
Ciências Biológicas

HELLEN MARIA SOARES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO
IMIDACLOPRIDE, SOBRE O SISTEMA
NERVOSO DE *Apis mellifera*
AFRICANIZADA, ATRAVÉS DA
EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS.**

HELLEN MARIA SOARES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO IMIDACLOPRIDE, SOBRE O
SISTEMA NERVOSO DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA,
ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador: Profa. Dra. Roberta C. F. Nocelli

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

Rio Claro
2009

595.799 Soares, Hellen Maria
S676a Avaliação dos efeitos do imidaclopride, sobre o sistema nervoso de
Apis mellifera africanizada, através da expressão da proteína Fos. / Hellen
Maria Soares. - Rio Claro : [s.n.], 2009
43 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Co-Orientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Abelha. 2. Apis mellifera. 3. Imidaclopride. 4. Sistema nervoso. 5.
Proteína Fos. I. Título.

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

Dedico à minha mãe Maria Aparecida Lopes Soares, ao meu irmão Willian Augusto José Soares e ao meu namorado Rodrigo dos Santos Lima, pessoas muito importantes para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela orientação, atenção e paciência diante de minhas dúvidas.

À Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação e pelo estímulo durante a realização deste trabalho.

À Cynthia R. O. Jacob, pela ajuda e incentivo diante das dificuldades. Ter você ao meu lado foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro à pesquisa realizada.

Ao laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ-CEIS) pelo apoio técnico fornecido e especialmente ao professor Mário Sérgio Palma pela atenção.

Ao técnico Antônio Sérgio Pascon, pela disponibilidade em ajudar, coletando as abelhas até mesmo durante as férias.

À Necis e aos técnicos Gerson e Antônio pela gentileza com que atenderam as minhas necessidades.

Ao 5º CBN 2009 pela convivência durante cinco anos, principalmente à Cynthia, à Leila, à Priscila Felipe, à Gabrielle e ao Wagner, agradeço a amizade e apoio.

A toda a minha família, principalmente ao meu irmão, Willian, aos meus pais, Ariovaldo e Maria Aparecida, e aos meus avós maternos Arlindo e Maria de Lourdes, pela confiança, pelo amor incondicional e pelo incentivo. Por que me ensinaram que o sucesso é consequência de muito trabalho e perseverança.

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

À meus primos Juliana Cristina Lopes, Agda Cristina Brigatto e Gustavo Luiz Lopes que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À Irany dos Santos Lima, Valmir Lima e Valmir dos Santos Lima Junior, pela amizade.

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

“Não encontre um defeito, encontre uma solução.”

Henry Ford

RESUMO: As abelhas *Apis mellifera* africanizadas são consideradas importantes agentes polinizadores que estão frequentemente expostos à ação tóxica de inseticidas aplicados em cultivos. O imidaclopride é um inseticida sistêmico do grupo dos neonicotinóides e atua como agonista da acetilcolina nas sinapses do sistema nervoso central. Em abelhas foi verificado, através do método de resposta de extensão da probóscide (REP), que doses subletais de imidaclopride provocam deficiência no aprendizado olfatório e prejudicam a memória. A proteína Fos, expressa em neurônios, tem sua transcrição alterada por diversos estímulos como estresse, lesões, exposição a toxinas ou a predadores. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos neurotóxicos do inseticida imidaclopride, em operárias de *Apis mellifera* africanizadas, através da análise da expressão de Fos. Abelhas recém-emergidas e campeiras foram tratadas com 10, 20, 40 e 80 ng/abelha de imidaclopride e seus cérebros dissecados 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas após a ingestão do composto. Houve uma marcação positiva para Fos nos ocelos e na região dos olhos, principalmente na lâmina e na retina. Tal resultado era esperado, uma vez que as abelhas foram expostas a luminosidade, durante a realização dos ensaios. Os lobos antenais são constituídos por prolongamentos de células sensoriais das antenas e pelos neurônios motores e os corpos pedunculados são tidos como os centros de processamento dos estímulos sensoriais recebidos pelos olhos e pelas antenas, assim, esperava-se que houvesse marcação positiva nestas regiões. Porém isto não foi observado no presente trabalho. Analisando-se os valores quantitativos da expressão da proteína Fos percebeu-se que não houve um padrão de resultados tendo muita variação entre os valores de mesmo tratamento, dessa forma, a expressão da proteína Fos não é um bom indicador dos efeitos neurotóxicos das doses subletais de imidaclopride sobre o cérebro de operárias recém-emergidas e campeiras de *Apis mellifera* africanizadas.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, imidaclopride, sistema nervoso, proteína Fos.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVO	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Material biológico	18
4.2 Tratamento de operárias pela ingestão de imidaclopride	18
4.3 Microtomia	18
4.4 Imunohistoquímica	19
4.5 Aquisição de imagens	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
Tabela 1	24
Tabela 2	25
Tabela 3	26
Tabela 4	27
Tabela 5	28
Tabela 6	29
Figura 1	30
Figura 2	31
Figura 3	32
Figura 4	33
Figura 5	34
Figura 6	35
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ASSINATURAS	43

1. INTRODUÇÃO

A descoberta das propriedades inseticidas do DDT, por Paul Müller no ano de 1939, incentivou muitas pesquisas de compostos organossintéticos no controle de pragas. Antes deste fato histórico, a maioria dos praguicidas utilizados na agricultura eram constituídos de compostos inorgânicos (arsênico branco, arseniato de cálcio, arseniato de chumbo, entre outros) e de extratos vegetais (nicotina, piretro, rotenona, entre outros) (MARICONI, 1983; LARINI, 1999). Além dos inseticidas de origem botânica, inorgânica ou sintética, aqueles provenientes da atividade microbiana (por exemplo, *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus* spp.) também têm merecido grande atenção (MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002).

