
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REGIANE ALVES DE OLIVEIRA

ANÁLISES MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICAS
DO VENTRÍCULO E DO CÉREBRO DE
OPERÁRIAS RECÉM EMERGIDAS DE *Apis*
mellifera L. (HYMENOPTERA, APIDAE)
TRATADAS COM THIAMETHOXAM.

REGIANE ALVES DE OLIVEIRA

**ANÁLISES MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICAS DO VENTRÍCULO E
DO CÉREBRO DE OPERÁRIAS RECÉM EMERGIDAS DE *Apis
mellifera* L. (HYMENOPTERA, APIDAE) TRATADAS COM
THIAMETHOXAM.**

Orientador: Prof Dr Osmar Malaspina
Co-Orientadora: Dr^a Thaisa Cristina Roat

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

**Rio Claro
2012**

595.799 Oliveira, Regiane Alves
O48a Análises morfológica e histoquímicas do ventrículo e do cérebro de operárias recém emergidas de Apis Mellifera L. (Hymenoptera, Apidae) tratadas com Thiamethoxam / Regiane Alves Oliveira. - Rio Claro : [s.n.], 2012
79 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Osmar Malaspina

Co-Orientador: Thaisa Cristina Roat

1. Abelha. 2. Apis mellifera. 3. Neonicotinóide. 4. Toxicidade. 5. Morfologia. 6. Histoquímica. I. Título.

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

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me dar força e coragem para seguir em frente a cada obstáculo encontrado nessa trajetória e, principalmente, por colocar pessoas tão especiais, insubstituíveis e imprescindíveis para me ajudar a concretizar este sonho.

Agradeço aos meus pais, Dirce e Leonides, que nunca me deixaram desanimar ou desistir deste sonho. Que independentemente das barreiras e das dificuldades sempre me encorajaram e me fizeram acreditar em mim mesma. Agradeço por acreditarem em mim sempre! Pelo apoio incondicional nas mais diversas empreitadas, mesmo que às vezes parecesse que eu estava voando – literalmente hahahaha – alto demais. Obrigada por estarem comigo neste momento, pra comemorar esta vitória e a conquista deste sonho que, sabem vocês, em alguns momentos pareceu impossível. Não tenho como expressar em palavras todo o amor e a gratidão que sinto por vocês. Esta é uma conquista NOSSA! Amo vocês! Obrigada!

Agradecimento especial a toda minha família, avós, tios, primos e agregados... Àqueles que estão sempre por perto, àqueles que nem tanto, mas que sempre torceram por mim e por essa conquista. Especialmente, não posso deixar de citar meus irmãos de coração, Giovan e Rafael. Giovan, obrigada por todos os momentos inesquecíveis nesses tantos anos de convivência, por todas as brincadeiras de infância e por até hoje, independente da distância estar ao meu lado! Você sempre foi e sempre será meu irmão, de verdade! Rafael, obrigada por me aturar nesse tempo que nos conhecemos, por cuidar de mim em muitos momentos em que eu não sabia o que fazer, por me abraçar todas as vezes que eu precisei, por me fazer rir tantas vezes descontroladamente, até mesmo quando eu era o alvo da piada, por ter sido meu vizinho, amigo e verdadeiro irmão durante todo esse tempo!

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Professor Dr Osmar Malaspina, por ter me recebido em seu grupo de pesquisas e por acreditar que eu poderia desenvolver este trabalho desde o meu primeiro ano nesta universidade. Você será sempre um grande exemplo de profissional a ser seguido. Obrigada! Agradeço a minha co-orientadora Dra Thaisa Cristina Roat, pela dedicação para me ensinar um pouquinho sobre o que é ser uma pesquisadora e, principalmente, pela paciência! Agradeço ainda a todos os companheiros de equipe do Centro de Estudos de Insetos Sociais por toda a ajuda e amizade, especialmente à Cynthia e Stephan, que se tornaram grandes amigos! Vocês salvaram minha pele mais vezes do que imaginam! Hahahahaha!!!

Agradeço à Unesp, Rio Claro, por me fornecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento dos meus trabalhos e para minha formação profissional. Aos professores e funcionários que possibilitam todos os dias o desenvolvimento de diversos trabalhos e a formação dos discentes aqui matriculados. À FAPESP, agência financiadora deste trabalho, por meio de uma bolsa de iniciação científica.

Meu puro e sincero agradecimento a TODOS os meus amigos! Àqueles que estiveram, estão e sempre estarão comigo! Àqueles que me apoiaram desde muito antes da universidade e àqueles que me ajudaram tanto nesta fase! Em especial as minhas lindas Aline Cecília, Aline Panontim, Émerin, Ana Carolina (Aninha), Suelen (Shu), Gabriela Pessenda, Júlia (Chapinha), Cris (Pulga), Dayene, Cynthia, Débora (Baby), Elisângela... E claro aos meus lindos Fábio, Giovan e Rafael! Hahahahaha Obrigada por todas as risadas e momentos inesquecíveis nestes anos! Obrigada até mesmo pelas brigas e puxões de orelha! Obrigada pelo apoio e por me ajudar SEMPRE! Vocês são demais!!! Independente da distância, eu amo vocês!!!

Obrigada aos amigos do Fórum de Socorro, especialmente a Luzia! Obrigada a Dona Sônia Coli, Alaérte e Fábio! Vocês sempre serão grandes exemplos para mim!

Obrigada família CBI 2009!!! Estes anos que passamos juntos me ensinaram muito, me proporcionaram muitas risadas, muitas farras, muitas fotos e, principalmente, a possibilidade de conhecer pessoas incríveis, ainda que muito diferentes de mim!

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são insetos sociais de grande importância econômica, seja ela direta, através do fornecimento de produtos apícolas, ou indireta, pela polinização de áreas de vegetação natural ou de áreas agrícolas. O uso constante de agrotóxicos, dentre eles o thiamethoxam, que é um inseticida pertencente à classe dos neonicotinóides, com ação neurotóxica, vem submetendo os polinizadores a situações de estresse severo, o que tem sido evidenciado pela queda na densidade das abelhas em várias partes do mundo. Diante destas considerações, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a toxicidade aguda do thiamethoxam para operárias recém emergidas *A. mellifera*, bem como investigar o efeito de dose subletal deste inseticida sobre o tempo de sobrevivência e sua citotoxicidade para o cérebro e intestino destas abelhas. Estabeleceu-se o valor da concentração letal 50 (CL₅₀) igual a 4,28 ng de thiamethoxam/μL de alimento e, a partir dela, as concentrações subletais deste inseticida, sendo elas, de 0,428 ng de thiamethoxam/μL (CL_{50/10}) e de 0,0428 ng de thiamethoxam/μL (CL_{50/100}), que foram utilizadas em bioensaios de intoxicação das abelhas, que visaram a coleta de cérebros e ventrículos para análise de possíveis alterações morfológicas (coloração com Hematoxilina-Eosina) e histoquímicas (técnica de Xylidine Ponceau e reações de Feulgen e PAS) causadas pela exposição ao thiamethoxam, e para o cálculo do tempo letal (TL₅₀) para as operárias. A duração dos experimentos foi de 8 dias após o início do fornecimento do alimento. Pôde-se concluir que o thiamethoxam é tóxico para operárias recém emergidas, causando, além de alterações morfológicas e histoquímicas nos órgãos analisados, alteração no tempo de sobrevivência dos indivíduos. Constata-se, desta maneira, que o inseticida thiamethoxam, mesmo em doses subletais, causa alterações tanto nos ventrículos, quanto nos cérebros das operárias recém emergidas, as quais podem se refletir em alterações fisiológicas e comportamentais que podem alterar o funcionamento de toda a colônia.

Palavras-chaves: *Apis mellifera*. Neonicotinóide. Toxicidade. Morfologia. Histoquímica. Corpos pedunculados. Lobos ópticos. Células digestivas. Células regenerativas.

ABSTRACT

Apis mellifera honeybees are social insects of economic importance, by providing honeybee products, and by the pollination of natural areas of vegetation or agricultural areas. The constant use of pesticides, including the thiamethoxam, which is an insecticide belonging to the class of neonicotinoids with neurotoxic action, is subjecting pollinators to situations of severe stress, which has been evidenced by the decrease in the density of honeybees in many parts of the world. By these considerations, the present study aimed to assess the acute toxicity of thiamethoxam for newly emerged workers of *A. mellifera*, and to investigate the effect of sublethal doses of this insecticide on the survival time and its cytotoxicity to the brain and midgut to the honeybees. It was established the value of the lethal concentration 50 (LC₅₀) equal to 4.28 ng thiamethoxam/μL of food and from it, the sublethal concentrations of 0.428 ng thiamethoxam/μL (CL_{50/10}) and 0.0428 ng thiamethoxam/μL (CL_{50/100}), which were used in bioassays of intoxication of the honeybees. After the bioassays the bees were dissected and the brain and midguts were collected to analyze possible morphological (staining with Hematoxylin-Eosin) and histochemical alterations (Xylidine Ponceau technique, and Feulgen and PAS reactions) caused by exposure to thiamethoxam, and to calculate the lethal time (LT₅₀) for the workers. The duration of the bioassays was 8 days after beginning of feeding. The results obtained showed that the thiamethoxam is toxic to newly-emerged workers of *A. mellifera*, causing changes in survival time of individuals. This study also shown that the thiamethoxam causes morphological and histochemical alterations on the midgut and brain of workers. These alterations may be reflected in physiological and behavioral changes that can modify the operation of the colony.

Keywords: *Apis mellifera*. Neonicotinoid. Toxicity. Morphology. Histochemistry. Mushroom bodies. Optical lobes. Digestive cells. Regenerative cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Coleta e acondicionamento dos indivíduos	15
3.2 Determinação da concentração letal (CL ₅₀) via ingestão de alimento contaminado	15
3.3 Bioensaios de intoxicação das abelhas	15
3.4 Determinação do tempo letal (TL ₅₀) através da ingestão de alimento contaminado	16
3.5 Coleta das abelhas após os períodos de intoxicação	16
3.6 Processamento do material para análises morfológicas e histoquímicas	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Determinação da CL ₅₀ e TL ₅₀ do thiamethoxam para operárias recém emergidas africanizadas de <i>A. mellifera</i>	18
4.2 Análises morfológicas e histoquímicas no cérebro.....	18
4.2.1 <i>Corpos Pedunculados</i>	18
4.2.2 <i>Lobos Ópticos</i>	19
4.3 Análises morfológicas e histoquímicas no ventrículo.....	20
4.3.1 <i>Células digestivas</i>	20
4.3.2 <i>Células regenerativas</i>	21
TABELAS	22
FIGURAS	25
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são consideradas insetos de interesse econômico por fornecer produtos apícolas de alto valor agregado, como mel, própolis, geléia real, cera e apitoxina, além de serem agentes polinizadores de diferentes espécies vegetais (CARVALHO; MARCHINI; ROS, 1999; KEVAN, 1999) contribuindo, portanto, para o equilíbrio das populações de plantas e animais que vivem em ecossistemas naturais e para a preservação da flora de uma região. Além disso, as abelhas são insetos que podem ser utilizados como bioindicadores em ecossistemas terrestres, sendo considerados de grande interesse em estudos ecotoxicológicos (BRAECKMAN; RAES, 1999; BRAECKMAN et al., 1999; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006), uma vez que o processo de bioacumulação de compostos tóxicos ambientais é comum nestes organismos (INTRONA; CAMPOBASSO; GOFF, 2001).

A importância da apicultura é conhecida já há muito tempo, especialmente pelas positivas repercussões que tem sobre a economia agrária em geral. Além disso, a polinização de muitas plantas cultivadas, realizadas pelas abelhas em seu trabalho diário, ocasiona uma fecundação muito mais rápida e completa que a realizada pela simples ação do vento ou de outros animais (TRINDADE et al., 2004).

A. mellifera representa 85% de todos os insetos polinizadores, sendo que 90% das plantas frutíferas são dependentes de sua ação para perpetuar-se. Dentre as 170 mil espécies de plantas polinizadas por abelhas, 40 mil são dependentes de *A. mellifera* (TAUTZ, 2008). De acordo com estimativas da Food and Agriculture Organization of the United Nations (2005), 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por algumas espécies de abelha, 19% por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por borboletas e 4% por pássaros. Segundo Willians (1995), um terço da alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização pelas abelhas, sendo que nos EUA, a espécie *A. mellifera* gera cerca de US\$ 14 bilhões todos os anos com sua atividade de polinização (MORSE; CALDERONE, 2000).

A produção de 84% das espécies vegetais cultivadas na Europa depende diretamente de insetos polinizadores, especialmente as abelhas (WILLIAMS, 1995). Klein et al. (2007) constataram que 87 culturas, o que corresponde a 70% dos 124 principais culturas utilizadas diretamente para consumo humano no mundo, são dependentes de polinizadores.

Segundo Gallai et al. (2009), em 2005, o valor das 46 principais culturas polinizadas por insetos representou 39% do valor da produção mundial, sendo que as culturas mais dependentes dos polinizadores são, respectivamente, hortaliças, frutas e óleos vegetais, os

quais possuem valor agregado relativamente alto, quando comparados a produtos que não dependem da polinização. É válido ressaltar que, em cada região do planeta, existe uma categoria de cultura que é altamente vulnerável a perda de polinizadores, sendo que estes índices podem variar de 22% a 94% (GALLAI et al., 2009), indicando a importância da presença dos polinizadores para a produção agrícola.

A agricultura vem apresentando profundas mudanças nas últimas décadas, que podem afetar diretamente os polinizadores. Com a finalidade de atender à crescente necessidade de produção de alimento, as extensões de áreas contínuas cultivadas vêm sendo ampliadas a cada dia em busca do aumento na produção agrícola. Em termos de qualidade e quantidade da produção de culturas, este crescimento da agricultura tornou-se cada vez mais dependente do uso de pesticidas eficientes na eliminação de pragas agrícolas. Prova disso, é o consumo anual de inseticidas no Brasil, que tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente ativo, são consumidas, anualmente no país, cerca de 130 mil toneladas (SPADOTTO et al., 2004). Isso representa um aumento no consumo de inseticidas de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou cerca de 78% nesse período (SPADOTTO et al., 2004).

As operárias campeiras por estarem em contato direto com o ambiente, são as mais expostas à este aumento do uso de agrotóxicos. No entanto, as abelhas nutridoras, recém-emergidas, e mesmo as larvas, que se alimentam de pólen e néctar contaminados, também estão expostas ao contato com os resíduos químicos provenientes da agricultura.

Deste modo, os agroecossistemas estão submetendo estes polinizadores a situações de estresse severo, causando graves consequências à apicultura (WARHURST; GOEBEL, 1995), fato evidenciado pela constante queda da densidade de abelhas nos arredores dos campos agrícolas em várias partes do mundo.

Recentemente, identificou-se um processo denominado “Colony Collapse Disorder” (CCD), que vem afetando consideravelmente as colônias. O problema se dá quando as abelhas campeiras, encarregadas de coletar o néctar e o pólen nas flores, não retornam às colmeias. A atividade de forrageamento é um fenômeno complexo que envolve uma sequência coordenada de ações como movimento, percepção sensorial, orientação, memória e regulação social (TREMOLADA et al., 2010). Acredita-se que todas essas ações possam ser afetadas por exposição, tanto a doses subletais de pesticidas, quanto a efeitos de toxicidade aguda (COLIN et al., 2004), de modo a colaborar com a CCD.

A CCD foi identificada inicialmente nos Estados Unidos, onde causou grandes prejuízos e, posteriormente, na Península Ibérica, Suíça e Alemanha. No Brasil, nas regiões

Sudeste e Centro-Oeste, o sumiço das abelhas começa a ser motivo de preocupação, pois acredita-se que no Brasil este fenômeno seja decorrente do intenso uso de inseticidas nas plantações, além de infecções por protozoários ou fungos (GUIMARÃES, 2007; WESTIN, 2007). Segundo Girolami et al. (2009), ácaros parasitas e vírus têm estado sob suspeita de influenciar o sumiço das abelhas, no entanto os pesticidas têm se mostrado estarem mais envolvidos com o fenômeno, com atenção voltada principalmente ao neonicotinoides, já que esta é a classe de inseticidas mais utilizada no mundo. Embora ainda não comprovados, os efeitos dos neonicotinoides em abelhas poderia ser coerente com os sintomas da CCD (GIROLAMI et al., 2009).

Carvalho et al. (2009) ressaltam que o uso de pesticidas é considerado o recurso tecnológico mais impactante para os polinizadores. O desaparecimento de várias espécies de abelhas dos campos de cultivo vem preocupando muitos pesquisadores no mundo todo. O debate gerado a partir da constatação da necessidade de conservação de polinizadores apontou para a importância do desenvolvimento de estudos sobre os agentes patogênicos e agroambientais que promovem, tanto de maneira direta como indireta, o declínio nas populações de abelhas.

Entre os pesticidas mais utilizados na atualidade, os neonicotinoides – inseticidas neurotóxicos – possuem considerável representatividade, devido a sua grande eficiência no combate aos insetos, substituindo os compostos organofosforados e metilcarbamatos, que tiveram seu uso diminuído devido às restrições de toxicidade e à diminuição de sua eficiência no combate às pragas agrícolas (TOMIZAWA; CASIDA; 2003). Assim, os neonicotinoides representam uma nova e distinta classe de inseticidas, a qual possui notáveis características químicas e biológicas (MAIENFISCH et al., 2001), como: alta sistemicidade nas plantas, efeito residual prolongado e variabilidade de métodos de aplicação, tornando estes produtos ferramentas ideais para a agricultura moderna (ELBERT et al., 2008).

Segundo Rancan, Rossi e Sabatini (2006), os neonicotinoides evoluíram da primeira – Imidaclopride – para a segunda geração – Thiamethoxam –, devido à necessidade de se encontrar pesticidas cada vez mais seletivos e eficientes para insetos alvo, sendo que o objetivo seria encontrar um produto que combinasse menor toxicidade para abelhas e insetos úteis que, inadvertidamente, entram em contato com pesticidas durante o forrageamento, ao mesmo tempo em que continuassem sendo seletivos aos receptores nicotínicos de insetos, sem afetar de maneira relevante os mamíferos.

Dentre os neonicotinoides, destaca-se o thiamethoxam, pertencente à segunda geração dos inseticidas resultantes da molécula de nicotina. O Thiamethoxam™

comercialmente vendido como Actara, fabricado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA e cuja fórmula bruta é $C_8H_{10}ClN_5O_3S$, vem sendo utilizado como inseticida em diversas culturas, como por exemplo, citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi, entre outras, atuando de modo sistêmico na planta e podendo ser aplicado via aérea ou terrestre. Possui grande eficiência no combate a pulgões, moscas e alguns besouros considerados pragas da agricultura. Segundo Elbert et al. (2008), o thiamethoxam é o segundo maior neonicotinoide em termos de vendas no mundo.

Estudos de campo e de laboratório indicam que o thiamethoxam é altamente tóxico para abelhas que produzem mel, tanto pelo contato quanto pela ingestão, ainda que a DL_{50} oral, dose que mata 50% das abelhas testadas, tenha aumentado de $18 \text{ ng.abelha}^{-1}$ para o imidacloprid, para $30 \text{ ng.abelha}^{-1}$ para o thiamethoxam (RANCAN; ROSSI; SABATINI, 2006).

