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

**ALTERAÇÕES NO CÉREBRO E NO VENTRÍCULO DE
ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS AO IMIDACLOPRIDO**

ALINE FERNANDA CATAE

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

Julho - 2016

ALINE FERNANDA CATAE

**ALTERAÇÕES NO CÉREBRO E NO VENTRÍCULO DE
ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS AO IMIDACLOPRIDO**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-Orientadora: Dra. Thaisa Cristina Roat

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

Rio Claro

2016

595.799 Catae, Aline Fernanda
C357a Alterações no cérebro e no ventrículo de abelhas *Apis mellifera* expostas ao imidacloprido / Aline Fernanda Catae. - Rio Claro, 2016
86 f. : il., figs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientador: Thaisa Cristina Roat

1. Abelhas. 2. Toxicidade. 3. Ultraestrutura. 4. MALDI-Imaging. 5. Inseticida. 6. Espectrometria. 7. Proteína.
I. Título.

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



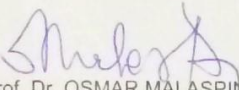
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

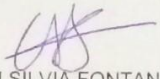
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ALTERAÇÕES NO CÉREBRO E NO VENTRÍCULO DE ABELHAS
Apis mellifera EXPOSTAS AO IMIDACLOPRIDO

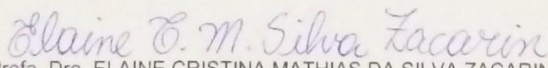
AUTORA: ALINE FERNANDA CATAE

ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

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


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / IB Rio Claro


Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 25 de julho de 2016

Agradecimentos

Início os agradecimentos pela minha família, que sempre esteve presente em todos os momentos, me apoiando e me dando forças para enfrentar todos os desafios e seguir em frente em busca dos meus objetivos. Agradeço especialmente aos meus pais, Eliana e Carlos, que com muito amor e esforço, batalharam ao longo de todos esses anos para que os meus sonhos pudessem ser alcançados; e ao meu irmão Eduardo, pelo apoio em todas as fases de minha vida.

Ao Murilo, meu porto seguro e abrigo, meu melhor amigo e meu amor. Por me ajudar em todos os momentos, por me fazer acreditar que as coisas dariam certo e por tornar meus dias mais felizes.

Ao CEIS e ao Departamento de Biologia pelo suporte oferecido e extremamente importante para a realização desse trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro à pesquisa (Nº Processos: 2014/14070-3; 2012/13370-8; 2012/50197-2).

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela orientação desde o meu primeiro ano de faculdade, quando eu ainda dava os meus primeiros passos na ciência. Tenho muito orgulho de poder trabalhar ao seu lado, e agradeço pelos ensinamentos e pelas oportunidades ao longo de todos esses anos (e já são 7 anos!).

À Thaisa Cristina Roat, minha co-orientadora e muito mais do que isso! Não tenho nem palavras para descrever o quanto você foi importante nessa minha trajetória, me apoiando em todos os momentos, acreditando e confiando em mim, me ensinando diariamente. Você é muito especial e um grande exemplo pra mim! Obrigada por tudo!

À Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, que também me acompanha desde o início e está sempre por perto disposta a me ajudar, dar conselhos e discutir resultados. Você foi fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui!

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, em especial ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma pela colaboração e auxílio com a técnica do MALDI. Agradeço também ao Marcel Pratavieira e à Anally Menegasso por toda a disponibilidade e ajuda. Sem vocês a realização desta pesquisa não teria sido possível.

Ao pessoal do LECA, em especial à Pamela, Pri Friol, Hellen, Tati, Jéssica, Adna, Ana, Lucas, Patrícia, Isabella, Gabi, Elisangela, Daiana e Pri Socolowski, pela amizade e companheirismo. É muito bom poder trabalhar com vocês!!

Ao Antônio Sérgio Pascon, fundamental para a realização dos experimentos. Sei que não deve ser fácil nos aguentar com tantas coletas imensas e de última hora, por isso, muito obrigada! Agradeço também aos técnicos: Gérson Mello Souza, Antônio Yabuki e Mônica Iamonte por todo apoio e auxílio.

À Necis Miranda de Lima, sempre super eficiente, atenciosa e disposta a me ajudar.

Agradeço também ao pessoal do CBI 2009 principalmente à Elen e Lais por serem amigas tão especiais e presentes até hoje em minha vida.

Às minhas amigas queridas Livinha e Bruna, por estarem sempre por perto, torcendo por mim, ouvindo meus desabafos e angústias e comemorando minhas vitórias.

Agradeço a Deus por me dar forças e por permitir que eu realizasse mais esse sonho.

RESUMO GERAL

As abelhas *Apis mellifera* se destacam expressivamente no contexto econômico e ecológico pelos produtos apícolas fornecidos como própolis, geleia real, mel, cera e apitoxina, e pela extrema importância que o processo de polinização representa para o equilíbrio dos ecossistemas. Estudos atuais indicam que algumas substâncias sintéticas, utilizadas no controle de pragas na agricultura, podem estar envolvidas em casos de intoxicação de abelhas. Os efeitos desses produtos podem não ser imediatamente notados, mas podem causar sérios efeitos fisiológicos e comportamentais que acabam por comprometer a viabilidade da colônia, de uma maneira geral. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos principais: avaliar a toxicidade oral do imidacloprido para *A. mellifera* por meio da determinação da concentração letal média (CL_{50}), e analisar os efeitos de uma concentração subletal ($CL_{50/100}$) no intestino e no cérebro por meio de microscopia eletrônica de transmissão, bem como na distribuição de proteínas no cérebro, por meio da técnica do MALDI-Imaging. O valor da CL_{50} estabelecido foi de 1,4651 ng imidacloprido/ μ L de dieta. A exposição à $CL_{50/100}$ (0,0146 ng imidacloprido/ μ L alimento) causou alterações bastante significativas nas células do ventrículo, principalmente a partir do quarto dia de exposição, como redução do tamanho do núcleo, condensação cromatínica, alterações mitocondriais e aumento de vacúolos digestivos e citoplasmáticos. No cérebro, destacaram-se os danos mitocondriais, espaçamento entre as células, núcleos irregulares e dilatação do espaço perinuclear. Essa concentração subletal afetou também a distribuição espacial de diversas proteínas no cérebro de abelhas, envolvidas principalmente com processos de sinapses, suprimento de oxigênio, estresse químico e oxidativo, degeneração neuronal e aprendizado e memória, demonstrando que esse inseticida causa alterações bioquímicas que podem inviabilizar funções neuronais importantes.

Palavras-chave: Inseticida. Toxicidade. Ultraestrutura. Espectrometria. Proteína.

ABSTRACT

The bees *Apis mellifera* stand out significantly in the economic and ecological context for products supplied as propolis, royal jelly, honey, beeswax and venom, and because the extreme importance that the pollination process is for the equilibrium of ecosystems. Current studies indicate that some synthetic substances used to control pests in agriculture may be involved in cases of intoxication of bees. The effects of these products may not be immediately noticeable, but they can cause serious physiological and behavioral effects that can compromise the viability of the colony. Given the above, this work had as main objectives: to evaluate the oral toxicity of imidacloprid to *A. mellifera* through the determination of the lethal concentration (LC_{50}), and analyse the effects of a sublethal concentration ($LC_{50/100}$) in the midgut and brain through transmission electron microscopy as well as the distribution of proteins in the brain, by MALDI-Imaging technique. The LC_{50} value established to imidacloprid was 1.4651 ng/ μ L diet. The exposure to $LC_{50/100}$ (0.0146 ng imidacloprid/ μ L diet) caused quite significant alterations in ventricular cells, especially after the fourth day of exposure, such as reduction of the size of the nucleus, chromatin condensation, mitochondrial alterations and increased of digestive and cytoplasmic vacuoles. In the brain, it was possible to observe mitochondrial damages, spacing among cells, irregular nuclei and dilation in the perinuclear space. This sublethal concentration also affected the spatial distribution of several proteins in the brains of bees, mainly involved in synapse processes, oxygen supply, chemical and oxidative stress, neuronal degeneration, learning and memory, demonstrating that this insecticide cause biochemical changes that can derail important neuronal functions.

Keywords: Insecticide. Toxicity. Ultrastructure. Spectrometry. Proteins.

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 OBJETIVOS	13
3 CAPÍTULO 1.....	14
3.1 RESUMO	15
3.2 INTRODUÇÃO	16
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	18
3.3.2 COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS ABELHAS	18
3.3.3 EXPOSIÇÃO CONTÍNUA À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DO IMIDACLOPRIDO.....	19
3.3.4 BIOENSAIOS DE INTOXICAÇÃO DAS ABELHAS	20
3.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	20
3.4 RESULTADOS	21
3.4.1 TOXICIDADE AGUDA	21
3.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	22
3.4.2.1 VENTRÍCULO	22
3.4.2.2 CÉREBRO: CÉLULAS DE KENYON DOS CORPOS PEDUNCULADOS	25
3.5 DISCUSSÃO	28
3.6 REFERÊNCIAS	32
4 CAPÍTULO 2.....	35
4.1 RESUMO	36
4.2 INTRODUÇÃO	37
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.3.1 EXPOSIÇÃO CONTÍNUA A CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE IMIDACLOPRIDO	39
4.3.2 TÉCNICA DE IMAGEAMENTO QUÍMICO (MALDI-IMAGING)	40
4.3.3 IDENTIFICAÇÕES DE PROTEÍNAS	42
4.3.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE IMAGEAMENTO ESPECTRAL	42
4.3.5 ANÁLISE DAS IMAGENS – CRIAÇÃO DE MAPAS DE CONTORNOS.....	43
4.4 RESULTADOS	45
4.5 DISCUSSÃO	61
4.6 REFERÊNCIAS	71
5 DISCUSSÃO GERAL	79
6 CONCLUSÕES GERAIS	81
7 REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO GERAL

A abelha *A. mellifera* africanizada, introduzida no Brasil em 1839, é resultante de um cruzamento entre *Apis mellifera scutellata* (originária da África), *Apis mellifera mellifera* (originária do norte da Europa), *Apis mellifera ligustica* (originária da Itália e norte da Iugoslávia) e *Apis mellifera iberica* (provinda da Europa Ocidental) (RUTTNER, 1988).

Essa espécie é hoje, uma das mais estudadas, possuindo grande importância econômica pelo fornecimento de produtos apícolas de alto valor agregado tais como, própolis, geleia real, mel, cera e apitoxina (CARVALHO; MARCHINI; ROS, 1999; KEVAN, 1999). Elas se destacam também por sua importância cultural através dos produtos oferecidos com finalidades alimentícia, religiosa, cosmética e medicinal (COSTA-NETO, 1998; RODRIGUES, 2006).

As abelhas africanizadas apresentam maior eficiência na coleta de alimentos, maior produtividade de mel, maior eficiência na transmissão de informações e comportamento de forrageamento mais longo durante o dia, quando comparadas às abelhas europeias (KERR et al., 1970; MALASPINA, STORT, 1987).

Por utilizarem os recursos florais, especialmente néctar e pólen, como fonte de alimento e energia, as abelhas são extremamente importantes para o processo de polinização de áreas nativas e cultivadas (KEARNS; INOUE, 1997; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A polinização é um processo essencial para a reprodução cruzada e consequente manutenção da diversidade nas plantas, aumentando desta maneira, a produtividade de culturas importantes para a alimentação (EARDLEY et al., 2006; KLEIN et al., 2007).

Uma pesquisa desenvolvida pela FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) (2015) mostra a eficácia do uso de abelhas no processo de polinização em sete países. No Brasil, as culturas de algodão e tomate foram as que apresentaram suas produtividades aumentadas significativamente pela visita das abelhas.

Alguns registros mostram que 73% das espécies vegetais de interesse agrícola mundial são polinizadas pelas abelhas, 19% por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por aves e 4% por borboletas e mariposas (FAO, 2004).

Fatores como ampla extensão territorial, variabilidade climática e de flora fazem do Brasil um país de destaque no cenário agrícola, já que, diferentemente dos demais países, as colheitas ocorrem ao longo de praticamente o ano todo (MARCHINI; SODRÉ; MORETI, 2004).

As áreas contínuas cultivadas vêm sendo ampliadas a cada dia em busca do aumento na produção agrícola e este crescimento da agricultura tornou-se cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos para a eliminação de pragas agrícolas. Como resultado, o consumo anual de inseticidas no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas. Expresso em quantidade de ingrediente ativo, é consumido anualmente no país cerca de 130 mil toneladas, representando um aumento no consumo de inseticidas de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (SPADOTTO et al., 2004).

O Brasil começou a utilizar os agrotóxicos em grande escala a partir dos anos 70, não havendo neste período, maiores preocupações relacionadas ao seu emprego (EMBRAPA, 2014). Seu uso, nos últimos anos, aumentou de forma expressiva. No cenário mundial, o crescimento desse mercado foi de 93%, enquanto que no Brasil, é estimado um aumento de 190% (CARNEIRO et al., 2012). O consumo na safra de 2010/2011 foi de 936 mil toneladas, movimentando desta maneira, 8,5 bilhões de dólares entre dez empresas líderes desse segmento no país (ANVISA, 2013). Este uso de inseticidas vem provocando diversos impactos sobre o ambiente, gerando resíduos no solo, na água, no ar e nas plantas (FERNÁNDEZ et al., 2001).

O fenômeno conhecido como “Colony Collapse Disorder” (CCD) vem sendo alvo de inúmeros trabalhos, pois dados apontados por apicultores indicam perda de até 75% das

colônias de *A. mellifera* (STOKSTAD, 2007; NEUMANN; CARRECK, 2010). Um dos fatores mais apontados como provável causador do CCD relatado por apicultores é o uso indiscriminado de agrotóxicos (CHAUZAT et al., 2006; HO; CUMMINS, 2007; OLDROYD, 2007; YANG et al., 2008).

O sumiço de abelhas é um motivo de preocupação também no Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Este fenômeno pode estar relacionado com infecções por protozoários ou fungos e com o intenso uso de inseticidas nas plantações (GUIMARÃES, 2007; WESTIN, 2007).

Muitos relatos de apicultores alertam sobre a mortalidade de abelhas. No interior de São Paulo, por exemplo, diversas cidades já apresentam tal problema, como Araras, Boa Esperança do Sul, Brotas, Mogi Mirim, Piracicaba, Pirassununga, Rio Claro, Santa Rita do Passa Quatro, São Carlos e Tabatinga (MALASPINA; SOUZA, 2008).

O desmatamento dos habitats naturais das abelhas faz com que essas ampliem suas atividades de forrageamento para áreas agrícolas, o que resulta numa maior exposição aos inseticidas utilizados nas culturas para o controle de insetos-praga (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006). Além disso, a deriva ocasionada pelas correntes de vento, que pode levar os agrotóxicos para apiários, meliponários ou colônias silvestres próximos aos locais de aplicação desses compostos, é um fator preocupante para as abelhas (KERR et al., 2001).

A EMBRAPA realizou estudos que mostram o alto risco da pulverização aérea, já que esse procedimento é responsável por deixar 32% dos agrotóxicos pulverizados retidos nas plantas, 49% no solo, sendo que 19% sofrem deriva para outras áreas nos arredores do local alvo da aplicação (CHAIM, 2004).

Diversos agrotóxicos possuem ação sistêmica, tendo a capacidade de se translocar através da seiva de uma parte da planta para outra, podendo ser detectado em todos os tecidos vegetais (MARICONI, 1983; SCHMUCK et al., 2001; GALLO et al., 2002; BONMATIN et

al., 2003). Com base nisto, uma forma de contaminação das abelhas se dá através da presença de ingredientes ativos e de seus metabólitos no pólen e no néctar (SCHMUCK; NAUEN; EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2003; RORTAIS et al., 2005)

As abelhas campeiras, apesar de estarem em contato direto com a área externa à colônia, não são as únicas a se exporem aos inseticidas. Os indivíduos que desenvolvem suas atividades dentro da colmeia, como as larvas, também podem se contaminar ao entrarem em contato com pólen e néctar contaminados com agrotóxicos (RORTAIS et al., 2005).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas, em muitos casos, não são imediatos, já que pequenas doses podem não causar a morte das abelhas, entretanto, podem resultar em mudanças fisiológicas e comportamentais, tais como, desorientação e diminuição da atividade de forrageamento (GUEZ; ZHANG; SRINIVASAN, et al., 2005; van ENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Os inseticidas neonicotinoides são neurotóxicos e se destacam dentre os diversos grupos de inseticidas, por serem muito utilizados para o controle de pragas (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; ELBERT et al., 2008). Essa classe de inseticidas substituiu os compostos organofosforados e metilcarbamatos, que tiveram seu uso restrito devido à toxicidade em mamíferos e pela diminuição da eficiência dos mesmos no controle de pragas agrícolas (TOMIZAWA; CASIDA, 2003).

Os neonicotinoides são agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (nAChRs), agindo principalmente nas subunidades α do receptor (BUCKINGHAM et al., 1997), localizados nos neurônios pós-sinápticos (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL; DEBRAUWER; BELZUNCES, et al., 2004). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esse composto não é degradado imediatamente, portanto, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua e levam a hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (GALLO et al., 2002). A afinidade entre os

receptores colinérgicos e os neonicotinoides é relativamente maior em insetos do que em mamíferos, tornando-os mais tóxicos para o primeiro grupo (CARVALHO, 2008).

Os mais relevantes inseticidas dessa classe são o acetamiprido, o tiametoxam e o imidacloprido (YAMAMOTO; CASIDA, 1999; NAUEN; BRETSCHNEIDER, 2002; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). O imidacloprido é amplamente utilizado no Brasil para o controle de pragas aéreas e do solo das culturas de cana-de-açúcar, algodão, café e citrus. Este inseticida, que é conhecido comercialmente como Confidor, Connect, Cropstar, Evidence, Gaucho, Kohinor, Premier, Provado, Warrant e Winner (BRASIL, 2008), é bastante utilizado no tratamento de sementes, do solo e de plantações, matando os insetos via ingestão ou contato. Apresenta alta tendência de sofrer lixiviação e dissipação no ambiente devido sua baixa adsorção em matéria orgânica do solo e elevada suscetibilidade em água (FOSSEN, 2006). A olefina e o 5-hidroxiimidaclopride são alguns dos metabólitos resultantes da degradação desse composto na planta, sendo estes, tóxicos ao sistema nervoso dos insetos (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES et al., 2001).

Seu uso, desde a sua introdução em meados dos anos 90, tem aumentado consideravelmente, sendo considerado atualmente, o inseticida possivelmente mais usado no controle de pragas e doenças agrícolas (FREITAS; PINHEIRO, 2010; BLACQUIÈRE et al., 2012).

2 OBJETIVOS

Com base no exposto acerca do uso cada vez mais frequente e abundante de inseticidas no cenário agrícola do Brasil e do mundo, e considerando seus efeitos nas abelhas, insetos indispensáveis nos processos de polinização, este trabalho teve como objetivos principais:

- avaliar a toxicidade oral do imidacloprido para abelhas *A. mellifera* africanizada, por meio da determinação da concentração letal média (CL₅₀);
- analisar, após a exposição oral pela concentração subletal (CL_{50/100}) do imidacloprido, as possíveis alterações ultraestruturais nos corpos pedunculados e no ventrículo dessas abelhas;
- analisar as possíveis alterações na distribuição de proteínas específicas no cérebro de abelhas expostas a concentração subletal do imidacloprido (CL_{50/100}), por meio da técnica do MALDI-Imaging.

3 CAPÍTULO 1

TOXICIDADE ORAL DO IMIDACLOPRIDO PARA ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*) E EFEITOS DE CONCENTRAÇÃO SUBLETAL NO INTESTINO E NO CÉREBRO

Aline Fernanda Catae, Thaisa Cristina Roat, Osmar Malaspina

UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) - Rio Claro, São Paulo.