Com base na aplicação, os inseticidas podem ser sistêmicos ou não sistêmicos. Ambos os tipos de inseticidas possuem ação de contato, ingestão, fumigação e um certo poder de penetração nos tecidos vegetais, porém, apenas os sistêmicos são translocados, pela seiva, de uma parte da planta para outra (MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002).

Os inseticidas agem sobre os organismos vivos pela alteração de processos fisiológicos e/ou bioquímicos. Existem aqueles que regulam o crescimento dos insetos interferindo nos processos de ecdise (por exemplo, as benzoilfenilurêias que atuam como inibidoras da síntese de quitina) ou de metamorfose (por exemplo, aqueles que funcionam como agonistas ou antagonistas do hormônio juvenil). Outros inseticidas inibem a respiração celular alterando o transporte de elétrons ou a síntese de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa (NOVOS..., 1999; GALLO et al., 2002).

Embora existam vários mecanismos de ação dos inseticidas, o principal alvo tem sido o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta. Os inseticidas neurotóxicos podem atuar na transmissão axônica, nas sinapses periféricas ou nas sinapses centrais.

Inseticidas como os piretróides e o DDT agem como moduladores dos canais de sódio (Na^+) das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos. Os canais de Na^+ abrem-se no momento da transmissão do impulso nervoso e fecham-se imediatamente após a despolarização da célula nervosa. Esses inseticidas mantêm os canais de Na^+ abertos por um período de tempo mais longo, acarretando em um fluxo maior deste íon para o interior do axônio e alterando, assim, a transmissão do impulso nervoso levando os insetos a morte devido à hiperexcitabilidade. O DDT interfere tanto nos canais de Na^+ abertos como nos fechados; enquanto, os piretróides atuam apenas nos canais de Na^+ abertos (NOVOS..., 1999; NARAHASHI, 2000; GALLO et al., 2002).

As sinapses periféricas dos nervos motores (junção neuro-muscular) dos insetos não são colinérgicas, mas utilizam dois outros neurotransmissores: L-glutamato (excitador) e γ -aminobutírico ou GABA (inibidor). Tal junção é chamada glutaminérgica. Inseticidas que atuam na junção glutaminérgica interferem particularmente no sistema GABA, que se associa à presença de íons cloro (Cl^-). As milbemicinas, por exemplo, são agonistas do GABA, ou seja, elas aumentam a permeabilidade da membrana da célula nervosa para o íon Cl^- , bloqueando a transmissão do estímulo nervoso e culminando na paralisia e morte do inseto. Por outro lado, os ciclodienos e fenil-pirazóis são antagonistas de GABA e levam a hiperexcitação do sistema nervoso central do inseto por estimular a transmissão do impulso nervoso pela diminuição da permeabilidade das células nervosas aos íons Cl^- (COLE et al., 1993; NOVOS..., 1999; GALLO et al., 2002).

Os inseticidas neurotóxicos podem, ainda, interferir nas sinapses centrais agonisticamente ou antagonisticamente à acetilcolina. Com ação antagonista, o cartap atua competindo com a acetilcolina pelos receptores nicotínicos de acetilcolina. A intoxicação leva o inseto a uma rápida paralisia por interromper a transmissão do impulso nervoso (LEE, 2003). Já os neonicotinóides são agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina localizados nos neurônios pós-sinápticos (SUCHAIL et al., 2003). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente, portanto, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua e levam a hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (NOVOS..., 1999; GALLO et al., 2002).

O imidaclopride (conhecido comercialmente como Gaucho) é um inseticida pertencente a família dos neonicotinóides com fortes efeitos tóxicos (LAMBIN et al., 2001; SUCHAIL et al., 2003). No Brasil, este é utilizado no controle de pragas aéreas e do solo em culturas de cana-de-açúcar, *Citrus*, café, entre outras (BRASIL, 2008). Por ser um inseticida sistêmico o imidaclopride é translocado, pela seiva, de uma parte da planta para outra e pode ser encontrado até mesmo no pólen e nas sementes (NAUEN et al., 2001; SCHMUCK et al., 2001). Uma vez no sistema da planta, este composto é degradado em mais de cinco metabólitos, dos quais dois deles, olefina e 5-hidroxiimidaclopride, também são tóxicos ao sistema nervoso dos insetos.

Estudos toxicológicos mostram efeitos adversos do imidaclopride sobre o meio ambiente e sobre os organismos não-alvo deste inseticida. Jemec et al. (2007) constataram que o imidaclopride e uma de suas fórmulas comerciais, o Confidor SL 200, afetam a reprodução do microcrustáceo *Daphnia magna*, porém o Confidor provoca tais efeitos em concentrações

mais baixas que o imidaclopride puro. O potencial negativo do imidaclopride não foi apenas verificado em ecossistemas aquáticos, Capowiez e Bérard (2006) notaram que a infiltração do inseticida no solo alterou o comportamento exploratório de duas espécies de minhocas *Aporrectodea nocturna* e *Allolobophora icterica* (respectivamente, exógena e endógena).

Outra preocupação do uso indiscriminado de inseticidas é a evolução da resistência que culmina na aplicação mais freqüente de pesticidas, no aumento na dosagem do produto, no uso de misturas indevidas de tóxicos, na substituição de um praguicida por outro de maior toxicidade e na maior contaminação do meio ambiente (MARÇON, 2009).

Em estudos com o besouro *Leptinotarsa decemlineata*, Zhao et al. (2000) observaram que a exposição constante ao inseticida neonicotinóide imidaclopride culminou em insetos 100.8 vezes, para adultos, e 13.2 vezes, para larvas, mais resistentes ao inseticida em apenas três gerações. Os autores ainda sugerem que esta resistência consiste numa herança incompleta, autossômica e recessiva, cujo gene está ligado à atividade de enzimas oxidases responsáveis pela desintoxicação do organismo.