Iwasa et al. (2004), em um estudo comparativo da toxicidade de alguns inseticidas neonicotinoides, determinaram que a DL_{50} do thiamethoxam é de $29,9 \text{ ng/abelha}$, indicando menor toxicidade que o imidacloprid, cuja DL_{50} foi de $17,9 \text{ ng/abelha}$. Já, Senn et al. (1998), estimaram uma DL_{50} para thiamethoxam de 24 ng/abelha .

El Hassani et al. (2008) realizaram testes comportamentais em *A. mellifera* européia quando expostas a dosagens do inseticida thiamethoxam e verificaram que esse neonicotinoide, em doses subletais, não afeta as funções cognitivas importantes para a sobrevivência do adulto e para a execução das tarefas da colônia. No entanto, os autores utilizaram dosagens muito baixas que não são consideradas tóxicas e, por isso, não excluíram a hipótese de que este inseticida possa causar alta mortalidade desses insetos. No trabalho desenvolvido por Hashimoto, Ruvolo-Takasusuki e Toledo (2003), os autores relatam que a maior toxicidade do thiamethoxam foi observada em operárias recém emergidas e que o grau de toxicidade foi diminuindo com o aumento da idade das operárias.

Os neonicotinoides são substâncias que agem diretamente nos sistema nervoso dos insetos provocando colapso do mesmo e morte do indivíduo. Sua grande utilização deve-se ao fato dos compostos apresentarem grande seletividade para atuar nos receptores nicotínicos dos insetos (EL HASSANI et al., 2008). Alguns trabalhos destacam, ainda, o fato de este produto possuir baixa toxicidade sobre mamíferos e peixes (NONDILLO et al., 2007), o que torna bastante aconselhável sua utilização na agricultura.

O colapso do sistema nervoso de insetos ocorre porque os neonicotinoides mimetizam a ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos durante as sinapses, no entanto não são degradados pela acetilcolinesterase (CHAPMAN, 2003). Assim, a ativação dos

receptores de acetilcolina é prolongada de modo anormal, causando hiperexcitabilidade nervosa devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos. Isso acaba por resultar na hipertatividade do sistema nervoso e seu posterior colapso.

Segundo Breer (1987) e Bicker (1999), a acetilcolina é um importante neurotransmissor no cérebro do inseto e os sítios de ligação da mesma são amplamente distribuídos no cérebro das abelhas, incluindo as áreas envolvidas nos processos de aprendizagem e memória, como os cálices do corpo pedunculado, de modo que, mesmo doses subletais de neonicotinoides podem afetar as abelhas. Assim, os efeitos, embora sutis, sobre a fisiologia ou sobre o comportamento das abelhas, podem acabar por afetar toda uma população (EL HASSANI et al., 2008).

Deste modo, sendo o thiamethoxam um pesticida neonicotinoide, torna-se importante verificar sua toxicidade para o sistema nervoso – mais especificamente no cérebro – de abelhas tratadas com o mesmo.

O cérebro das abelhas apresenta três massas ganglionares: o protocérebro, que é a maior região e mais complexa, constituída por corpos pedunculados, ponte protocerebral, corpo central e lobos acessórios, além de receber os nervos dos lobos ópticos; o deutocérebro, que apresenta os lobos antenais e os axônios motores e sensoriais das antenas; e o tritocérebro que contém os centros tritocerebrais (DALY; DOYEN; PURCELL III, 1998).

Os corpos pedunculados do protocérebro são também conhecidos como corpos de cogumelo (*mushroom bodies*). Essas estruturas são as mais volumosas e apresentam mais células e sinapses nos insetos com o comportamento e o aprendizado mais complexo, uma vez que esse é o centro mais importante de memória (DALY; DOYEN; PURCELL III, 1998). Essas estruturas são constituídas de numerosos neurônios (células Kenyon) que formam os cálices com seus dendritos e o pedúnculo e os lobos (α , β e γ) com seus axônios (FARRIS, 2005; FAHRBACH, 2006).

Além de verificar o efeito do thiamethoxam no sistema nervoso da abelha, é importante analisar a citotoxicidade deste inseticida para tecidos não alvo, que são atingidos durante a rota de metabolização deste composto. Assim, outro órgão chave para ser analisado é o intestino, já que este é um órgão de absorção, e, portanto, uma das primeiras fontes de contato com o inseticida, quando este é administrado oralmente.

O canal alimentar dos insetos é dividido em três regiões: estomodeu ou intestino anterior; mesêntero ou intestino médio (também chamado de ventrículo); e proctodeu ou intestino posterior.

O ventrículo é a região do tubo digestório na qual ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos da digestão, nutrientes e possíveis substâncias químicas, sendo, portanto, considerado o estômago funcional dos insetos. É um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco, no interior da cavidade abdominal (CRUZ-LANDIM, 2009). As células desta região apresentam, em geral, invaginações da membrana basal que contribuem no aumento da superfície de troca – seletiva – com a hemolinfa, e microvilosidades, as quais são responsáveis pelo aumento da superfície de absorção celular. São constantemente renovadas devido ao desgaste causado pela intensa atividade secretora e absorptiva e, às vezes, pela atividade excretora ou por fatores genéticos de envelhecimento celular. Estas células principais têm por função a produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos que ocorre na luz do ventrículo, além de absorverem produtos da hemolinfa que tem por finalidade, serem excretados.

O ventrículo de abelhas adultas possui três tipos de células: as células digestivas, as células endócrinas e as células regenerativas. As células digestivas são as principais constituintes do epitélio ventricular, que sintetizam enzimas digestivas e absorvem nutrientes (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996). Estas células possuem tempo limitado de vida, cuja duração é 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). As células endócrinas estão distribuídas de forma esparsa na parede do órgão e produzem hormônios (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996), os quais são liberados geralmente pela superfície basal para a hemolinfa, de modo que estas células desempenham um importante papel no controle do peristaltismo, na digestão, na diurese, no desenvolvimento e na reprodução dos insetos (CRUZ-LANDIM, 2009). As células regenerativas, responsáveis pela reestruturação do epitélio, estão agrupadas em ninhos localizados na porção basal do epitélio (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996). Para substituir as células mortas e deste modo recompor o epitélio do ventrículo, as células regenerativas sofrem um processo de diferenciação, do qual resulta uma nova célula digestiva que substituirá a célula que foi eliminada na luz do ventrículo (CRUZ-LANDIM, 1999).

Conforme o exposto é nítido a importância econômica de *A. mellifera* africanizada como agente polinizador, importante na manutenção da biodiversidade e auxiliando no aumento da produção de uma série de culturas, além da alta valorização de seus produtos. Entretanto, com o desenvolvimento e crescimento das atividades agrícolas, houve o aumento no uso de pesticidas para o controle de pragas, os quais podem atingir também insetos não

alvo, como as abelhas. Sendo assim, mostra-se a necessidade da realização de estudos que avaliem a toxicidade destes pesticidas à estes eficientes agentes polinizadores. No Brasil, pesquisas à respeito do impacto de inseticidas agrícolas sobre as abelhas africanizadas são pouco realizadas. Desta forma, a investigação de possíveis prejuízos morfológicos e histoquímicos em tecidos destas abelhas contribuirá para o entendimento dos efeitos resultantes da intoxicação por doses subletais do inseticida thiamethoxam, podendo gerar argumentos a fim de garantir a conservação destes importantes polinizadores.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Determinar por ingestão, a concentração letal 50 (CL₅₀) do thiamethoxam para operárias recém emergidas de *A. mellifera* africanizada;
- Analisar, após a exposição de abelhas recém-emergidas de *A. mellifera* a doses subletais de thiamethoxam:
 - O tempo de sobrevivência, através da determinação do tempo letal 50 (TL₅₀);
 - Os efeitos citotóxicos deste inseticida, sobre o cérebro e ventrículo, através de análises morfológicas e histoquímicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e acondicionamento dos indivíduos

As operárias recém emergidas de *A. mellifera* africanizadas foram coletadas diretamente das colônias, assim que saíram de seus alvéolos. As abelhas foram acondicionadas em caixas plásticas (11 x 11 x 7cm) forradas com papel-filtro. O número de operárias foi de 20 por caixa, tendo como base o trabalho de Betioli (1989). Os experimentos foram conduzidos em estufa tipo BOD, à temperatura de 32°C e umidade relativa de 60%.

3.2 Determinação da concentração letal (CL₅₀) via ingestão de alimento contaminado

Primeiramente, uma solução mãe de thiamethoxam foi preparada utilizando acetona como solvente, sendo que a partir desta preparou-se diversas outras diluições, desta vez usando como solvente o alimento sacarose + H₂O (1:1), abrangendo uma faixa de concentração de 1000 a 0,01 ng thiamethoxam/μL dieta. Ressalta-se que nestas diluições, a concentração máxima de acetona na dieta foi inferior a 1%. Um grupo de 60 abelhas recém emergidas foi dividido igualmente em três gaiolas descartáveis, sendo que, antes de fornecer o alimento contaminado, as mesmas passaram por um período de jejum de 2h. Após este período, uma alíquota média de 10 μL dieta/abelha contaminada por cada concentração foi fornecida em tampas plásticas, além de um chumaço de algodão umedecido com água. O tratamento controle recebeu somente o alimento puro, isento do inseticida thiamethoxam. Após 24 horas, o número de abelhas mortas por repetição/concentração foi contabilizado e os dados foram submetidos à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo log-logístico do pacote “*drc*” (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005) compilado pelo software R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004) para determinação da CL₅₀. De posse do modelo matemático, o valor da dose de referência CL₅₀ foi calculado e, a partir desse, o valor da dose subletal CL_{50/10} e CL_{50/100} que foram utilizados nos demais experimentos.

3.3 Bioensaios de intoxicação das abelhas

Após os ensaios preliminares para determinação da CL₅₀, os ensaios de intoxicação foram realizados utilizando o alimento preparado com sacarose + H₂O (1:1). Neste alimento

puro foi adicionada uma solução acetônica de thiamethoxam de modo que o alimento tivesse concentração final proporcional à concentração subletal 10 e 100 vezes inferior a CL_{50} ($CL_{50/10}$ e $CL_{50/100}$) obtida no item 3.2. Um grupo de 60 abelhas foi individualizado em 3 gaiolas descartáveis (20 abelhas/gaiola), sendo que a ingestão média diária/abelha do inseticida foi de $1/10$ e $1/100$ da CL_{50} , administradas através de 10 μ L de solução, estas a um décimo das concentrações finais. Nesses experimentos dois tipos de tratamento controle foram realizados, sendo que naquele sem solvente, foi fornecido somente o alimento de sacarose + H₂O (1:1); já no controle com solvente, adicionou-se o solvente acetona ao alimento sacarose + H₂O (1:1), na mesma proporção que usado nos grupos experimentais, nos quais existia a presença do inseticida thiamethoxam. Em todos os casos, o alimento foi fornecido em tampas plásticas, cobertas com uma tela para evitar que as abelhas morressem por afogamento, ou se contaminassem pelo inseticida por contato. Em todos os experimentos também, a água foi fornecida por meio de um chumaço de algodão embebido.

3.4 Determinação do tempo letal (TL_{50}) através da ingestão de alimento contaminado

A sobrevivência e o tempo letal (TL_{50}) das abelhas após a ingestão do alimento contaminado com thiamethoxam foram determinados de maneira semelhante como o descrito anteriormente (item 3.3). A cada 24 horas, o número de abelhas mortas por repetição/concentração ($1/10$ e $1/100$ da CL_{50}) foi contabilizado, até a morte do último indivíduo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de sobrevivência, usando o pacote *Survival* (THERNEAU, 2011) do *software* R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, realizou-se a análise de contraste para verificar a semelhança entre os produtos testados e a formação de grupos congêneres. Também foram calculados os tempos letais 50 (TL_{50}) para cada grupo formado.

3.5 Coleta das abelhas após os períodos de intoxicação

A coleta dos espécimes para os estudos de alterações morfológicas e histoquímicas no cérebro e no ventrículo foi baseada no período de exposição das abelhas ao thiamethoxam, sendo ele 1, 3, 5 e 8 dias após o início do fornecimento do alimento contaminado. Juntamente a estas coletas, foram realizadas coletas de abelhas dos grupos controle com solvente e sem solvente.

3.6 Processamento do material para análises morfológicas e histoquímicas

Para análise das alterações morfológicas e histoquímicas causadas pelo inseticida thiamethoxam no cérebro e no ventrículo de *A. mellifera* foram coletados pelo menos cinco indivíduos de cada classe, nos dias acima indicados (item 3.5). Os cérebros e ventrículos foram dissecados em solução salina tamponada para insetos (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L), imersos em fixadores específicos para a análise morfológica (paraformaldeído a 4%), de proteínas (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M - pH 7,4), de polissacarídeos e de cromatina (formaldeído 40% e ácido acético glacial em solução aquosa saturada de ácido pícrico - Bouin aquoso). Em seguida foi feita uma lavagem com o mesmo tampão e o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%), cada banho com duração de duas horas. O material foi então colocado em resina de embebição por 3 dias e incluído em historesina Leica, sendo, posteriormente, submetido à microtomia com espessura de 5µm.

Posteriormente, o material fixado em paraformaldeído foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para análise morfológica ou submetido à técnica de Xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). O material fixado em bouin aquoso foi submetido à reação de PAS (Ácido Peridódico – Schiff) para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros (MCMANUS, 1946), e à reação de Feulgen para análise do nível de compactação cromatínica (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924).

As lâminas foram analisadas em microscópio (Olympus BX51) e as fotomicrografias adquiridas por meio de uma câmera digital (Olympus DP-71) e um computador Dell, acoplados ao microscópio. Para aquisição das imagens foi utilizado o Software DP Controller.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da CL_{50} e TL_{50} do thiamethoxam para operárias recém emergidas africanizadas de *A. mellifera*

O valor obtido para a CL_{50} de operárias recém emergidas foi de 4,28 ng de thiamethoxam/ μ L de alimento (Figura 1). De posse desses valores, calcularam-se os valores das concentrações subletais ($CL_{50/10} = 0,428$ ng ingrediente ativo/ μ L dieta e $CL_{50/100} = 0,0428$ ng i.a./ μ L dieta), que foram utilizadas nos ensaios de intoxicação das abelhas.

A partir da obtenção dos valores das concentrações subletais, realizou-se um ensaio para determinação da sobrevivência das abelhas (Figura 2). Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos controle sem solvente, controle com solvente e $CL_{50/100}$, apresentando um TL_{50} de 9,59 dias. No entanto, o grupo de abelhas do tratamento com thiamethoxam na concentração $CL_{50/10}$ apresentou significativa diminuição na sobrevivência (41,2%) com um TL_{50} de 6,79 dias.

4.2 Análises morfológicas e histoquímicas no cérebro

A análise dos resultados morfológicos e histoquímicos realizados no cérebro dos grupos controle e expostos mostrou alterações evidentes nos corpos pedunculados (Figura 3) e lobos ópticos (Figura 4). Já os lobos antenais das abelhas expostas ao inseticida não apresentaram diferenças em relação aos grupos controle.

4.2.1 *Corpos Pedunculados*

Através das análises morfológicas, obtidas pela coloração com HE, foi possível observar a presença de células de Kenyon intensamente coradas, sugerindo a presença de células condensadas na concentração $CL_{50/100}$, à partir do 3º dia. Já na concentração igual a $CL_{50/10}$, esta alteração foi perceptível à partir do 5º dia de análises (Tabela 1). Isso evidencia que, mesmo que a $CL_{50/100}$ não apresente diferenças em relação ao tempo de sobrevivência em relação aos grupos controle, a mesma se mostra citotóxica para os corpos pedunculados. Nos grupos controle não foram observadas alterações morfológicas (Figura 3A).

Em relação às análises histoquímicas dos grupos tratados comparados aos grupos controle (Tabela 2, Figura 3C), a técnica de Xylidine Ponceau possibilitou a visualização células de Kenyon com aumento da intensidade de coloração. Isso pode indicar tanto a compactação celular, quanto o aumento de síntese proteica, desde o 1º de contato dos indivíduos com a dose CL_{50/10} e somente a partir do 3º dia para a CL_{50/100} (Figura 3D). Em ambas as exposições, à partir do 5º dia, a intensidade de coloração das células diminuiu, o que poderia indicar que, o aumento da síntese proteica ocorrente nos primeiros contatos das células com o thiamethoxam, seria um mecanismo de proteção celular.

Já a reação de PAS (Figura 3E) indicou a presença de grânulos de polissacarídeos nos corpos pedunculados, sem diferenças entre os tratamentos controle e os grupos expostos às doses subletais (Tabela 1).

A reação de Feulgen revelou coloração fraca dos núcleos das células dos corpos pedunculados sem diferenças de intensidade entre os grupos expostos e controle (Tabela 1, Figura 3F).

4.2.2 Lobos Ópticos

A partir do 1º dia de exposição com a concentração CL_{50/100} foram visualizadas, através da análise morfológica, células fortemente coradas, possivelmente devido à condensação celular (Tabela 1, Figura 4B). Nos lobos ópticos de abelhas expostas à concentração CL_{50/10} não foram evidenciadas células com coloração mais intensa, bem como nos grupos controle (Figura 4A). Este resultado mostra que, assim como para os corpos pedunculados, o thiamethoxam, na dose subletal igual à CL_{50/100}, é citotóxico para os lobos ópticos.

A técnica de Xylidine Ponceau mostrou um aumento de intensidade de coloração tanto na CL_{50/10}, quanto na CL_{50/100}, do 1º até o último dia de análise (Figura 4D). Nos grupos controle não foram verificadas alterações (Figura 4C).

A reação de PAS indicou também a presença de grânulos de polissacarídeos em todas as idades coletadas, do mesmo modo que nos corpos pedunculados. Não houve diferenças entre os grupos controle e os grupos expostos às doses subletais (Tabela 1, Figura 4E).

A reação de Feulgen revelou coloração fraca dos núcleos das células (Figura 4F), sem diferenças de intensidade entre os grupos expostos e controle, também do mesmo modo que nos corpos pedunculados (Tabela 1).

4.3 Análises morfológicas e histoquímicas no ventrículo

4.3.1 Células digestivas

As análises morfológicas das células digestivas do ventrículo de *A. mellifera* (Tabela 2, Figuras 5A e 5B) mostraram vacuolização citoplasmática, aumento de secreção apócrina e aumento de eliminação celular nos dois grupos que foram expostos às diferentes concentrações do inseticida thiamethoxam. A presença de grande quantidade de vacuolização nos grupos expostos (CL_{50/10} e CL_{50/100}) ocorreu desde o 1º dia de análise, mas com tendência à diminuição com o decorrer do tempo, de modo que, no último dia de análise não havia mais indícios de vacuolização. Tanto o aumento de secreção apócrina, quanto o aumento de eliminação celular são notadas com 1 dia na CL_{50/100} e com 3 dias na CL_{50/10}, aumentando, em ambos os casos, ao longo do tempo de análise (Tabela 2).

As células digestivas apresentaram citoplasma com regiões negativas para a técnica histoquímica de Xylidine Ponceau (Tabela 2, Figuras 5C e 5D), indicando vacuolização citoplasmática nas duas concentrações de inseticida utilizadas, logo no 1º dia de exposição. Com 3 e 5 dias de exposição, as colorações do citoplasma das células digestivas se igualam ao controle e, depois de 8 dias, as células apresentam, novamente, regiões negativas à técnica. As vesículas positivas foram notadas em maior número em ambas as concentrações de inseticida testadas, quando comparadas aos grupos controle desde o 1º dia. Neste caso também ocorreu diminuição destes sinais com o decorrer do tempo, de modo que os grupos tratados se igualaram com os grupos controle no último dia analisado. A reação permitiu ainda, a visualização de halos pericromáticos nas células do epitélio, entretanto isso foi encontrado somente na CL_{50/100} e a partir do 5º dia de exposição.