3.1 RESUMO

No Brasil, o uso de inseticidas vem sendo cada vez mais frequente, e estudos indicam que esses compostos estão envolvidos com casos de intoxicação de abelhas. O imidacloprido é um neonicotinoide, com ação neurotóxica, amplamente empregado em culturas de café, citrus, algodão e cana-de-açúcar, que são visitadas pelas abelhas melíferas. Diante destas considerações, destaca-se a importância de se avaliar a toxicidade oral do imidacloprido para as abelhas africanizadas e de se investigar os efeitos subletais causados por esse inseticida no cérebro, órgão alvo do imidacloprido, e no ventrículo, responsável pela digestão e absorção de alimento, por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Foram efetuados então, bioensaios para a determinação da CL_{50} após 24 horas. O valor obtido foi de 1,4651 ng imidacloprido/ μ L de dieta. Com base nesse resultado, foi estabelecida a $CL_{50/100}$ (0,0146 ng imidacloprido/ μ L alimento) para ser administrada via oral durante 1, 4 e 8 dias. Os resultados obtidos a partir da análise ultraestrutural mostraram alterações nas células do ventrículo de *A. mellifera*, principalmente após o quarto dia de exposição, causando danos nucleares, mitocondriais e aumento de vacúolos citoplasmáticos e digestivos. No cérebro, o inseticida causou espaçamento entre as células de Kenyon, compactação e marginalização cromatínica, dilatação de espaço perinuclear e perda de cristas mitocondriais. Essas alterações demonstram assim, que o imidacloprido pode comprometer a viabilidade do epitélio intestinal, bem como, processos cognitivos importantes nos indivíduos, podendo refletir assim, em prejuízos na colônia.

Palavras-chave: Neonicotinoide. Concentração letal média. Intoxicação. Ultraestrutura.

3.2 INTRODUÇÃO

Os himenópteros constituem a ordem mais estudada e conhecida, destacando-se como importantes agentes polinizadores de inúmeras espécies de plantas (PERCIVAL, 1965; AMARAL; ALVES, 1979; CREPET, 1983; LENZI et al., 2003). Dentro deste contexto, as abelhas representam os visitantes florais mais eficazes dentre os polinizadores conhecidos (MICHENER, 1954; FRIEDMAN; SHMIDA, 1995; GRISWOLD et al., 1995; WILMS et al., 1997).

Estima-se que 90% das plantas frutíferas dependem diretamente da polinização realizada por estes insetos para o seu sucesso reprodutivo. De um total de 170 mil espécies vegetais que necessitam das abelhas para a polinização, 40 mil são especificamente dependentes das abelhas *A. mellifera* (TAUTZ, 2008). Dados divulgados na reunião da Plataforma Intergovernamental sobre Biodiversidade e Serviços de Ecossistêmicos (IPBES), na Turquia em 2013, estimam que pelo menos três quartos das culturas no mundo dependem da polinização realizada por abelhas e outros agentes polinizadores (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

As abelhas, entretanto, são consideradas insetos vulneráveis aos agrotóxicos aplicados em culturas agrícolas para o controle de pragas, pois seu genoma apresenta uma deficiência no número de genes decodificando enzimas capazes de metabolizar tais produtos, quando comparados a outros insetos (CLAUDIANOS et al., 2006).

Dentre os inseticidas mais utilizados na atualidade, os neonicotinoides possuem considerável representatividade. O fato de apresentarem uma variabilidade relativamente grande de aplicação e efeito residual prolongado tornam esses produtos, ferramentas bastante úteis para a agricultura moderna (ELBERT et al., 2008). Estes inseticidas atuam

principalmente no sistema nervoso dos insetos, agindo como agonistas da acetilcolina (SUCHAIL; DEBRAUWER; BELZUNCES, 2004).

O sistema nervoso dos insetos é formado por um cérebro e um cordão nervoso ventral (CRUZ-LANDIM, 2009), sendo organizado em sistema nervoso central e periférico. Três regiões principais constituem o cérebro das abelhas: o protocérebro, o deutocérebro, e o tritocérebro. No protocérebro localizam-se os corpos pedunculados, que estão diretamente relacionados à aprendizagem e memória (DALY et al., 1998), despertando bastante interesse em pesquisas. Eles são constituídos de numerosos neurônios (células de Kenyon) que formam os cálices, com seus dendritos e o pedúnculo e os lobos (α , β e γ) com seus axônios (FAHRBACH, 2006; MOBBS, 1985).

O imidacloprido é um inseticida que possui ação sistêmica, podendo contaminar pólen e néctar (ELBERT et al., 2008) e atingir as abelhas através da alimentação. Portanto, é importante analisar a citotoxicidade deste composto em órgãos envolvidos no metabolismo de alimentos contaminados com o inseticida. Um órgão importante para a análise de toxicidade é o intestino, já que o trato digestório é o primeiro local de contato com o inseticida via oral.

Em abelhas, o tubo digestório é dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (SNODGRASS, 1956). O intestino médio, ou ventrículo, é um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco no interior da cavidade abdominal, sendo considerado o estômago funcional dos insetos, já que a maior parte da digestão e absorção ocorre nesta região (CRUZ-LANDIM, 2009; ZERBO, 2003).

O ventrículo das abelhas é constituído principalmente de dois tipos celulares: as células principais ou digestivas responsáveis pela síntese de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, e as células regenerativas, que aparecem agrupadas em ninhos, e substituem as células principais quando estas são eliminadas por desgaste (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996).

Assim os objetivos deste trabalho foram avaliar a citotoxicidade do imidacloprido para as células de Kenyon dos corpos pedunculados e para as células do ventrículo de abelhas expostas a uma concentração subletal deste inseticida ($CL_{50/100}$), através de análises ultraestruturais.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material biológico

Em todos os experimentos, foram utilizadas abelhas *A. mellifera* oriundas de colmeias presentes no apiário do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro. Foram verificadas as condições de saúde das colônias com base nas diretrizes para avaliações de xenobióticos em abelhas (OECD, 1998).

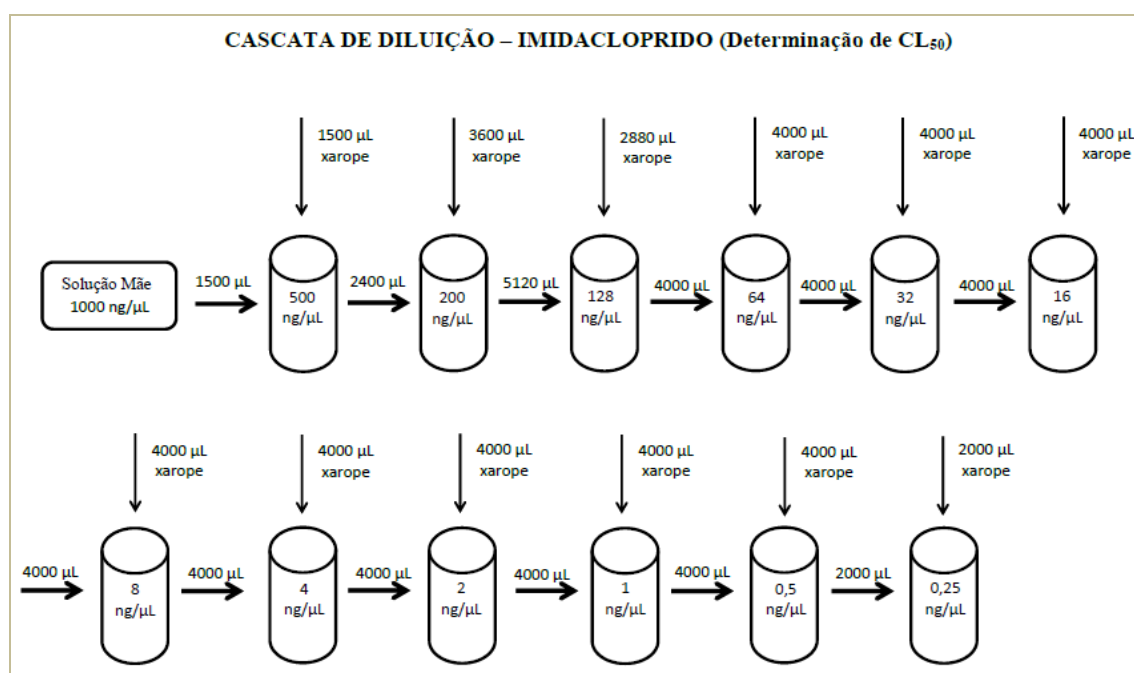
3.3.2 Coleta e acondicionamento das abelhas

Operárias campeiras foram coletadas diretamente da entrada de três colônias diferentes, acondicionadas em potes descartáveis plásticos (250 mL) previamente forrados com papel-filtro e furados nas laterais, totalizando 20 indivíduos por pote. Todos os grupos experimentais foram montados com indivíduos das três colônias, cada pote contendo abelhas de uma única colônia, totalizando 60 abelhas por grupo experimental. Em todos os casos, os alimentos foram fornecidos *ad libitum* em tubos tipo “eppendorf” (1,5 mL) com as laterais furadas. Em todos os experimentos, os potes foram mantidos em estufa do tipo BOD à temperatura de $32 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. Os bioensaios foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP – Rio Claro.

3.3.3 Exposição contínua à concentração subletal do imidacloprido

Os procedimentos para a determinação da CL_{50} via oral basearam-se no protocolo da OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (1998). O grupo controle recebeu dieta composta de xarope a 50%. O inseticida imidacloprido (Imidacloprid Pestanal da empresa Sigma-Aldrich, Brasil) foi diluído em acetona (15%) e água e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento para atingir as concentrações a serem oferecidas às abelhas (0,25 ng ingrediente ativo/ μ L dieta, 0,5 ng i.a./ μ L dieta, 1 ng i.a./ μ L dieta, 2 ng i.a./ μ L dieta, 4 ng i.a./ μ L dieta, 8 ng i.a./ μ L dieta, 16 ng i.a./ μ L dieta, 32 ng i.a./ μ L dieta e 64 ng i.a./ μ L dieta) (Fig. 1). Cada grupo experimental recebeu somente o respectivo tipo de dieta ao longo de todos os dias do experimento, havendo o preenchimento diário dos alimentadores. A mortalidade dos indivíduos foi registrada 24 horas após o oferecimento do alimento e submetida à análise probit do software BioStat 2009 (Analystsoft), pelo método de Finney (distribuição log-normal).

Figura 1: Cascata de Diluição utilizada para a determinação da CL_{50} do imidacloprido



Fonte: Elaborado pela autora

3.3.4 Bioensaios de intoxicação das abelhas

Com base no ensaio de toxicidade (determinação da CL_{50}) foi estabelecida a concentração subletal de imidacloprido para ser adicionada à dieta do grupo exposto ao inseticida. Neste alimento foi adicionada uma solução acetônica (15%) de imidacloprido de modo que o alimento tivesse concentração final proporcional à concentração subletal 100 vezes inferior a CL_{50} ($CL_{50/100}$: 0,014651 ng imidacloprido/ μ L de alimento). O grupo controle recebeu uma dieta composta de solução aquosa de sacarose a 50%. Cada um dos dois grupos experimentais recebeu somente o respectivo tipo de dieta ao longo de todos os dias do experimento, havendo o preenchimento diário dos alimentadores.

A coleta dos espécimes para os estudos de alterações ultraestruturais no ventrículo e cérebro foi baseada no período de exposição das abelhas ao imidacloprido, sendo ele 1, 4 e 8 dias após o início do fornecimento do alimento contaminado, para que os efeitos imediatos e em longo prazo do imidacloprido fossem investigados.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para cada grupo experimental, 6 abelhas foram dissecadas em placas de Petri no estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a obtenção dos cérebros e dos ventrículos. Durante a dissecação, os materiais foram pré-fixados na solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4). Foi realizada lavagem em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4) e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas.

Em seguida, foram efetuadas duas lavagens de 5 minutos, do material em tampão cacodilato, e este foi contrastado em acetato de uranila 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 horas, em temperatura ambiente. O material foi então desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de álcool (70% a 100%), 15 minutos cada, e assim, embebido em resina Epon-Araldite por 24 h e polimerizado em resina mais catalizador, a 60°C.

Foi realizada a secção do material em cortes semi-finos com cerca de 10 µm de espessura. Estes cortes foram corados com o Azul de Toluidina. As secções ultrafinas, com aproximadamente 2 µm de espessura foram obtidas a partir do ultramicrotomo Supernova (Reichert) e coletadas em grades de cobre e contrastadas com solução saturada de acetato de uranila 2% em álcool e citrato de chumbo 0,4%. Os cérebros e os ventrículos foram analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL-JEM1011), no NAP/MEPA - Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Piracicaba.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Toxicidade aguda

Com base nos ensaios de toxicidade, o valor de CL_{50} determinado foi de 1,4651 ng imidacloprido/µL de dieta, sendo os limites inferiores e superiores 1,0203 e 2,0073 ng imidacloprido/µL de dieta, respectivamente (Tabela 1). A partir desse valor, foi calculada a concentração subletal correspondente a $CL_{50/100}$, obtendo-se dessa forma o valor de 0,014651 ng imidacloprido/µL de alimento, que foi utilizado nos bioensaios de contaminação das abelhas para análise das possíveis alterações ultraestruturais nas células do ventrículo e do cérebro.

Tabela 1: Toxicidade oral (24 h) do inseticida imidacloprido para abelhas *A. mellifera*

Modo de Exposição	Tempo (horas)	CL_{50}	$IC^{95\%}$	χ^2	G.L.
Ingestão (ng i.a./µL dieta)	24	1,4651	1,0203 – 2,0073	3,7848	7

(CL_{50}) concentração letal média; ($IC^{95\%}$) intervalo de confiança 95%; (χ^2) qui-quadrado e (G.L.) grau de liberdade

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.4.2.1 Ventrículo

As análises do ventrículo mostraram que as células digestivas dos diferentes grupos controles mostraram características ultraestruturais típicas (Figs. 2A, 2D e 2G), com núcleos de formato regular e envoltórios com poucas sinuosidades e sem dilatações na região perinuclear (Figs. 2B, 2E e 2H). As mitocôndrias apresentaram membranas duplas e cristas evidentes (Figs. 2C, 2F e 2I).

A análise ultraestrutural do grupo exposto à CL_{50/100} do imidacloprido no primeiro dia não mostrou alterações ultraestruturais nas células digestivas (Figs. 3A, 3B e 3C). No entanto, com 4 dias de exposição, as alterações decorrentes da ação do inseticida foram bastante significativas no núcleo celular. Grande parte dos núcleos analisados apresentaram regiões eletrólúcidas na matriz nuclear (Fig. 3D). Além disso, foi possível observar alguns núcleos em estágios avançados de degeneração, com tamanhos reduzidos e cromatina muito condensada (Fig. 3E). As mitocôndrias permaneceram com morfologia típica (Fig. 3F).

No oitavo dia de exposição, nota-se presença de grandes vacúolos no citoplasma das células (Fig. 3H), vacúolos digestivos (Fig. 3G) e mitocôndrias dilatadas, com perda de matriz, dupla membrana e cristas mitocondriais (Fig. 3I).

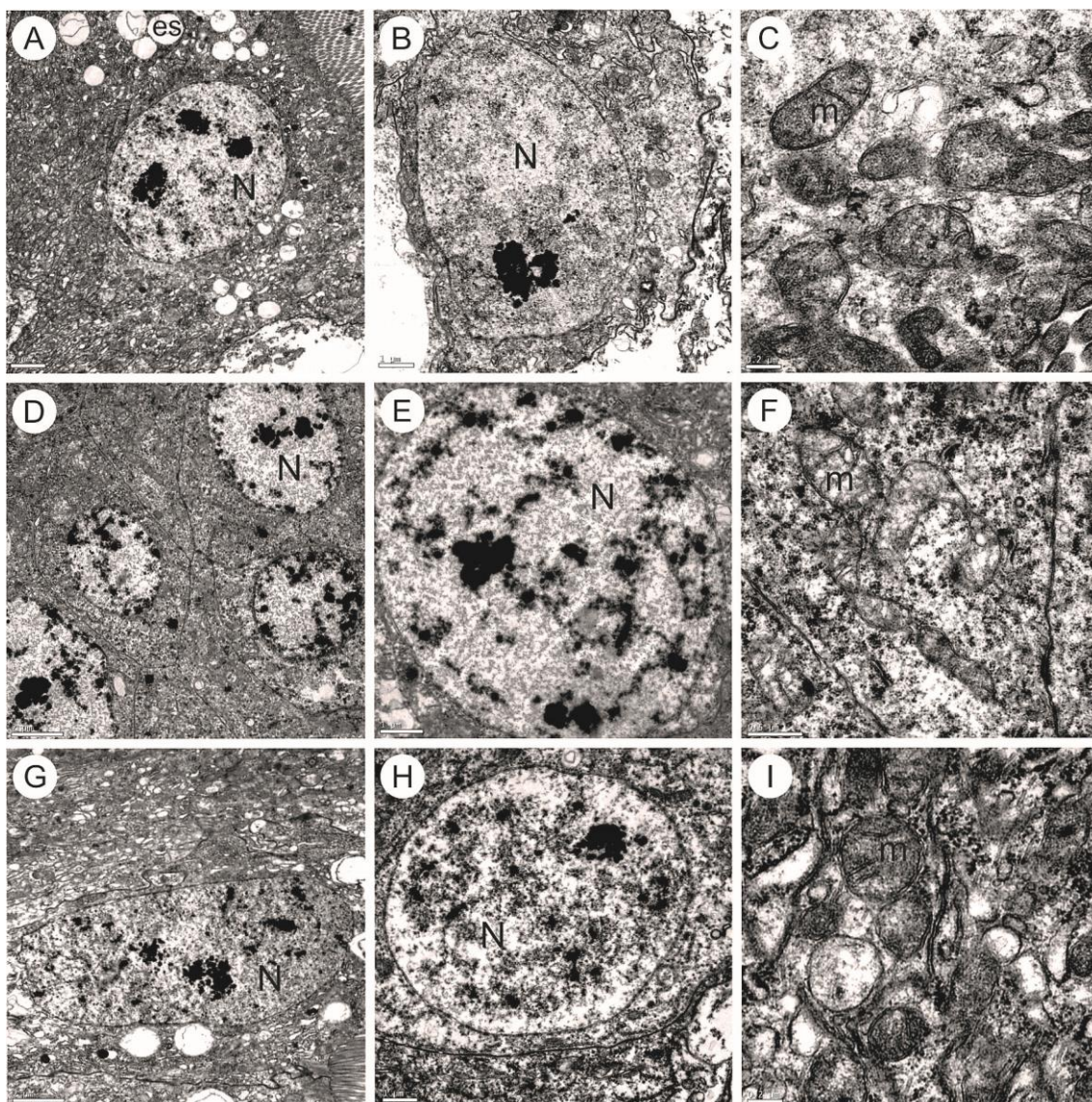


Figura 2. Eletromicrografias de transmissão das células do ventrículo de abelhas operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada, sem exposição ao imidacloprido. (A, B e C): Grupo controle 1 dia; (D, E e F): Grupo controle 4 dias; (G, H e I): Grupo controle 8 dias. N – núcleo, m - mitocôndria, es – esferocrystal. Obs.: Células preservadas, sem comprometimento de núcleo e organelas.