Smirle e Winston (1988) afirmam que o desenvolvimento da resistência a pesticidas relacionam-se diretamente com a ação de enzimas de detoxificação, uma vez que os pesticidas induzem a atividade dessas. Eles mostraram, através da atividade de enzimas de detoxificação, que as abelhas *Apis mellifera* L. possuem uma adaptação ao forrageamento em ecossistemas contaminados. Neste trabalho foram estudados dois grupos enzimáticos: o das oxidases ou monooxigenases e o das GHS- transferases. Para ambas houve uma diminuição da atividade enzimática em relação à idade das abelhas, porém houve um aumento na capacidade de detoxificação das enzimas (aumento da atividade enzimática por miligrama de proteína).

Liu et al. (2005) levantaram a hipótese de que a resistência a organofosforados, carbamatos e neonicotinóides poderiam também estar associadas à mutações nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), além de mutações nos genes que codificam a acetilcolinesterase, como o mostrado na maioria dos trabalhos (MUTERO et al., 1994; BROGDON E MCALLISTER, 1998; FOSTER et al., 2003; FFRENCH- CONSTANT et al., 2004). Os nAChRs são formados de subunidades, das quais cinco delas (Nl α 1–Nl α 4 e Nl β 1) foram clonadas da espécie *Nilaparvata lugens* (praga do arroz), no trabalho de Liu et al. (2005), com o intuito de compreender a base molecular da resistência ao inseticida imidaclopride. Uma forte correlação entre a freqüência de mutações pontuais na sequência gênica Y151S das subunidades Nl α 1 e Nl α 3 com o aparecimento de resistência ao imidaclopride em insetos praga do arroz foi mostrada. Em 25 gerações, quando a resistência

ao imidaclopride foi de 73 vezes, 84% da população de *N. lugens* era heterozigota para a mutação em Y151S e o restante era homozigota. Em 35 gerações, resistência de 250 vezes, todos os insetos testados foram homozigotos para a mutação. Esses dados levantam uma intrigante questão, não respondida pelo trabalho: a mutação é de caráter recessivo e apenas em homozigoze conferem fenótipo de resistência ou o aparecimento de apenas uma mutação produz subunidades com um mínimo de proteção contra o imidaclopride? Neste estudo, ainda, mostrou-se que as duas subunidades citadas apresentam alta sequência de similariedade com nAChRs de *Drosophila* (Nl α 1 apresenta 73% de similariedade com D α 1/ALS e Nl α 3 apresenta 56% de similariedade com D α 3) que em trabalhos anteriores foram identificadas como alvos com alta afinidade pela molécula do inseticida em questão.

Muitas pesquisas vêm sendo feitas sobre a ação do imidaclopride no sistema nervoso de abelhas da espécie *Apis mellifera* (GUEZ et al., 2001; GUEZ et al., 2003; MEDRZYCKI et al., 2003; SUCHAIL et al., 2003; DECOURTYE et al., 2004; DECOURTYE et al., 2005; entre outros). Esses insetos são importantes agentes polinizadores que freqüentemente sofrem a ação tóxica de produtos químicos aplicados nas áreas de cultivo. Malaspina e Silva-Zacarin (2006) afirmaram que houve uma redução no número de espécies de abelhas devido ao aumento da atividade de forrageamento em culturas tratadas com pesticidas.

No Brasil, a maioria dos ninhos naturais encontrados correspondem às formas híbridas, as chamadas *Apis mellifera* africanizadas, provenientes do cruzamento de diversas subespécies originárias da Europa e África (IMPERATIZ-FONSECA et al., 1993).

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

Nem sempre as abelhas forrageiras entram em contato com doses letais dos inseticidas. Em pequenas doses, o imidaclopride não causa a morte das abelhas, porém, induz a mudanças no comportamento, além da diminuição na atividade de forrageamento e desorientação, o que pode afetar temporariamente toda a colônia. As doses que provocam tais efeitos são conhecidas como subletais, ou seja, abaixo da DL₅₀ (MEDRZYCKI et al., 2003). Medrzycki et al. (2003) realizaram testes laboratoriais e analisaram que abelhas tratadas com

doses subletais de imidaclopride tiveram sua mobilidade reduzida e declínio na capacidade de comunicação. Esses sintomas apareceram de 30 a 60 minutos após a administração oral do inseticida e duraram por muitas horas.

Decourtye et al. (2004) verificaram que após trinta minutos de tratamento oral com imidaclopride, as abelhas apresentaram uma deficiência no aprendizado olfatório verificada através do método de resposta de extensão da probóscide (REP). Esse método visou reproduzir a interação entre abelha e a planta. Quando a abelha forrageia e chega ao botão floral, ela instintivamente estende sua probóscide como reflexo dos receptores gustativos na antena, tarso ou outras partes que são estimuladas pelo néctar. Esse reflexo induz a abelha a coletar o néctar e memorizar o odor floral ali presente. (DECOURTYE et al., 2005).

Lambin et al. (2001) explicaram que a REP é induzida pela estimulação do néctar na antena que ativa os neurônios motores para a movimentação dos músculos do aparato bucal. A repetição dessas estimulações naturalmente leva a um decréscimo gradual da REP. Eles aplicaram diferentes doses do inseticida imidaclopride no tórax de abelhas para determinar alterações na sensibilidade olfatória (proporcional a menor concentração de solução de açúcar capaz de provocar REP), na atividade motora e no número de estimulações necessárias para o decréscimo da REP. Nas doses de 5, 10 e 20 ng/abelha houve um aumento na sensibilidade olfatória, enquanto que nas doses de 1.25 e 2.5 ng/abelha a função olfato/gustativa não foi afetada. A atividade motora foi prejudicada nas doses de 2.5, 5, 10 e 20 ng/abelha (efeito maximizado 60 minutos após a aplicação) e favorecida pela dose de 1.25 ng/abelha (independentemente do tempo). Por não afetar a função olfato/gustativa e a atividade motora, a única dose em que foi possível analisar o número de estimulações necessárias para o decréscimo da REP foi a de 1.25 ng/abelha. Assim, verificou-se que o imidaclopride reduz o número de estimulações necessárias para o decréscimo desta resposta.