A reação de PAS (Tabela 2, Figuras 5E e 5F) resultou em regiões de citoplasma negativo em todos os grupos e dias analisados nas células digestivas, demonstrando que não há presença de polissacarídeos. Houve ausência de vesículas positivas, e presença de grânulos positivos ao PAS principalmente na região apical do epitélio intestinal e na luz do ventrículo. A presença de grânulos é maior nos tratamentos com as concentrações subletais de inseticida (CL_{50/10} e CL_{50/100}), quando comparados aos grupos controle.

Com a reação de Feulgen (Tabela 2, Figuras 5G e 5H) os núcleos das células digestivas apresentaram-se fracamente corados, não demonstrando sinais de compactação cromatínica.

4.3.2 Células regenerativas

As células regenerativas (Tabela 3, Figura 6) mostraram-se dispostas em ninhos, na base do epitélio ventricular. Através da coloração com HE (Figuras 6A e 6B), foi possível visualizar citoplasma corado, cromatina descondensada e presença de vários nucléolos. No entanto, no grupo de abelhas expostas à CL_{50/10} foi possível observar vacuolização citoplasmática das células regenerativas, com 1 e 5 dias de análise, e com 3 dias no grupo exposto à CL_{50/100}. Além disso, outra característica peculiar foi diminuição do número de células regenerativas presentes nos ninhos nos grupos expostos, sendo que, naquele exposto à CL_{50/10}, esta diminuição ocorreu logo no 1º dia de exposição, enquanto que, no grupo relativo à CL_{50/100}, isso foi observado após 3 dias de exposição.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos através das análises histoquímicas que foram empregadas para as células regenerativas. A técnica de Xylidine Ponceau, tanto para o grupo exposto à CL_{50/10}, quanto para a CL_{50/100}, mostrou células regenerativas com regiões de citoplasma negativas à coloração, evidenciando intensa vacuolização citoplasmática, (Figura 6D), diferentemente dos grupos controle (Figura 6C). A reação de PAS (Figuras 6E e 6F) não evidenciou diferenças entre os grupos controle e expostos às doses subletais, não havendo também presença de grânulos positivos à mesma nas células regenerativas. Considerando-se a reação de Feulgen (Figuras 6G e 6H) as células regenerativas tiveram seus núcleos fracamente corados nas análises de todos os grupos.

TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises morfológica e histoquímicas realizadas nas estruturas cerebrais de *A. mellifera* africanizadas, submetidas aos bioensaios de exposição a doses subletais de thiamethoxam.

Tratamento	Morfologia		Histoquímica						
	Corpos Pedunculados	Lobos Ópticos	Corpos Pedunculados			Lobos Ópticos			
	CC	CC	XYP	PAS	FEU	XYL	PAS	FEU	
1 dia	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	CL ₅₀ /10	-	-	+++	+	+	++	+	+
	CL ₅₀ /100	-	+	+	+	+	+++	+	+
3 dias	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	CL ₅₀ /10	-	-	+++	+	+	++	+	+
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+++	+	+	+++	+
5 dias	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	CL ₅₀ /10	+	-	+	++	+	+	++	+
	CL ₅₀ /100	+	+	+	++	+	+	++	+
8 dias	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	CL ₅₀ /10	+	-	+	++	+	+	++	+
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+	+	+	++	+

Fonte: Elaborado pelo autor

(+) Presença de alteração; (++) Alteração moderada presente; (+++) Alteração extrema presente; (-) Alteração ausente; (CL₅₀) Concentração letal; (C-) Controle sem acetona; (C+) Controle com acetona; (CC) Células condensadas; (FEU) Reação de Feulgen; (XYP) Técnica de Xylidine-Ponceau; (PAS) Reação de PAS.

Tabela 2: Resultados das análises morfológica e histoquímicas realizadas nas células digestivas do ventrículo de *A. mellifera* africanizadas, submetidas aos bioensaios de exposição a doses subletais de thiamethoxam.

	Tratamento	Morfologia			Histoquímica						
					XYP			PAS			FEU
		VA	SA	CE	CIT	PV	HP	CIT	PG	PV	CC
1 dia	C-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	CL ₅₀ /10	++	-	+	-	++	-	-	++	-	-
	CL ₅₀ /100	++	+	++	-	++	-	-	+	-	-
3 dias	C-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	C+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	CL ₅₀ /10	+	+	++	+	++	-	-	+	-	-
	CL ₅₀ /100	+	+	++	+	++	-	-	++	-	-
5 dias	C-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	C+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	CL ₅₀ /10	+	+	++	+	++	-	-	+	-	-
	CL ₅₀ /100	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-
8 dias	C-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	C+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	CL ₅₀ /10	-	++	+++	-	+	-	-	++	-	-
	CL ₅₀ /100	-	++	+++	-	+	+	-	++	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor

(+) Presença de alteração; (++) Alteração moderada presente; (+++) Alteração extrema presente; (-) Alteração ausente; (CL₅₀) Concentração letal; (C-) Controle sem acetona; (C+) Controle com acetona; (FEU) Reação de Feulgen; (XYP) Técnica de Xylidine-Ponceau; (PAS) Reação de PAS; (VA) Vacuolização; (SA) Secreção apócrina; (CE) Células eliminadas; (CIT) Citoplasma; (CC) Cromatina compactada; (HP) Halo pericromatínico; (PG) Presença de grânulos; (PV) Presença de vesículas.

Tabela 3: Resultados das análises morfológica e histoquímicas, realizadas nas células regenerativas dos ninhos de *A. mellifera* africanizadas, submetidas aos bioensaios de exposição a doses subletais de thiamethoxam.

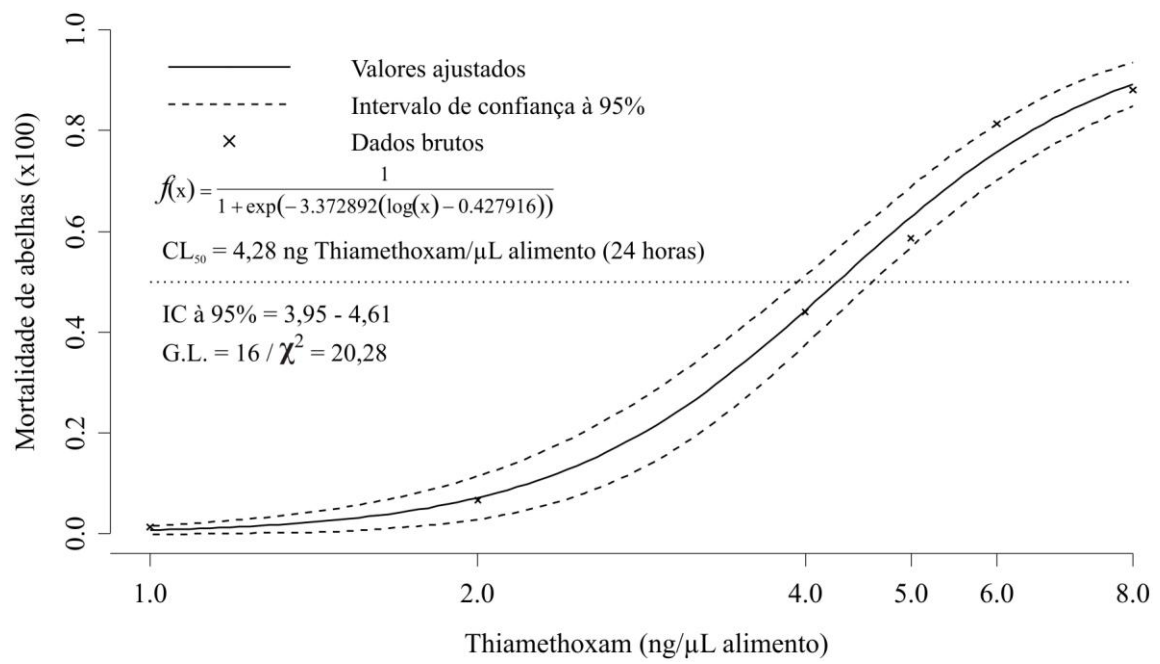
Tratamento		Morfologia		Histoquímica			
				XYL	PAS		FEU
		VA	DC	CIT	CIT	CC	PG
1 dia	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
	CL ₅₀ /10	+	+	-	-	-	-
3 dias	CL ₅₀ /100	-	-	-	-	-	-
	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
5 dias	CL ₅₀ /10	-	+	-	-	-	-
	CL ₅₀ /100	+	+	-	-	-	-
	C-	-	-	+	-	-	-
8 dias	C+	-	-	+	-	-	-
	CL ₅₀ /10	+	-	-	-	-	-
	CL ₅₀ /100	-	-	+	-	-	-
8 dias	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
	CL ₅₀ /10	-	-	-	-	-	-
	CL ₅₀ /100	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor

(+) Presença de alteração; (++) Alteração moderada presente; (+++) Alteração extrema presente; (-) Alteração ausente; (CL₅₀) Concentração letal; (C-) Controle sem acetona; (C+) Controle com acetona; (FEU) Reação de Feulgen; (XYP) Técnica de Xylidine-Ponceau; (PAS) Reação de PAS; (VA) Vacuolização; (DC) Diminuição no número de células; (CIT) Citoplasma; (CC) Cromatina compactada; (PG) Presença de grânulos.

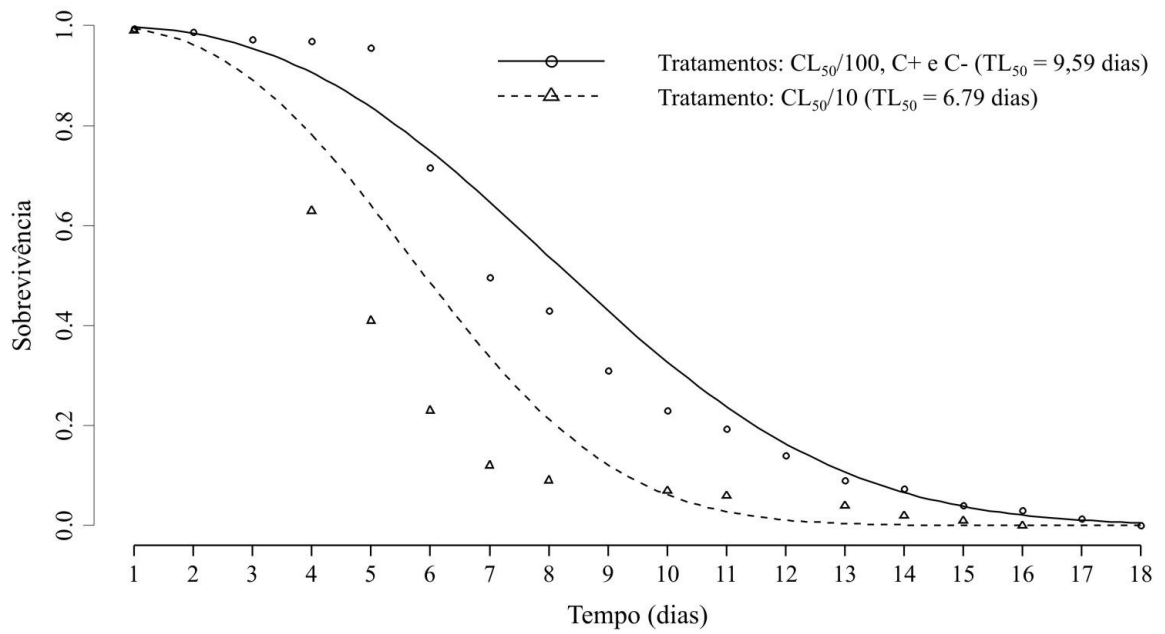
FIGURAS

Figura 1 - Mortalidade de operárias recém emergidas de *A. mellifera* em função da ingestão de alimento contaminado com doses do inseticida thiamethoxam variando de 1 a 8 ng/ μ L dieta.



Fonte: Elaborado pelo autor

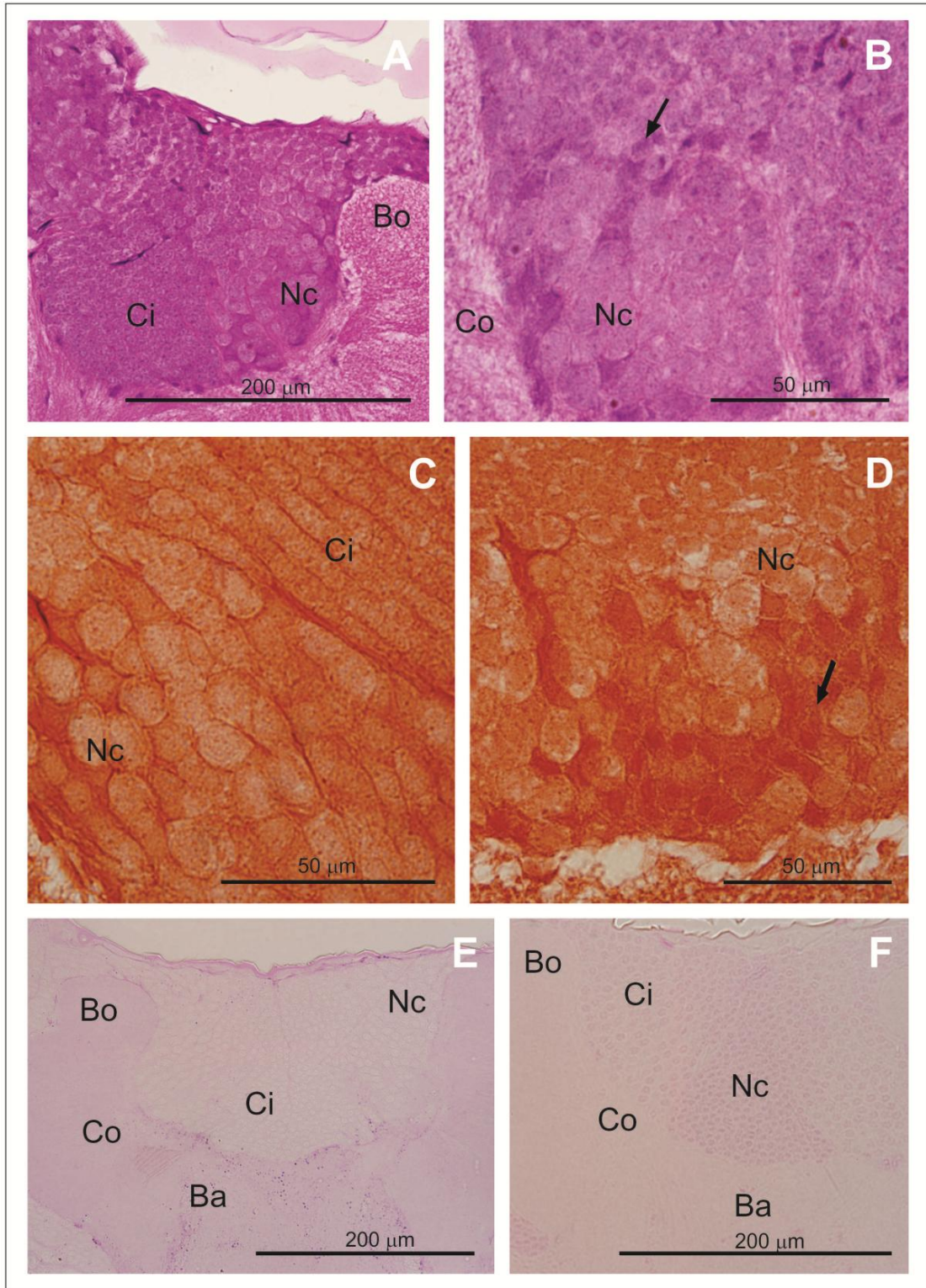
Figura 2 - Sobrevivência de operárias recém emergidas de *A. mellifera* em função da ingestão de alimento em diferentes tratamentos: controle sem solvente (C-); controle com solvente (C+); doses subletais ($CL_{50/10} = 0,428$ ng i.a./ μ L dieta e $CL_{50/100} = 0,0428$ ng i.a./ μ L dieta).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 - Fotomicrografias dos corpos pedunculados do cérebro de *Apis mellifera*, corados com HE (A e B), submetidos à técnica de Xylidine Ponceau (C e D), reação de PAS (E) e reação de Feulgen (F), expostas ou não ao inseticida thiamethoxam. **A** – detalhe do corpo pedunculado do grupo controle de 1 dia, sem alterações morfológicas. **B** – detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta à CL_{50/100} durante 3 dias, mostrando presença de células fortemente coradas (seta). **C** – detalhe do corpo pedunculado do grupo controle sem solvente, com 8 dias, mostrando células uniformemente coradas. **D** – detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta à CL_{50/10} durante 3 dias, mostrando presença de células fortemente coradas (seta), indicando aumento de síntese proteica ou compactação celular. **E** – visão geral do corpo pedunculado do grupo controle sem solvente, com 3 dias. **F** – detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta à CL_{50/100} durante 3 dias, sem alterações.