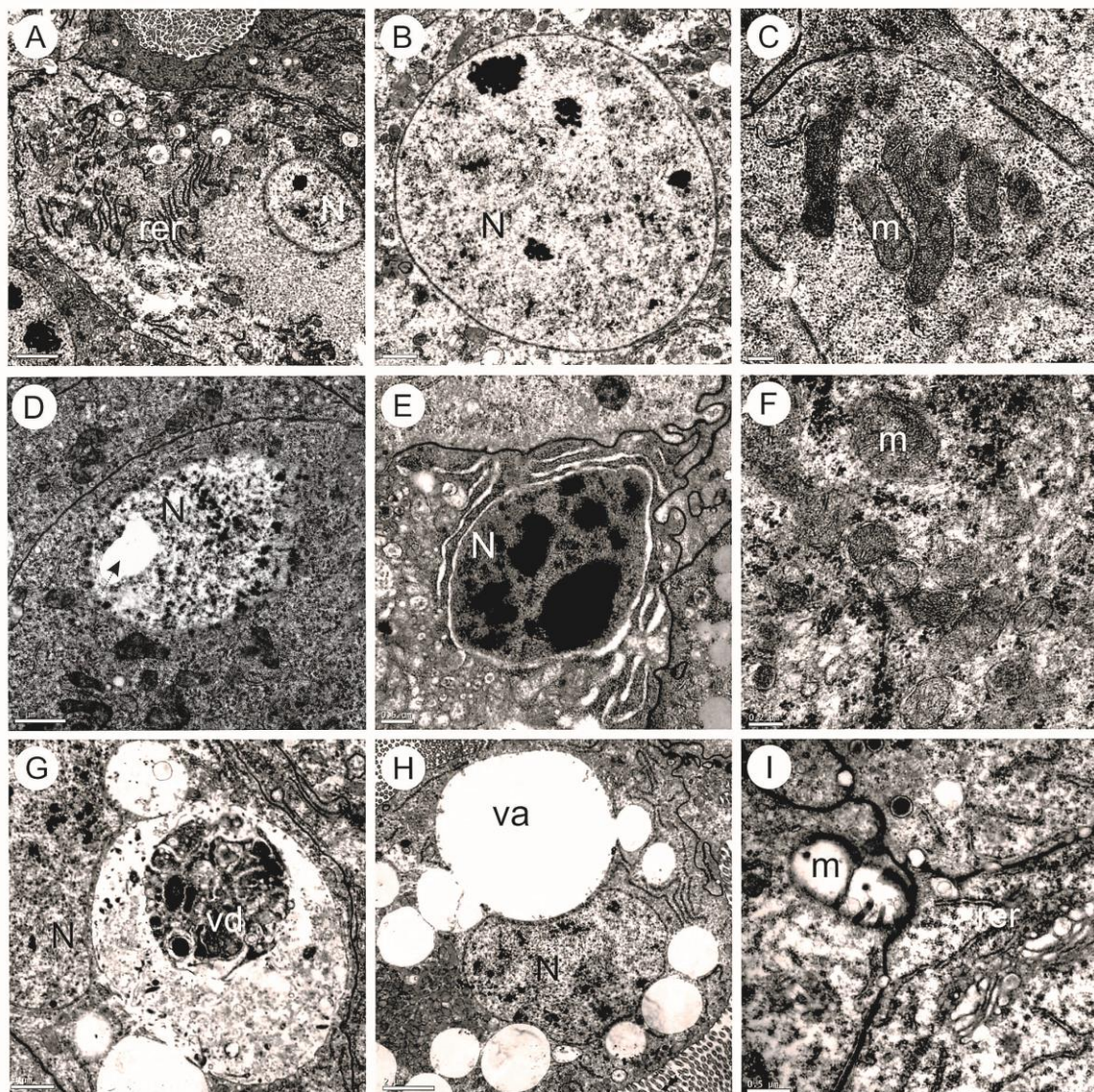


Figura 3. Eletromicrografias de transmissão das células do ventrículo de abelhas operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada com exposição ao imidacloprido. (A, B e C): Grupo exposto ao imidacloprido por 1 dia; (D, E e F): Grupo exposto ao imidacloprido por 4 dias; (G, H e I): Grupo exposto ao imidacloprido por 8 dias. N – núcleo, m - mitocôndria, rer – retículo endoplasmático rugoso, va – vacúolo de secreção, vd – vacúolo digestivo. Atentar para as regiões eletrólúcidas no núcleo indicadas pela seta tracejada.

3.4.2.2 Cérebro: células de kenyon dos corpos pedunculados

Nos grupos controles do primeiro, quarto e oitavo dia, as células apresentaram características ultraestruturais típicas: núcleos com formatos regulares e espaço perinuclear uniforme (Figs. 4B, 4E e 4H), citoplasma com organelas sem alterações (Figs. 4A, 4D e 4G), mitocôndrias evidentes com dupla membrana, cristas mitocondriais preservadas e matriz homogênea (Figs. 4C, 4F e 4I).

Na presença de inseticida, entretanto, foram observadas algumas alterações nessas células. No primeiro dia de exposição à $CL_{50/100}$ foi possível verificar alterações nas mitocôndrias, que se mostraram visivelmente dilatadas, com perda de eletrondensidade e cristas (Fig. 5C). Além disso, fagossomos também foram encontrados no citoplasma das células (Fig. 5C), indicando degradação e digestão de restos celulares. Os núcleos das células não apresentaram alterações evidentes (Figs. 5A e 5B).

Com 4 dias de exposição ao imidacloprido, as alterações celulares se mostraram mais evidentes. Além da compactação e marginalização cromatínica, alguns núcleos mostraram-se mais irregulares (Fig. 5E). O inseticida provocou também dilatações no espaço perinuclear (Fig. 5E) e danos bastante evidentes nas mitocôndrias (Fig. 5F). Uma característica observada exclusivamente nesse grupo foi um maior espaçamento entre as células de Kenyon no cérebro (Fig. 5D).

A análise ultraestrutural do cérebro das abelhas expostas ao inseticida por 8 dias evidenciou novamente alterações mitocondriais e presença de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 5I).

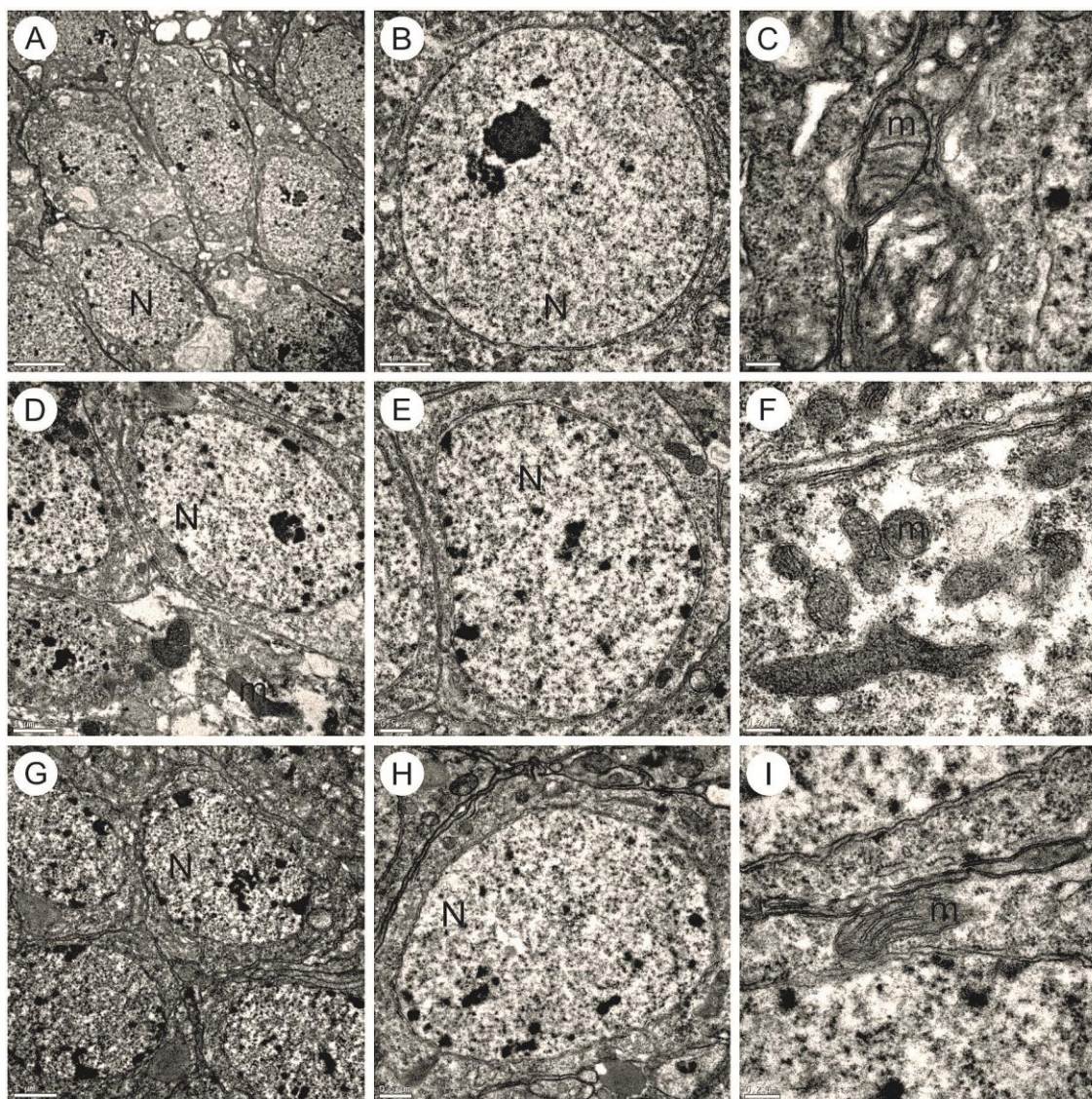


Figura 4. Eletromicrografias de transmissão das células de Kenyon do cérebro de abelhas operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada, sem exposição ao imidacloprido. (A, B e C): Grupo controle 1 dia; (D, E e F): Grupo controle 4 dias; (G, H e I): Grupo controle 8 dias. N – núcleo, m – mitocôndria. Obs.: Células preservadas, sem comprometimento de núcleo e organelas.

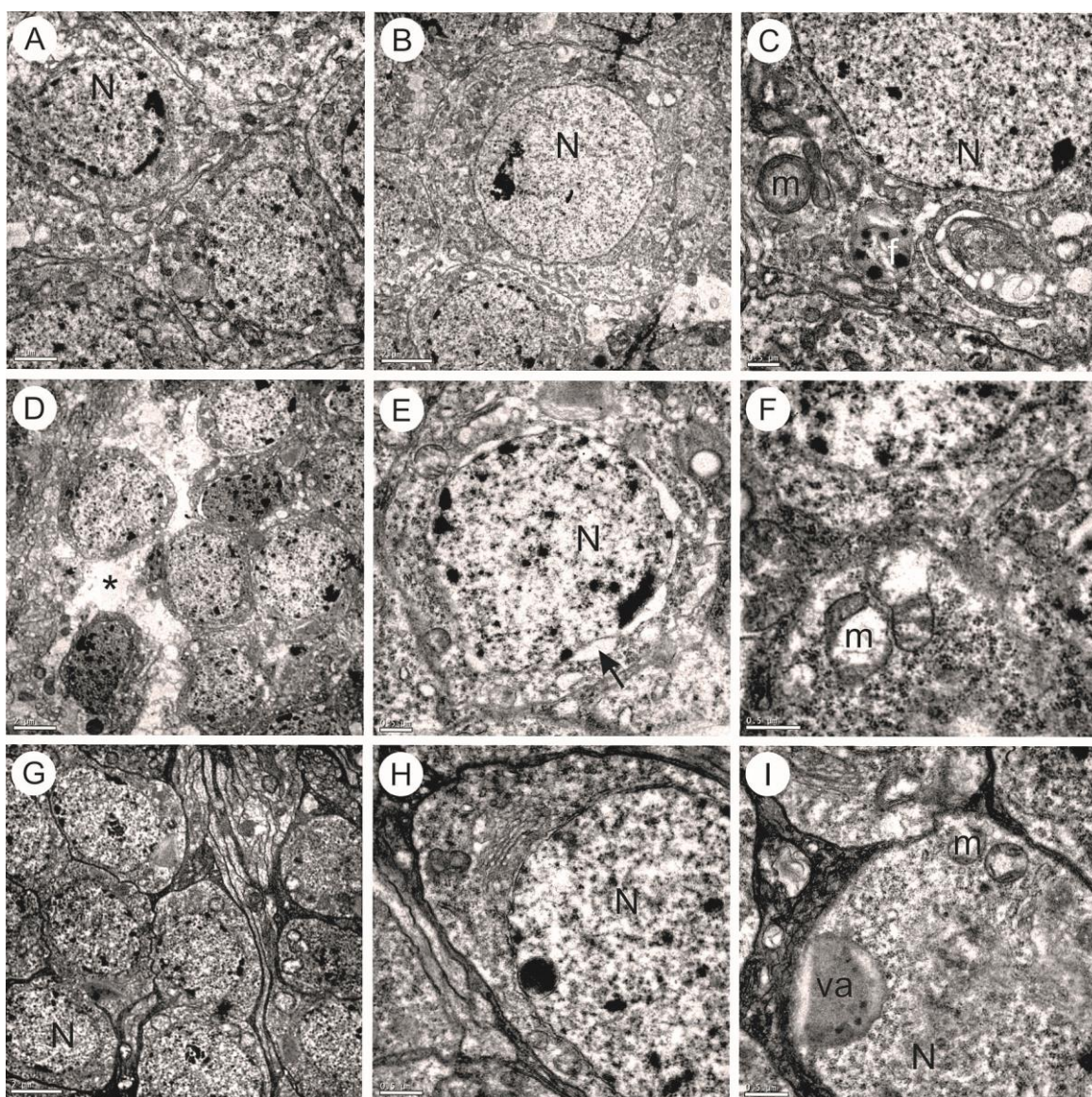


Figura 5. Eletromicrografias de transmissão das células de Kenyon do cérebro de abelhas operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada, com exposição ao imidacloprido. (A, B e C): Grupo exposto ao imidacloprido por 1 dia; (D, E e F): Grupo exposto ao imidacloprido por 4 dias; (G, H e I): Grupo exposto ao imidacloprido por 8 dias. N – núcleo, m – mitocôndria, vacúolo. Atentar para a os espaços entre as membranas do envoltório nuclear (seta) e para os espaços entre as células de Kenyon (asterisco).

3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que a CL_{50} (24 h) do imidacloprido para abelhas da espécie *A. mellifera* africanizada é de 1,4651 ng imidacloprido/ μ L de dieta. A avaliação da toxicidade dos inseticidas pode ser feita de duas maneiras: a partir de testes de determinação de dose ou de concentração letal (DL e CL). Quando a quantidade de inseticida utilizada é conhecida e entra em contato apenas uma vez com o indivíduo, utiliza-se o termo DL. Quando os indivíduos são expostos ao agente químico em uma determinada concentração por um período específico de tempo, o termo mais adequado é CL (CAMPOS; ANDRADE, 2001), o que seria o caso deste trabalho.

Os dados presentes na literatura são em sua maioria, referentes aos valores de DL_{50} . Estes trabalhos geralmente têm como principal objetivo verificar a toxicidade de determinado inseticida por um curto período de tempo (24 e 48h). No entanto, como o presente estudo visou analisar o efeito de uma exposição contínua à concentração subletal, o emprego da CL_{50} é o indicado. Alguns trabalhos também utilizaram a CL_{50} para avaliar a toxicidade do imidacloprido para outras espécies de abelhas. A CL_{50} deste inseticida foi estabelecida como sendo de 2,01 ng i.a./ μ L dieta, para 24 horas e 0,81 ng i.a./ μ L dieta, para 48 horas em abelhas *Melipona scutellaris* (COSTA, 2014). Com base nesses valores, percebe-se uma toxicidade semelhante desse inseticida tanto para as abelhas africanizadas como para as abelhas nativas.

Oliveira et al. (2013) avaliaram a toxicidade do tiametoxam, inseticida também pertencente à classe dos neonicotinóides e neurotóxico, com ação semelhante ao do imidacloprido, em abelhas *A. mellifera* e verificaram que a CL_{50} foi de 4.28 ng i.a./ μ L dieta. Dessa forma, o imidacloprido parece ser mais tóxico para essas abelhas do que o tiametoxam, por apresentar um valor de CL_{50} mais baixo, indicando que concentrações menores já causam danos na sobrevivência dos indivíduos.

Além de analisar a toxicidade oral do imidacloprido para abelhas campeiras de *A. mellifera*, o presente trabalho também visou estudar os possíveis efeitos deste inseticida no ventrículo e no cérebro através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Apesar de o imidacloprido ser um inseticida neurotóxico, atuando principalmente no cérebro, vale ressaltar a importância da análise de seus efeitos no intestino das abelhas, já que esse órgão representa uma das primeiras vias de contato com o inseticida, por meio da contaminação através do alimento.

Os resultados mostraram que a exposição ao inseticida por 1 dia não altera a ultraestrutura das células digestivas. No entanto, o imidacloprido se mostra citotóxico para as células digestivas de abelhas expostas por um período maior, alterando sua ultraestrutura. Assim, indivíduos expostos à $CL_{50/100}$ do imidacloprido por 4 dias apresentaram núcleos das células digestivas bastante danificados, com intensa compactação cromatínica e evidente desestruturação do envoltório nuclear. A compactação da cromatina é uma característica típica de morte celular programada e está relacionada com diminuição da atividade das células que irão sofrer degeneração (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; CRUZ-LANDIM; CAVALCANTE, 2003; SILVA-ZACARIN et al., 2007).

Sabe-se que as células digestivas possuem tempo limitado de vida, sendo esta duração menor que o tempo de vida da abelha, diminuindo ainda mais em situações patológicas e/ou toxicológicas, quando é encontrada uma maior quantidade de células em degeneração (BOWEN; BOWEN; JONES, 1998). É o que ocorre no presente estudo, sendo que as abelhas expostas por 8 dias ao imidacloprido também apresentaram células digestivas com características ultraestruturais que indicam morte celular.

No oitavo dia, observou-se a presença de vacúolos digestivos no citoplasma e as mitocôndrias, que até então não haviam sofrido danos aparentes, passaram a apresentar importantes sinais de degradação, como inchaço, perda de matriz, de dupla membrana e de

cristas mitocondriais. Segundo Häcker (2000), as mitocôndrias podem permanecer fisicamente intactas nos estágios iniciais de morte celular. Porém, a perda de conteúdo da matriz mitocondrial também pode ser observada em células que passam por esse processo. Os danos mitocondriais provocam alterações na permeabilidade das membranas, liberação de proteínas ativadoras de morte e interrupção da síntese de ATP (LOEFFLER; KROEMER, 2000; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Outros trabalhos visaram analisar os efeitos do tiametoxam, inseticida também neurotóxico, para operárias forrageiras da espécie *A. mellifera*, através de técnicas morfológicas e histoquímicas. Os resultados mostraram que esse composto causou vacuolizações citoplasmáticas, aumento de secreção apócrina e redução no número de células regenerativas no epitélio (OLIVEIRA et al., 2013). O tiametoxam provocou desorganização no retículo liso, alterações nucleares e mitocondriais e presença de vacúolos citoplasmáticos no intestino de abelhas recém-emergidas de *A. mellifera*, porém com 8 dias de exposição, houve uma suposta recuperação do órgão, possivelmente pela ação dos túbulos de Malpighi e de proteínas de desintoxicação (CATAE et al., 2014). Essa recuperação nas células do ventrículo não foi observada nos resultados obtidos nesse trabalho.

Todas as alterações verificadas demonstram a alta citotoxicidade do imidacloprido para as células digestivas do ventrículo, evidenciando que mesmo uma concentração bastante baixa, como a avaliada nesse trabalho, foi capaz de induzir respostas celulares indicativas de citotoxicidade e também, inviabilizar as funções desempenhadas por esse órgão.

Portanto, embora o intestino apresente proteínas como a glutathione S-transferase, a citocromo P450 e a carboxilesterase que são relacionadas com o processo de detoxificação (CLAUDIANOS et al., 2006), os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que essas proteínas não conseguiram evitar os danos causados pelo imidacloprido, já que esses foram mais significativos com o decorrer dos dias de exposição.

Assim, pode não ter ocorrido desintoxicação pelas células digestivas, permitindo assim que o imidacloprido ou seus metabólitos atingissem o órgão alvo de sua ação, conforme evidenciado pelas alterações ultraestruturais observadas no cérebro, no presente estudo.

As mitocôndrias se mostraram alteradas desde o início das análises após a exposição ao inseticida. Segundo Nicodemo et al. (2014) o imidacloprido afeta o estágio 3 do processo de respiração celular, inibindo a produção de ATP. Como as mitocôndrias apresentaram-se alteradas em todas as fases estudadas, a produção de ATP provavelmente não foi reestabelecida, alterando as biomembranas de outras estruturas celulares, como o núcleo. As alterações nucleares foram mais evidentes no quarto dia de exposição ao imidacloprido, período em que muitos núcleos apresentavam formatos irregulares e espaços perinucleares dilatados.

Os espaços intercelulares, maiores na presença do imidacloprido, indicam perda de contato celular, provavelmente devido a alterações no citoesqueleto, estrutura responsável pela adesão celular. A perda do contato célula-célula pode levar à desorganização tecidual.

Esse foi um resultado observado também por Barbosa (2015) nas células do cérebro de abelhas expostas ao dimetoato por meio de análises histoquímicas. Além disso, esse mesmo autor verificou que a $CL_{50/100}$ do dimetoato (0,0796 ng i.a./ μ L de dieta) promoveu poucas alterações nas células de Kenyon enquanto que a $CL_{50/10}$ (0,796 ng i.a./ μ L de dieta) levou, em 5 dias, à condensação das células de Kenyon.

Em relação ao tiametoxam, a análise do cérebro de operárias forrageiras expostas a doses subletais evidenciou alterações morfológicas e histoquímicas nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos, tais como condensação citoplasmática e nuclear e vacuolização (OLIVEIRA et al., 2013). Doses subletais de imidacloprido causaram também efeitos citotóxicos no cérebro. Núcleos picnóticos, com cromatina condensada, e aumento na síntese de proteínas de determinadas células foram notados em indivíduos expostos ao imidacloprido,

sugerindo morte celular (ROSSI et al., 2013). Esses resultados foram encontrados também em abelhas *Scaptotrigona postica* expostas ao inseticida fipronil (JACOB et al., 2014).