Em estudos com abelhas *Apis mellifera* L., Ramirez-Romero et al. (2005) avaliaram os efeitos dos inseticidas deltametrina e imidaclopride e da proteína Cry1 Ab expressa por plantas geneticamente modificadas (produzida naturalmente pela bactéria *Bacillus thuringiensis*) sobre a mortalidade, consumo de xarope, atividade forrageadora, aprendizagem olfatória pelo método de extensão da probóscide e capacidade de vôo desses insetos. Os autores concluíram que os inseticidas sintéticos (500mg/ Kg de deltametrina e 48mg/ kg de imidaclopride) são mais prejudiciais às abelhas do que a proteína Cry1 Ab (1000mg / Kg), uma vez que essa não afetou significativamente a mortalidade, o consumo de xarope e a capacidade de aprendizagem.

Outro fato interessante é como o imidaclopride é metabolizado no organismo de *Apis mellifera*. Suchail et al. (2003) realizaram o tratamento oral de abelhas com imidaclopride nas doses de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por abelha. Vinte minutos após o tratamento, 70% do inseticida foi detectado no organismo das abelhas, entretanto, apenas 50% era de fato imidaclopride. Os outros 20% correspondiam aos metabólitos 5- hidroximidaclopride e olefina (respectivamente 9% e 8%). Os pesquisadores verificaram, ainda, que havia uma coincidência entre o aparecimento dos metabólitos no corpo das abelhas e a mortalidade dessas. Tais dados mostraram que o imidaclopride é o responsável pela neurotoxicidade e hiperatividade do inseto, mas a letalidade deste é ocasionada também pelos seus metabólitos.

Em estudos com neurônios, nAChR, isolados do lobo antenal de operárias de *Apis mellifera* com mais de 14 dias de idade e posteriormente submetidos ao imidaclopride, Schmuck et al. (2003) mostraram que este composto age como um agonista completo em alguns neurônios, porém em outros a ação é parcial (pouca corrente é transmitida), sugerindo diferentes tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina. Um resultado semelhante obteve Guez et al. (2003) em pesquisa com abelhas *Apis mellifera* tratadas topicamente com o inseticida em questão.

Guez et al. (2001) fizeram experimentos para avaliar os efeitos do imidaclopride sobre a resposta de extensão da probóscide e descobriram que o aprendizado olfatório associativo nas abelhas é idade-dependente. Entre as abelhas do grupo controle, notou-se que as mais velhas (8-10 dias de idade) precisavam de um número maior de estímulos de solução de açúcar nas antenas para que não houvesse mais REP do que as abelhas novas (4-7 dias de idade). Este comportamento é uma adaptação das abelhas mais velhas ao forrageamento, uma vez que a coleta de néctar se dá em locais monótonos e repetitivos. Nas abelhas que receberam aplicação de imidaclopride no tórax, notou-se que o inseticida aumentou o número de estimulações necessárias em abelhas novas e diminuiu o número de estimulações necessárias em abelhas velhas para que a REP fosse interrompida. Dessa forma, Guez et al. (2001) propôs uma hipótese confirmada em 2003 por GUEZ et al.: existem dois subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) com diferentes afinidades ao imidaclopride e seus metabólitos. Abelhas com até 7 dias de idade apresentam o subtipo I de nAChRs, enquanto que abelhas a partir de 8 dias possuem o subtipo I e o subtipo II de nAChRs. O imidaclopride é agonista dos dois subtipos de nAChRs, a olefina é agonista do subtipo I e o 5- hidroximidaclopride é agonista do subtipo II.

Thany et al. (2003) afirmam que existem diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina e seus RNAm são expressos em diferentes etapas do desenvolvimento. Eles

analisaram o subtipo $\alpha 3$ e identificaram que em larvas de *Apis mellifera*, o RNAm desse nAChR estava restrito aos gânglios subesofageanos do sistema nervoso periférico e em operárias adultas a expressão deste se dava nos lobos ópticos, lobos antenais e principalmente no cálice dos corpos pedunculados.

Decourtye et al. (2003) mostraram ainda que a ação do imidaclopride sobre as abelhas é alterada por diversos outros fatores. Em trabalhos com operárias de *Apis mellifera* de inverno e de verão, percebeu-se que a letalidade do imidaclopride se dava em doses menores para as primeiras ($48 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $96 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Por outro lado, em testes de aprendizado olfatório as abelhas de verão se mostraram mais sensíveis ao inseticida. Tais fatos contraditórios os fizeram concluir que as diferenças comportamentais e fisiológicas entre essas operárias e a qualidade do pólen coletado alteram a ação do imidaclopride. Como por exemplo, nas abelhas de inverno o tecido adiposo é mais espesso e é nele que acontece a bioacumulação dos pesticidas; as abelhas de inverno emergem em câmaras mais internas da colônia e a estocagem de pólen na colméia é grande; e as abelhas de verão emergem em câmaras mais ventiladas e quase não há estocagem de pólen na colônia nesta estação. Dessa forma, a exposição à substâncias tóxicas por períodos longos induz a maior mortalidade das operárias de inverno, mas faz com que elas sejam tolerantes a alguns efeitos dos pesticidas.