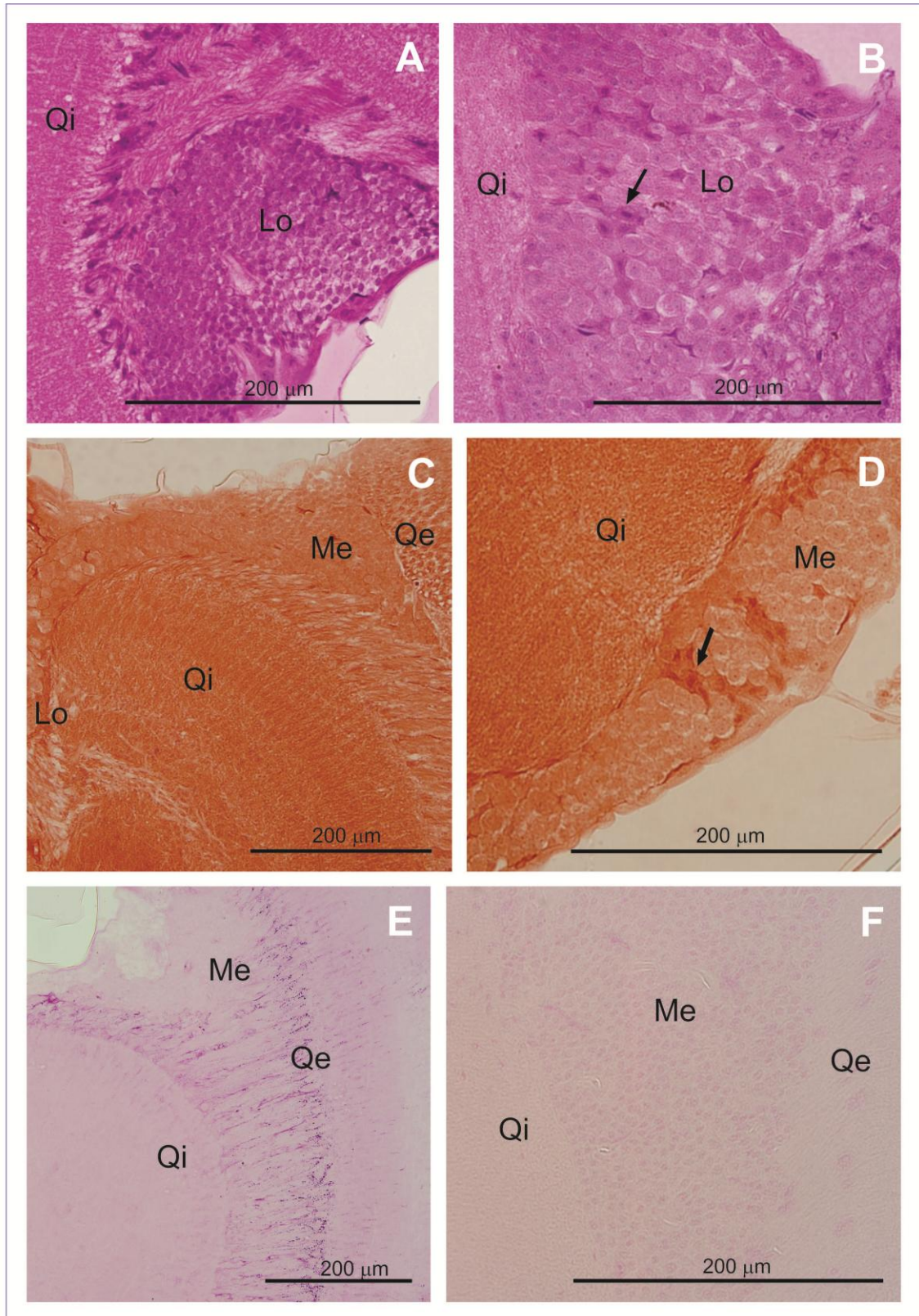
Ba = base; **Bo** = borda; **Ci** = células de Kenyon compactas internas; **Co** = colar; **Nc** = células de Kenyon não compactas.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Fotomicrografias dos lobos ópticos do cérebro de *Apis mellifera*, corados com HE (A e B), submetidos à técnica de Xylidine Ponceau (C e D), reação de PAS (E) e reação de Feulgen (F), expostas ou não ao inseticida thiamethoxam. **A** – detalhe do lobo óptico do grupo controle de 1 dia, sem alterações morfológicas. **B** – detalhe do lobo óptico de abelha exposta à CL_{50/100} durante 3 dias. Notar células condensadas, com coloração mais intensa (seta). **C** – detalhe do lobo óptico do grupo controle sem solvente, com 8 dias, mostrando ausência de alterações. **D** – detalhe do lobo óptico de abelha exposta à CL_{50/100} durante 1 dia, com presença de células com coloração intensa. **E** – detalhe do lobo óptico de abelha exposta à CL_{50/10} durante 5 dias. **F** – detalhe do lobo óptico de abelha exposta à CL_{50/100} durante 3 dias, submetido à reação de Feulgen.

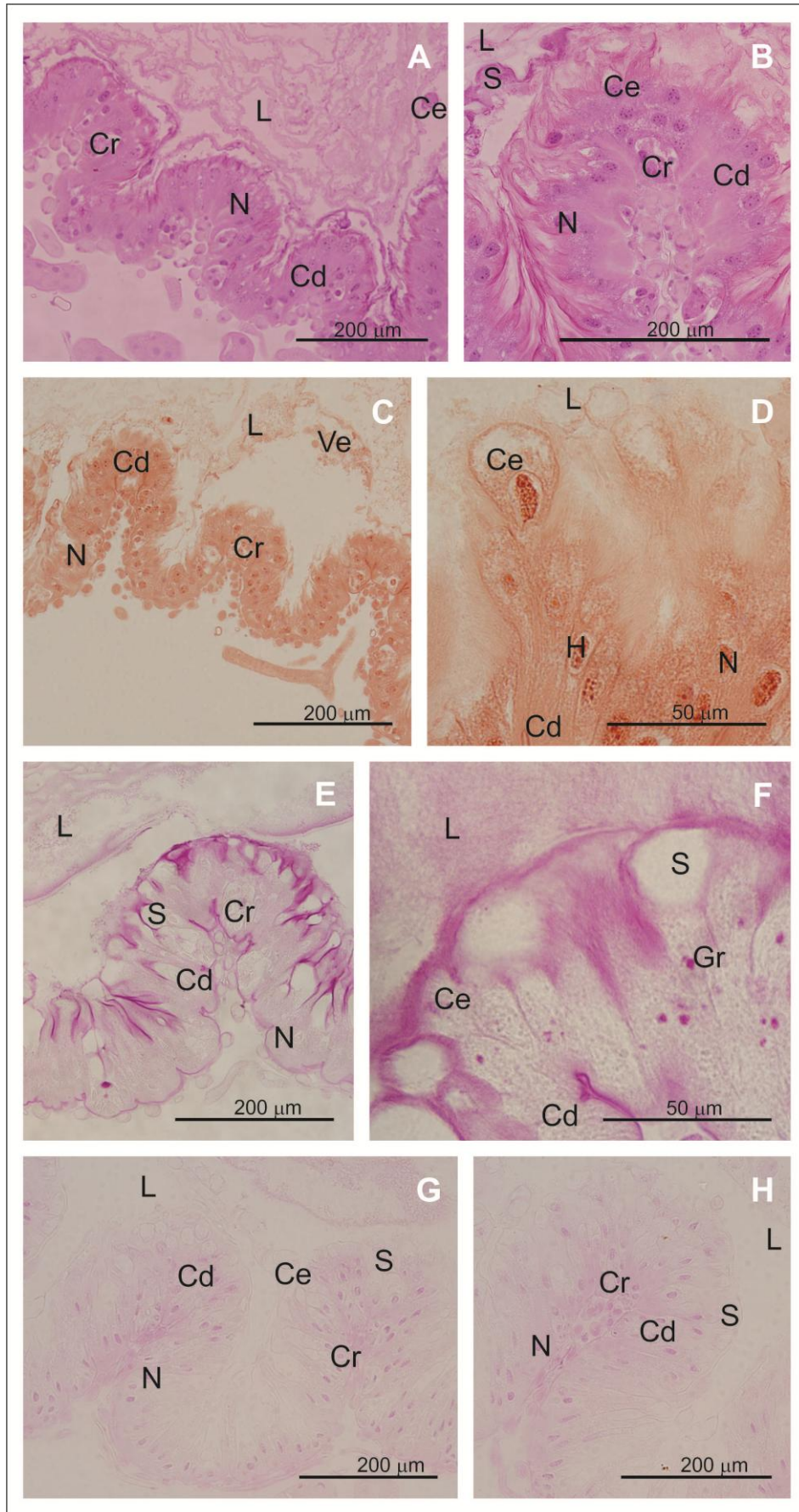
Lo = lobo; **Me** = medula; **Qe** = quiasma externo; **Qi** = quiasma interno.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 - Fotomicrografias do ventrículo de *Apis mellifera*, corados com HE (A e B), submetidos à técnica de Xylidine Ponceau (C e D), reação de PAS (E e F) e reação de Feulgen (G e H), expostas ou não ao inseticida thiamethoxam. **A** – ventrículo de abelha do grupo controle sem solvente de 1 dia, mostrando morfologia típica do órgão. **B** – ventrículo do grupo exposto à CL_{50/10} por 5 dias, no qual ocorre aumento de eliminação celular (Ce) e presença de secreção apócrina (S). **C** – ventrículo de abelha do grupo controle sem solvente de 5 dias, sem alterações. **D** – ventrículo de abelhas expostas à CL_{50/100} por 5 dias mostrando aumento da eliminação celular (Ce) e presença de halos pericromatínicos (H). **E** – ventrículo de abelha do grupo controle sem solvente de 1 dia. **F** – ventrículo de abelhas expostas à CL_{50/100} por 8 dias. Notar presença de grânulos positivos à técnica de PAS (Gr). **G e H** – ventrículo de abelha do grupo controle sem solvente de 1 dia, mostrando núcleos fracamente corados com a reação de Feulgen.

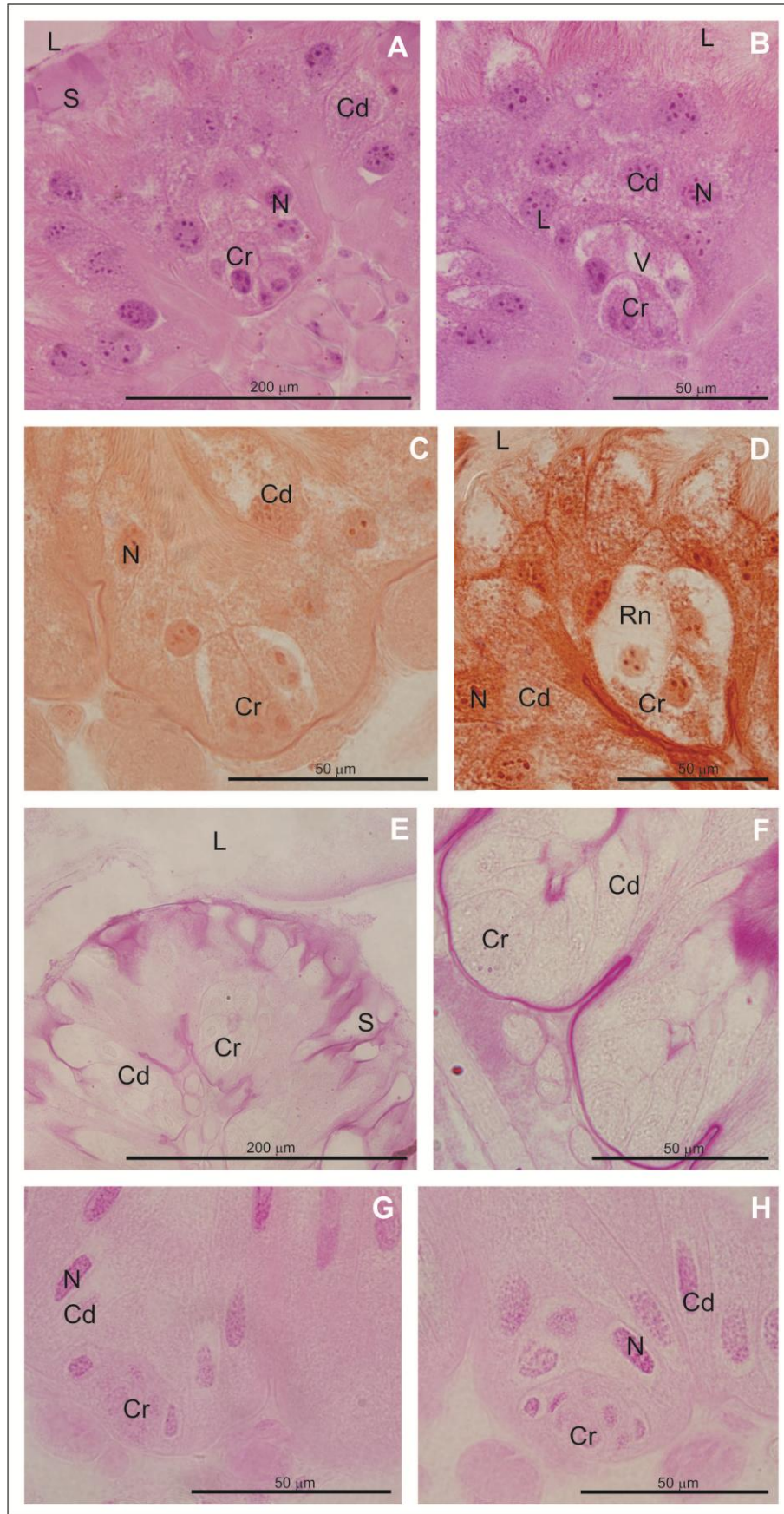
Cd = célula digestiva; **Cr** = célula regenerativa; **L** = lúmen; **N** = núcleo; **Ve** = Vesícula; **S** = secreção apócrina.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 - Fotomicrografias das células regenerativas dos ninhos do ventrículo de *Apis mellifera*, corados com HE (A e B), submetidos à técnica de Xylidine Ponceau (C e D), reação de PAS (E e F) e reação de Feulgen (G e H), expostas ou não ao inseticida thiamethoxam. **A** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo controle sem solvente de 5 dias mostrando morfologia típica. **B** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo CL_{50/10} com 5 dias evidenciando vacuolização citoplasmática (V). **C** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo controle sem solvente de 8 dias mostrando citoplasma fracamente corado. **D** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo CL_{50/10} com 1 dia evidenciando regiões citoplasmáticas negativas à reação (Rn). Notar diminuição do número de células regenerativas compondo este ninho. **E e F** – nas abelhas do grupo controle sem solvente de 1 dia, submetidos à reação de PAS (**E**), as células regenerativas apresentam-se sem coloração. O mesmo ocorre para o ninho de células regenerativas de abelha do grupo CL_{50/10} com 5 dias (**F**). **G** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo controle sem solvente de 3 dias com núcleos fracamente corados, evidenciando presença de cromatina descondensada. **H** – ninho de células regenerativas de abelha do grupo CL_{50/10} com 3 dias mostrando coloração semelhante ao grupo controle.

Cd = célula digestiva; **Cr** = célula regenerativa; **L** = lúmen; **N** = núcleo; **S** = secreção apócrina.



Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a CL_{50} do thiamethoxam, com valor igual a 4,28 ng i.a./ μ L dieta, mostraram que este inseticida é tóxico para abelhas recém emergidas de *A. mellifera* africanizada.

Em relação ao valor da CL_{50} obtido ser inferior a aqueles encontrado em literatura, vale lembrar que estudos preliminares (SMIRLE, WINSTON; 1988) comprovaram que abelhas recém emergidas são mais suscetíveis aos poluentes ambientais devido a mecanismos bioquímicos de adaptação e compensação. Uma hipótese que justifica essa teoria é que as enzimas Glutathione S-transferases e oxidases, que são em grande parte responsáveis pela metabolização dos neonicotinóides em animais (CASIDA, 2011), também são aquelas com menor atividade em recém emergidas (SMIRLE, WINSTON, 1988).

Esta alta toxicidade do thiamethoxam está de acordo com diversos estudos que mostram os neonicotinóides são bastante tóxicos para abelhas (IWASA et al., 2004). Os inseticidas neonicotinóides são divididos em 2 grupos de acordo com o grau de toxicidade que apresentam. Esta classificação é baseada na presença do agrupamento nitro ou do agrupamento ciano. Deste modo, os neonicotinóides com agrupamento nitro são os mais tóxicos, sendo eles o imidacloprido, clotianidina e thiamethoxam. Já os neonicotinóides que apresentam o agrupamento ciano apresentam uma toxicidade menor sendo eles: acetamiprido e o tiacloprido (EL HASSANI, 2008). A elevada toxicidade do thiamethoxam para abelhas recém emergidas de *A. mellifera* demonstra, mais uma vez que, uma vez que faz parte do grupo dos neonicotinóides que possuem um grupamento nitro, o thiamethoxam apresenta umas das maiores toxicidades entre esta família de compostos (EL HASSANI, 2008).

Em relação a sobrevivência das abelhas em função da intoxicação com doses subletais do thiamethoxam, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os grupos controle sem solvente, controle com solvente e $CL_{50/100}$ no que diz respeito ao tempo de sobrevivência dos indivíduos em confinamento, todos apresentando TL_{50} de 9,59 dias, o grupo exposto à $CL_{50/10}$ apresentou TL_{50} de 6,79 dias, mostrando significativa diminuição no tempo de sobrevivência. Carvalho et al. (2009) comprovaram, através de estudos com diversos compostos ativos comumente usados no combate à pragas que, independentemente do método de exposição, o composto thiamethoxam é extremamente tóxico para operárias de *A. mellifera*, apresentando um TL_{50} médio de 3,57 horas, utilizando uma dose de 1.500 mg/L. Do mesmo modo, Pereira (2010), analisando a toxicidade de

diversos inseticidas para operárias de *A. mellifera*, encontrou um TL₅₀ de 3,8 horas para uma concentração de 17 ng de thiamethoxam/abelha. Para abelhas tratadas oralmente com thiamethoxam a 0,025 ppm, a mortalidade apresentou-se acentuada depois de 6 horas do início do teste (KAKAMAND; MAHMOUD; AMIN, 2008). Kakamand, Mahmoud e Amin (2008) observaram também uma mortalidade superior a 90% quando abelhas ingeriram o thiamethoxam na dose de 0,125ppm.

No presente estudo, ambas as doses subletais utilizadas apresentaram alterações morfológicas e histoquímicas significativas nas estruturas cerebrais de *A. mellifera*. Morfológicamente, a CL_{50/100} apresentou alterações mais imediatas nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos que a CL_{50/10}. Estas alterações foram marcadas pelo aparecimento de células condensadas logo no primeiro dia de exposição ao inseticida, o que pode ser um indicativo de morte celular (BOWEN; BOWEN; JONES, 1998). Pelo fato de que a dose menor apresentou este tipo de alteração primeiramente, em relação à dose mais alta, poder-se-ia inferir o acontecimento do chamado “Efeito Hormesis”. Este efeito consiste numa resposta bifásica, onde uma dose baixa apresenta uma resposta estimulatória, e uma dose alta, uma inibitória (CALABRESE, 2008). Esta relação deve ser bem definida quanto aos parâmetros quantitativos, incluindo, por exemplo, a magnitude e a largura da zona estimulatória, bem como o limiar toxicológico (CALABRESE, 2008), o que significa que para a confirmação da hipótese aqui proposta, são necessários mais estudos, considerando todos os parâmetros necessários. Entretanto, sabe-se que os estudos na área são restritos e que muitos pesquisadores possuem opiniões divergentes sobre o tema.

O aumento na intensidade da coloração pela reação de Xylidine Ponceau é evidenciado nas células dos corpos pedunculados, que são importantes centros de memória e aprendizagem (DALY; DOYEN; PURCELL III, 1998), e nos lobos ópticos, responsáveis diretamente com o processamento da visão (RIBI et al, 2008). Nas duas estruturas, a coloração celular é intensa no contato inicial, diminuindo com o decorrer do tempo. Pelo fato da técnica de Xylidine Ponceau detectar proteínas presentes no tecido, este aumento de coloração pode ser indicativo de aumento da síntese proteica. Assim, pode-se inferir que isto seja ocasionado como um mecanismo de proteção celular contra um agente exógeno, sugerindo a expressão de HSPs (proteínas de choque térmico), as quais também foram detectadas por Silva-Zacarin, Gregorc e Silva-de-Moraes (2006) em glândulas salivares de larvas de *A. mellifera* tratadas com acaricidas. As HSPs constituem um grupo seletivo de proteínas que não se expressam apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos tipos de estresses. Condições estressantes causam um efeito de

desdobramento parcial das proteínas celulares e a capacidade das HSP de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse torna-se uma extensão de sua função normal como chaperonas (MEYER, 1999), ou seja, neste caso atuam basicamente na conservação das estruturas funcionais das proteínas celulares, as quais são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular, podendo ainda aumentar a rapidez de remoção de proteínas desnaturadas de dentro das células (MEYER, 1999). No entanto, se a exposição ao agente estressor é prolongada, como ocorrente neste ensaio, o efeito das HSPs é superado e a célula entra em processo de morte celular, como observado para os neurônios presentes nos corpos pedunculados e lobos ópticos de *A. mellifera* africanizada.