Os corpos pedunculados são estruturas importantes em relação ao aprendizado e memória (DALY; DOYEN; PURCELL III; 1998; CRUZ-LANDIN, 2009). O fato da exposição ao imidacloprido ter induzido efeitos tardios citotóxicos, no presente estudo, pode significar comprometimento na orientação dos indivíduos e na eficácia da coleta de alimento durante as atividades de forrageamento.

3.6 REFERÊNCIAS

AMARAL, E.; ALVES, S. B. **Insetos úteis**. Piracicaba: Livro Ceres, 1979. 192 p.

BARBOSA, R. A. **Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera* africanizada**. 2015. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2015.

BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M.; JONES, A. H. **Mitosis and Apoptosis: matters of life and death**. London: Chapman & Hall, 1998.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CATAE, A. F. et al. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy research and technique**, v. 77, n. 4, p. 274-281, 2014.

CLAUDIANOS, C. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

COSTA, L. M. **Avaliação dos efeitos sinérgicos dos inseticidas fipronil e imidacloprido sobre a mortalidade da abelha nativa *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811)**. 2014. 29 f. Trabalho de Qualificação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Centro de Ciências Agrárias, Faculdade Federal de São Carlos, Araras, SP, 2014.

CREPET, W.L. The role of pollination in the evolution of the angiosperms. In: REAL, L. (ed.). **Pollination biology**. Londres: Academic Press, 1983. p. 29-50.

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

CRUZ-LANDIM, C.; CAVALCANTE, V. M. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). **Canadian journal of research**, Ottawa, v. 20, p. 1099-1107, 2003.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultraestrutural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v.1, p.29-40, 1996.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL III, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998. 680 p.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Sciences**, Glasgow, v. 64, p. 1099–1105, 2008.

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

FRIEDMAN, J. W.; SHMIDA, A. Pollination, gathering nectar and the distribution of flower species. **Journal of Theoretical Biology**, v. 175, p. 127-138, 1995.

GRISWOLD, T. et al. The bees (Apidae). In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. **The Hymenoptera of Costa Rica**. Oxford: Oxford University Press, 1995. p. 650-691.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, jul. 2007.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 301, n. 1, p. 5-17, jul. 2000.

JACOB, C. R. O. et al. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 71, p. 114-122, 2014.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Berlin, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

LENZI, M. et al. Associação das abelhas silvestres (Hym. Apoidea) visitantes florais de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), na Ilha de Santa Catarina (sul do Brasil). **Acta Biológica**, v. 32, p. 107-127, 2003.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 19-26, abr. 2000.

MICHENER, C. D. Bees of Panama. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 104, p. 1-176, 1954.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Polinizadores em risco de extinção são ameaça à vida do ser humano**. 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/9976-polinizadores-em-risco-de-extin%C3%A7%C3%A3o-%C3%A9-amea%C3%A7a-%C3%A0-vida-do-ser-humano>>. Acesso em: 30 set 2015.

MOBBS, P. G. Brain Structure. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Perganomon Press Ltda., 1985.

NICODEMO, D. et al. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 33, n. 9, p. 2070-2075, 2014.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. **Honeybee Acute Oral Toxicity Test**, n. 213, 1998.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2013.

PERCIVAL, M. S. **Floral Biology**. Londres: Pergamon Press, 1965. 243 p.

ROSSI, C. A. et al. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p.234-243, 2013.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. et al. Programmed cell death in the larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Journal Bioscience**, Bangalore, v. 32, n. 2, p. 309- 328, 2007.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy and physiology of the honeybees**. New York: Comstock Publishing Associates, 1956.

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

TAUTZ, J. **The buzz about bees: biology of a superorganism**. Berlim: Springer- Verlag, 2008, 284 p.

WILMS, W. et al Bees and other insects recorded on flowering trees in a subtropical *Araucaria* forest in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 32, p. 220-226, 1997.

ZERBO, A. C. **Diferenciação morfológica e funcional do tubo digestivo de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2003. 101p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

4 CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS NO CÉREBRO DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS AO IMIDACLOPRIDO PELA TÉCNICA DE MALDI-IMAGING

Aline Fernanda Catae, Thaisa Cristina Roat, Marcel Pratavieira, Anally Ribeiro da Silva Menegasso, Mario Sergio Palma, Osmar Malaspina.

UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).

4.1 RESUMO

Com base na importância de estudos toxicológicos para avaliação de possíveis efeitos deletérios que os inseticidas podem causar sobre as abelhas, permitindo assim, o surgimento de estratégias de proteção e conservação de polinizadores, o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da exposição à concentração subletal do imidacloprido ($CL_{50/100}$) na distribuição de proteínas identificadas no cérebro de *A. mellifera*, através do imageamento químico. Esta técnica permite a análise química de tecidos através do monitoramento da dinâmica espaço-temporal dos processos bioquímicos que estão ocorrendo em um determinado momento. Para isso, abelhas campeiras foram expostas por 8 dias a uma dieta contendo a concentração subletal correspondente a $CL_{50/100}$ de imidacloprido. Os indivíduos foram coletados 1 e 8 dias após o início do fornecimento do alimento e os cérebros foram seccionados em criostato. A impressora química ChIP-1000 (Shimadzu) foi usada para deposição de matriz e tripsina e os espectros foram adquiridos através do MALDI ToF-ToF (Shimadzu). Os espectros foram convertidos em imagens pelo software MSiReader v0.05, gerando assim, mapas de densidade para proteínas. Os resultados obtidos mostraram que a exposição ao imidacloprido provocou alterações na expressão de proteínas específicas no cérebro, o que causa danos em sinapses químicas e no suprimento de oxigênio nas células, bem como estresse químico por aumento de espécies reativas de oxigênio, prejudicando deste modo, processos biológicos importantes, e que em longo prazo podem comprometer a fisiologia dos indivíduos da colônia.

Palavras-chave: Cérebro. Imageamento Químico. Espectrometria.

4.2 INTRODUÇÃO

Um problema bastante preocupante com o uso de agrotóxicos em culturas no Brasil e no mundo é o fato desses produtos atuarem não apenas sobre os insetos-praga, mas também sobre insetos importantes para a polinização das culturas agrícolas (WARHURST; GOEBEL, 1995).

Os neonicotinoides representam uma classe de inseticidas que apresenta um novo mecanismo de ação. Da mesma maneira que os piretroides foram produzidos a partir de piretrinas naturais, os neonicotinoides foram sintetizados a partir da nicotina natural (WARE, 2003). Como membro desta classe, destaca-se o imidacloprido, de ação sistêmica, que pode ser transportado pela seiva de uma parte da planta para outra (MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002).

As possíveis alterações que o imidacloprido pode causar em *A. mellifera*, relacionadas às diferenças nas respostas protéicas no cérebro destas abelhas expostas ou não à dose subletal deste neonicotinóide, podem ser obtidas através do emprego de técnicas de imageamento químico (MALDI-IMS - *Imaging Mass Spectrometry*), que permite a análise espacial da distribuição de proteínas em amostras de tecido.

A espectrometria de massas é atualmente uma das ferramentas analíticas mais eficientes e utilizadas em estudos nas áreas de Biologia, Ciências Médicas e Ciências Tecnológicas, sendo possível quantificar biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios e oligonucleotídeos, além de elucidar suas estruturas e confirmar suas identificações (FERREIRA et al., 2009).

Um espectrômetro de massas possui basicamente cinco componentes: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador, detector e processador de dados. Um tipo de equipamento muito utilizado atualmente para análise de macromoléculas biológicas é o que

tem como fonte de íons o tipo MALDI (do inglês, matrix-assisted laser desorption/ ionization) (PANDEY; MANN, 2000).

A técnica de imageamento químico (MALDI-IMS - *Imaging Mass Spectrometry*), introduzida em 1997, é uma tecnologia promissora para a análise espacial de proteínas a partir de tecidos intactos (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997). Essa ferramenta combina a grande sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas com a análise espacial fornecida pela histologia tradicional, permitindo dessa forma, a visualização do arranjo de biomoléculas no tecido (GESSEL; NORRIS; CAPRIOLI, 2014).

Caprioli e seus colaboradores foram pioneiros na utilização do imageamento químico em tecidos utilizando MALDI como fonte de ionização (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997). As aplicações do MALDI-IMS são classificadas em duas categorias de acordo com o tipo de substância a ser analisada: proteínas e pequenas moléculas (CORNETT et al., 2007).

Essa tecnologia já foi utilizada com sucesso na caracterização e expressão de proteínas e outros compostos biológicos orgânicos de tecidos normais e doentes (CHAURAND et al., 2005). A visualização de moléculas individuais na superfície de tecidos sem a necessidade do uso de coloração, anticorpos ou um tratamento específico da amostra são algumas das inúmeras vantagens do MALDI. Dessa forma, não há a necessidade de mistura das moléculas presentes em uma superfície, como ocorre em alguns métodos tradicionais de proteoma utilizando eletroforese em gel e cromatografia líquida (ABDELNUR, 2011).

Alguns trabalhos vêm utilizando a técnica do MALDI-Imaging com o objetivo de investigar possíveis alterações no cérebro de abelhas. Pratavieira et al. (2014), por exemplo, revelaram uma possível correlação entre a localização de alguns neuropeptídeos com a divisão de trabalho relacionada à idade desses indivíduos.

Assim, a aplicação desta técnica para investigar possíveis alterações na distribuição espacial de proteínas presentes no sistema nervoso decorrentes da exposição das mesmas a

xenobióticos torna-se bastante elucidativa, mostrando a localização das estruturas cerebrais atingidas pelo composto. Tais resultados, fornecem embasamento para a elucidação em nível bioquímico e morfológico das alterações no sistema nervoso decorrentes da exposição de *A. mellifera* ao imidacloprido que podem conduzir a alterações comportamentais e afetar as relações intra-coloniais, gerando maior conhecimento sobre o modo de ação deste inseticida e informações que podem subsidiar os programas de proteção de polinizadores.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Exposição contínua a concentração subletal de imidacloprido

Operárias campeiras foram coletadas diretamente da entrada de três colônias diferentes, acondicionadas em potes descartáveis plásticos (250 mL) previamente forrados com papel-filtro e furados nas laterais, totalizando 20 indivíduos por pote. Todos os grupos experimentais foram montados com indivíduos das três colônias, cada pote contendo abelhas de uma única colônia, totalizando 60 abelhas por grupo experimental. Em todos os casos, os alimentos foram fornecidos *ad libitum* em tubos tipo “eppendorf” (1,5 mL) com as laterais furadas. Em todos os experimentos as gaiolas foram mantidas em estufa do tipo BOD à temperatura de $32 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$.

Durante os ensaios de intoxicação, o grupo controle recebeu uma dieta composta de solução aquosa de sacarose a 50%. Com base no ensaio de toxicidade (determinação da CL_{50}) foi estabelecida a concentração subletal de imidacloprido para ser adicionada à dieta do grupo exposto ao inseticida. Neste alimento foi adicionada uma solução acetônica (15%) de imidacloprido de modo que o alimento tivesse concentração final proporcional a concentração subletal 100 vezes inferior a CL_{50} ($\text{CL}_{50/100}$: 0,014651 ng imidacloprido/ μL de alimento).

A coleta dos espécimes para os estudos de alterações proteicas no cérebro, foi baseada no período de exposição das abelhas ao imidacloprido, sendo ele 1 e 8 dias após o início do fornecimento do alimento contaminado, para que os efeitos imediatos e à longo prazo do imidacloprido fossem investigados. Juntamente a estas coletas, foram realizadas coletas de abelhas do grupo controle.

4.3.2 Técnica de Imageamento Químico (MALDI-Imaging)

Abelhas expostas ou não à concentração subletal do imidacloprido foram coletadas após 1 e 8 dias o início dos experimentos (Fig. 1A) e congeladas em ultra-freezer -80°C (por um período inferior a 24 horas). As cabeças de abelhas foram seccionados a -20 °C utilizando-se um micrótomo por congelamento (LEICA, CM1850) (Fig. 1B) para a aquisição de cortes de 12 µm de espessura (Lâmina do MALDI). Tais cortes foram realizados no plano sagital da cabeça de cada operária, na região do eixo maior da capsula cefálica (Fig. 1C).

Secções histológicas subsequentes foram analisadas imediatamente pela técnica histológica de coloração por hematoxilina e eosina (H&E) e por MALDI-MSI, possibilitando que para cada corte analisado fosse gerado um mapa de contorno do cérebro deste indivíduo, para que a distribuição espacial das proteínas estudadas pudesse ser representada. Os cortes a serem analisados por MALDI-MSI foram lavados sucessivamente em etanol 70% (v/v), e 90%, durante um minuto em cada solução para a eliminação de sais e lipídeos presentes nas amostras. Posteriormente, as secções histológicas foram submetidas à dessecação durante 30 minutos, sob temperatura ambiente, em um dessecador selado a vácuo contendo sílica gel como agente dessecante.

Alguns cortes foram submetidos à coloração com H&E para localização das estruturas cerebrais. Para esta técnica, as lâminas foram submersas em etanol 95% (v/v) por 20 minutos, lavadas com água corrente e, em seguida, foram coradas com hematoxilina por 20 segundos.

Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água destilada. As mesmas foram então coradas com eosina por mais 20 segundos e lavadas com água destilada. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas com soluções de etanol 95% (v/v) para a remoção do excesso de corante e em soluções de xilol. Esta etapa é necessária para que se possa fazer a correspondência da localização das proteínas às estruturas presentes no cérebro da abelha.

As imagens digitais das secções de tecidos foram geradas através de um microscópio Olympus BX51TF, conectado a uma câmera Olympus U-LH100HG. As secções histológicas coradas com H&E foram utilizadas na construção do mapa de contorno para a interpretação dos dados de MALDI-MSI.

Para as análises dos digestos trípticos foi realizada deposição automática de tripsina por meio da impressora química CHIP-1000 (Shimadzu) (Fig. 1D). A impressora química foi programada para gerar um micro-arranjo de aproximadamente 500 pontos/análise, onde cada ponto de aplicação da solução de matriz foi espaçado um do outro por 200 μm de centro a centro (resolução lateral), perfazendo 36 pontos/ mm^2 da secção histológica.

Inicialmente foram aplicados 20 nL/ponto de solução contendo 20 mg/mL de tripsina em 20 mM de tampão NH_4HCO_3 (pH 8,0) e incubados por 2 hs à 37 °C. A secção de tecido foi então incubada por 2 horas em uma atmosfera úmida a 37°C. Em seguida, uma solução contendo 10 mg/mL de ácido cinâmico (CHCA) em solução acetonitrila 50% (v/v) contendo ácido trifluoroacético (TFA), 1% (v/v) foi utilizada como matriz para a análise dos digestos trípticos, sendo aplicados 500 pL (5 gotas de 100 pL) de solução de matriz/ponto. Após a aplicação da matriz, as secções histológicas foram submetidas ao processo de dessecação durante 10 minutos, sob temperatura ambiente. As coordenadas planares (x e y) criadas pela CHIP-1000 foram salvas e exportadas para o espectrômetro de massas.

Os espectros de MALDI-MS foram obtidos no modo *reflectron* positivo por um instrumento MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu) (Fig. 1E), equipado com

um laser de N₂ *SmartBeam*, controlado pelo algoritmo Launchpad v2.8 (Shimadzu). Peptídeos ACTH (fragmento 18-39) e Angiotensina II foram utilizados para a calibração do instrumento. Espectros de MALDI-MS foram adquiridos no intervalo de m/z 700 – 4000, com um total de 250 disparos de laser/ponto de preparação de amostra, disparados apenas no conjunto de coordenadas (x e y) mencionadas acima. Foram realizados cerca de 125.000 disparos de laser por amostra analisada, sendo que para cada disparo de laser, se adquire um espectro de massas (gerando um total de 125.000 espectros/amostra). Os espectros MS/MS foram adquiridos no modo positivo com o dispositivo “reflectron” ativado, com o sistema CDL ajustado para 200°C, e ajustando-se a pressão da região do TOF em $1,5 \times 10^{-4}$ Pa, o tempo de acumulação de íons em 50 ms e o nível de gás de colisão em 30%. Sob estas condições, um erro de massa 3,00 ppm, e uma resolução de 10.000 FWHM foram obtidos

4.3.3 Identificações de proteínas

As identificações de proteínas foram realizadas analisando-se os espectros MS/MS através da ferramenta de bioinformática Mascot v2.3, utilizando-se banco de proteínas restrito ao gênero *Apis* (NCBI). Os parâmetros de pesquisa utilizados foram: i) inexistência de restrições à massa molecular da proteína; ii) perda de clivagem triptica ajustado para 01; iii) modificações fixas de oxidação: metionina; iv) modificação variável: carbamidometilação. Os erros de tolerância utilizados nas buscas foram de 0,5 Da para MS e 0,3 para MS/MS.

4.3.4 Processamento dos dados de imageamento espectral

Através da utilização do algoritmo Launchpad v2.8 (Shimadzu) os dados brutos (**.raw**) foram convertidos para o formato **.mzXML**. As imagens foram reconstruídas no algoritmo MSiReader v0.05 a partir dos dados no formato **.mzXML**, utilizando-se tolerância de massa de ± 0.3 Da e espaçamento de 200 μm . Nesse algoritmo os seguintes parâmetros foram

configurados: o método utilizado para calcular a intensidade exibida nas imagens moleculares foi o *Max of Window* (**Max**); subtração de ruído e *background*; correção da linha de base; normalização dos dados com base na intensidade do padrão interno 2-Feniletilamina, de m/z 122.18 na forma $[M+H]^+$; e interpolação cúbica de ordem 5 dos pixels das imagens.

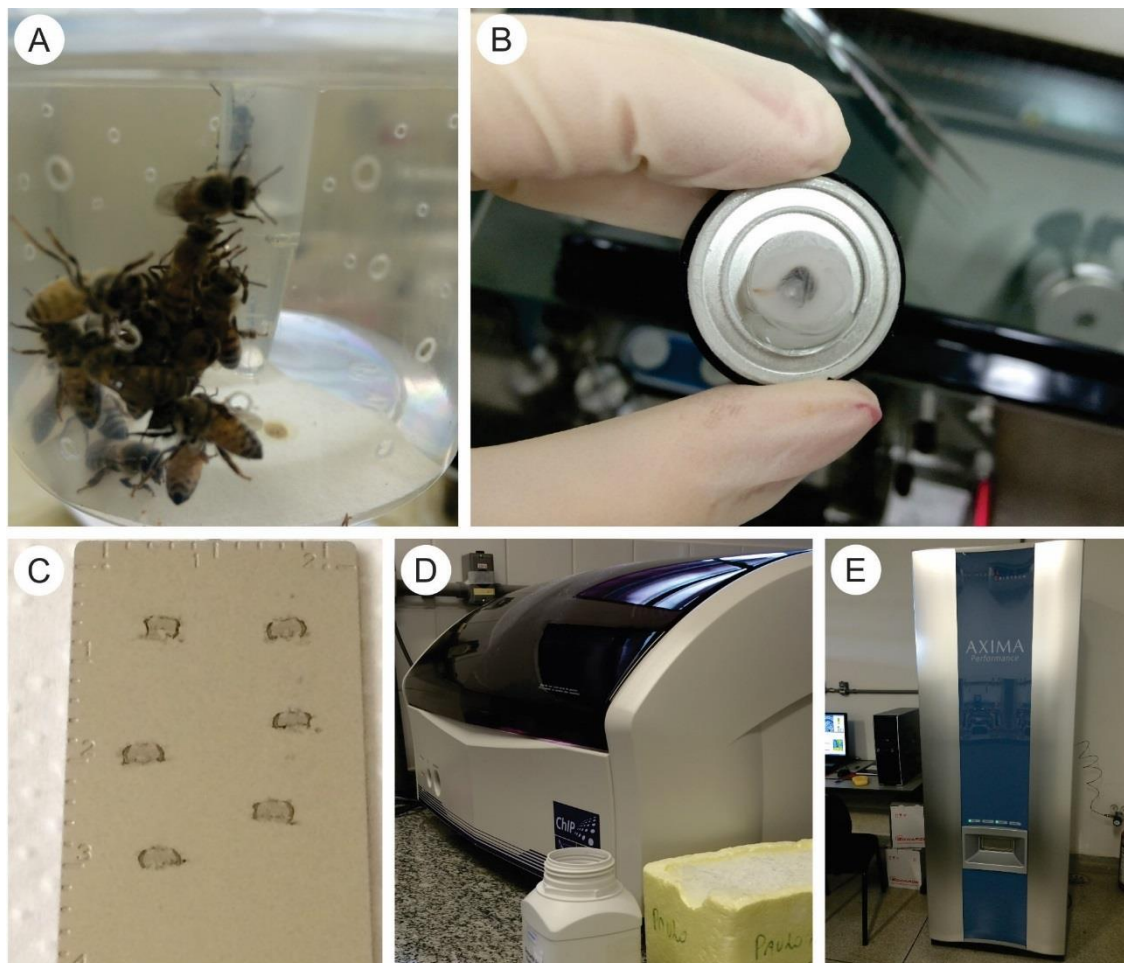
4.3.5 Análise das Imagens – criação de mapas de contornos

Após a aquisição dos dados, as imagens moleculares das proteínas identificadas foram reconstruídas a partir de valores da razão massa/carga (m/z) de íons moleculares na forma monoprotonada ($[M+H]^+$) dos peptídeos tripticos, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05, uma plataforma livre de código aberto, construído sobre a plataforma do Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA).