Em experimentos, Zafeiridou e Theophilidis (2006) expuseram quatro espécies de insetos, *Apis mellifera macedônica*, *Decticus albifrons*, *Vespa orientalis* e *Tenebrio molitor*, a produtos químicos como acetona, imidaclopride e deltametrina para avaliar a alteração metabólica que tais compostos provocam. O metabolismo, neste estudo, foi monitorado através do ritmo respiratório destes animais. Como a atividade dos músculos respiratórios é controlada pelos neurônios motores, que por sua vez são estimulados pelo sistema nervoso central, mostrou-se que a concentração de 50 ng de imidaclopride, aplicada topicamente em *Apis mellifera macedônica*, causou uma gradual inibição respiratória por alterar a atividade dos motoneurônios após a primeira hora de exposição. Em contraste, nas doses de 100 e 500 ng a inibição do trato respiratório foi mais rápida, entre 20 e 40 minutos.

As abelhas *Apis mellifera* africanizadas se adaptam fisiologicamente as alterações ambientais e, assim, podem atuar como um bioindicador natural para a avaliação dos efeitos de inseticidas neurotóxicos. Visto que as mudanças na atividade neuronal refletem a interação entre o organismo e o meio (CHEN et al., 2002), este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos neurotóxicos do inseticida imidaclopride no sistema nervoso de operárias de *Apis mellifera* africanizadas. Como indicador da atividade neuronal foi utilizada a expressão da proteína Fos.

O proto-oncogene *fos*, que codifica a proteína nuclear Fos, é um gene de resposta precoce, ou seja, o início de sua transcrição se dá momentos após o organismo sofrer um estímulo químico, elétrico ou fisiológico. A maioria dos neurônios expressa pouco ou não expressa a proteína Fos em condições normais (MORGAN et al., 1987), mas qualquer tipo de estímulo (estresse, lesões, alterações climáticas e luminosas, exposição a predadores ou a toxinas e até crescimento e diferenciação celular) induz rapidamente a transcrição de Fos nos mesmos.

A fosfoproteína Fos é denominada de fator de transcrição induzível, pois sua função é ativar a codificação de outros genes de resposta tardia (SHENG E GREENBERG, 1990). Dessa forma, Fos pode aparecer em diversos tipos celulares regulando a ação de outras proteínas.

Para que Fos se ligue a um determinado DNA, dando início a sua transcrição, é necessário que esta forme um complexo heterodimérico com proteínas da família Jun. O heterodímero interage com uma sequência consensus -TGACTCA - (CURRAN E FRANZA, 1988), denominada de Ativador da Proteína-1 (AP-1), ativando a expressão do gene em questão.

O gene *fos* foi isolado por Curran et al. (1982) a partir do vírus causador do sarcoma osteogênico murino (*gene v-fos*). O gene *c-fos* encontrado em vertebrados foi isolado utilizando-se o gene *v-fos* como sonda (CURRAN et al., 1983) e mostra-se bastante conservado. Ambos codificam fosfoproteínas com localização nuclear. Em invertebrados, fatores de transcrição análogos ao produto do gene *fos* foram identificados em embriões de *Drosophila* por Perkins et al. (1988) e a estrutura do gene homólogo ao *c-fos* de mamíferos foi determinada por Rousseau e Goldstein (2001) e chamado de *d-fos*. Em *Apis mellifera*, estudos realizados por Fonta et al. (1995) demonstraram a existência de proteínas semelhantes a Fos sendo expressas durante o desenvolvimento e a maturação do sistema nervoso de operárias.

O padrão geral de organização do sistema nervoso de abelhas adultas é basicamente o mesmo existente no larval, embora ocorra uma reestruturação durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009). Além do cérebro, situado dorsalmente na cabeça, o sistema nervoso central é constituído pela cadeia nervosa ventral e pelo sistema estomogástrico (CHAPMAN, 1998).

O cérebro é constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominada de somata, e as regiões que contêm os prolongamentos celulares chamados de neurólipas (CHAPMAN, 1998; BRANDT et al., 2005). Em abelhas adultas, o cérebro é formado pela fusão de três gânglios: o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro.

A região do protocérebro é constituída pelos corpos pedunculados, ponte protocerebral, corpo central, lobos acessórios e duas projeções laterais que correspondem aos lobos ópticos. Os corpos pedunculados, também conhecidos como corpos de cogumelo, são estruturas volumosas e que contêm neurônios intrínsecos, chamados células de Kenyon, em número de aproximadamente 170.000 por hemisfério do cérebro. Estes são formados por dois pares de cálices, de onde partem pedúnculos em direção ao lobo alfa (região que processa toda a informação proveniente das outras regiões do cérebro) (RYBAK E MENZEL,1993; FARRIS et al.,1999; ROAT, 2008). Há evidências de que os corpos pedunculados do cérebro dos insetos sejam equivalentes ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem temporal (CAPALDI et al.,1999). Os lobos ópticos possuem complexa estrutura e contêm elementos nervosos que formam os olhos compostos, responsáveis pela captação de estímulos visuais (BRANDT et al.,2005).

Na região relacionada a fotorrecepção os insetos apresentam duas estruturas: os olhos compostos e os ocelos. Os olhos compostos são formados por um complexo arranjo celular, onde cada célula possui uma especialização. Geralmente existem três ocelos situados anteriormente no topo da cabeça (observado nas operárias e rainha de *Apis mellifera*) formando um triângulo (CRUZ-LANDIM, 2009). Provavelmente estas estruturas respondem a diferentes graus de intensidade luminosa e possivelmente permitem, em abelhas, a visualização da luz ultravioleta (CHAPMAN, 1998).