A análise da técnica de PAS indicou também a presença de grânulos de polissacarídeos espalhados pelas diversas regiões do cérebro. Estes grânulos constituem, provavelmente, a reserva energética dos neurônios, já que estas células são capazes de utilizar somente polissacarídeos – glicose ou glicogênio – como fonte de energia para seus processos (CHAPMAN, 2003). Entretanto, as análises não mostraram diferenças entre os grupos analisados, mostrando que esta demanda energética é similar tanto para os grupos expostos quanto para os grupos controle.

Corroborando com os resultados aqui descritos, Rossi (2011), analisando efeitos de imidacloprido, composto também pertencente a família dos neonicotinoides, no cérebro de *A. mellifera*, por meio de técnicas morfológicas, histoquímicas e imunocitoquímicas constatou que, mesmo doses subletais foram capazes de promover processos de morte celular em diferentes regiões do cérebro, como os corpos pedunculados e lobos ópticos. Do mesmo modo, Tavares (2010), estudando os efeitos do inseticida thiamethoxam sobre larvas de *A. mellifera*, observou que a presença de doses subletais adiantou o processo de morte celular nos lobos ópticos, que em condições normais ocorre em fases posteriores, durante a metamorfose.

Portanto, o presente estudo somado a outros trabalhos, mostram que os inseticidas neonicotinoides atingem preferencialmente os corpos pedunculados e os lobos ópticos. Por serem estruturas relacionadas respectivamente na integração sensorial de todo o cérebro e no processamento da visão, estes trabalhos conferem fortes indícios de que estes inseticidas possam ser responsáveis pela desorientação das abelhas, como relatado nos casos de CCD, fenômeno este, ainda de origens não totalmente esclarecidas, que é diagnosticado quando as abelhas campeiras, que são encarregadas de coletar néctar, pólen e resinas, não retornam às colmeias (VANENGELSDORP et al., 2009).

Além de alterações no cérebro, órgão alvo de ação do inseticida, o presente estudo mostrou que o thiamethoxam também é citotóxico para o ventrículo. Morfologicamente, constataram-se vacuolização citoplasmática, aumento de secreção apócrina e aumento de eliminação celular nos dois grupos que foram expostos às diferentes concentrações do inseticida thiamethoxam. A secreção apócrina e a eliminação celular são notadas inicialmente na dose mais baixa, o que também pode ser um indicativo do chamado Efeito Hormesis (CALABRESE, 2008), como anteriormente descrito.

Nas análises histoquímicas, a reação de PAS possibilitou a visualização de grânulos positivos à esta reação em maior número nos dois grupos expostos, descritos por Cruz-Landim (2009) como sendo esferocristais de importância para a regulação osmótica do meio interno do indivíduo e para impedir a intoxicação, tratando-se, portanto, de material de excreção. A partir disso, pode-se perceber que o aumento da presença de grânulos nos grupos expostos deve ser decorrente de mecanismos celulares de defesa contra a presença do agente xenobiótico. A não visualização de compactação cromatínica pela reação de Feulgen, sugere que as células afetadas pelo inseticida, antes de entrarem em processo de morte celular, são eliminadas para a luz do ventrículo (CRUZ-LANDIM, 2009), como notado com auxílio da análise morfológica.

A presença de vacúolos e regiões citoplasmáticas negativas à técnica de Xylidine Ponceau nas células digestivas foi observada nos primeiros dias, desaparecendo por um período e reaparecendo com a continuidade da exposição, o que pode indicar que o epitélio sofre os danos da exposição imediata ao thiamethoxam (logo no primeiro dia de exposição), seguida de uma tentativa de recuperação (apontada pela ausência destas características). Sabe-se que em *A. mellifera* três principais superfamílias de enzimas desempenham importante função no processo de desintoxicação, sendo elas Glutathione S-transferases (GSTs), citocromo P450s (P450s) e Carboxil-esterases (CCEs) (CLAUDIANOS et al., 2006). Essas superfamílias estão profundamente envolvidas no metabolismo de inseticidas (FEYEREISEN, 2005; OAKESHOTT et al., 2005; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Deste modo, estas enzimas poderiam estar agindo na tentativa de recuperação do epitélio ventricular, entretanto como a exposição ao inseticida não cessou, o ventrículo não conseguiu se recuperar completamente e os danos voltaram a aparecer.

Alguns estudos também mostraram alterações causadas no ventrículo de abelhas expostas a agentes xenobiontes. Jesus (2007) em pesquisas envolvendo operárias recém emergidas de *A. mellifera* expostas à fipronil e ácido bórico encontrou diversas alterações nas células do ventrículo, entre elas a intensificação da liberação de células para o lúmen,

vacuolização, aumento de liberação de material celular pelas células digestivas, núcleos picnóticos, e compactação cromatínica, concluindo que o contato das células digestivas com agentes estressantes causa alterações consideráveis no epitélio ventricular.

Do mesmo modo, Rossi (2011) constatou que a exposição de operárias recém emergidas de *A. mellifera* ao imidaclopride via oral causa danos ao epitélio do ventrículo. Nas células digestivas, a eliminação celular apresentou-se intensificada nos grupos expostos, bem como, aumento da secreção apócrina, presença de halos pericromatínicos, compactação cromatínica e presença de regiões citoplasmáticas negativas à técnica de Xylidine Ponceau. Cruz et al. (2010), analisando larvas de *A. mellifera* tratadas com fipronil e ácido bórico via oral constatou aumento de eliminação celular e vacuolização citoplasmática, respectivamente, como constatado no presente trabalho, de modo que estes processos apresentam-se intensificados na presença de compostos xenobióticos.

Apesar das células digestivas aparecerem em maior número, as células regenerativas, estruturadas em ninhos celulares, também são facilmente encontradas na base do epitélio do ventrículo. Os ninhos celulares são de fundamental importância para a reestruturação do epitélio, já que o mesmo perde células constantemente devido ao atrito com o alimento presente no aparelho digestivo (CRUZ-LANDIM, 2009). Devido à sua função, a análise das consequências causadas nas células regenerativas pela presença de um xenobiótico é de grande importância.

Nestas células, as análises morfológicas evidenciaram vacuolização citoplasmática e diminuição no número de células regenerativas presentes nos ninhos nas duas concentrações de inseticida analisadas. As análises da técnica de Xylidine Ponceau mostraram regiões citoplasmáticas negativas à coloração, diferentemente dos grupos controle, de modo que a exposição ao inseticida pode ter um efeito na diminuição da síntese proteica destas células, podendo ser prejudicial, já que as mesmas se encontram em estado de diferenciação. Este resultado sugere perda da capacidade de renovação tecidual, característica extremamente importante quando o epitélio é exposto a algum xenobiótico, ou até mesmo quando sofre desgaste natural.

Em conclusão, sugere-se que as alterações morfológicas e histoquímicas provocadas pelo thiamethoxam no cérebro e intestino de *A. mellifera*, podem refletir em alterações fisiológicas e comportamentais a nível individual e em toda a colônia. Essas alterações podem levar, por exemplo, na redução da expectativa de vida (CARVALHO et al., 2009), deficiência na capacidade de voo (VANDAME et al, 1995) e de aprendizagem (EL HASSANI et al., 2008), acarretando na desestruturação, declínio e desaparecimento das

abelhas (NEUMANN, CARRECK, 2010). Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho comprovam que intoxicações com doses subletais ($1/100$ of CL_{50}) e que não afetam a sobrevivência das abelhas (ver 4.1), podem ser tão prejudiciais quanto aquelas (doses altas) que provocam imediatamente a morte do inseto.

Deste modo, destaca-se a necessidade de uma intensificação de estudos sobre os efeitos dos pesticidas sobre os ecossistemas e seus componentes, em especial os relacionados aos neonicotinoides, bem como maior rigidez na legislação quanto ao uso dos pesticidas, com o intuito de preservar e diminuir os impactos ambientais.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o thiamethoxam é tóxico para abelhas recém emergidas de *A. mellifera* africanizada. Neste trabalho, os resultados mostraram uma CL_{50} igual a 4,28 ng i.a./ μ L dieta. Além disso, a dose referente à $CL_{50/10}$ causa redução de 41,2% da expectativa de vida destas abelhas.

Com relação aos efeitos de doses subletais, pôde-se verificar que ambas as doses testadas ($CL_{50/10}$ e $CL_{50/100}$) são citotóxicas para o cérebro e ventrículo de abelhas africanizadas. O grau de alterações morfológicas e histoquímicas causadas pelo inseticida nestes órgãos não difere entre ambas as concentrações, concluindo-se que, apesar da dose subletal mais baixa ($CL_{50/100}$) não causar alterações no tempo de sobrevivência, esta dose é tóxica para as abelhas.

As análises morfológicas e histoquímicas realizadas no cérebro de abelhas expostas às doses subletais permitiram concluir que os corpos pedunculados e os lobos ópticos são as estruturas cerebrais que sofrem alterações resultantes da exposição ao inseticida. No entanto, estas doses não alteram a morfologia e histoquímica dos lobos antenais.

Com relação ao ventrículo, a ingestão de doses subletais de thiamethoxam causa alterações morfológicas e histoquímicas neste órgão, afetando as células digestivas e células regenerativas presentes neste epitélio.

REFERÊNCIAS

- BETIOLI, J. V. **Estudo da longevidade de operárias de *Apis mellifera* (Hym.: Apidae) em condições de confinamento.** 1989. 74f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.
- BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, New York, v.45, p.174-183, 1999.
- BOWEN, I.D.; BOWEN, S.M.; JONES, A.H. **Mitosis and Apoptosis: matters of life and death.** New York: Chapman & Hall, 1998. 174p.
- BRAECKMAN, B.; BRYNS, K.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Cell and tissue research**, New York, v.31, n.1, p.45-53, 1999.
- BRAECKMAN, B.; RAES, H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). **Cell and tissue research**, New York, v.31, n 2, p.223-232, 1999.
- BREER, H. Neurochemical aspects of cholinergic synapses in the insect brain. In: GUPTA, A.P. (Ed.) **Arthropod brain: its evolution, development, structure and functions.** New York: Wiley, 1987. p.415- 37.
- CALABRESE, E.J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Amherst, v.27, n.7, p.1451-1474, 2008.
- 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.M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; BUENO FILHO, J.S.S.; BAPTISTA, A.P.M. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.597-606, 2009.
- CASIDA, J.E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.2923-2931, 2011.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function.** 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R.M.; BISWAS, S.; SCHULER, M.A.; CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting.** London: Duckworth, 2006. 682p.

- COLIN, M.E.; BONMATIN, M.; MOINEAU, I.; GAIMON, C.; BRUN, S.; VERMANDERE, J.P. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.47, p.387-395, 2004.
- CRUZ, A.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO O.C.; MALASPINA O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v.26, p.165-176, 2010.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: UNESP, 2009, 408p.
- CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (hymenoptera, Apidae) midguts. **Behavioral ecology and sociobiology**, New York, v.34, n.3, p.597-603, 1999.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural 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**. 2th ed. New York: Oxford University Press, 1998. 680p.
- EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v.54, n.4, p.653-661, 2008.
- ELBERT, A., HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, Sussex, 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.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Protección a los Polinizadores**, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0512sp1.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2010.
- FARRIS, S. M. Evolution of insect mushroom boddies: old clues, new insights. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v.34, n.3, p.211-234, 2005.
- FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch – Chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und Die Darauf Beruhend Elective Färbung von Zillkernen in Mikroskopischen Präparaten Hoppe-Seylers. **Zeitschrift für Physiologische Chemie**, Strassburg, v.135, p.203-248, 1924.
- FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. **Comprehensive Molecular Insect Science-Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.4, p.1-7, 2005.

GALLAI, N., SALLES, J.C., SETTELE, J., VAISSIÈRE, B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v.68, p.810-821, 2009.

GIROLAMI, V.; MAZZON, L.; SQUARTINI, A.; MORI, N.; MARZARO, M.; DI BERNARDO, A.; GREATTI, M.; GIORIO, C.; TAPPARO, A. Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.102, p.1808-1815, 2009.

GUIMARÃES, M. Colméias às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e Europa. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v.137, 2007. Disponível em: <<http://revistapesquisa2.fapesp.br/?art=3295&bd=1&pg=1&lg=>> Acesso em: 25 abr. 2011.

HASHIMOTO, J.H., RUVOLO-TAKASUSUKI, TOLEDO, V.A.A. Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide Thiamethoxam Pesticide Residues. **Sociobiology**, Chico, v.42, n.3, p.693-699, 2003.

INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C.P.; GOFF, M.L. Entomotoxicology. **Forensic Science International**, Lausanne, v.120, p.42-47, 2001.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, R.M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Guildford, v.23, p.371-378, 2004.

JESUS, D. **Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos de operárias recém emergidas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico.** 2007. 101f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual e Paulista, Rio Claro, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KAKAMAND, F.A.K.H.; MAHMOUD, T.T.; AMIN, A.B.M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Dohuk University**, Dohuk, v.11, n.1, p.144-151, 2008.

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.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNIGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHAMTKE, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, Edinburgh, v.274, p.303-313, 2007.

MAIENFISCH, P.; HUERLIMANN, H.; RINDLISBACHER, A.; GSELL, L.; DETTWILER, H.; HAETTENSCHWILER, J.; SIEGER, E.; WALTI, M. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, Sussex, v.57, p.165-176, 2001.

- 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, p.303-309, 2006.
- MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v.158, p.202, 1946.
- MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.45, n.2, 1999.
- MORSE, R.A.; CALDERONE, N.W. The value of honeybees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, Medina, v.128 p.1-15, 2000.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, London, v.49, p.1-6, 2010.
- NONDILLO, A.; ZANARDI, O.; AFONSO, A. P.; BENEDETTI, A. J.; BOTTON, M. Efeitos de inseticidas neonocotinóides sobre a Mosca-das-Frutas Sul-Americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira. **Bioassay**, Piracicaba, v.2, p.9, 2007.
- OAKESHOTT, J.G., CLAUDIANOS, C., CAMPBELL, P.M., NEWCOMB, R.D., RUSSEL, R.J. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. **Comprehensive Molecular Insect Science- Pharmacology**, Oxford, v.5, p.309-381, 2005.
- PEREIRA, A.M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010, 124f. Tese de Doutorado (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual e Paulista, Rio Claro, 2010.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 12 ago. 2011.
- RANCAN, M.; ROSSI, S.; SABATINI, A. G. Determination of Thiamethoxam residues in honeybee by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1123, p.60-65, 2006.
- RANSON, H., HEMINGWAY, J. Glutathione transferases. **Comprehensive Molecular Insect Science-Pharmacology**, Oxford. v.5, p.383-402, 2005.
- RIBI, W.; SENDEN, T.J.; SAKELLARIOU, A.; LIMAYE, A.; ZHANG, S. Imaging honey bee brain anatomy with micro-x-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**. Amsterdam, v.171, p.93-97, 2008.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v.12, n.5, p.1-22, 2005.

ROSSI, C.A. **Avaliação dos efeitos das doses subletais do imidaclopride no cérebro de *Apis mellifera* africanizada.** 2011, 60f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

SENN, R.; HOFER, D.; HOPPE, T.; ANGST, M.; WYSS, P.; BRANDL, F.; MAIENFISCH, P. CGA 293'343: a novel broad-spectrum insecticide supporting sustainable agriculture worldwide. **Pests and Diseases.** Brighton, v.1, p.27-36, 1998.

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; GREGORC, A.; SILVA DE MORAES, R.L.M. *In situ* localization of heat-shock proteins and cell death labeling in the salivary gland of acaricide treated honeybee larvae. **Apidologie,** Versailles, v.37, p.507-515, 2006.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento de risco ambiental de Agrotóxicos:** princípios e recomendações. Jaguariúna: EMBRAPA, 2004. 29p. (Documentos 42).

SMIRLE, M.J.; WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: na adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology,** v.66, p.1938-1942, 1988.

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

TAVARES, D.A. **Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de larvas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* após exposição à doses subletais de tiametoxam.** 2010, 41f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

THERNEAU, T. **Package ‘survival’:** Survival analysis, including penalized likelihood. 2011. 104p. Version 2.36-5. Disponível em: < <http://cran.r-project.org/web/packages/survival/survival.pdf> >. Acesso em: 10 fev. 2011.

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.

TREMOLADA, P.; MAZZOLENI, M.; SALIU, F.; COLOMBO, M.; VIGHI, M. Field Trial for Evaluating the Effects on Honeybees of Corn Sown Using Cruiser and Celest xl Treated Seeds, **Bulletin of environmental contamination and toxicology,** New York, v.85, p.229-234, 2010.

TRINDADE, M. S. A.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA, D. S.; MARACAJÁ, P. B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra,** Campina Grande, v.4, n.1, 2004.

VANDAME, R.; MELED, M.; COLIN, M.-E; BELZUNCES, L.P. Alteration of homingflight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry,** v.14, p.855-860, 1995.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D.R.; PETTIS, J.S. Colony collapse disorder: A descriptive study. **Plos One**, United States, v.4, 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006481>>. Acesso em: 22 out. 2011.

WARHURST, P., GOEBEL, R. Chemical poisoning of bees. In: _____. **Bee book: beekeeping in the warmer areas of Australia**. Oveensland: Department of Primary Industries, 1995. p.179-214.

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

WILLIAMS, C.S. Conserving Europe's bees: why all the buzz? **Trends in ecology and Evolution**, Amsterdam, v.10, n.8, p.309-310, 1995.

ANEXO

Artigo submetido à revista *Environmental Toxicology* em: 12/09/2012.

**SIDE-EFFECTS OF THIAMETHOXAM ON THE BRAIN AND MIDGUT OF THE
AFRICANIZED HONEYBEE**

Regiane Alves OLIVEIRA, Thaisa Cristina ROAT,
Stephan Malfitano CARVALHO and Osmar MALASPINA

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências de
Rio Claro, UNESP-Univ. Estadual Paulista,
Av. 24A, 1515, Bela Vista, 13.500-900 Rio Claro São Paulo, Brazil

ABSTRACT

The development of agricultural activities coincides with the increased use of pesticides to control pests, which can also be harmful to non-target insects such as bees. Thus, the goal of this work was to assess the toxic effects of thiamethoxam on newly emerged worker bees of the species Africanized *Apis mellifera* (AHB). Initially, we determined that the lethal concentration 50 (LC₅₀) of thiamethoxam was 4.28 ng a.i./μL of diet. To determine the LC₅₀, a survival assay was conducted using diets contaminated with sublethal doses of thiamethoxam equal to 1/10 and 1/100 of the LC₅₀. The group of bees exposed to 1/10 of the LC₅₀ had a 41.2% reduction of life expectancy. When AHB samples were analyzed by morphological and histochemical techniques, we found that thiamethoxam caused diverse alterations to the midgut and brain of the AHB, particularly to the digestive and regenerative cells of the midgut and to the mushroom bodies and optical lobes of the brain. Thus, intoxication with a sublethal dose of thiamethoxam may induce physiological and behavioral changes in AHB that may also contribute to honeybee decline.

Keywords: *Apis mellifera*, neonicotinoid, toxicity, morphology, histochemistry, mushroom bodies, optical lobes, digestive cells, regenerative cells.