Para correlacionar as distribuições especiais das proteínas com suas localizações no cérebro de abelhas, foi desenvolvido um mapa de contorno com base no Atlas Digital 3D do Cérebro da Abelha *A. mellifera*, desenvolvido por Rybak et al. (2010), no qual os limites de cada centro nervoso foram definidos para auxiliar a interpretação dos dados de MSI. O atlas padrão para o cérebro de abelha (*Honeybee Standard Brain Atlas* – atlas HSB, <http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain/>) foi calculado a partir de 20 cérebros individuais, corados por técnica de imunohistoquímica; as imagens foram geradas a partir de microscopia confocal e segmentadas ao longo das fronteiras de 22 centros nervosos; por último, foi reconstruído um modelo de superfície tridimensional a partir dos dados obtidos (RYBAK et al., 2010). Posteriormente, o mapa de contorno foi plotado sobre a imagem obtida a partir da técnica histológica de coloração por H&E de cada secção, permitindo a visualização da anatômica do cérebro na secção sagital, e facilitando o alinhamento das imagens moleculares obtidas por espectrometria de massas com as imagens histoquímicas. Desta maneira, foi criada uma “máscara” contendo os limites anatômicos de cada estrutura

nervosa, permitindo a análise das imagens geradas por MALDI-MSI. Após o desenvolvimento do mapa de contorno, as estruturas foram nomeadas de acordo com o atlas HSB

Figura 1: Etapas da técnica de imageamento químico



A: Abelhas em pote plástico expostas ao alimento *ad libitum*; **B:** Cabeça fixada em gelo para secção no criostato; **C:** Lâmina metálica com cortes no plano sagital da cabeça; **D:** Impressora química CHIP-1000 (Shimadzu) ; **E:** MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu).

4.4 RESULTADOS

A técnica de espectrometria de massas utilizada nesse trabalho permitiu a identificação de um total de 24 proteínas nos cérebros de *A. mellifera*. A tabela 1 mostra as proteínas identificadas, o código de acesso, os peptídeos utilizados para a identificação, os valores de ion score e os de m/z para cada um deles.

Tabela 1: Proteínas identificadas por análise proteômica nas secções do cérebro de abelhas *A. mellifera*

Código de Acesso*	Proteína	Peptídeos	Ion Score	m/z (carga)
XP_006571554.1	neuroligin-1 isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]	VVLLGGSALSPWAIQR	38	1667.98 (+1)
		SSASAFANK	24	882.94 (+1)
XP_624195.4	neurexin-4 isoform X6 [<i>Apis mellifera</i>]	FEVPIIAQWIR	50	1372.65 (+1)
		GYEGVSSLNVSLTFR	58	1629.81 (+1)
NP_001091690.1	nicotinic acetylcholine receptor alpha1 subunit [<i>Apis mellifera</i>]	YLLFTMVLVTLVVVTIAVLNVNFR	65	2826.52 (+1)
		LYDDLLSNYNR	46	1386.51 (+1)
XP_624128.2	synapsin isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]	DQGASILGAAVSGATR	49	1474.61 (+1)
		HIADLVTAK	38	968.13 (+1)
NP_001035320.1	acetylcholinesterase [<i>Apis mellifera</i>]	FLGIINNIFK	43	1179.43 (+1)
		ILLFFLLSSCTR	32	1640.10 (+1)
XP_006564780	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]	IGNIQDAAILDYYR	57	1624.22 (+1)
		PLVQSESLLDVILYR	62	1859 (+1)
XP_006559931.1	endophilin-A isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]	QPCCTALYDFAENPGELGFK	68	2333.63 (+1)
		SVTTTTNTMAFAGLK	57	1543.79 (+1)
NP_001128420.1	protein kinase C [<i>Apis mellifera</i>]	LLTQEEGEYYNVPVPEEGVDLAELK	76	2836.14 (+1)
		SLSKEAREICK	54	1264.49 (+1)
XP_006566155.1	14-3-3 protein zeta-like isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]	QAFDDAIAELDTLNEDSYK	59	2159.28 (+1)
		AYQEAFDIAK	40	1156.28 (+1)

XP_001120262.1	actin, [<i>Apis mellifera</i>]	TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR	74	3153.58 (+1)
		DLYANNVLSSGGTTMYPGIADR	65	2228.48 (+1)
NP_001153544.1	heat shock protein Hsp70Ab-like [<i>Apis mellifera</i>]	FEELCADLFR	38	1243.44 (+1)
		VSYPKGETK	31	912.02 (+1)
NP_001229443.1	hsp90 co- chaperone Cdc37 [<i>Apis mellifera</i>]	DIEISDDEDDTHPNIDTPSLFR	65	2545.66 (+1)
		QLDVDPR	30	842.92 (+1)
XP_001119884.1	protein lethal(2)essential for life-like [<i>Apis mellifera</i>]	LLDQNFGLGLYPEQLLSPSR	71	2261.59 (+1)
		DQGNVENER	39	1061.04 (+1)
XP_006562956.1	beta amyloid protein precursor- like isoform X5 [<i>Apis mellifera</i>]	CWESHRWNATAADTCR	63	1629.81 (+1)
		YQADVTSKQKEK	47	1425.53 (+1)
XP_001119981.2	cytochrome P450 9e2 [<i>Apis mellifera</i>]	ICTDEFELQGSDDLNYR	72	1961.13 (+1)
		QSYSEIIEEIYR	60	1530.69 (+1)
NP_001153742.1	glutathione S- transferase S1 [<i>Apis mellifera</i>]	LIYFNIPGLAEPIR	55	1616.95 (+1)
		SEMPLGQVPILEIDGK	62	1727.03 (+1)
XP_006559625	vascular endothelial growth factor receptor 3-like [<i>Apis mellifera</i>]	GGDLLTYLHNQR	45	1387.53 (+1)
		FNVLLPEYSNLDDIPDLYIK	62	2382.72 (+1)
XP_006569753.1	protein disulfide- isomerase [<i>Apis mellifera</i>]	ETNEAVEYNGER	50	1411.43 (+1)
		IFALTIVICFFTFSLAK	57	2048.60 (+1)
NP_001171498.1	superoxide dismutase 1 [<i>Apis mellifera</i>]	HVGDLGNIEADASGVANVNITDK	85	2310.46 (+1)
		TLVVHADPDDLK	44	1380.53 (+1)
NP_001171540.1	catalase [<i>Apis mellifera</i>]	FSTVGGESGSADTVR	49	1470.54 (+1)
		SFKWNPFDLTK	45	1383.58 (+1)
XP_003249289.1	peroxiredoxin 1 [<i>Apis mellifera</i>]	DYGVLDDEESGVPFR	54	1583.70 (+1)
		PDVVGSK	40	701.78 (+1)
XP_003250526.1	phospholipid hydroperoxide mitochondrial isoformX2 [<i>Apis mellifera</i>] glutathione peroxidase,	ILAFPSNEFGGQEPGTSVEILEFVK	67	2717.07 (+1)
		WLKTQANGFITDDIK	64	1750.98
NP_001011572.1	transferrin 1 precursor [<i>Apis mellifera</i>]	FFGLPVGVTAAIPTSENPADYR	64	2323.63 (+1)
		DLALICPDGGR	52	1130.31 (+1)

NP_001164445.1	glutamine synthetase [<i>Apis mellifera</i>]	YIWIDGTGESLR	48	1410.57 (+1)
		IMDGSWNGAGAHTNFSTK	57	1895.05 (+1)

* Códigos de Acesso do Protein Data Bank para *A. mellifera*, junto ao NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Com base nas funções desempenhadas por cada proteína segundo consulta a banco de dados do Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>), e revisão na literatura, as proteínas foram separadas em grupos funcionais (tabela 2), facilitando assim, o entendimento dos efeitos causados pelo imidacloprido no cérebro.

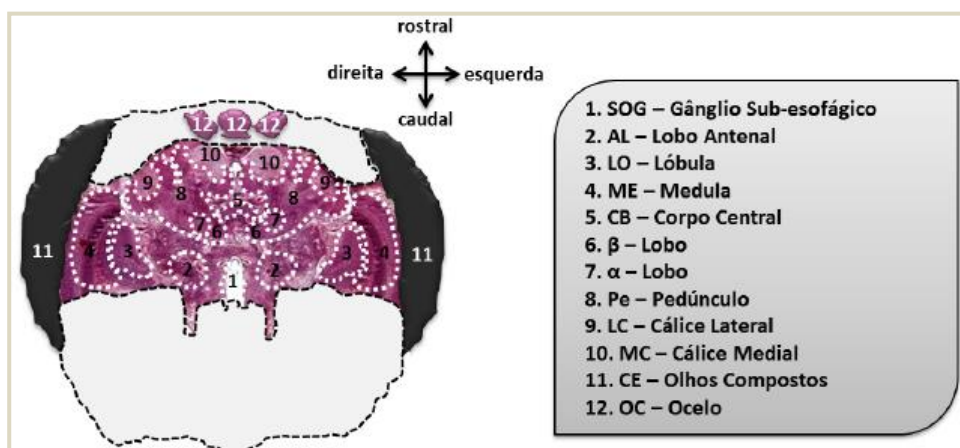
Tabela 2: Relação das proteínas analisadas no cérebro de *A. mellifera* classificadas de acordo com o processo biológico e funções que desempenham

Processo Biológico	Proteínas	Funções	Referências
Sinapses	Neuroligina	Mediação de sinapses entre neurônios	CLAUDIANOS et al., 2006 BISWAS et al., 2008
	Neurexina	Moléculas de reconhecimento nos terminais nervosos em sinapses	DEAN et al., 2003
	Sinapsina	Atividade catalítica Ligação de ATP Regulação liberação neurotransmissores	SUN et al., 2011 HILFIKER et al., 1999 KLAGGES et al., 1996
	Receptor Nicotínico de Acetilcolina	Ativação de acetilcolina Processamento de informações, aprendizado e memória	THANY et al., 2013 GAUTHIER, 2010 ALBUQUERQUE et al., 1997
	Acetilcolinesterase	Hidrólise da acetilcolina durante as sinapses	BELZUNCES; TOUTANT; BOUNIAS, 1988
	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)	Desenvolvimento dos corpos pedunculados	KOBAYASHI et al., 2006
	Endofilina	Endocitose	SUN et al., 2011
	Glutamina Sintetase	Síntese de glutamina Redução dos níveis de amônia e glutamato	WANG et al., 2012 ROWBOTTOM et al., 1996 SUAREZ et al., 2012

Memória e Aprendizado	Proteína Quinase C	Fase inicial de memória Aprendizagem associativa	KAMIKOUCHI et al., 2000
	Leonardo 14,3,3	Aprendizado e Memória Aprendizagem olfatória	PHILIP et al., 2001 ROMAN et al., 2001
	Actina 5C	Componente citoesqueleto Desenvolvimento corpos pedunculados Comportamento agressivo Memória e aprendizado	EDWARDS et al., 2009 CRISTINO et al., 2014
	Transferrina	Percepção visual	FAROOQUI, 2008
Chaperonas	HSP 70	Estabilidade proteica Inibição de processos apoptóticos	XIE et al., 2015 LI et al., 2000
	HSP 90	Dobramento de proteínas	YOUNG et al., 1998
Degeneração Neuronal	Proteína Letal	Inibe agregação da proteína β -amiloide	SUN et al., 2011 KURZIK-DUMKE; LOHMANN, 1995
	Precursor Amiloide	Ligação de heparina Degeneração neuronal de pacientes com Alzheimer	SUN et al., 2011 MASTER et al., 1985 SELKOE et al., 1986 MURAKAMI et al., 1998
Detoxificação	Citocromo P450	Fase inicial da detoxificação Metabolismo de xenobióticos	DENISON; WHITLOCK JR, 1995
	Glutathione S-transferase	Segunda fase do processo de desintoxicação metabólica	BARATA et al., 2005; KETTERMAN, et al., 2011
Suprimento de Oxigênio	Fator de crescimento endotelial (VEGF)	Regulação positiva processos apoptóticos Regulação negativa de angiogênese Altamente expressa em condições de hipóxia	WU et al., 2010 RISAU, 1997
	Dissulfeto Isomerase	Resposta celular à hipoxia Proteção contra apoptose	KO et al., 2002 GRAVEN et al., 2002
Proteção contra ROS	CuZn Superóxido Dismutase	Antioxidante Resposta ao estresse oxidativo	MARTINDALE; HOLBROOK, 2002
	Catalase	Resposta ao estresse oxidativo	MARTINDALE; HOLBROOK, 2002
	Thioredoxina Peroxidase	Atividade da peroxidase Inibição processos apoptose Proteção contra estresse oxidativo	YAO et al., 2013 SANTOS et al., 2010 ZHANG et al., 1997
	fosfolípídeo hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPx)	Resposta ao estresse oxidativo	MARTINDALE; HOLBROOK, 2002

Foram criados os mapas de distribuição destas proteínas, permitindo assim a análise da expressão *in situ*. O método utilizado nessa técnica é semi-quantitativo através de um padrão de coloração que varia de 0% a 100%. Concentrações elevadas de proteínas são representadas através de intensidades 100% e apresentam coloração em vermelho, enquanto que cores em gradiente decrescente de intensidade representam concentrações menores de proteínas. Uma máscara foi utilizada para uma melhor localização das proteínas nas estruturas do cérebro de *A. mellifera* (Figura 2).

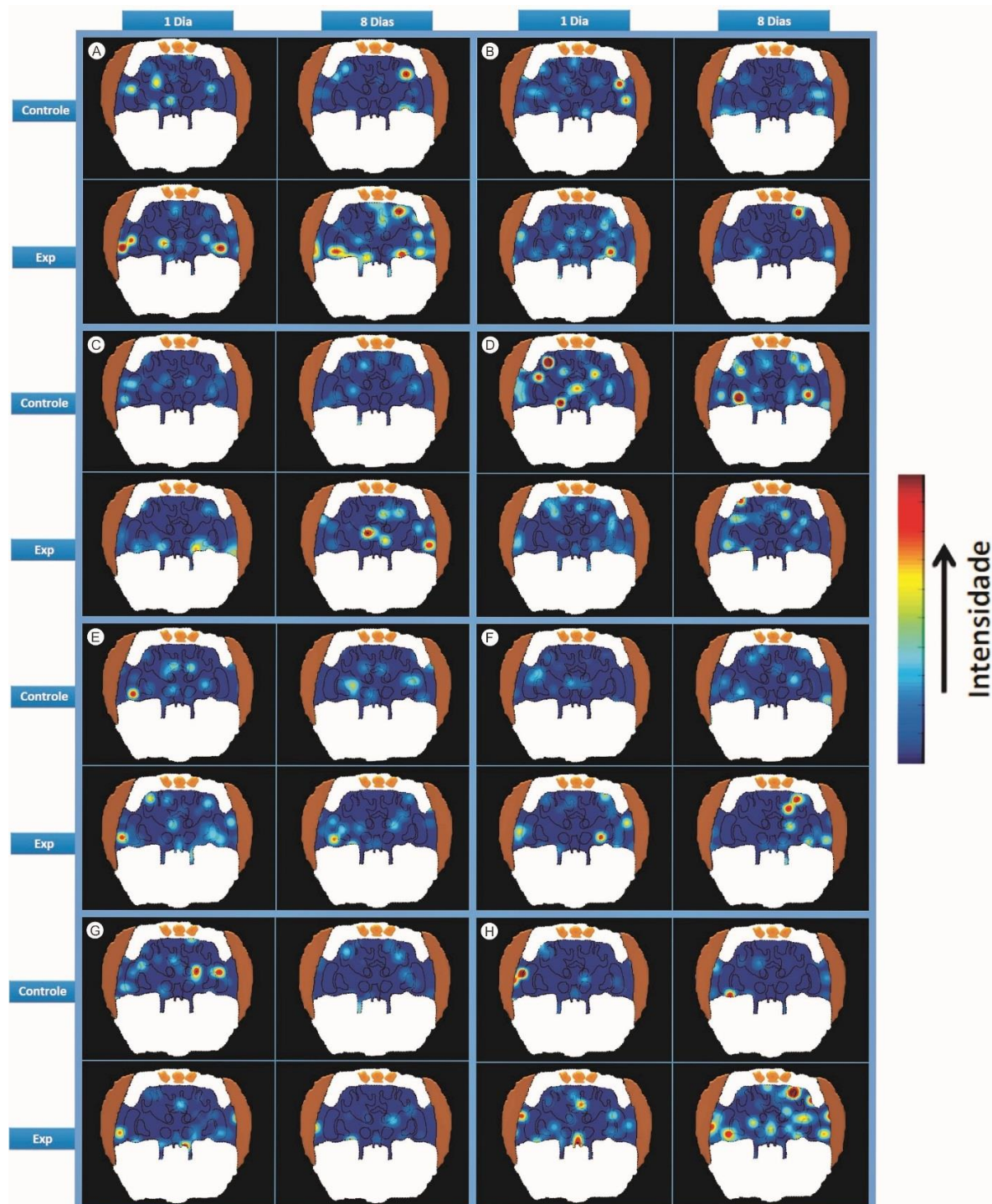
Figura 2: Máscara utilizada para análise da distribuição de proteínas



Fonte: PRATAVIEIRA, 2013

Das proteínas identificadas, diversas estão relacionadas com a formação e manutenção de sinapses. Algumas dessas proteínas tiveram suas expressões relativas aumentadas no cérebro na presença do imidacloprido: neuroligina 1 (*neuroligin 1*) (Fig. 3A), neurexina (*neurexin-4 isoform X6*) (Fig. 3B), sinapsina (*synapsin isoform X1*) (Fig. 3C), acetilcolinesterase (*acetylcholinesterase*) (Fig. 3E), receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform X1*) (Fig. 3F) e glutamina sintetase (*glutamine synthetase*) (Fig. 3H). Em relação ao receptor nicotínico de acetilcolina (*nicotinic acetylcholine receptor alpha 1 subunit*) (Fig. 3D) e à endofilina (*endophilin-A isoform X2*) (Figura 3G), foi observada diminuição de expressão provocada pela CL_{50/100} do inseticida.