A região do deutocérebro apresenta os lobos antenais, estas são estruturas esféricas formadas de prolongamentos de neurônios sensitivos e que recebem estímulos olfatórios captados pelos corpos celulares presentes nas antenas e nas estruturas da boca. Estes prolongamentos se organizam em aproximadamente 150 glomérulos envolvidos por corpos celulares de neurônios motores que controlam o movimento das antenas (KLOPPENBURG, 1995). Esta estrutura corresponde ao bulbo olfatório dos vertebrados (LANCET, 1986).

O tritocérebro é uma pequena região da qual partem conectivos que ligam o cérebro ao glânglio subesofageano e ao glânglio frontal (pertencente ao sistema estomogástrico) (CRUZ-LANDIM, 2009).

Roat e Cruz-Landim (2005) estudaram as diferenças morfológicas do cérebro de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera*, associadas com as diferenças comportamentais de cada indivíduo. Os cérebros foram dissecados, preparados de acordo com rotina histológica e cortados em micrótomo. Nos zangões o protocérebro é mais desenvolvido, devido ao maior desenvolvimento dos lobos ópticos, uma vez que eles não participam da organização social, mas precisam de uma visão exata para o acasalamento e sua própria sobrevivência. Nas

rainhas, no entanto, que apresentam papel essencial na reprodução, observou-se apenas maior quantidade de células neurosecretores, que produzem hormônios reguladores do comportamento reprodutivo. Nas operárias, entretanto, as partes mais desenvolvidas são os corpos pedunculados, onde se verificam um cálice mais profundo com grande número de pontos convergentes para o pedúnculo, que indicam a presença de mais sinapses. Essa maior quantidade de sinapses é necessária para que as operárias possam desenvolver todas as suas funções na colônia, como defesa, forrageamento e cuidado e alimentação das abelhas jovens. Essa maior plasticidade do cérebro das operárias faz delas os melhores indivíduos da colônia para o estudo do sistema nervoso desses insetos.

2. JUSTIFICATIVA

Está bem estabelecido que altas doses de inseticidas, entre eles o imidaclopride, levam à morte dos mais variados insetos, sem distinção daqueles considerados praga e dos benéficos aos seres humanos. No entanto, o efeito de doses subletais destes compostos sobre a morfofisiologia destes indivíduos ainda merece atenção, pois pode levar a alterações comportamentais que venham a comprometer a atividade dos mesmos no ambiente. Desta forma, é de extrema importância entender a ação de doses abaixo da DL_{50} do inseticida imidaclopride sobre o sistema nervoso de operárias de *Apis mellifera*, inseto de grande importância econômica mundial.

3. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos neurotóxicos do inseticida imidaclopride no sistema nervoso de operárias de *Apis mellifera* africanizadas através da análise da expressão da proteína Fos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Foram utilizados exemplares de abelhas *Apis mellifera* coletados no apiário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Rio Claro.

Favos limpos foram introduzidos em colméias em plena atividade para que suas rainhas realizassem a postura e transferidos, 24 horas depois, para as respectivas áreas de recria, onde foram monitorados para obtenção de operárias recém- emergidas. As operárias campeiras foram coletadas diretamente das colméias.

4.2 Tratamento de operárias pela ingestão de imidaclopride

Operárias de *Apis mellifera* foram acondicionadas em caixas de madeira medindo 11 cm de comprimento x 11 cm de largura x 7 cm de altura (10 abelhas por caixa), previamente forradas com papel-filtro. Os grupos experimentais receberam suprimentos de água, que consiste em algodão embebido em água e colocado em tampa plástica. Antes do tratamento, estas permaneceram de 2 a 4 horas em jejum em estufa B.O.D., com temperatura a 32 °C +- 1°C e umidade relativa de 70%. Transcorrido o tempo do jejum, uma gota de 1µL de solução de açúcar e imidaclopride (nas doses de 10, 20, 40 e 80 ng/abelha), foi oferecida às abelhas individualmente. Ao grupo controle foi oferecido uma gota de 1 µL contendo apenas solução de açúcar. Após a ingestão, cada abelha tratada foi acondicionada em um recipiente plástico e coletada para dissecação aos 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas após o tratamento.

4.3 Microtomia

Após a coleta, tratamento e anestesia (5 minutos no freezer) dos insetos nos tempos mencionados, os cérebros foram dissecados e rapidamente fixados em formalina neutra tamponada. O material após 48 horas de fixação foi desidratado com banhos de 30 minutos de soluções de álcool com concentrações crescentes e de xilol 100%. Depois do último banho em xilol os cérebros foram imersos em paraplast Merck (60°C em estufa) por 12 horas e incluídos para corte.

Os cortes do cérebro foram realizados em micrótomo Leica (mod. RM 2145) com espessura aproximada de 6 µm, e colocados sobre lâminas histológicas pré- tratadas com polilisina. As lâminas permaneceram por uma noite em temperatura ambiente para secagem e,

posteriormente, foram desparafinizadas com banhos de 20 minutos em soluções de xilol e álcool com concentrações decrescentes e novamente secas à temperatura ambiente.

4.4 Imunohistoquímica

Os cortes foram tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato de potássio 0,02M e pH 7,4 (KPBS) + 0,3% de Triton X-100, por cerca de 10 minutos, sendo em seguida, incubados em soro normal de cabra para bloqueio. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados, por 48 horas, com o anticorpo primário policlonal anti-*fos* (Ab-5, Calbiochem) feito em coelho, na concentração 1:20.000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Vector, 1:1000) e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500). Após esses procedimentos os cortes foram revelados com tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,03% de peróxido de hidrogênio dissolvidos em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 5 minutos, e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS.

Existe uma grande similaridade entre a proteína Fos de mamíferos (55 a 72 KDa) e de insetos (proteína Fos de abelhas - ~30KDa e ~55KDa), por isso a utilização dos reagentes imunohistoquímicos citados acima (TRATNER et al., 1990; FONTA et al., 1995). A eficácia desses reagentes para a marcação de Fos no cérebro de *Apis mellifera* africanizada foi comprovada, em nosso laboratório, pelo trabalho de Nocelli et al., 2009.