1. INTRODUCTION

Honeybees are insects with great economic interest that provide high value products, such as honey, propolis, royal jelly, beeswax and venom. Additionally, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) represents 85% of all insect pollinators, upon which 90% of fruiting plants are dependent to reproduce (TAUTZ, 2008). However, there have been profound changes to the current model of agriculture in recent decades that can affect pollinators. For example, we have observed an increase in cultivated areas for monoculture as well as high use of fertilizers and pesticides. Concomitantly, several cases of decreasing numbers of honeybee colonies have been reported in the northern hemisphere, (NEUMANN; CARRECK, 2010). This phenomenon, termed Colony Collapse Disorder, has recently occurred in the USA and is believed to be strongly related to the use of pesticides (STOKSTAD, 2007).

Among the various pesticides employed in agriculture, special attention is given to those belonging to the neonicotinoid class, particularly thiamethoxam. This insecticide is a second generation neonicotinoid showing low toxicity to mammals with exceptional translaminar and systemic action. Thiamethoxam is used to control aphids, whiteflies, leafhoppers, trips, some beetles and caterpillars. Furthermore, thiamethoxam is becoming one of the most widely used insecticides in various cultures in Brazil due to its successful application through various methods (terrestrial and aerial spraying and soil and seed treatment), its control efficiency and its moderate residual effects (MAIENFISCH et al., 2001a; GIROLAMI et al., 2009; ANDREI, 2009).

Africanized Honeybees (AHBs) are often found in cultures where thiamethoxam is used, where they are also affected by its toxic effects through either direct (death of the bee) or indirect damage (sublethal effects) (DEVILLERS, 2002; DESNEUX et al., 2007). In this sense, Maienfisch et al. (2001b) and Iwasa et al. (2004) found that for *A. mellifera*, thiamethoxam has a toxicity up to 192 times greater than the neonicotinoids acetamiprid and thiacloprid. In another study, Carvalho et al. (2009) found that a thiamethoxam concentration of 37.5 g a.i./100 L H₂O (the maximum concentration for citrus crops), applied through different routes (spraying, ingestion and residue on the crop surface), is extremely toxic to the AHB; on average, it kills 50% of the bees within 214 minutes. Studies have also suggested that neonicotinoids, such as thiamethoxam, might affect the homing flight of the honeybee (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010), as shown for imidacloprid by Blacquièrre et al. (2012).

Neonicotinoids are substances that act directly on the insect nervous system through agonistic action on nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; TAN et al., 2007). In the honey bee brain and ganglia, nAChRs are widely distributed and involved in pathways controlling a variety of physiological functions (EL HASSANI et al., 2008). Thus, it is important to check the toxicity of this insecticide on the nervous system, and more specifically in the brain, in exposed AHBs.

Secondary targets may also be affected by xenobiotics. Thiamethoxam exhibits systemic action in plants, and honeybees may become affected through ingestion of contaminated pollen and nectar. It is therefore important to analyze the cytotoxicity of thiamethoxam in tissues reached via the metabolism of contaminated food containing this compound. For example, recently Badiou-Beneteau et al. (2012) reported a battery of biomarkers in honeybees that may be modulated after intoxication with thiamethoxam. Furthermore, it is necessary to analyze the midgut, as it is an absorption organ and therefore the source of first contact with an orally administered insecticide. The purpose of this work was to analyze the toxic effect of thiamethoxam on newly emerged honeybees and to examine the cytotoxic effect on the brain and midgut through morphological and histochemical techniques.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

The analytical standard thiamethoxam (92.5% of purity) was obtained from Syngenta Crop Protection (Brazil). Sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4), paraformaldehyde, formaldehyde, glacial acetic acid, picric acid, ethanol, hematoxylin, eosin, xylydine ponceau, periodic-acid, Schiff's reagent and hydrochloride acid (HCl) were obtained from Sigma Aldrich (Brazil). The historesin embedding kit was purchased from Leica Microsystems (Germany).

2.2 Honeybee collection

To obtain the newly emerged AHB, three frames with sealed broods (near of adult emergence) were collected on a queen-right colony and kept in a climatic room ($34 \pm 2^\circ\text{C}$,

relative humidity of $80\pm 10\%$ and in darkness). Using this procedure, we obtained specimens of a known age (0 to 24 hours). For all experiments, adults were put into disposable cages (11 x 11 x 7 cm), fed a sucrose + H₂O solution (1:1), and maintained at $32\pm 2^\circ\text{C}$ with a relative humidity of $70\pm 10\%$ in darkness.

2.3 Acute toxicity test by ingestion of thiamethoxam

A thiamethoxam stock solution (1000 ng a.i./ μL) was prepared using acetone as a solvent. Several solutions were prepared directly in the diet of sucrose + H₂O (1:1) (w/v) with concentrations ranging from 1000 to 0.01 ng a.i./ μL , with a maximum acetone concentration of less than 0.1%. Before starting the bioassays, the bees were starved for 2 hours. A total of 75 newly emerged honeybees from each treatment were divided into three replicates/cages of 25 honeybees. Each treatment received an average of 10 mL diet/bee packaged in a plastic container at the cage bottom as well as a cotton swab soaked in distilled water. In these experiments, two controls were used: control without solvent (C-), providing only food sucrose + H₂O (1:1), and solvent control (C+), which added acetone to the diet sucrose + H₂O (1:1); they were provided in the same ratios as used in the experimental groups treated with thiamethoxam. After 24 hours, the number of dead bees for each treatment was recorded and subjected to statistical analysis to determine the lethal concentration (LC₅₀).

2.4 Honeybee survival after exposure to thiamethoxam

The honeybee intoxication assay using a sublethal dose of thiamethoxam was performed with the LC₅₀ dose (see section 2.3). From the stock solution (1000 ng a.i./ μL acetone), we prepared diets with thiamethoxam final solutions of $1/10$ and $1/100$ of LC₅₀. A total of 75 newly emerged honeybees were equally divided into three disposable cages. The bees were collectively fed the contaminated syrup, with the total volume adjusted so that each bee could daily consume 10 μL of sucrose solution containing 0.0428 ng/ μL or 0,00428 ng/ μL thiamethoxam per bee (i.e., 250 μL of enriched diet per cage). Therefore, each bee ingested 0.428 ng/ μL thiamethoxam per day ($1/10$ of LC₅₀) or 0.0428 ng/ μL thiamethoxam per day ($1/100$ of LC₅₀). Every day, the number of dead bees was counted, and the total volume of syrup was adjusted to the number of remaining live bees. Two experimental controls were used in these experiments: (1) control without acetone, where the bees were fed only with sucrose and H₂O

(1:1), and (2) control with acetone, in which the sucrose and H₂O (1:1) contained acetone at the same concentration used when bees were fed thiamethoxam (0.01%).

2.5 Bioassays of intoxication and body dissection

The specimens used for morphological studies were obtained in an independent intoxication assay with procedures described previously (Section 2.4). Honeybees were collected at intervals of one, three, five and eight days after the start of the bioassay. Five samples were taken per treatment/time.

For the morphological and histochemical studies, the brains and midguts of AHBs were dissected with an optical microscope in a buffer solution of 20 mM Na₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7.4 + 130 mM of NaCl. After obtaining the organs, they were immersed in specific fixing solutions for morphological analysis (4% paraformaldehyde), for proteins (sodium phosphate buffer 100 mM pH 7.4 + 4% paraformaldehyde) or for polysaccharides and chromatin (aqueous Bouin - 75% saturated picric acid solution, 25% of formaldehyde and 5% of glacial acetic acid).

2.6 Procedures to morphological and histochemical analysis

Organs were bathed three times with the same buffer solution used for fixation and then subjected to dehydration. Dehydration was carried out using an ascending ethanol series (from 15% to 95%) lasting two hours for each bath. After this step, brains and midguts were embedded in resin without catalyst for three days and then finally embedded in historesin. Sections measuring 5 µm were cut with a Leica Microtome (Germany). Some posterior sections of brain and midgut fixed in paraformaldehyde were stained with hematoxylin-eosin (HE) for morphological analysis (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Other sections fixed with 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 + 4% of paraformaldehyde were subjected to histochemical staining with xylydine-Ponceau to detect total proteins (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). The material fixed with aqueous Bouin was processed with the PAS reaction (periodic-acid Schiff stain) to detect acidic and neutral polysaccharides (MCMANUS, 1946) and with the Feulgen reaction to analyze the levels of chromatin compaction (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924). Slides were examined by light microscopy (Olympus BX51 - Olympus America Inc), and images were obtained with a digital camera (Olympus DP-71). Image acquisition was conducted with DP Controller software.

2.7 Statistical analysis

Analyses were performed using R[®] software (2012). Mortality data obtained in acute toxicity tests were subjected to dose-response curve analysis with package *drc* (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005). The LC₅₀, 95% confidence interval and chi-square values were determined. The survival experimental data were analyzed using the package *Survival* (THERNEAU; LUMLEY, 2012) using Weibull distribution to determine the LT₅₀ value. The similarities between treatments were compared by cluster analysis using the contrasts between templates (MONCHARMONT et al., 2003).

3. RESULTS

3.1 Acute toxicity of thiamethoxam and honeybee survival

The LC₅₀ of thiamethoxam for newly emerged AHBs was 4.28 ng a.i./μL diet (Figure 1). Using this value, the sublethal concentrations equivalent to $1/10$ and $1/100$ of LC₅₀ (0.428 and 0.0428 ng a.i./μl diet, respectively) were calculated for use in subsequent experiments.

The survival rate of honeybees was determined using the sublethal concentration values for thiamethoxam (Figure 2). No significant differences were observed between the groups C-, C+ and LC₅₀/100, all of which resulted in an LT₅₀ of 9.59 days. However, the bee group treated with LC₅₀/10 showed a significant decrease in survival (LT₅₀ of 6.79 days). These results show the good choice of the doses for testing, which may be considered as sublethal doses.

3.2 Morphological and histochemical assessment of the brain

The results of the morphological and histochemical analysis in brains of AHBs either exposed to thiamethoxam or not are shown in Figures 3 and 4 and summarized in Table 1. Honeybees exposed to thiamethoxam presented morphological and histochemical alterations of the mushroom bodies and optical lobes of their brains; however, alterations of the antennal lobe were not observed (data not shown).

3.2.1 Mushroom bodies

The Kenyon cells of AHBs exposed to thiamethoxam showed morphological alterations, as observed through HE staining. In the groups of bees exposed to $1/100$ or $1/10$ of LC_{50} on the 3rd and 5th days of the experiments, respectively, the presence of intensely stained cells in the central region of the mushroom bodies' calyx was observed, suggesting the presence of condensed cells (Figure 3B and Table 1). Morphological alterations were not found in AHBs from groups C- and C+ (Figure 3A). These data show that use of the $1/100$ of LC_{50} of thiamethoxam does not present differences in the survival time but that it is cytotoxic for the Kenyon cells of the mushroom bodies.

Histochemical analyses (Table 1) using the xyloidine Ponceau technique allowed the visualization of Kenyon cells, which stained more intensely in groups exposed to thiamethoxam (Figure 3D) in comparison with control groups (C- and C+) (Figure 3C). For the group exposed to $1/10$ of LC_{50} , this alteration was observed in bees as early as the 1st day of exposure, while for the group exposed to $1/100$ of LC_{50} , the alteration was observed starting on the 3rd day of exposure. However, on the fifth day of exposure, the cells of bees exposed to either concentration of insecticide showed a decrease in the intensity of staining.

Analysis of mushroom bodies by the PAS reaction indicated the presence of polysaccharide granules, with no observable differences between control groups and those exposed to sublethal doses of thiamethoxam (Figure 3E and Table 1). Similarly, the Fuelgen reaction showed weak cell nucleus staining in all treatments, with no difference between the groups (Figure 3F and Table 1).

3.2.2 Optical lobe

HE staining of the optical lobes showed strongly stained cells, possibly the result of cytoplasmic and nuclear condensation (Figure 4B and Table 1), in AHB exposed to $1/100$ of LC_{50} since the 1st day of analysis. However, the optical lobe cells of honeybees exposed to $1/10$ of LC_{50} did not show morphological alterations (Figure 4A). This result indicates that the sublethal dose of thiamethoxam $LC_{50}/100$ is cytotoxic to the optical lobes in addition to the mushroom bodies.

Xyloidine-Ponceau staining of optical lobes showed cells with increased staining intensity in honeybees exposed to $LC_{50}/10$ and in $LC_{50}/100$ over the entire time course of experimental analysis (Figure 4D and Table 1). This increase in staining may be due to

cellular compression and/or increased cellular protein synthesis. No alterations were observed in the control treated cells (Figure 4C).

Using the PAS reaction, polysaccharide granules were observed in all honeybees independent of the treatment (Figure 4D and Table 1). Analysis with the Fuelgen reaction showed a weak staining of the cell nucleus in all groups (Figure 4F), revealing no difference between the controls and groups exposed to thiamethoxam (Table 1).

3.3 Morphological and histochemical assessment on midgut

3.3.1 Digestive cells

The morphological analyses of digestive cells in bees exposed to thiamethoxam (Figures 5A and 5B and Table 2) showed cytoplasmic vacuolization, increased apocrine secretion, and increased cell elimination. The presence of a large amount of vacuolization caused by both concentrations of thiamethoxam occurred on the first day of analysis, with a tendency to decrease with the course of time. By the last day of analysis (eighth day), there was no evidence of this alteration. The increase of apocrine secretion and cellular elimination was noted on the first day in bees exposed to $1/100$ of LC_{50} and by the third day with $1/10$ of LC_{50} , with both increasing over the duration of the analysis (Table 2).

The digestive cells of bees exposed to both concentrations of thiamethoxam presented cytoplasmic regions negative to xyloidine-Ponceau staining since the first day of analysis (Figures 5C and 5D and Table 2), indicating cytoplasmic vacuolization. By the third and fifth days, the digestive cells of the exposed groups were similar to those of the control. After eight days, the cells again showed cytoplasmic regions negative to xyloidine-Ponceau staining. The presence of xyloidine-Ponceau positive vesicles was noted on the first day and observed in greater amounts in honeybees exposed to thiamethoxam. These vesicles decreased over time and looked similar to the control on the last (eighth) day of analysis. Perichromatin halos were observed in the midgut epithelial cells of honeybees exposed to $1/100$ of LC_{50} of thiamethoxam since the fifth day. That finding was not verified in any other treatment.

Staining with the PAS reaction (Figures 5E and 5F and Table 2) resulted in a negative cytoplasmic staining in all the bee groups on all the analyzed days. PAS reaction positive granules, found mainly in the apical region of the intestinal epithelium and in the lumen of the midgut, were observed in greater amounts in honeybees exposed to either

concentration of thiamethoxam when compared with the control groups. The nuclei of digestive cells were weakly stained by the Feulgen reaction, showing no signs of chromatin compaction (Figures 5G and 5H and Table 2).

3.3.2 Regenerative cells

The regenerative cells of the midgut (Figures 6A and 6B and Table 3) were arranged in nests at the base of the ventricular epithelium. Staining with HE revealed that the cytoplasm was stained, and the nucleus contained uncondensed chromatin with many nucleoli. The regenerative cells of honeybees exposed to $1/10$ of LC_{50} showed cytoplasmic vacuolization from the first day until the fifth day of the experiments. At a dose of $1/100$ of LC_{50} , this vacuolization was only evident from the third day. There was a decrease in the number of regenerative cells in the nests under both treatment conditions on the first day for the $1/10$ of LC_{50} and on the third day for $1/10$ of LC_{50} .

Table 3 displays the results obtained from histochemical analysis. The regenerative cells of honeybees exposed to thiamethoxam showed xyloidine-Ponceau negative cytoplasmic regions (Figure 6) for both doses, indicating intense cytoplasmic vacuolization (Figure 6D). The control groups did not show this alteration (Figure 6C). PAS positive granules were not observed in the regenerative cells, and all groups studied showed the same characteristics (Figures 6E and 6F). The nuclei of the regenerative cells stained weakly by the Feulgen reaction (Figures 6G and 6H) in all treatments.

4. DISCUSSION

The acute oral toxicity of thiamethoxam (LC_{50} of 4.28 ng i.a./ μ l diet) shows that this insecticide is highly toxic to newly emerged AHB. Similarly, Iwasa et al. (2004) compared the toxicity of various neonicotinoid class insecticides and found that those with nitro-substituted compounds, such as imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam, are the most toxic to honeybee species from the northern hemisphere. Regarding the LC_{50} value obtained, it was less than those found in literature. It is worth noting that studies (SMIRLE; WINSTON, 1988) have shown that newly emerged honeybees are more susceptible to environmental pollutants due to the biochemical mechanisms of adaptation and compensation. One hypothesis for this difference is that the enzymes glutathione S-transferase and mixed-function oxidase, which are largely responsible for the metabolism of neonicotinoids in

animals (CASIDA, 2011), have lower activity in newly emerged honeybees (SMIRLE; WINSTON, 1988).

The survival of AHB is a function of the dose of thiamethoxam given. Although no differences were found among the treatments C-, C+ and $1/100$ of LC_{50} (LT_{50} of 9.59 days), the group of bees that was exposed to $1/10$ of LC_{50} had a 41.2% reduction of life expectancy (LT_{50} of 6.79 days). Similarly, Carvalho et al. (2009) showed that regardless of the method of exposure, thiamethoxam at a concentration of 375 ppm is extremely toxic to AHB, with an LT_{50} average of 3.57 hours. In another study, Kakamand et al. (2008) observed mortality of over 90% of studied honeybees when thiamethoxam was ingested at a dose of 0.125 ppm.

In this study, both sublethal doses tested caused morphological and histochemical alterations in the brain structures of AHBs. Morphologically, the concentration equivalent to $1/100$ of LC_{50} required less time to induce alterations of the mushroom bodies and optical lobes compared with the higher dose ($1/10$ of LC_{50}). These alterations were characterized by condensed cells observed on the first day of exposure to the insecticide, which may be indicative of cell death (BOWEN; BOWEN; JONES, 1998).

An increase in the intensity of xylydine-Ponceau staining is seen in the cells of treated mushroom bodies, which are important centers of learning and memory (DALY, DOYEN; PURCELL III, 1998), and in optical lobes, which are responsible for directly processing vision (RIBI et al., 2008). In both structures, the cellular staining was intense at the beginning of the treatment and decreased over time. Xylydine-Ponceau staining detects proteins in tissue, and an increase in staining intensity may indicate an increase in protein synthesis by cells. An increase in protein staining may be due to the expression of heat shock protein (HSP), which is a mechanism of cell protection against an exogenous agent, as observed by Silva-Zacarin et al. (2006), who noted an increase in HSP expression in the salivary glands of *A. mellifera* larvae treated with acaricide. The HSPs are a select group of proteins that are expressed not only after exposure to heat but also when cells are exposed to various types of stress. In these situations, the ability of HSPs to protect cells against adverse effects is an extension of their normal function as chaperones, acting to conserve the functional structures of cellular proteins (MEYER, 1999). However, if exposure to the stressor is extended, as occurred in the present work, the HSPs are overcome, and the cell starts the cell death process, as was observed in the neurons of the mushroom bodies and optical lobes of the AHB.

The PAS reaction indicates the presence of polysaccharides (glucose or glycogen), which are the main energy source to perform neuron processes (CHAPMAN, 2003).

However, no difference between the groups was found, demonstrating that the energy demands are similar for honeybees regardless of whether they are exposed to thiamethoxam.

This study demonstrates that the neonicotinoid thiamethoxam directly affects the mushroom bodies and optical lobes. Because these structures are associated with the sensory integration of the whole brain and in the processing of vision, there is strong evidence that this insecticide could aggravate the effects of disorientation in honeybees, as reported in the case of Colony Collapse Disorder (VANENGELSDORP et al., 2009).