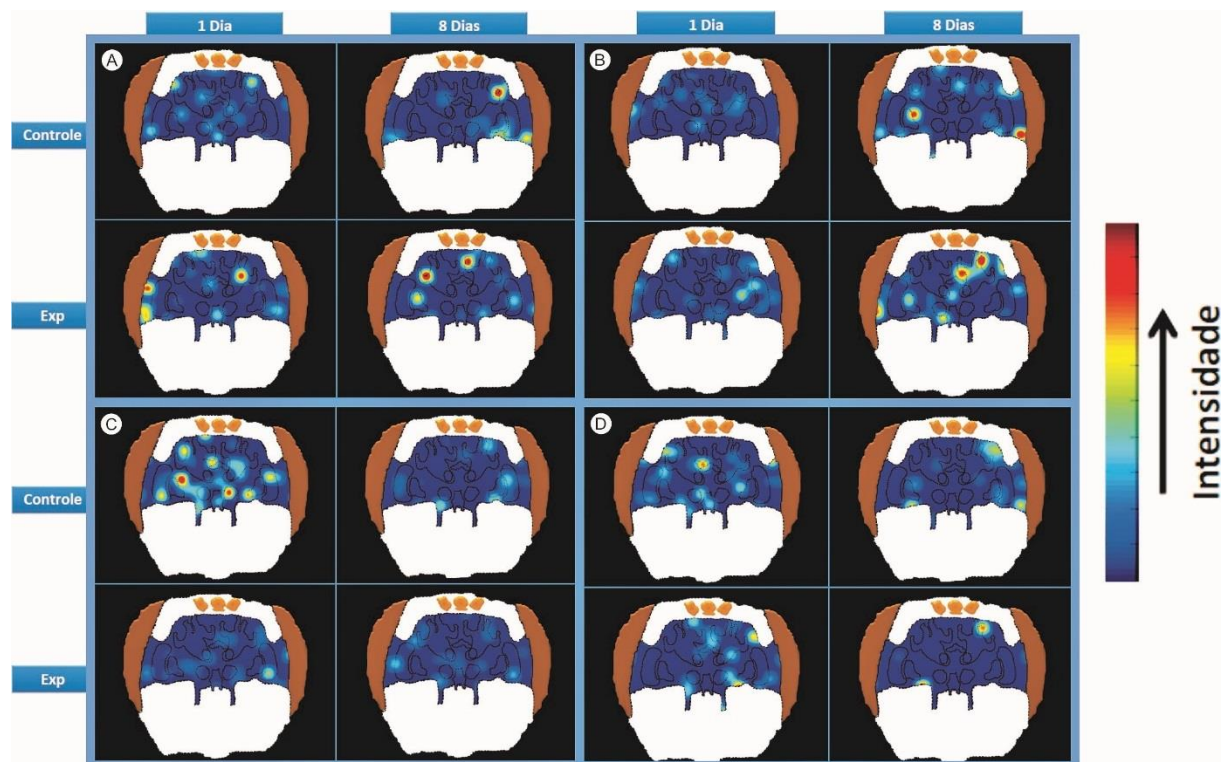
Figura 3: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de sinapses no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) neuroligina; (B) neurexina; (C) sinapsina; (D) receptor nicotínico de acetilcolina;
(E) acetilcolinesterase; (F) inositol; (G) endofilina; (H) glutamina sintetase

As proteínas quinase C (*protein kinase C*) e Leonardo 14-3-3 (*14-3-3 Leonardo protein*), envolvidas com os processos de aprendizado e memória apresentaram-se mais expressas nos cérebros de indivíduos expostos ao imidacloprido (Figs. 4A e 4B, respectivamente). Já a actina 5-C (*actin-5C-like isoform X1*), proteína considerada também importante para esses processos, mostrou-se menos expressa na presença do imidacloprido quando comparada ao controle, principalmente no primeiro dia analisado (Fig. 4C). Em relação à transferrina (*transferrin*), a característica mais evidente foi a diminuição de expressão nos lobos ópticos (Fig. 4D).

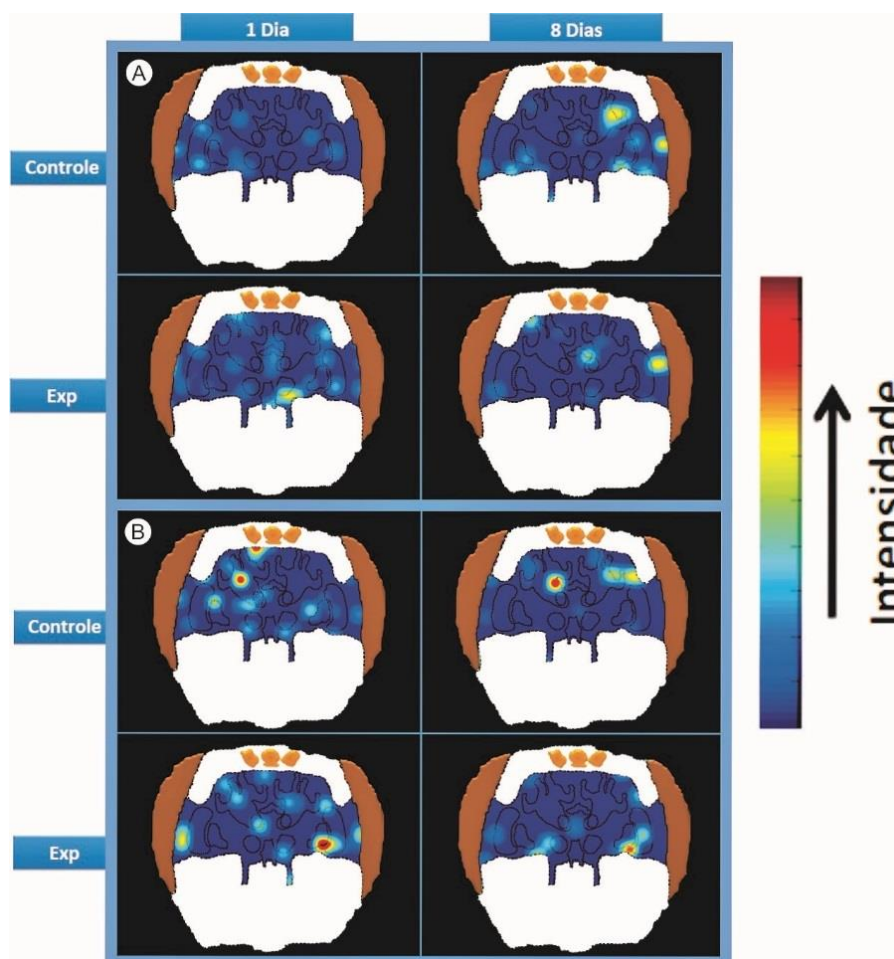
Figura 4: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de memória e aprendizado no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) proteína quinase C; (B) Leonardo 14-3-3; (C) actina 5-C; (D) transferrina

A HSP 70 (*Heat Shock Protein 70 Ab-like*) apresentou seu padrão de distribuição pouco alterado na presença do imidacloprido, não havendo diferenças evidentes entre os grupos controles e expostos, sendo essa proteína, pouco evidenciada no cérebro (Fig. 5A). Em relação à HSP 90 (*HSP 90 Cdc37*) (Fig. 5B) tanto nos grupos expostos quanto nos grupo controles não houve alterações na intensidade de expressão.

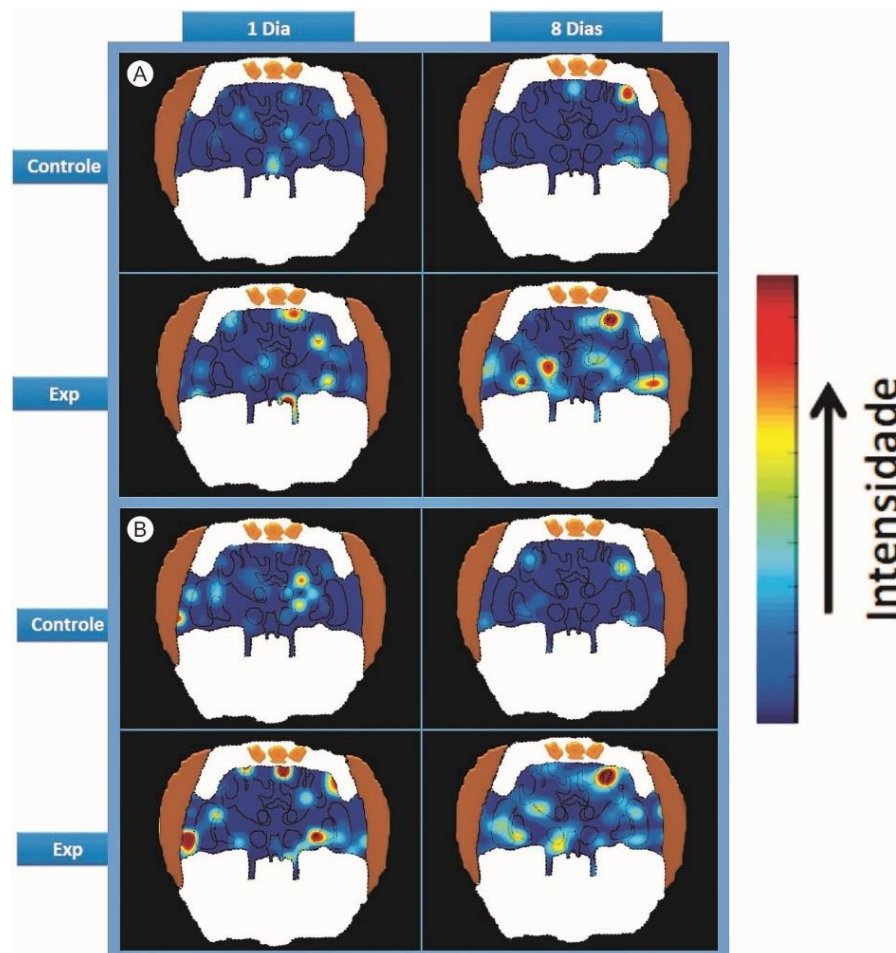
Figura 5: Expressão relativa das proteínas chaperoninas no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) HSP 70; (B) HSP 90

Em relação à proteína letal essencial para a vida (*protein lethal essential for life - Protein Efl21*), pôde-se notar evidente aumento da expressão relativa nos indivíduos expostos ao imidacloprido, principalmente no oitavo dia após o início do fornecimento do alimento contaminado (Fig. 6A). Houve também aumento de expressão do precursor da proteína amiloide (*amyloid protein precursor-like*) nos dois grupos expostos ao inseticida. Essas duas proteínas são indicativas de degeneração neuronal (Fig. 6B).

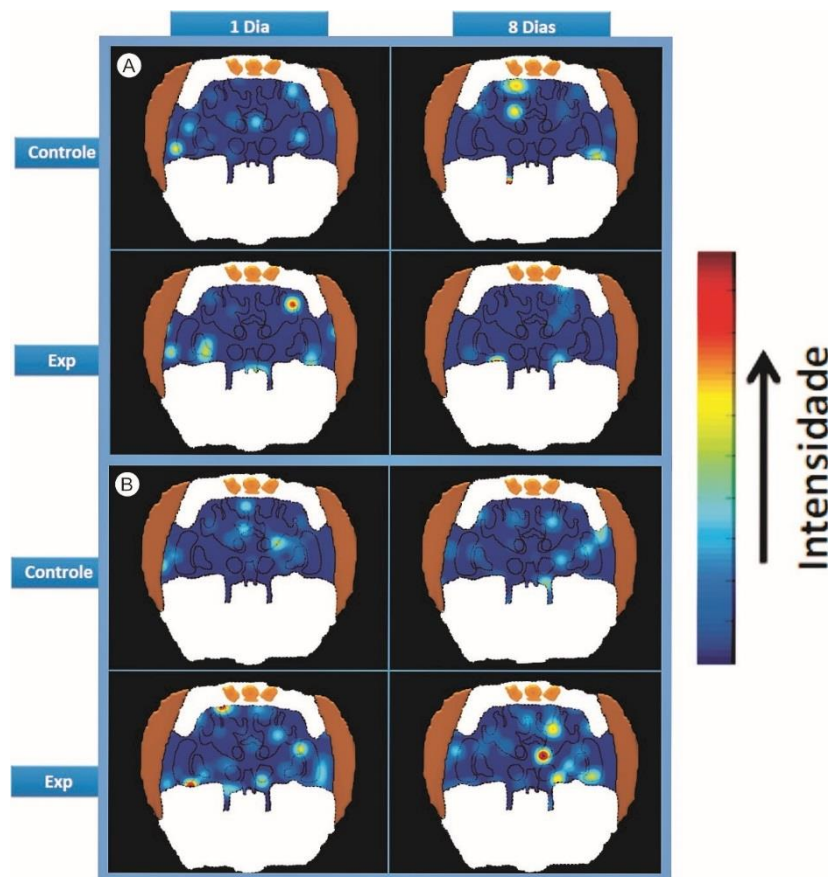
Figura 6: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de degeneração neuronal no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) proteína letal essencial para a vida; (B) precursor da proteína amiloide

As possíveis alterações na expressão relativa de proteínas relacionadas com a proteção ao estresse oxidativo foram também investigadas nesse estudo. A análise da citocromo P450 (*cytochrome P450 9e2*) mostrou que essa proteína teve uma expressão relativa levemente aumentada no primeiro dia de exposição ao imidacloprido. No oitavo dia e na presença do inseticida, pôde-se notar diminuição de expressão e de distribuição dessa proteína no cérebro (Fig. 7A). Já a glutathione S-transferase (*glutathione S-transferase*), com um dia de exposição ao inseticida, apresentou-se levemente mais dispersa pelo cérebro. Com oito dias de exposição, foi possível observar aumento mais evidente na expressão relativa dessa proteína, principalmente nas estruturas do lado esquerdo do cérebro (Fig. 7B).

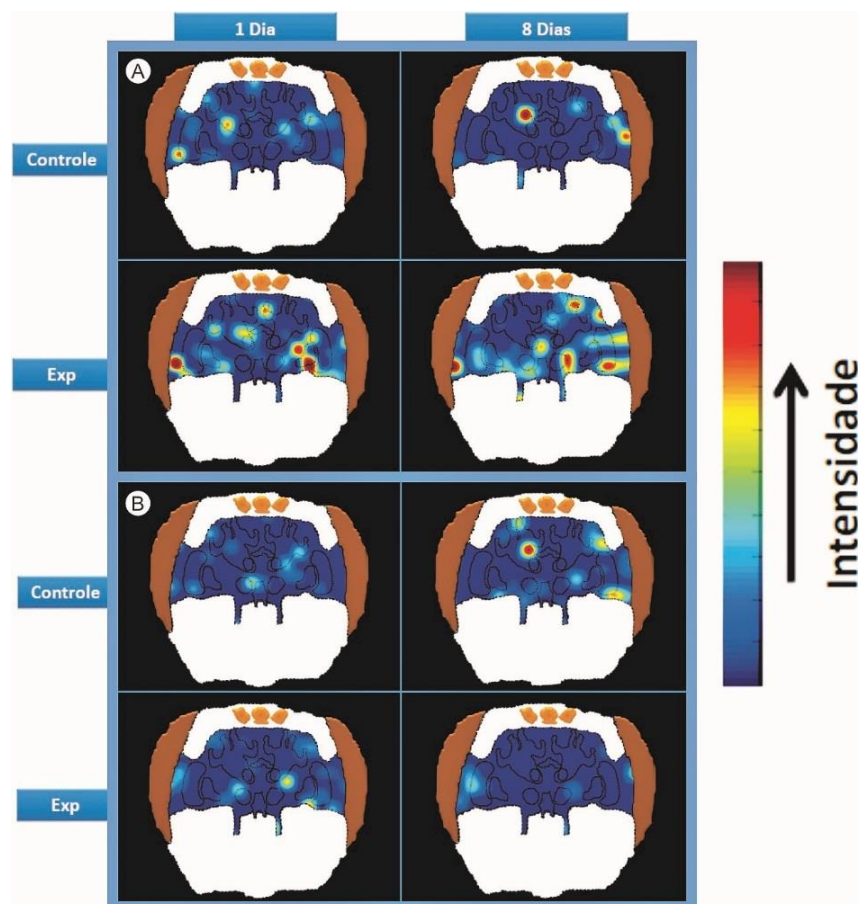
Figura 7: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de detoxificação no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) citocromo P450; (B) glutathione S-transferase

Duas proteínas foram classificadas como sendo indicativas de uma resposta das abelhas à ocorrência de danos no suprimento de oxigênio nas células: a proteína VEGF (*vascular endothelial growth factor receptor 3-like*) e a proteína dissulfeto isomerase (*protein disulfide-isomerase*). A proteína VEGF apresentou-se mais fortemente expressa nos grupos expostos ao imidacloprido, podendo-se observar pontos de intensa marcação nas imagens (Fig. 8A). Já a proteína dissulfeto isomerase apresentou diminuição em sua expressão relativa no oitavo dia de exposição ao inseticida (Fig. 8B). No primeiro dia, não foram observadas diferenças relevantes em sua expressão/distribuição no cérebro.

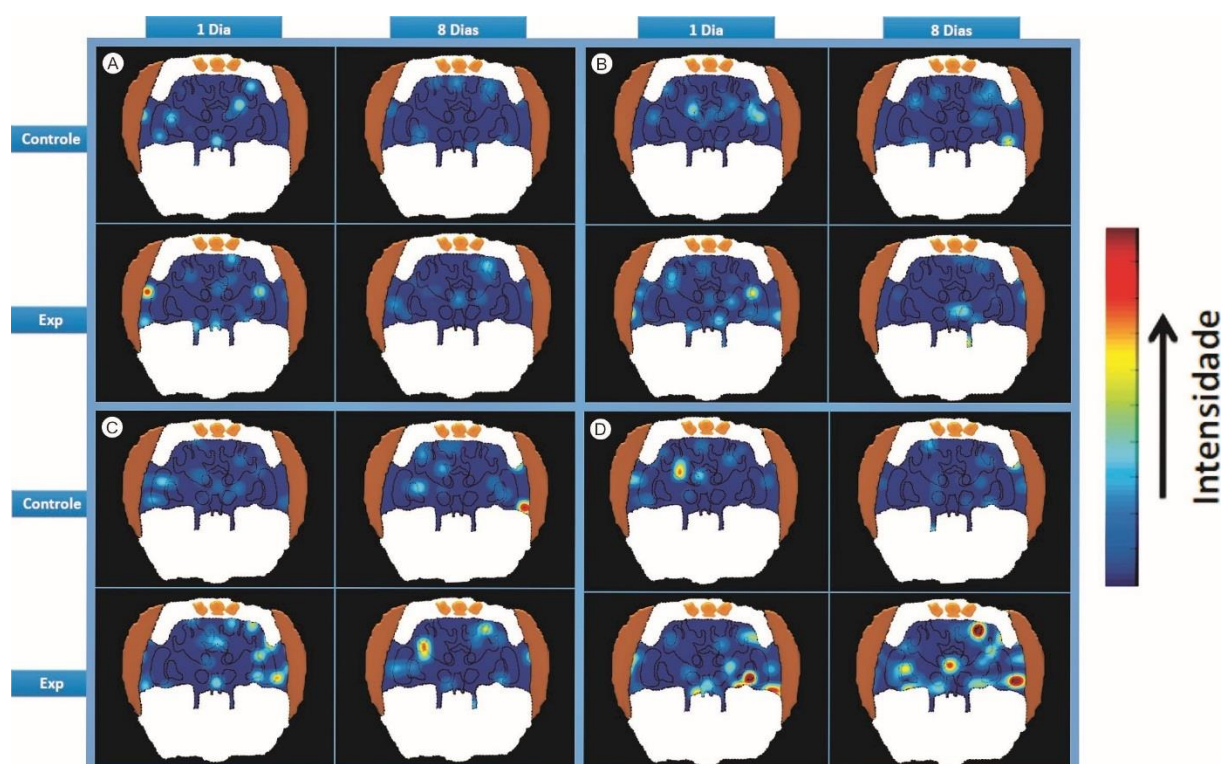
Figura 8: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de suprimento de oxigênio no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



(A) VEGF; (B) dissulfeto isomerase

Com relação às proteínas envolvidas na proteção contra danos causados pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) a CuZn superóxido dismutase (*CuZn superoxide dismutase*) e a catalase (*catalase*) não apresentaram alterações em suas expressões relativas (Fig. 9A e 9B) mostrando expressão/distribuição bastante semelhantes tanto no grupo controle quanto no grupo exposto (Fig. 9B). As imagens representando a distribuição das enzimas fosfolípido hidropéroxido glutathione peroxidase (PHGPx) (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*) (Fig. 9C) e tioredoxina peroxidase (*thioredoxin peroxidase 1*) (Fig. 9D) mostraram uma baixa expressão relativa desta proteína no cérebro dos indivíduos dos grupos controles, sendo que nos grupos expostos, notou-se um aumento da intensidade relativa de expressão desta proteína.

Figura 9: Expressão relativa das proteínas envolvidas com o processo de proteção contra ROS no cérebro de *A. mellifera* expostas ou não à concentração subletal de imidacloprido



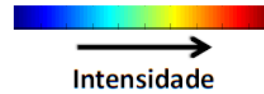
(A) CuZn superóxido dismutase; (B) catalase; (C) PHGPx; (D) tioredoxina peroxidase

Com o objetivo de sumarizar de forma objetiva o padrão de expressão de cada proteína analisada e discutida nos resultados acima, criou-se a tabela 3 mostrando-se a expressão relativa de proteínas em alguns dos neurópilos do cérebro de abelhas (corpos pedunculados, lobos ópticos e lobos antenais) decorrentes da exposição ao imidacloprido. O ponto de maior intensidade da proteína em cada estrutura foi representado na tabela a seguir.

Tabela 3: Relação das proteínas analisadas no cérebro de *A. mellifera*, com indicação de sub ou superexpressão nas diferentes estruturas do cérebro.

CP: corpo pedunculado; LO: lobo óptico; LA: lobo antenal.

● não expressa; ● pouco expressa; ● relativamente expressa; ● muito expressa

[illegible]

4.5 DISCUSSÃO

Foram criadas imagens moleculares para as proteínas identificadas nesse estudo, e a análise feita por MALDI-Imaging permitiu concluir que a distribuição espacial de algumas proteínas no cérebro de abelhas difere entre os grupos controle e experimental.