4.5 Aquisição de imagens

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmara digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição foi utilizado o software DP Controller. As imagens foram trabalhadas utilizando-se o programa Corel Draw 11 apenas para ajustes finos, como brilho, contraste e balanço de cores.

Para análise quantitativa de células imunorreativas a fos foram escolhidas fotomicrografias, aumento de 40X, de cada região de interesse. Em cada uma das imagens, o número de células com marcação positiva foram contadas pelo programa Image - Pro Plus 6.3 numa área tecidual de 1001 μ m X 1001 μ m, zoom de 25%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abelhas recém-emergidas e campeiras foram tratadas com 10, 20, 40 e 80 ng/abelha de imidaclopride e seus cérebros dissecados 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas após a ingestão do composto. O tempo de exposição ao inseticida foi de no máximo 4 horas devido à grande mortalidade de campeiras tratadas com 80 ng/abelha (Tabelas 1 e 2). Souza (2009) em trabalho com operárias de *Apis mellifera* observou uma elevada taxa de mortalidade de abelhas expostas à dose letal de 1,0 ng/abelha do inseticida fipronil, tendo que dissecar os cérebros 4 horas após o contato. O fato de operárias campeiras terem apresentado maior taxa de mortalidade quando comparadas as recém-emergidas pode ser explicado pela diferente interação do imidaclopride e seus metabólitos com os receptores de acetilcolina nas idades mencionadas. Suchail et al. (2003) realizaram o tratamento oral de abelhas *Apis mellifera* com imidaclopride e notaram que este é o responsável pela neurotoxicidade e hiperatividade do inseto, mas a letalidade é ocasionada também pelos seus metabólitos, 5-hidroxiimidaclopride e olefina. Guez et al. (2003), em pesquisa com abelhas *Apis mellifera* tratadas topicamente com imidaclopride, sugerem que existem dois subtipos de receptores nAChRs com diferentes afinidades à este composto e seus metabólitos. Operárias com até 7 dias de idade apresentam o subtipo I de nAChRs, enquanto que abelhas a partir de 8 dias possuem o subtipo I e o subtipo II de nAChRs. O imidaclopride é agonista dos dois subtipos de nAChRs, a olefina é agonista do subtipo I e o 5-hidroxiimidaclopride é agonista do subtipo II. Por executarem tarefas extra-coloniais, as campeiras apresentam maior desgaste físico do que as recém-emergidas, o que certamente influenciou na menor sobrevivência das primeiras.

O proto-oncogene *fos*, que codifica a proteína nuclear Fos, é um gene de resposta precoce, ou seja, o início de sua transcrição se dá momentos após o organismo sofrer um estímulo químico, elétrico ou fisiológico. A maioria dos neurônios expressa pouco ou não expressa a proteína Fos em condições normais (MORGAN et al., 1987), mas qualquer tipo de estímulo (estresse, lesões, alterações climáticas e luminosas, exposição a predadores ou a toxinas e até crescimento e diferenciação celular) induz rapidamente a transcrição de Fos nos mesmos. Como as condições experimentais (luminosidade, condicionamento, manipulação, entre outros) consistem num fator estressante, as abelhas dos grupos tratados e controles foram submetidas aos mesmos procedimentos com o propósito de garantir que as oscilações de expressão de Fos entre os indivíduos controle e tratados fossem decorrentes da ação do inseticida no sistema nervo dos insetos.

Os anticorpos citados no item 4.4, se ligam às proteínas Fos produzidas no núcleo dos neurônios. O papel do reagente DAB é evidenciar tais proteínas ligadas ao anticorpo, assim, o núcleo que apresenta expressão de Fos aparece mais fortemente corado que os demais. Esta técnica nos permitiu avaliar a quantidade de núcleos de neurônios que expressaram a proteína Fos.

Os resultados para a expressão de *fos* obtidos pelo presente trabalho são semelhantes à expressão basal do gene mapeada por Nocelli et al. (2009). Houve uma expressão positiva para Fos nos ocelos e na região dos olhos, principalmente na lâmina e na retina (as quais são formadas por corpos celulares de neurônios). As demais regiões não apareceram marcadas.

Expressão semelhante nas estruturas dos olhos e ocelos foi identificada pelo trabalho de Jacob (2007) que tem avaliado os efeitos do dióxido de carbono no cérebro de *Apis mellifera*. Bidmon et al. (1991) em estudos com *Manduca sexta* e Cymborowski e King (1996) trabalhando com *Calliphora vicina* também observaram expressão de Fos nos lobos ópticos destes insetos. A partir do analisado, comprovou-se que a marcação positiva de Fos nas regiões do ocelo e dos cálices ópticos é devido ao contato das abelhas com a luminosidade, em condições não naturais, uma vez que para que o tratamento com o inseticida fosse realizado, as operárias precisaram ser retiradas das colônias e acondicionadas sob certa intensidade luminosa. Como a marcação nestas regiões se deu em consequência ao estresse luminoso e não ao contato com o imidaclopride, os resultados da contagem do número de células com expressão positiva para Fos não foram apresentados neste trabalho.