In addition to changes in the brain of the AHB, this study also demonstrates that thiamethoxam is cytotoxic in the midgut. With regard to cell morphology, cytoplasmic vacuolization, an increase of apocrine secretion and cell elimination were found in both groups of AHBs exposed to thiamethoxam. Histochemical analysis with the xylydine-Ponceau technique allowed for the observation of negative cytoplasmic regions, high elimination of reaction positive vesicles and the presence of perichromatin halos. The PAS reaction allowed for the visualization of reaction positive granules in both exposed groups, which were described as crystals by Cruz-Landim (2009). These crystals, present in the midgut of bees, are important structures for internal osmotic regulation and to prevent poisoning. Thus, the increased presence of granules in treated groups must be due to cellular mechanisms of defense against the presence of a xenobiotic agent. Staining with the Fuelgen reaction showed an absence of chromatin compaction in digestive cells. These data suggest that cells affected by the insecticide are eliminated to the lumen of the ventricle before finishing the cell death process (CRUZ-LANDIM, 2009).

The digestive cells of exposed bees showed the presence of vacuoles and cytoplasmic regions of negative xylydine-Ponceau staining. These characteristics were noted during the first days of exposure; then, they disappeared for a period, and they reappeared with continued exposure. These data may indicate that the epithelium suffers damage from immediate exposure to thiamethoxam (the first day of exposure), which is then followed by a recovery attempt (indicated by the absence of signs, i.e, presence of vacuoles and cytoplasmic regions of negative xylydine-Ponceau staining). In *A. mellifera*, there are three families of enzymes that play a role in the detoxification process: glutathione S-transferases (GTSs), cytochrome P450s (P450s) and carboxli-esterases (SCCs) (CLAUDIANOS et al., 2006). These superfamilies are involved in insecticide metabolism (FEYEREISEN, 2005; OAKESHOTT et al., 2005; RANSON; HEMINGWAY, 2005). These enzymes could be attempting to recover the midgut epithelium during insecticide exposure; however, in cases of continuous exposure, the midgut epithelium was unable to fully recover, and the damage

reappeared. Some studies have also shown changes caused in the midgut of honeybees that were exposed to xenobiotics agents. Cruz et al. (2010) analyzed *A. mellifera* larvae treated with fipronil and boric acid and found that these compounds increase cellular elimination and cytoplasmic vacuolization.

Regenerative cells are of fundamental importance for epithelium restructuring and are found in cell nests at the base of the midgut epithelium (CRUZ-LANDIM, 2009). The morphological analyses performed showed that thiamethoxam caused cytoplasmic vacuolization and a reduction in the number of regenerative cells present in these nests. Histochemical analysis with the xylydine-Ponceau technique showed negative cytoplasmic staining in the exposed groups, suggesting that exposure to the insecticide may decrease protein synthesis in these cells. This result may be detrimental because these cells are undifferentiated. Thus, these results suggest that thiamethoxam decreases the renewal capacity of the midgut epithelium.

This work showed that thiamethoxam causes morphological and histochemical alterations in the brain and midgut of the AHB. Intoxication with thiamethoxam may cause physiological and behavioral changes at the individual level and throughout the colony. Such changes may lead to a reduction in life expectancy (CARVALHO et al., 2009), impairment of the ability to fly (VANDAME et al., 1995) and impairment of learning (EL HASSANI et al., 2008), which may cause the disruption, decline and disappearance of honeybees (NEUMANN; CARRECK, 2010). Furthermore, the present results show that intoxication with sublethal doses ($1/100$ of LC_{50}) of thiamethoxam does not affect the survival of bees but that it can be harmful as high doses that cause the immediate death of the insect.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP for its financial support (grants 2010/15628-7).

REFERENCES

- Andrei. 2009. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 8nd edição. São Paulo: Ed Andrei. 1380 p.
- Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet JL, Carvalho GA, Buleté A, Giroud B, Belzunces LP. 2012. **Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam**. *Ecotoxicol Environ* 82:22-31.
- Blacquièrre, T, Smagghe G, Van Gestel CAM, Mommaerts V. 2012. **Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment**. *Ecotoxicol* 21(4):973-92.
- Bowen ID, Bowen SM, Jones AH. 1998. **Mitosis and Apoptosis: matters of life and death**. New York: Chapman & Hall, 174 p.
- Carvalho SM, Carvalho GA, Carvalho CF, Bueno Filho JSS, Baptista APM. 2009. **Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. *Arqu Inst Biol* 76(4):597-606.
- Casida JE. 2011. **Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms and relevance**. *J Agri Food Chem* 59:2923-2931.
- Chapman RF. 2003. **The insects: structure and function**. 4nd edição. Cambridge: Cambridge University Press. 770 p.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG. 2006. **A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee**. *Insect Mol Biol* 15:615-36.
- Cruz AS, Silva-Zacarin ECM, Bueno OC, Malaspina O. 2010. **Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae**. *Cell Biol Toxicol* 26:165-176.
- Cruz-Landim C. 2009. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 408p.
- Daly HV, Doyen JT, Purcell III AH. 1998. **Introduction to insect biology and diversity**. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 680p.
- Decourtye A, Devillers J. 2010. **Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees**. *Adv Exp Med Biol* 683:85-95.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M. 2007. **The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods**. *Annu Rev Entomol* 52:81-106.
- Devillers J. 2002. **Acute toxicity of pesticides to honey bees**. In: Devillers J, Phamdelègue M-H. *Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals*, Taylor & Francis: London, p 56-66.

- El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C. 2008. **Effects of sublethal doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*)**. Arch Environ Con Tox 54(4):653-661.
- Feulgen R, Rossenbeck H. 1924. **Mikroskopisch – Chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und Die Darauf Beruhend Elective Färbung von Zillkernen in Mikroskopischen Präparaten Hoppe-Seylers**. Z Psychol Chemie 135:203-248.
- Feyereisen, R. 2005 **Insect Cytochrome P450**. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S., Eds. Comprehensive Molecular Insect Science, London: Elsevier. p. 1–77.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. 2009. **Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees**. J Econ Entomol 102:1808-1815.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. 2004. **Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera***. Crop Prot 23:371-378.
- Junqueira LCU, Junqueira LMMS. 1983. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 123p.
- Kakamand FAKH, Mahmoud TT, Amin ABM. 2008. **The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers**. Journal of Dohuk University 11(1):144-151.
- Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, Widmer H. 2001a. **The discovery of tiametoxam: a second-generation neonicotinoid**. Pest Manage Sci 57:165- 176.
- Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, Widmer H. 2001b. **Chemistry and biology of tiametoxam: a second generation neonicotinoid**. Pest Manage Sci 57: 906-913.
- Mcmanus JFA. 1946. **Histological demonstration of mucin after periodic acid**. Nature 158:202.
- Meyer TN, Silva AL. 1999. **Resposta celular ao estresse**. Revista da Associação Medica Brasileira 45:2.
- Moncharmont FXD, Decourtye A, Hantier CH, Pons O, Pham-Delegue M. 2003. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. Environ Toxicol Chem 22:3088-3094.*
- Neumann P, Carreck N. 2010. **Honey bee colony losses**. J Apicult Res 49:1-6.

Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ. 2005 **Biochemical genetics and genomics of insect esterases**. In Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, Eds Comprehensive molecular insect science. London: Elsevier; p. 309-361.

R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Ranson, H., Hemingway, J., 2005. **Glutathione transferases**. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S., Eds. Comprehensive Molecular Insect Science. London, Elsevier. p. 383-402.

Ribi W, Senden TJ, Sakellariou A, Limaye A, Zhang S. 2008. **Imaging honey bee brain anatomy with micro-x-ray-computed tomography**. J Neurosci Meth 171:93-97.

Ritz C, Streibig JC. 2005. **Bioassay analysis using R**. J. Statist. Software 12(5):1-22.

Silva-Zacarin ECM, Gregorc A, Silva De Moraes RLM. 2006. **In situ localization of heat-shock proteins and cell death labeling in the salivary gland of acaricide treated honeybee larvae**. Apidologie 37:507-515.

Smirle MJ, Winston ML. 1988. **Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems**. Can J Zool 66:1938-1942.

Stokstad E. 2007. **The case of the empty hives**. Science 316:970-972.

Tautz J. 2008. **The buzz about bees: biology of a superorganism**. Berlin: Springer 284 pp.

Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM. 2007. **Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons**. Neuro-toxicol 28,829-842.

Tomizawa M, Casida JE. 2003. **Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors**. Annu Rev Entomol 48: 339-364.

Therneau T, Lumley T. 2012. **Survival analysis, including penalised likelihood**. Package version 2:36-12.

Vandame R, Meled M, Colin M-E, Belzunces LP. 1995. **Alteration of homingflight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin**. Environ Toxicol Chem 14:855-860.

Vanengelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. 2009. **Colony collapse disorder: A descriptive study**. Plos One, 4:8.

TABLES

Table 1. Summary of morphological and histochemical analyses on the brain structures of Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

Table 2. Summary of morphological and histochemical analyses on the digestive cells of the midgut from Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

Table 3. Summary of morphological and histochemical analyses on the regenerative cells from Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Mortality of newly emerged workers of Africanized *A. mellifera* according to the ingestion of food contaminated with several doses of thiamethoxam (1 to 8 ng/ μ L diet).

Figure 2. Survival rate of newly emerged workers of Africanized *A. mellifera* according to the food intake during different treatments: control without solvent (C-); solvent control (C+); $1/10$ of LC_{50} of thiamethoxam (0.428 ng i.a./ μ L diet) and $1/100$ of LC_{50} of thiamethoxam (0.0428 ng i.a./ μ L diet).

Figure 3. Images of the mushroom bodies of newly emerged workers of Africanized *A. mellifera*, stained with HE (A and B), subjected to Xylidine-Ponceau technique (C and D), PAS reaction (E and F), and the Feulgen reaction (G and H), with or without exposure to thiamethoxam. **A** - mushroom body detail from a control honeybee treated without solvent with one day, with no observed morphological changes, stained with hematoxylin-eosin. **B** - details of the mushroom body of a honeybee exposed to the $LC_{50}/100$ for 3 days, showing the presence of strongly stained cells (arrow). **C** - detail of the mushroom body from a control honeybee without solvent, at eight days of treatment, showing cells stained uniformly, subject to Xylidine-Ponceau technique. **D** - details of the mushroom body of a honeybee exposed to $LC_{50}/10$ for three days, showing the presence of strongly stained cells (arrow), indicating increased protein synthesis or cell compaction. **E** - overview of the mushroom body from a control honeybee without solvent, for three days, subjected to PAS reaction. **F** - details of the

mushroom body of a honeybee exposed to LC₅₀/100 for three days, subjected to the Feulgen reaction.

Ci = inner compact Kenyon cells; **Nc** = non-compact Kenyon cells.

Figure 4. Images of the optical lobes of newly emerged workers of Africanized *A. mellifera*, stained with HE (A and B), subjected to the Xylidine-Ponceau technique (C and D), the PAS reaction (E and F), and the Feulgen reaction (G and H), with or without exposure to thiamethoxam. **A** - details of the optical lobe from a control honeybee after one day, with no observable morphological alterations, stained with hematoxylin-eosin. **B** - details of a honeybee optical lobe exposed to LC₅₀/100 for three days. Note condensed cells with more intense staining (arrow). **C** - details of an optical lobe from a control honeybee without solvent, after eight days, showing no alterations, when subjected to the xylidine-Ponceau technique. **D** - details of a honeybee optical lobe exposed to LC₅₀/100 for one day, with the presence of cells with intense staining. **E** - details of a honeybee optical lobe exposed to LC₅₀/10 for five days, subject to PAS reaction. **F** - details of a honeybee optical lobe exposed to LC₅₀/100 for three days, subjected to the Feulgen reaction.

Lo = lobula; **Me** = medula; **Qe** = outer chiasm; **Qi** = inner chiasm.

Figure 5. Images of the midguts from newly emerged workers of Africanized *A. mellifera*, stained with HE (A and B), subjected to Xylidine-Ponceau technique (C and D), the PAS reaction (E and F), and the Feulgen reaction (G and H), with or without exposure to thiamethoxam. **A** - midgut of a honeybee from the control group without solvent, after one day, showing the typical morphology of the organ. **B** - midgut of a honeybee exposed to LC₅₀/10 for five days in which there is an increase of cell removal (**Ce**) and the presence of apocrine secretion (**S**). **C** - midgut of a honeybee from the control group without solvent, after five days, subjected to the technique of Xylidine Ponceau, and without changes. **D** - midguts of honeybees exposed to LC₅₀/100 for five days showing increased cell elimination (**Ce**) and the presence of perichromatin halos (**H**). **E** - midgut of a honeybee from the control group without solvent after one day, subject to PAS reaction. **F** - midguts of honeybees exposed to LC₅₀/100 for eight days. Note positive granules to the PAS reaction (**Gr**). **G** and **H** - midgut of a honeybee from the control group without solvent after one day, showing a weakly stained nucleus using the Feulgen reaction.

Cd = digestive cell; **Cr** = regenerative cell; **L** = lumen; **N** = cell nucleus; **Ve** = vesicle; **S** = apocrine secretion.

Figure 6. Images of the nests of regenerative cells in the midguts of newly emerged workers of Africanized *A. mellifera* stained with HE (A and B), subjected to the technique of Xylidine-Ponceau (C and D), the PAS reaction (E and F), and the Feulgen reaction (G and H), with or without exposure to thiamethoxam. **A** - nest of regenerative cells with a typical morphology (C-, 5 days) **B** - regenerative cells with cytoplasmic vacuolization (**V**) (five days, LC₅₀/10). **C** - weakly stained cytoplasm of regenerative cells subjected to the Ponceau Xylidine (C-, 8 days). **D** - nest of regenerative cells with negative cytoplasmic regions (**Rn**) to Xylidine-Ponceau (LC₅₀/10, one day). Note the decrease in the number of regenerative cells composing this nest. **E** - regenerative cells without staining, subject to PAS (C-, one day). **F** - nest of regenerative cells without staining, of the honeybee group subjected to LC₅₀/10 for five days subject to PAS. **G** - nest of regenerative cells with weak nuclear staining by the Feulgen reaction (C-, 3 days). **H** - nests of regenerative cells from the group subjected to LC₅₀/10 for three days (Feulgen reaction), showing staining similar to the control group.

Cd = digestive cell; **Cr** = regenerative cell; **L** = lumen; **N** = cell nucleus; **S** = apocrine secretion.

TABLES

Table 1. Summary of morphological and histochemical analyses on the brain structures of Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

Treatment		Morphological		Histochemical					
		Mushroom Bodies	Optical Lobe	Mushroom Bodies			Optical Lobe		
		CC	CC	XYP	PAS	FEU	XYL	PAS	FEU
1 day	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	LC ₅₀ /10	-	-	+++	+	+	++	+	+
3 days	LC ₅₀ /100	-	+	+	+	+	+++	+	+
	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
5 days	LC ₅₀ /10	-	-	+++	+	+	++	+	+
	LC ₅₀ /100	+	+	+++	+	+	+++	+	+
	C-	-	-	+	+	+	+	+	+
8 days	C+	-	-	+	+	+	+	+	+
	LC ₅₀ /10	+	-	++	+	+	++	+	+
	LC ₅₀ /100	+	+	+	+	+	++	+	+

(+) Presence of alteration; (++) Alteration moderately present; (+++) Alteration extremely present; (-) alteration absent; (LC₅₀) lethal concentration; (C-) control without acetone; (C+) control with acetone; (CC) condensed cells; (FEU) Fuelgen Reaction; (XYP) Xylidine-Ponceau technique; (PAS) PAS reaction.

Table 2. Summary of morphological and histochemical analyses on the digestive cells of the midgut from Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

Treatment		Morphological			Histochemical						
					XYP			PAS			FEU
		VA	AS	EC	CIT	PV	PH	CIT	PG	PV	CC
1 day	C-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	C+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	LC ₅₀ /10	++	-	+	-	++	-	-	++	-	-
	LC ₅₀ /100	++	+	++	-	++	-	-	+	-	-
3 days	C-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	C+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	LC ₅₀ /10	+	+	++	+	++	-	-	+	-	-
	LC ₅₀ /100	+	+	++	+	++	-	-	++	-	-
5 days	C-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	C+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	LC ₅₀ /10	+	+	++	+	++	-	-	+	-	-
	LC ₅₀ /100	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-
8 days	C-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	C+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	LC ₅₀ /10	-	++	+++	-	+	-	-	++	-	-
	LC ₅₀ /100	-	++	+++	-	+	+	-	++	-	-

(+) Presence of alteration; (++) Alteration moderately present; (+++) Alteration extremely present; (-) alteration absent; (LC₅₀) lethal concentration; (C-) control without acetone; (C+) control with acetone; (FEU) Fuelgen Reaction; (XYP) Xylidine-Ponceau technique; (PAS) PAS reaction.; (VA) vacuolization; (AS) apocrine secretion; (EC) eliminated cells; (CIT) cytoplasm; (CC) compacted chromatin; (PH) perichromatin halo; (PG) presence of granules; (PV) presence of vesicles.

Table 3. Summary of morphological and histochemical analyses on the regenerative cells from Africanized honeybees exposed to sublethal doses of thiamethoxam.

Treatment	Morphological		Histochemical				
			XYL	PAS		FEU	
	VA	DC	CIT	CIT	CC	PG	
1 day	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
	LC ₅₀ /10	+	+	-	-	-	-
3 days	LC ₅₀ /100	-	-	-	-	-	-
	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
5 days	LC ₅₀ /10	-	+	-	-	-	-
	LC ₅₀ /100	+	+	-	-	-	-
	C-	-	-	+	-	-	-
8 days	C+	-	-	+	-	-	-
	LC ₅₀ /10	+	-	-	-	-	-
	LC ₅₀ /100	-	-	+	-	-	-
8 days	C-	-	-	+	-	-	-
	C+	-	-	+	-	-	-
	LC ₅₀ /10	-	-	-	-	-	-
	LC ₅₀ /100	-	-	-	-	-	-

(+) Presence of alteration; (++) Alteration moderately present; (+++) Alteration extremely present; (-) alteration absent; (LC₅₀) lethal concentration; (C-) control without acetone; (C+) control with acetone; (FEU) Fuelgen reaction; (XYP) Xylidine-Ponceau technique; (PAS) PAS reaction; (VA) vacuolization; (DC) decrease in cell number; (CIT) cytoplasm; (CC) compacted chromatin; (PG) presence of granules.