A neuroligina apresentou aumento relativo de expressão nos cérebros de indivíduos expostos ao imidacloprido e a neurexina mostrou-se mais expressa no oitavo dia de exposição. Geralmente, essas duas proteínas são estudadas conjuntamente, uma vez que ambas apresentam papéis importantes na regulação da transmissão de impulsos nervosos.

As neuroliginas são proteínas de adesão celular da membrana pós-sináptica que estão relacionadas com a formação e a manutenção das sinapses entre os neurônios (SCHEIFFELE et al., 2000), sendo identificadas tanto em invertebrados como em vertebrados (LISÉ; EL-HUSSEINI, 2006). As neurexinas são consideradas moléculas importantes no processo de reconhecimento entre neurônios (ULLRICH et al., 1995; MISSLER; SUDHOF, 1998). Mutações nos genes de neuroliginas e neurexinas foram encontradas em pacientes humanos com autismo (KANDEL et al., 2014).

O trabalho de Biswas et al. (2008) mostra que as neuroliginas e neurexinas são encontradas em tecidos cerebrais, especialmente nos corpos pedunculados, ao longo de todo o desenvolvimento da abelha *A. mellifera*, porém na maioria dos casos, nota-se um aumento de expressão nos adultos.

Alguns trabalhos mostram que o aumento na expressão de neuroliginas nos neurônios resulta em um maior número de sinapses nervosas (CHIH et al., 2004, BOUCARD et al., 2005), o que provavelmente deva ocorrer também com o aumento da expressão de neurexinas. Sabe-se também que os neonicotinoides são agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (nAChRs), (BUCKINGHAM et al., 1997). Esses receptores estão localizados nos neurônios pós-sinápticos e a ligação com as moléculas

de inseticida, que não são degradadas de maneira imediata pela acetilcolinesterase, faz com que os impulsos nervosos sejam transmitidos de maneira contínua (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004; GALLO et al., 2002). A ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina causa a hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, e pode causar tremores, convulsões, colapso e morte (FARIA, 2009).

Como o imidacloprido é agonista da acetilcolina e age nos receptores nicotínicos, foram criados mapas de distribuição deste receptor no cérebro de abelhas expostas ao inseticida e do grupo controle. Assim, observou-se evidente diminuição da expressão relativa dos receptores nicotínicos de acetilcolina em ambos os grupos expostos ao inseticida. A diminuição da expressão dos receptores observada neste estudo pode ser resultado de uma tentativa do organismo do inseto de reverter essa transmissão ininterrupta de impulsos nervosos, e o estado de hiperexcitação, conforme evidenciado pelas expressões relativas das proteínas descritas acima.

Os receptores nicotínicos de acetilcolina, além de estarem envolvidos nas sinapses nervosas, estão associados também ao processamento de informações e ao aprendizado e memória (GAUTHIER, 2010; ALBUQUERQUE et al., 1997). Onze subunidades foram descritas para esse receptor em *A. mellifera*, sendo nove subunidades α e duas subunidades β (JONES et al., 2006). O imidacloprido se liga a esses receptores, atuando mais especificamente nas subunidades α (BUCKINGHAM et al., 1997). Assim, a redução observada na expressão relativa desses receptores implicaria em danos nos processos cognitivos da abelha.

Tais evidências acerca do aumento de sinapses nervosas, decorrentes da presença do inseticida, são reforçadas também pela maior expressão relativa de outra proteína sinalizante deste processo: a sinapsina. Essas proteínas regulam a liberação de neurotransmissores (HILFIKER et al., 1999; KLAGGES et al., 1996) e são importantes para o ajuste fino de

formação de sinapses, plasticidade e remodelação (BENFENATI, 2011; HUMEAU et al., 2011).

A acetilcolinesterase, também alvo deste trabalho, apresentou sutil aumento de expressão relativa em indivíduos expostos ao imidacloprido. A principal função da acetilcolinesterase é hidrolisar a acetilcolina durante as sinapses, interrompendo assim, a transmissão sináptica no sistema nervoso colinérgico da maioria dos animais, incluindo os insetos (BELZUNCES; TOUTANT; BOUNIAS, 1988).

Essa proteína é conhecida por desempenhar diversas funções, atuando, por exemplo, na formação de sinapses (OLIVERA et al., 2003) e desempenhando importante papel nos processos de memória e aprendizado (GAUTHIER et al., 1992; SHAPIRA et al., 2001). O aumento observado em sua expressão indica provável resposta compensatória ao estado de hiperexcitação do sistema nervoso central da abelha resultante da ação do inseticida, já que a acetilcolinesterase é responsável pelo reestabelecimento do estado de repouso do sistema nervoso através da interrupção dos impulsos nervosos.

Os receptores do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) são responsáveis pela liberação de cálcio das reservas intracelulares, sendo ativados pelo aumento intracelular de IP3 (PIMENTEL, 2003). A ação do cálcio no sistema nervoso desencadeia a exocitose de vesículas sinápticas contendo neurotransmissores (NEHER; SAKABA, 2008), sendo importante deste modo para a manutenção de sinapses. Pelo fato de o receptor de IP3 estar envolvido com a sinalização de cálcio e estar presente preferencialmente nas células de Kenyon, conclui-se que ele desempenha um papel extremamente importante nos processos de aprendizado e memória (KAMIKOUCHI et al., 2008).

O aumento da expressão relativa dos receptores de IP3 pode estar relacionado com a busca pelo equilíbrio dos níveis de cálcio nos neurônios. A desregulação nos níveis de cálcio

está associada com os danos na transmissão de sinapses, já evidenciados por alterações na expressão de outras proteínas importantes neste processo.

Outra proteína identificada, também relacionada com a ocorrência de sinapses no cérebro é a endofilina. As endofilinas são proteínas presentes na membrana pré-sináptica, desempenhando um papel relevante para a formação de vesículas, principalmente nos processos de endocitose de vesículas sinápticas mediadas por clatrina. Em *Drosophila*, a endofilina está amplamente presente no sistema nervoso central e nos olhos (GUICHET et al., 2002; VERSTREKEN et al., 2002). Essa proteína apresentou redução em sua expressão relativa, principalmente no primeiro dia, evidenciando prováveis danos no tráfego vesicular que ocorre durante a transmissão de impulsos nervosos, e consequente prejuízo na liberação dos neurotransmissores.

A glutamina sintetase é uma proteína ligada à síntese da glutamina e à regulação do metabolismo celular do nitrogênio, sendo amplamente distribuída nos seres vivos e possuindo papel essencial para a manutenção da vida de microorganismos e animais (CURI, 2000; HISCOCK; PEDERSEN, 2002). No cérebro, essa proteína é extremamente importante no processo de redução de concentração de amônia (detoxificação), e também na regulação dos níveis de glutamato (ROWBOTTOM KEAST; MORTON, 1996; SUAREZ; BODEGA; FERNANDEZ, 2012).

O presente trabalho mostra um aumento considerável da expressão relativa da proteína glutamina sintetase, além de uma maior distribuição por toda a área do cérebro dos indivíduos submetidos ao imidacloprido. Considerando que a glutamina é precursora do glutamato, e que esse é um neurotransmissor importante em abelhas (LEBOULLE, 2011), esse resultado pode ser indicativo de uma resposta compensatória do sistema glutamatérgico frente aos danos causados no sistema colinérgico no cérebro de abelhas.

Dessa forma, as alterações na intensidade de expressão das proteínas descritas até o presente momento, podem significar um desbalanço no padrão de sinapses nervosas, possivelmente, um aumento na frequência dessas sinapses, contribuindo dessa forma, para o processo de hiperexcitação do sistema nervoso central, causado pelo neonicotinoide.

A proteína quinase C está relacionada com o processo de sinalização intracelular do inositol fosfato, desempenhando funções importantes em diversos eventos na célula como plasticidade neuronal, exocitose e endocitose de vesículas sinápticas, ciclo celular. Essa família de proteínas é ativada por dois tipos de sinalizadores intracelulares: o diacilglicerol (DAG) e o Ca^{2+} , produzido pela ação do IP3 (QUEIROZ, 2000). Os eventos bioquímicos relacionados com a formação de memória envolvem a ativação de cascatas específicas nos neurônios, sendo que a proteína quinase A, a proteína quinase dependente de GMPc, a proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina e a proteína quinase C, são algumas das proteínas envolvidas nessas cascatas (IZQUIERDO; MEDINA, 1997).

Dados mostrando o papel da proteína quinase C na aprendizagem associativa da abelha indicam que elas são importantes na fase inicial de formação de memória. Além disso, a atividade enzimática da proteína quinase C se mostrou mais elevada nos corpos pedunculados e nos corpos centrais de abelhas (KAMIKOUCHI et al., 2000). Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a expressão dessa proteína foi, de fato, mais elevada nas regiões dos corpos pedunculados, sendo essa característica, mais evidente nos cérebros de indivíduos expostos ao inseticida.

A exposição ao imidacloprido alterou o padrão de expressão da proteína Leonardo 14-3-3 com oito dias, sendo essa proteína sutilmente mais expressa pelo cérebro, especialmente nas regiões dos corpos pedunculados. Em *Drosophila*, essa proteína é altamente expressa nos corpos pedunculados em adultos, estando associada assim, na formação de aprendizado olfativo e memória (SKOULAKIS; DAVIS, 1996). Além disso, a proteína Leonardo 14-3-3

desempenha importante papel no controle da dinâmica das vesículas sinápticas (BROADIE et al., 1997) e na regulação da proteína quinase C (AITKEN et al., 1992; XIAO et al., 1995).

Com base então nas funções desempenhadas, e descritas acima, pelas proteínas Leonardo 14-3-3 e quinase C, e também considerando o papel que os corpos pedunculados (regiões que apresentaram maior intensidade dessas proteínas) desempenham no cérebro das abelhas, podemos sugerir que o composto testado altera a dinâmica sináptica e o aprendizado/memória dos indivíduos.

Outra proteína que também apresentou alteração na expressão relativa frente a exposição ao imidacloprido, especialmente no primeiro dia, foi a actina 5-C. Um estudo recente com *A. mellifera* mostra que microRNAs específicos interagem com a actina 5C afetando o processo de formação de memória e aprendizado (CRISTINO et al., 2014). O trabalho de Ganeshina et al. (2012) revela que a despolimerização da actina melhora a memória olfativa associativa em abelhas melíferas. Já em mamíferos ocorre o oposto, pois a formação e estabilização da memória requer a polimerização de actina (LAMPRECHT; LE DOUX, 2004). A expressão reduzida dessa proteína pode indicar uma diminuição no número de despolimerizações ocorrentes no cérebro de indivíduos submetidos ao neonicotinoide, sendo esta mais uma evidência de possíveis prejuízos nos processos que envolvem a constituição de memória.

A proteína transferrina, também apresentou alterações em sua expressão relativa na presença do imidacloprido. Dados mostram alta expressão de RNAm da transferrina nas neurópilas do cérebro e nos olhos de abelhas operárias campeiras, indicando assim, que essa proteína desempenha um papel importante na percepção visual dessas abelhas (KUCHARSKI; MALESKA, 2003; FAROOQUI, 2008). Uma das características observadas a partir da análise dessa proteína nos cérebros de indivíduos expostos ao imidacloprido foi

uma leve diminuição de sua expressão nos lobos ópticos na presença do inseticida, indicando assim, possíveis danos relacionados com a captação de estímulos visuais.

Algumas proteínas de choque térmico foram identificadas nesse estudo e tiveram suas expressões relativas no cérebro analisadas. As chaperonas, como são também conhecidas, têm a capacidade de desenovelar proteínas formadas, possibilitando um novo enovelamento, auxiliando a formação de conformações terciárias corretas, permitindo assim, que essas proteínas desempenhem suas funções adequadamente, além de reparar proteínas mal dobradas ou instáveis (LINDQUIST; CRAIG, 1988; FEDER; HOFMANN, 1999). O imidacloprido não alterou a expressão relativa das proteínas HSP 70 e 90 indicando que essa via não foi efetiva possibilitando assim a formação de proteínas danificadas.

A partir da análise da expressão da proteína letal essencial para a vida, notou-se aumento da expressão relativa e maior distribuição dessa proteína pelo cérebro. Essas proteínas auxiliam no controle e inibição da agregação da proteína β -amiloide (WILHELMUS et al., 2006a; 2006b).

A proteína precursora de amiloide analisada neste trabalho é processada, podendo gerar inúmeros fragmentos. A clivagem pela alfa-secretase cria fragmentos não relacionados com as placas senis, enquanto que a clivagem realizada pela beta e gama-secretase dão origem a β -amiloide, sendo este fragmento neurotóxico (BARBER, 2012). A proteína β -amiloide tem a capacidade de se agregar na parte extracelular dos neurônios formando as fibras amiloides (FRIDMAN et al., 2004; GANDY, 2005), principal componente da placa senil, estando diretamente relacionada com a degeneração neuronal de pacientes com Alzheimer (MASTER et al., 1985; SELKOE et al., 1986; MURAKAMI et al., 1998). Nossos resultados mostram evidente aumento de expressão da proteína precursora de amiloide, sendo este, juntamente com o aumento de expressão da proteína letal, um indício de ocorrência de degeneração neuronal resultante da presença do inseticida.

Em abelhas *A. mellifera*, três superfamílias de enzimas desempenham importante função no processo de desintoxicação, sendo elas glutathione S-transferases (GST), citocromo P450 (P450) e carboxilesterases (CLAUDIANOS et al., 2006).

A P450 está relacionada com a fase inicial da detoxificação (DENISON; WHITLOCK JR, 1995). Essa proteína tem como funções principais a metabolização de lipídeos, hormônios e feromônios, entretanto, ela está intimamente associada com a resistência dos insetos aos inseticidas pelo fato de metabolizarem também compostos químicos utilizados na agricultura (SNYDER et al., 1995; SCOTT; WEN, 2001; SHAH et al., 2011). A GST participa principalmente da segunda fase do processo de desintoxicação metabólica, participando também de processos contra danos celulares através do sistema de estresse oxidativo (BARATA et al., 2005; BABCZYNSKA et al., 2006; KETTERMAN, et al., 2011). Nos insetos, essa proteína é bastante conhecida por degradar compostos como pesticidas e inseticidas (ENAYATI et al., 2005).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o imidacloprido alterou mais efetivamente a expressão e a distribuição da proteína GST. Em ambos os dias analisados, essa proteína se mostrou mais expressa na presença do imidacloprido, sendo esse aumento mais evidente com oito dias, indicando assim, ativação do processo de proteção das células através da degradação do inseticida. Além disso, pode-se inferir também que o imidacloprido estimula mais a fase 2 da detoxificação.

Em vertebrados, o VEGF é uma proteína que induz a proliferação e migração de células endoteliais, sendo importante assim para a formação de novos vasos (angiogênese) e para a permeabilidade vascular (DVORAK et al., 1995; CONN et al., 1990; IZUTA et al., 2009). A hipóxia é considerada o principal estímulo para o aumento da expressão de VEGF (RISAU, 1997). Com base no papel desempenhado por essa proteína, pode-se sugerir que o

aumento de sua expressão relativa nos cérebros de abelhas seja um indício de problemas no suprimento de oxigênio no cérebro resultante da exposição ao inseticida.

A análise da expressão relativa da proteína dissulfeto isomerase corrobora a possível hipóxia causada pelo imidacloprido nos cérebros das abelhas. Apesar de atuar também como chaperona, prevenindo dobramentos proteicos incorretos (WANG; TSOU, 1993) e catalisando a formação de pontes dissulfetos durante a formação de proteínas (FREEDMAN et al., 1989), alguns dados mostram que ela tem sua expressão aumentada para evitar a apoptose após a hipóxia em células de glia, por exemplo (GRAVEN et al., 2002; SULLIVAN et al., 2003; TANAKA et al., 2000). O aumento então na expressão dessa proteína é extremamente importante na resistência a possíveis danos isquêmicos no cérebro (TANAKA et al., 2000). O imidacloprido, porém diminuiu a expressão da proteína dissulfeto isomerase, indicando assim, redução na resistência da célula à hipóxia.

As células possuem enzimas antioxidantes que têm como função primordial proteção contra efeitos prejudiciais causados pela presença de espécies reativas de oxigênios. Três proteínas se destacam nesse contexto: superóxido dismutase (que pode aparecer tanto na forma de Cu/Zn superóxido dismutase tanto como Mn superóxido dismutase), catalase e peroxidases (CORONA; ROBINSON, 2006; RADYUK et al., 2001). A expressão relativa da Cu/Zn superóxido dismutase e da catalase praticamente não foi afetada de acordo com nossos resultados.

Dentre as peroxidases, a fosfolípídio hidropéroxido glutathione peroxidase (PHGPx) e a thioredoxina peroxidase foram identificadas e então avaliadas. A primeira é uma proteína importante na proteção de danos oxidativos em membranas através da redução de hidroperóxidos de fosfolípídeos (FURSINI et al., 1995; WANG et al., 2010). Os resultados desse trabalho mostram que com um dia de exposição ao imidacloprido a expressão dessa proteína foi um pouco aumentada, e com oito dias, o aumento foi mais perceptível nas regiões

dos corpos pedunculados, indicando assim, que o inseticida em questão pode ter causado aumento de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, podem ter gerado danos nos fosfolípidos presentes nas membranas das células. O aumento na expressão relativa da (PHGPx) visava então, manutenção da integridade celular.

A exposição ao imidacloprido resultou também no aumento da expressão relativa da tioredoxina peroxidase principalmente na lóbula e no corpo pedunculado. Essa intensificação de expressão é indicativa também de mecanismos de defesa contra possível aumento de espécies reativas de oxigênio que o inseticida pode ter causado no cérebro, já que essa proteína está relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo (SANTOS et al., 2010) além de estar relacionada também com a inibição de processos de apoptose (ZHANG et al., 1997).

Com base então nas análises das proteínas estudadas nesse trabalho, pode-se inferir que provavelmente, como a exposição das abelhas ao inseticida ocorreu de maneira contínua, as proteínas envolvidas no processo de proteção celular não conseguiram evitar os danos causados pela $CL_{50/100}$ do imidacloprido. O aumento na expressão de proteínas indicadoras de degeneração neuronal evidencia esse detrimento. O processo de sinapses, alvo do imidacloprido, mostrou-se também afetado. A degeneração de parte dos neurônios no cérebro pode ter induzido um maior número de sinapses nos neurônios restantes ainda funcionais, como tentativa de manutenção de equilíbrio e recuperação.

Além disso, alterações em algumas proteínas revelaram estresse causado por espécies reativas de oxigênio e problemas no fornecimento de oxigênio nas células afetadas pelo composto. Todos esses danos resultantes da ação do inseticida podem prejudicar os processos de memória, aprendizagem e orientação. O fato de a maior parte das alterações referentes à expressão relativa das proteínas ocorrerem nas regiões dos corpos pedunculados, dos lobos ópticos e dos lobos antenais (estruturas relacionadas com o processamento de informações no

sistema nervoso, captação de estímulos visuais e recepção de estímulos olfatórios) juntamente com a modificação do padrão de expressão de proteínas envolvidas com a cognição confirmam essa hipótese.

Portanto, frente aos resultados aqui relatados, bem como a discussão apresentada acima pode-se aventar que as alterações proteicas causadas no cérebro devido à exposição ao imidacloprido levam a uma série de alterações bioquímicas que podem causar um desequilíbrio evidente nas funções neuronais, e consequentemente, na performance das operárias forrageiras, o que pode comprometer a colônia a longo prazo.

4.6 REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P. V. **Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais**. Embrapa. 2011.

AITKEN, A. et al. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 12, p. 498-501, 1992.

ALBUQUERQUE, E. X. et al. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 280, n. 3, p. 1117-1136, 1997.

BARATA, C. et al. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 74 p. 3-19, 2005.

BARBER, R. C. **The Genetics of Alzheimer's Disease**. Hindawi Publishing Corporation Scientifica, 2012.

BELZUNCES, L. P.; TOUTANT, J. P.; BOUNIAS, M. Acetilcolinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by triton X-114 phase separation. **Biochemical Journal**, v. 255, p. 463-470, 1988.

BENFENATI, F. Synapsins – Molecular function, development and disease. **Seminars in Cell & Development Biology**, v. 22, p. 377, 2011.

BISWAS, S. et al. Bridging the synaptic gap: neuroligins and neurexin I in *Apis mellifera*. **Plos one**, v. 3, n. 10, 2008.

BOUCARD, A. A. et al. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to α - and β -neurexins, **Neuron**, Cambridge, v. 48, p. 229–236, 2005.

BROADIE, K. et al. Leonardo, a Drosophila 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. **Neuron**, v. 19, n. 2, p. 391-402, 1997.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, p. 2685-2692, 1997.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF-MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.

CHAURAND, P. et al. Imaging mass spectrometry: principles and potentials. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 1, p. 92–101, 2005.

CHIH, B. et al. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins, **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 13, pp. 1471–1477, 2004.

CLAUDIANOS, C. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

CONN, G. et al. Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, n. 4, p. 1323-1327, 1990.

CORNETT, D. S. et al. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. **Nature Methods**, New York, v. 4, n. 10, p. 828-833, 2007.

CORONA, M.; ROBINSON, G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. **Insect molecular biology**, v. 15, n. 5, p. 687-701, 2006.

CRISTINO, A. S. et al. Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. **Nature communications**, New York, v. 5, 2014.

CURI, R. **Glutamina**: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 261 p.

DEAN, C. et al. Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. **Nature neuroscience**, New York, v. 6, n. 7, p. 708-716, 2003.

DENISON, M. S.; WHITLOCK, J.P. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 31, p. 18175-18178. 1995.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 146, n. 5, p. 1029, 1995.

EDWARDS, A. C. et al. Mutations in many genes affect aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. **BMC biology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2009.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect molecular biology**, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo Integrado de pragas florestais. **Ambiência**, Guarapuava, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FAROOQUI, T. Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. **Behavioral neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 433, 2008.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

FERREIRA, C. R. et al. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: II SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL. 2009, São Carlos. **Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. São Carlos, SP, 2009, p. 109-136.

FREEDMAN, R. B. et al. Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins. In: **Biochemical Society Symposium**. 1988. p. 167-192.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 31, p. 19-25, 2004.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 87, p. 245, 1990.

FURSINI M. et al. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in enzymology**, v. 252, p. 38-53, 1995.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GANDY, S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. **The Journal of clinical investigation**, New York, v. 115, n. 5, p. 1121-1129, 2005.

GANESHINA, O. et al. (2012). Depolymerization of actin facilitates memory formation in an insect. **Biology letters**, London, v. 8, n. 6, p.1023-1027, 2012.

GAUTHIER, M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. In: **Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors**. New York: Springer, 2010. p. 97-115.

GAUTHIER, M. et al. Modulatory effect of learning and memory on honey bee brain acetylcholinesterase activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 91-95, 1992.

- GESSEL, M. M.; NORRIS, J. L.; CAPRIOLI, R. M. MALDI imaging mass spectrometry: Spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. **Journal of Proteomics**, v. 107, p. 71-82, 2014.
- GRAVEN, K. K. et al. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 5, p. L996-L1003, 2002.
- GUICHET, A. et al. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1661-1672, 2002.
- HILFIKER, S. et al. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. **The Royal Society**, v. 354, p. 269-279, 1999.
- HISCOCK, N.; PEDERSEN, B. K.; Exercise-induced immunodepression: plasma glutamine is not the link. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p. 813-22, 2002.
- HUMEAU, Y. et al. Functional roles of synapsins: Lessons from invertebrates. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, p. 425-433, 2011.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.
- IZUTA, H. et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 9, n. 1, p. 45, 2009.
- JONES, A. K. et al. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. **Genome research**, v. 16, n. 11, p. 1422-1430, 2006.
- KAMIKOUCHI, A. et al. Concentrated expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. **Journal of Comparative Neurology**, v. 417, n. 4, p. 501-510, 2000.
- KAMIKOUCHI, A. et al. Preferential Expression of the Gene for a Putative Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor Homologue in the Mushroom Bodies of the Brain of the Worker Honeybee *Apis mellifera* L. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 242, n. 1, p. 181-186, 1998.
- KANDEL, E. et al. **Princípios de neurociências**. 5. ed. AMGH Editora, 2014, 1531 p.
- KETTERMAN, A. J.; SAISAWANG, C.; WONGSANTICHON, J. Insect glutathione transferases. **Drug metabolism reviews**, v. 43, n. 2, p. 253-265, 2011.
- KLAGGES, B. R. E. et al. Invertebrate Synapsins: A Single Gene Codes for Several Isoforms in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 3154-3165, 1996.
- KO, H. S.; UEHARA, T.; NOMURA, Y. Role of ubiquitin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35386-35392, 2002.

KOBAYASHI, M. et al. Differential microarray analysis of *Drosophila* mushroom body transcripts using chemical ablation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14417-14422, 2006.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**, v. 3, n. 1, p. 27, 2003.

KURZIK-DUMKE, U.; LOHMANN, E. Sequence of the new *Drosophila melanogaster* small heat-shock-related gene, lethal(2) essential for life [l(2)efl], at locus 59F4,5. **Gene**, v. 154, n. 2, p. 171–175, 1995.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2004.

LEBOULLE, G. Glutamate Neurotransmission in the Honey Bee Central Nervous System. In: GALIZIA, C. G.; EISENHARDT, D.; GIURF, M. (Eds.) **Honeybee Neurobiology and Behavior**, 2012.

LI, C. Y. et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25665-25671, 2000.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LISÉ, M. F.; EL-HUSSEINI, A. The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 16, p. 1833–49, 2006.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 6. ed. São Paulo: Nobel, 1983. 305 p.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2002.

MASTERS, C. L. et al. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid plaque cores and blood vessels. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 2757, 1985.

MISSLER, M.; SUDHOF, T. C. Neurexins: three genes and 1001 products. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 1, p. 20–26, 1998.

MURAKAMI, N. et al. Experimental brain injury induces expression of amyloid precursor protein, which may be related to neuronal loss in the hippocampus. **Journal of neurotrauma**, New York, v. 15, n. 11, p. 993-1003, 1998.

NEHER, E.; SAKABA, T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 861-872, 2008.

OLIVERA, S. et al. Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 96-106, 2003.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, New York, v. 405, p. 837-846, 2000.

PHILIP, N.; ACEVEDO, S. F.; SKOULAKIS, E. M. C. Conditional rescue of olfactory learning and memory defects in mutants of the 14-3-3 ζ gene leonardo. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 21, p. 8417-8425, 2001.

PIMENTEL, S. **Canais e Transportadores de Cálcio**. Fisiologia Porto, 2003

POHANKA, M. et al. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical papers**, v. 155, n. 3, p. 219-223, 2011.

PRATAVIEIRA, M. **Desenvolvimento de uma plataforma analítica para aquisição de imagens moleculares em tecidos animais**. 2013. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

PRATAVIEIRA, M. et al. MALDI imaging analysis of neuropeptides in the Africanized honeybee (*Apis mellifera*) brain: effect of ontogeny, **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 13, p. 3054–3064, 2014.

QUEIROZ, C. M. T. **Modulação da função neuronal por proteínas quinases e fosfatases**. 2000. Trabalho de Conclusão de Curso. UNIFESP, 2000.

RADYUK, S. N. et al. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1090-1100, 2001.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis, **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671-674, 1997.

ROMAN, G.; DAVIS, R. L. Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. **Bioessays**, v. 23, n. 7, p. 571-581, 2001.

ROWBOTTOM, D. G. et al. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, Auckland, v. 21, p. 80-97, 1996.

RYBAK, J. et al. The digital bee brain: integrating and managing neurons in a common 3D reference system. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 4, 2010.

SANTOS, L. D. et al. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n.8, p. 3867–3877, 2010.

SCHEIFFELE, P. et al. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axon. **Cell**, v. 101, n. 6, p. 657–69, 2000.

SCOTT, J. G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, p.958-967, abr. 2001.

SELKOE, D. J. et al. Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1820-1834, 1986.

SHAH, S. et al. Insecticide detoxification indicator strains as tools for enhancing chemical discovery screens. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 1, p. 38-48, 2011.

SHAPIRA, M. et al. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2001.

SKOULAKIS, E. M. C.; DAVIS, R. L. Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. **Neuron**, v. 17, n. 5, p. 931-944, 1996.

SNYDER, M. J. et al. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 321, n. 1, p. 13-20, 1995.

SUAREZ, I. et al. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 41, p. 123-142, 2012.

SUAREZ, I.; BODEGA, G.; FERNANDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 41, p. 123-142, 2012.

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

SULLIVAN, D. C. et al. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 47079-47088, 2003.

SUN, L. et al. **Decoding the brain transcriptome of the Eastern honey bee (*Apis cerana*) based on pyrosequencing**. EMBL, Gen Bank, DDBJ databases. 2011

TANAKA, S.; UEHARA, T.; NOMURA, Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10388-10393, 2000.

THANY, S. H. et al. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 255-262, 2003.

ULLRICH, B.; USHKARYOV, Y. A.; SUDHOF, T. C. Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. **Neuron**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 497-507, 1995.

VERSTREKEN, P. et al. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 101-112, 2002.

- WANG, C. C.; TSOU, C. L. Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 15, p. 1515-1517, 1993.
- WANG, M. et al. Identification and characterization of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes from *Apis cerana cerana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 75-83, 2010.
- WANG, X.; GUO, X.; XU, B. **Molecular cloning and characterization of a glutamine synthetase gene from *Apis cerana cerana***. EMBL, Gen Bank, DDBJ databases. 2012.
- WARE, G. W. **An introduction to insecticides**. Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona. 2003. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2009.
- WARHURST, P.; GOEBEL, R. Chemical poisoning of bees. In: **Bee Book: Beekeeping in the Warmer Areas of Australia**. Queensland: Department of Primary Industries, 1995, p. 179-214.
- WILHELMUS, M. M. M. et al. Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid- β protein aggregation and cerebrovascular amyloid- β toxicity. **Acta neuropathologica**, v. 111, n. 2, p. 139-149, 2006b.
- WILHELMUS, M. M. M. et al. Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 32, n. 2, p. 119-130, 2006a.
- WU, J. L. et al. **Nucleotide Sequence**. EMBL, Gen Bank, DDBJ databases. 2010.
- XIAO, B. et al. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. **Nature**, 1995.
- XIE, W. et al. Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA. **Autophagy**, v. 11, n. 9, p. 1623-1635, 2015.
- YAO, P. et al. Molecular cloning, expression and oxidative stress response of a mitochondrial thioredoxin peroxidase gene (AccTpx-3) from *Apis cerana cerana*. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 273-282, 2013.
- YOUNG, J. C.; OBERMANN, W. M. J.; HARTL, F. U. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18007-18010, 1998.
- ZHANG, P. et al. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 49, p. 30615-30618, 1997.

5 DISCUSSÃO GERAL

De maneira geral, foi possível observar que o imidacloprido, mesmo em uma concentração baixa, como no caso da $CL_{50/100}$ (0,014651 ng imidacloprido/ μ L de alimento) causou danos significativos no intestino e no cérebro das abelhas. Como o inseticida foi administrado oralmente, destaca-se a importância da investigação de possíveis alterações nas células do ventrículo. A análise ultraestrutural desse órgão mostrou alterações muito evidentes nas células dos indivíduos expostos ao inseticida principalmente, naqueles que foram expostos por um período mais longo (4 e 8 dias).

O intestino apresenta um grupo de proteínas relacionadas com o metabolismo de desintoxicação que são importantes na resistência aos xenobióticos (JOHNSON et al., 2006). Nossos resultados sugerem, entretanto, que essas enzimas não conseguiram evitar os danos causados pela concentração subletal de imidacloprido utilizada nesse estudo. Como a detoxificação não foi efetiva, o inseticida, ou seus metabólitos, conseguiu atingir seu alvo principal: o cérebro, comprometendo ainda mais a fisiologia e o comportamento dos indivíduos.

A análise das células de Kenyon mostrou a elevada citotoxicidade do composto para o cérebro. Muitas alterações foram observadas em decorrência da exposição ao imidacloprido, principalmente nos núcleos e nas mitocôndrias. Nessa organela, em específico, os danos foram notados logo no primeiro dia de exposição. Ela é extremamente importante para o desempenho de funções celulares, principalmente pelo fato de ser responsável pelo acúmulo de energia na forma de ATP (NELSON; COX, 2000; ALBERTS et al., 1997).

Entretanto, algumas disfunções na célula podem desencadear problemas nas mitocôndrias. A presença de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, pode resultar em danos irreversíveis no DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos de membrana e proteínas,

permeabilidade da mitocôndria, podendo causar comprometimento da cadeia respiratória, mutações no DNA, alterações nas vias de sinalização da célula e até mesmo, morte celular (KOWALTOWSKI et al., 2001; PAK et al., 2003; SEO et al., 2006; LARSSON, 2010).

A análise dos resultados obtidos pela técnica de MALDI-Imaging, para a distribuição de proteínas no cérebro, mostrou alterações na expressão de proteínas relacionadas com a proteção ao estresse oxidativo e aumento de espécies reativas de oxigênio, como a hidropéroxido glutathione peroxidase e a tioredoxina peroxidase, indicando assim, que esse fenômeno causado pelo imidacloprido, pode ter sido responsável pelos danos mitocondriais observados através da microscopia eletrônica de transmissão. Uma mitocôndria danificada apresenta maior vazamento de elétrons e maior produção de espécies reativas de oxigênio o que causa um ciclo vicioso (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2002).

O fipronil e o imidacloprido são considerados inseticidas inibidores da bioenergética mitocondrial, resultando em esgotamento de ATP (NICODEMO et al., 2014). O comprometimento das mitocôndrias está intimamente relacionado com danos no suprimento de oxigênio, indicados também por alterações na expressão de VEGF e dissulfeto isomerase.

Os neurônios são muito dependentes da função mitocondrial normal já que a liberação de neurotransmissores a partir de sinapses requer grandes quantidades de energia (CHEN; CHAN, 2006). As alterações na expressão e distribuição de proteínas envolvidas com a sinapse como neuroligina, neurexina, sinapsina, acetilcolinesterase, receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, glutamina sintetase, receptor nicotínico de acetilcolina e endofilina reforçam os prejuízos na transmissão de impulsos nervosos, processo alvo do imidacloprido, já que este atua como agonista da acetilcolina (BUCKINGHAM et al., 1997).

O aumento na expressão de proteínas específicas como proteína letal essencial para a vida e precursor da proteína amiloide acompanhado das alterações ultraestruturais observadas, principalmente no núcleo, evidencia grave comprometimento celular e degeneração neuronal.

Este comprometimento demonstra que não houve desintoxicação das células nervosas, já que as proteínas envolvidas neste processo, como a GST e a P450, não apresentaram grandes alterações em suas expressões relativas. Além disso, as HSPs que podem desempenhar papel protetivo nas células frente a diversos fatores estressantes, também não apresentaram alterações na expressão.

As alterações referentes à expressão relativa de proteínas foram geralmente observadas nas regiões dos corpos pedunculados, dos lobos ópticos e dos lobos antenais. Tais estruturas estão relacionadas com o processamento de informações no sistema nervoso, captação de estímulos visuais e recepção de estímulos olfatórios, respectivamente. Dessa forma, as alterações promovidas pelo imidacloprido estão relacionadas com prováveis danos na memória, aprendizagem e orientação, o que se confirma pela alteração na expressão de proteínas envolvidas nesses processos (proteína quinase C, Leonardo 14-3-3, actina 5C e transferrina), bem como pelas alterações ultraestruturais observadas nas células de Kenyon dos corpos pedunculados.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho conclui-se que:

- A CL_{50} do imidacloprido para abelhas *A. mellifera* africanizada é de 1,46 ng imidacloprido/ μ L de dieta;
- A $CL_{50/100}$ promoveu alterações ultraestruturais nas células do ventrículo e do cérebro;
- A $CL_{50/100}$ afetou a distribuição de proteínas específicas no cérebro de abelhas indicando presença de estresse químico, alterações no suprimento de oxigênio, em sinapses nervosas, degeneração neuronal e deficiência em processos de aprendizagem e memória;

- As regiões dos corpos pedunculados, dos lobos ópticos e dos lobos antenais foram as que mais apresentaram alterações de expressão relativa referentes às proteínas avaliadas, não havendo, entretanto, um padrão de alterações nessas estruturas, mesmo a partir da análise de proteínas pertencentes a um mesmo processo biológico.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1549 p.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, sideeffects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973-992, 2012.

BONMATIN, J. M. et al. LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2027-2033, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxico Fitossanitários (Agrofit)**. Brasília. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 set 2011.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, p. 2685-2692, 1997.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, 2012. p. 98.

CARVALHO, C. A. L.; MARCHINI, L. C.; ROS, P. B. Fontes de pólen utilizadas por *Apis mellifera* L. e algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 49-56, 1999.

CARVALHO, S. P. L. **Toxicidade de inseticidas neonicotinóides sobre psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e o parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae)**. 2008. 59 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.

CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. (Orgs.). **Agrotóxicos & Ambiente**. Brasília: Embrapa, 2004. p. 317.

CHAUZAT, M. P. et al. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 253-262, 2006.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 4, p. 453-459, 2006.

COSTA-NETO, E. M. O significado dos orthoptera (Arthropoda, Insecta), no estado de Alagoas. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 18, p. 9-17, 1998.

EARDLEY, C. et al. **Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice**. 1. ed. Pretoria: Agricultural Research Council (ARC), 2006. 88 p.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Sciences**, Glasgow, v. 64, p. 1099–1105, 2008.

EMBRAPA. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Jaguariúna, 2014. 35 p.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 29 ago. 2015.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B.M.; PEREIRA, J.O.P. (Eds.). **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004, p. 2-19.

FERNÁNDEZ, M. et al. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees alter solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 922, n. 1-2, p. 257- 65, 2001.

FOSSEN, M. **Environmental Fate of Imidacloprid, Environmental Monitoring Department**, California Department of Pesticide Regulation. Califórnia, 2006. p. 1-16.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GUEZ, D.; ZHANG, S. W.; SRINIVASAN, M. V. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 14, n. 4, p. 431-437, 2005.

GUIMARÃES, M. Colmeias às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e Europa. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v. 137, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3. ed., Oxford University Press, 2002.

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

JOHNSON, R.M. et al. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v. 99, n. 4, p. 1046-50, 2006.

KEARNS, C. A; INOUE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. Much remains to be learned about pollinators and plants. **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 5, p. 297-307, 1997.

KERR, W. E. et al. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n. 12, p. 20-41, 2001.

KERR, W. E. et al. Biologia comparada de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanas (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1970, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura, 1970, p. 151-185.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 373-93, 1999.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences**, Londres, v. 274, p. 303-313, 2007.

KOWALTOWSKI, A. et al. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters**, v. 495, n. 1-2, p. 12-15, 2001.

LARSSON, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 683-706, 2010.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 23, n. 1-3, p. 303-309, 2006.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a agricultura brasileira. In: Congresso Brasileiro de Apicultura e Meliponicultura, 17. 2008, Belo Horizonte , **Anais...** Belo Horizonte, 2008. 4p.

MALASPINA, O.; STORT, A. C. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 459-469, 1987.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C. C. C. **Mel brasileiro: Composição e normas**. Ribeirão Preto, 2004. 131 p.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 6. ed. São Paulo: Nobel, 1983. 305 p.

NAUEN, R.; BRETSCHEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v. 10, n. 6, p. 241-245, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. L. **Principles of Biochemistry**, New York: Worth Publishers, 2000. 1255 p.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, Londres, v. 49, p. 1-6, 2010.

NICODEMO, D. et al. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2070-2075, 2014.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446 p.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

PAK, J. W. et al. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. **Aging cell**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2003.

RODRIGUES, A. S. Até quando o etnoconhecimento sobre as abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) será transmitido entre gerações pelos índios Guarani da Aldeia Morro da Saudade, localizada na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil? **Sitientibus**, Feira de Santana, 2006.

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Versailles, v. 36, p. 71-83, 2005.

RUTTNER, F. **Biogeography and Taxonomy of Honeybees**. Berlin: Springer - Verlag, 1988. 284 p.

SCHMUCK, R. et al. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, p. 225-238, 2001.

SCHMUCK, R.; NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n. 1, p. 27-34, 2003.

SEO, A. Y. et al. Hepatic oxidative stress during aging: effects of 8% long-term calorie restriction and lifelong exercise. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 529-538, 2006.

SPADOTTO, C. A. et al. **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Documentos 42. EMBRAPA: CNPMA, Jaguariúna, 2004. 29 p.

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

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

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by Imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 11, p. 2482–2486, 2001.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 339-364, 2003.

van ENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, n. Supplement 1, p. S80-S95, 2010.

WESTIN, R. Sumiço de abelhas intriga cientistas. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, jul. 2007. Vida & Meio Ambiente, p. A-14.

YAMAMOTO, I.; CASIDA, J. E. **Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor**. Tokyo: Springer, 1999. 300 p.

YANG, E. C. et al. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 6, p. 1743-1748, 2008.