Figure 1

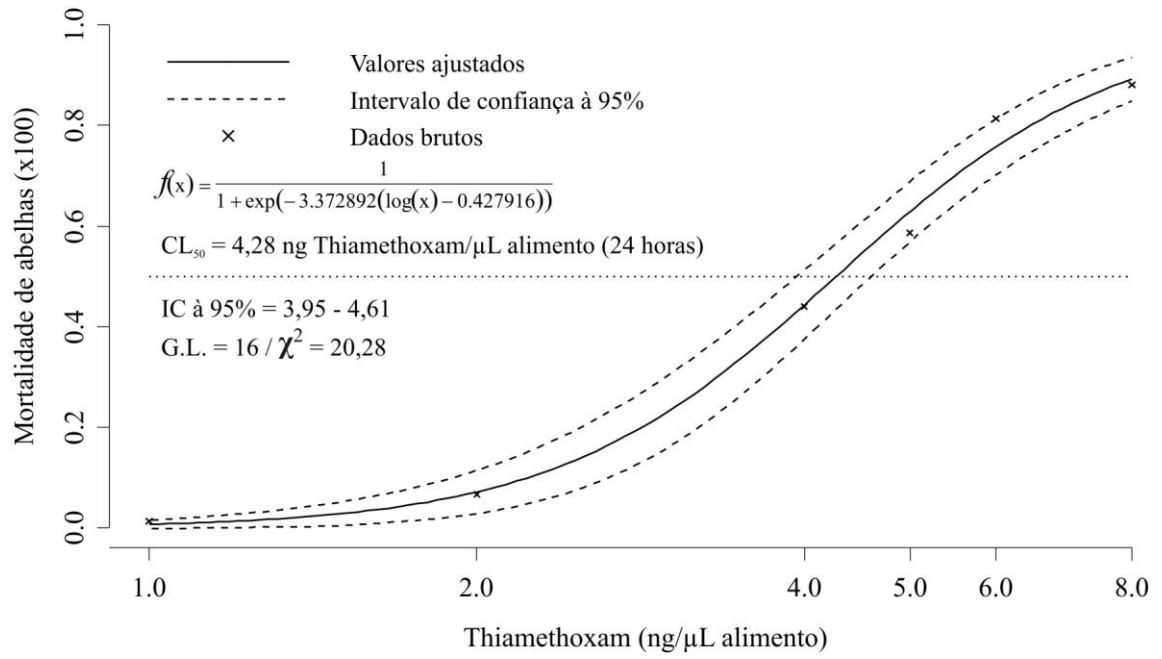


Figure 2

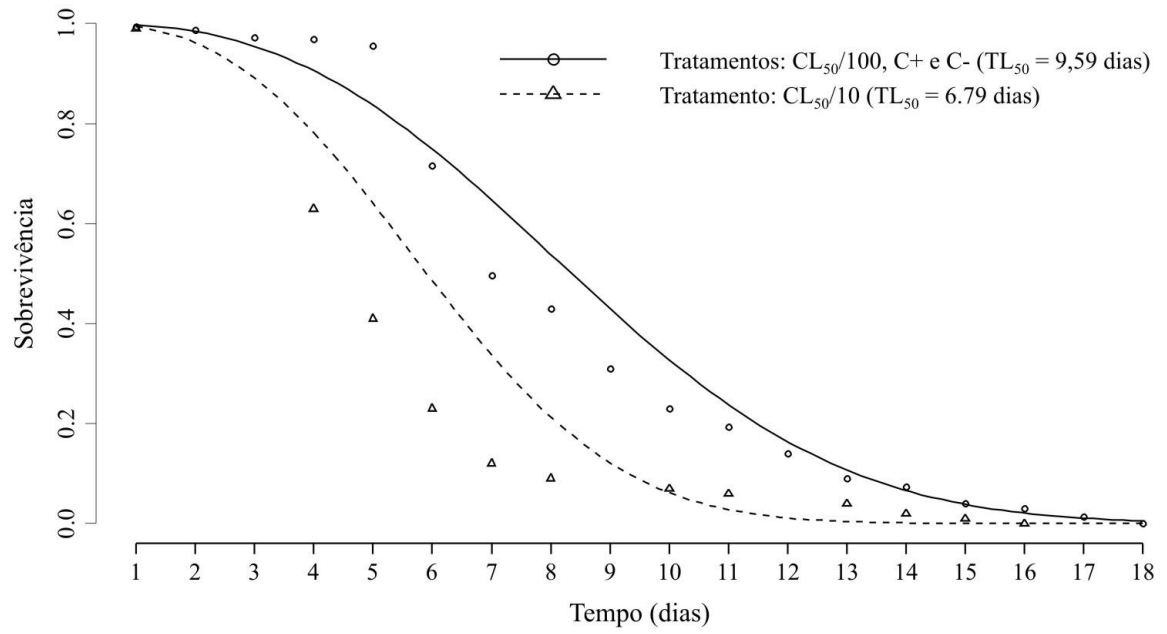


Figure 3

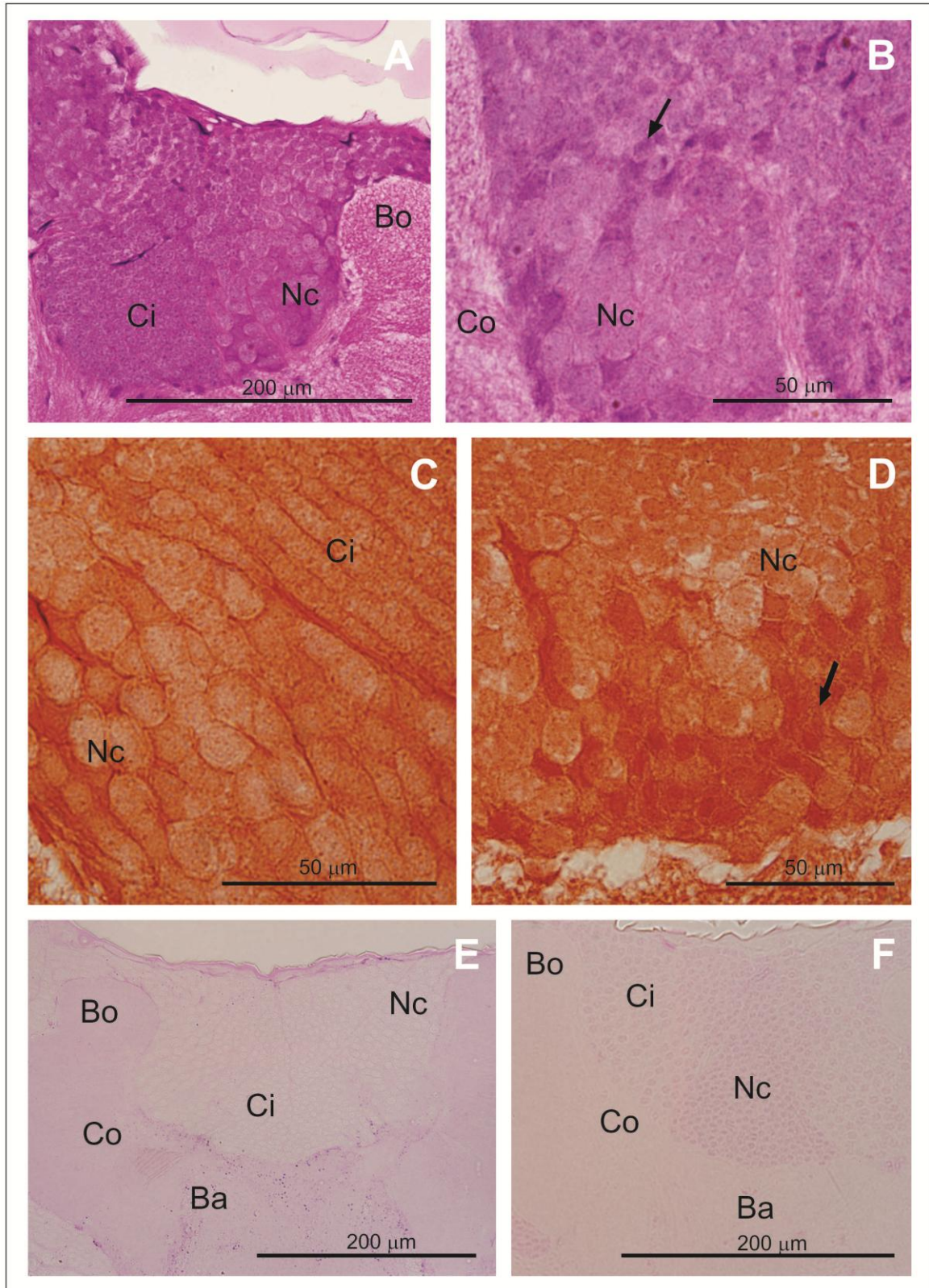


Figure 4

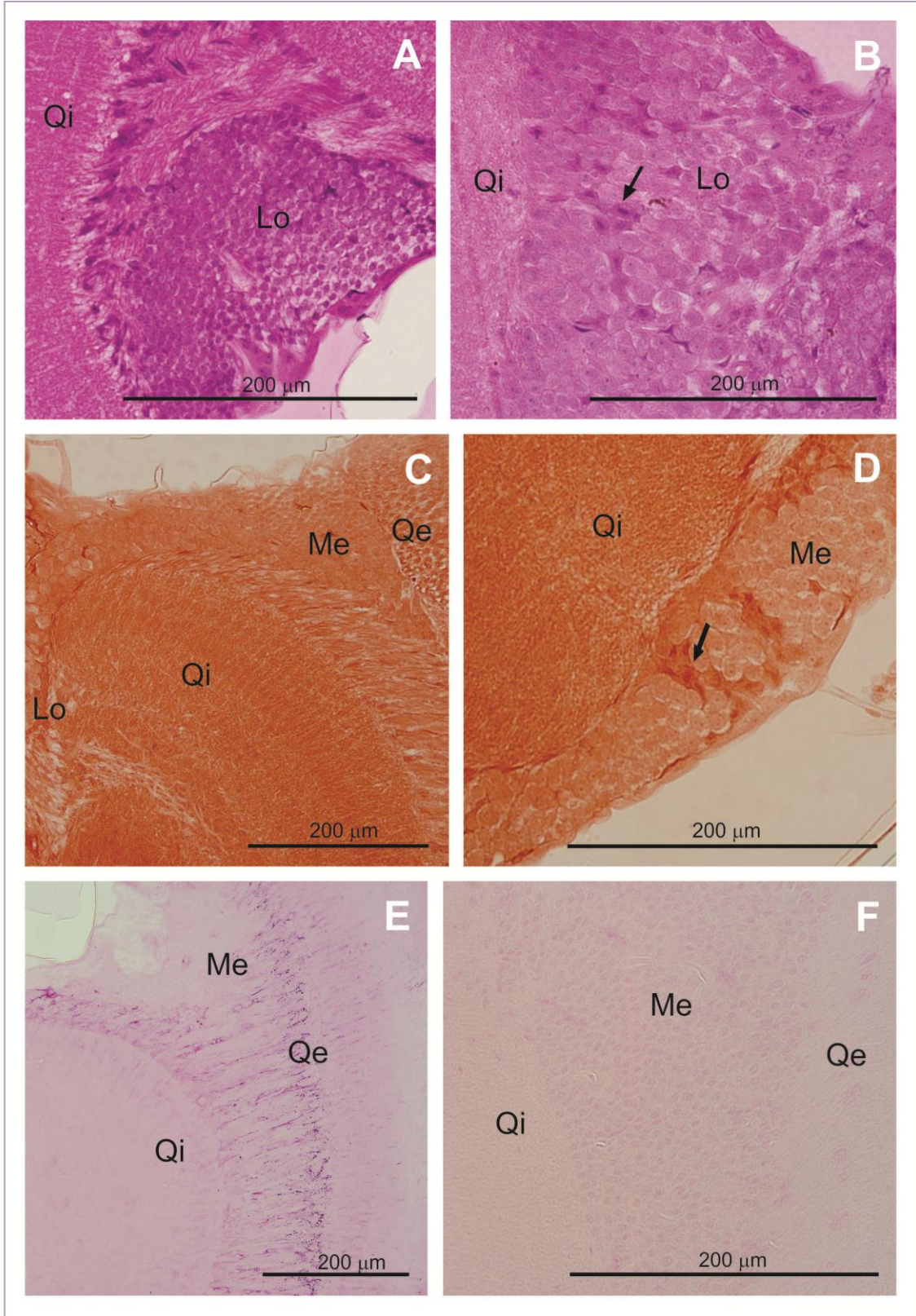


Figure 5

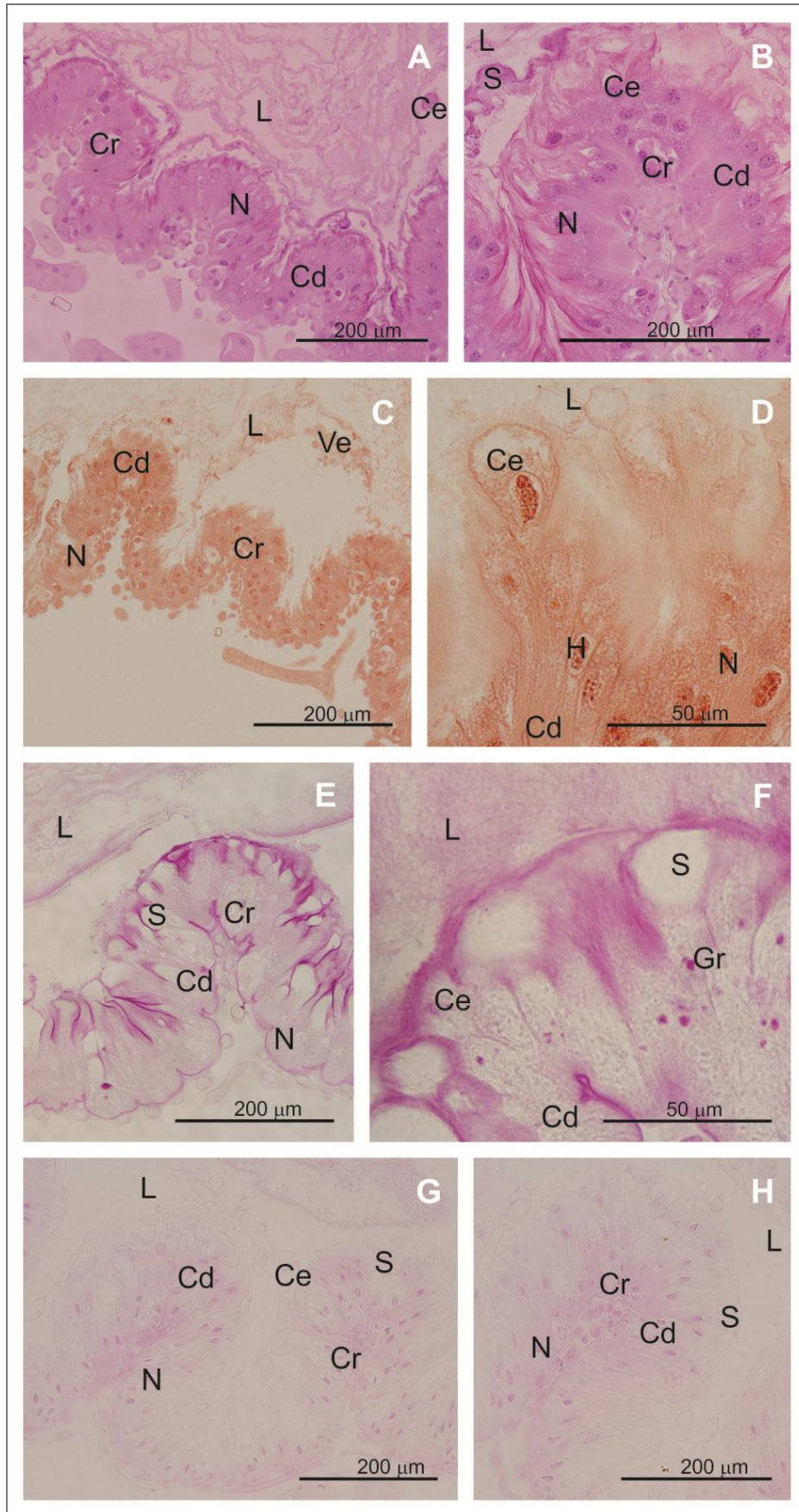
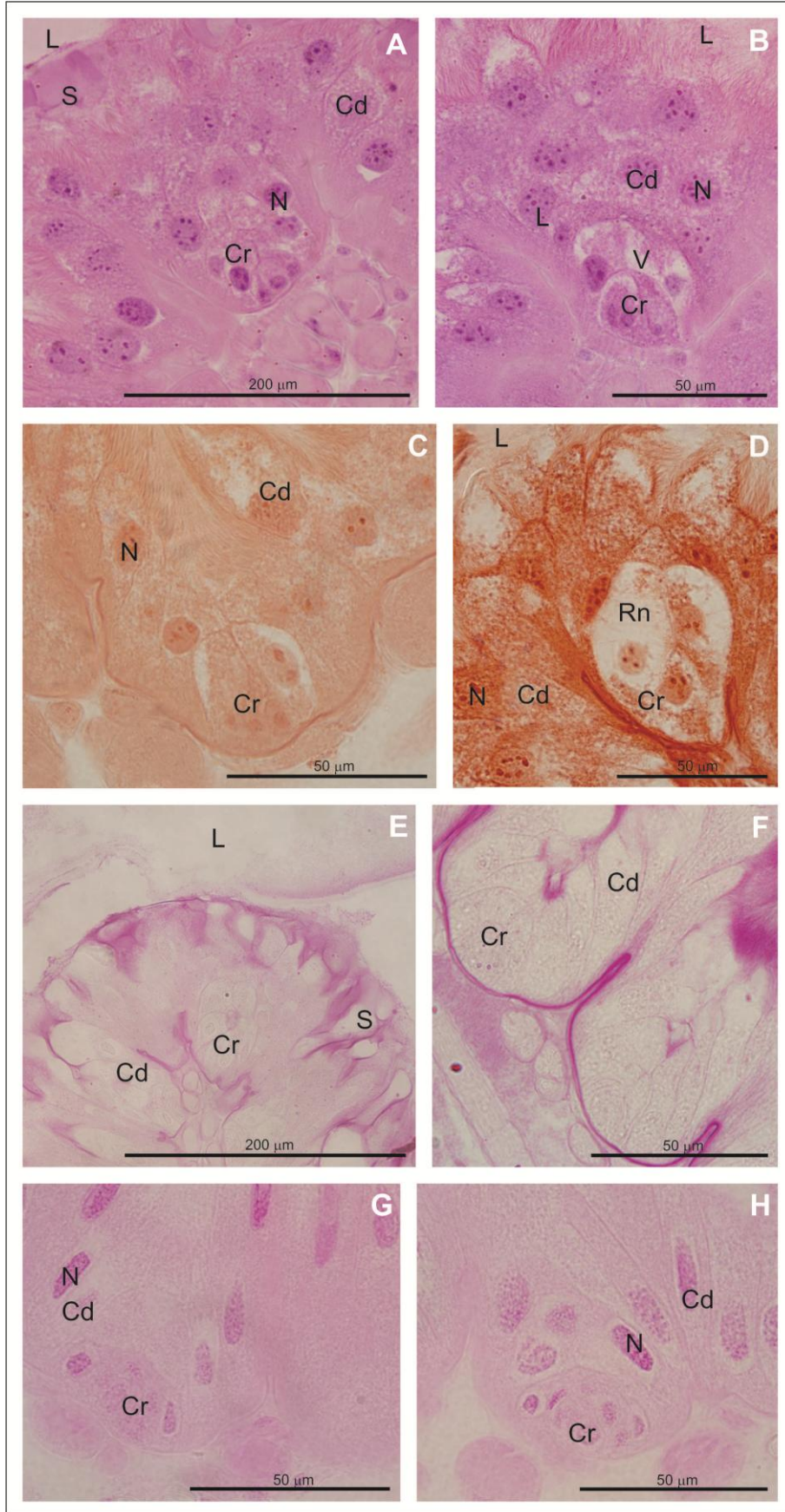


Figure 6



Rio claro, 12 de dezembro de 2012

Prof Dr Osmar Malaspina

(Orientador)

Dra Thaisa Cristina Roat

(Co-orientadora)

Regiane Alves de Oliveira

(Aluna)