As doses subletais de imidaclopride comprovadamente provocam alterações de memória nos insetos (LAMBIN et al., 2001; MEDRZYCKI et al., 2003; DECOURTYE et al., 2004), dessa forma, esperava-se um aumento na expressão da proteína Fos em determinadas regiões do cérebro envolvidas com a aprendizagem e a interação do inseto com o meio ambiente, como os corpos pedunculados e os lobos antenais, indicando a toxicidade do imidaclopride sobre o sistema nervoso central das abelhas *Apis mellifera*. Nos corpos pedunculados são observados a região do cálice, formada por corpos celulares de neurônios de associação, e o pedúnculo, formado pelos prolongamentos celulares. Esses são tidos como os centros de processamento dos estímulos sensoriais recebidos pelos olhos e pelas antenas. Os lobos antenais são constituídos por prolongamentos de células sensoriais das antenas e pelos neurônios motores (CRUZ-LANDIM, 2009). No estudo de Jacob (2007) operárias no 5º instar de desenvolvimento foram submetidas à 30 segundos, 1 minuto, 1 minuto e meio e 2 minutos de exposição ao gás dióxido de carbono. Essas abelhas foram coletadas e dissecadas 21, 28 e 35 dias após o tratamento e demonstraram uma marcação positiva para a proteína Fos

nos corpos pedunculados e nos lobos antenais (Figura 5), embora outros estudos sejam necessários para comprovar o quanto destas marcações são decorrentes do gás carbônico e o quanto são respostas à outros fatores externos à colônia. Fonta et al.(1995) também observaram tais marcações positivas na região dos lobos antenais.

Souza (2009) avaliou os efeitos tópicos do inseticida fipronil (DL_{50} de 0,157 ng/abelha) sobre os corpos pedunculados de *Apis mellifera* africanizada utilizando metodologia semelhante a deste trabalho e obteve como resultado uma super expressão de Fos apenas para as doses letais de 1,0 e 0,5 ng/abelha quando comparadas a expressão desta proteína no controle e na dose subletal de 0,1 ng/abelha. Embora o fipronil tenha modo de ação diferente do imidaclopride, seus resultados não contradizem o obtido neste trabalho, pois a dose letal para o imidaclopride, em condições laboratoriais, estabelecida por Rossi (2007), é de 80,9 ng/abelha e dessa forma, as doses testadas pelo presente trabalho constituem doses subletais e não provocaram super expressão da proteína. Embora não tenha ocorrido a expressão positiva para Fos, os sintomas de hiperexcitação foram notados e os cérebros de abelhas expostas ao imidaclopride, freqüentemente, se apresentaram gelatinosos e sensíveis. Também houve muita perda de material na montagem das lâminas histológicas e dificilmente os cortes eram obtidos com as estruturas cerebrais intactas (Figura 6). Tais fatos dificultaram as repetições para a amostragem de Fos.

Analisando-se os valores quantitativos da expressão da proteína Fos (Tabelas 3 e 4) percebe-se que não houve um padrão de resultados tendo muita variação entre os valores de mesmo tratamento (Figura 4), assim, uma comparação estatística entre diferentes tratamentos tornou-se inviável. Conclui-se, então, que a expressão da proteína Fos não é um bom indicador dos efeitos neurotóxicos das doses subletais de imidaclopride sobre o cérebro de operárias recém-emergidas e campeiras de *Apis mellifera* africanizadas.

A transcrição de gene *fos* é induzida por sinais extracelulares desencadeados por íons, fatores de crescimento, neurotransmissores, drogas, entre outros (KOVÁCS, 2008). Acredita-se, portanto, que a ação agonista do imidaclopride nas sinapses do sistema nervoso das abelhas não induziram a produção da proteína Fos ou que o estado convulsivo ou de hiperexcitação provocado pela intoxicação com imidaclopride levou a morte dos neurônios. Moretto (1998) em estudo com agentes inibidores da acetilcolinesterase afirmou que existe a recuperação completa da síndrome colinérgica (impulso nervoso é transmitido continuamente pela diminuição da atividade das enzimas degradadoras da acetilcolina) pela produção de novas enzimas, a menos que o sistema nervoso central tenha sido lesionado como consequência da convulsão ou da anóxia. Porém, Rossi (2007) não constatou morte celular no

cérebro de abelhas africanizadas expostas as doses de 25 ng/abelha, 50 ng/abelha e 80,9 ng/abelha de imidaclopride.

Muitos trabalhos vêm sendo feitos para melhor entender o modo de ação do imidaclopride. Armengaud et al. (2001) evidenciaram que compostos agonistas dos nAChRs do cérebro de abelhas provocam maior emissão de citocromo oxidase (CO) pelas células, ativando assim o metabolismo celular, enquanto que antagonistas dos nAChRs provocaram diminuição no metabolismo celular (pouca emissão de CO). Esses autores afirmam ainda que o imidaclopride ativou o metabolismo celular nos corpos pedunculados e não o fez com tanta eficácia nos lobos antenais. Em trabalho com culturas de células de Kenyon dos corpos pedunculados, Déglise et al. (2002) concluíram que o imidaclopride é um agonista parcial destas células, uma vez que este induziu apenas 36% de correntes nervosas quando comparados à correntes geradas pela acetilcolina. Além disso, quando os autores aplicaram nas culturas celulares uma mistura de acetilcolina e imidaclopride a amplitude das correntes induzidas nestas foram significativamente menores em comparação com a aplicação de acetilcolina com solução salina. Eles ainda mostraram que o imidaclopride (1 mM) atuou como antagonista dos receptores GABA quando aplicados em culturas de células de Kenyon juntamente com o neurotransmissor GABA, mas este efeito aconteceu independentemente da interação do inseticida com os nAChRs. As sinapses glutaminérgicas situam-se nos neurônios dos nervos motores e segundo Déglise et al. (2002) as células de Kenyon também estabelecem tais sinapses. Barbara et al. (2008) em pesquisa com cultura de células dos lobos antenais obtiveram resultados que identificaram o imidaclopride como agonista parcial dos nAChRs, semelhante aos dados de Déglise et al. (2002).

Comprovadamente as abelhas são sensíveis ao imidaclopride e um mecanismo bem conhecido de sua ação são os receptores nicotínicos de acetilcolina, porém acredita-se que os receptores GABA também constituem um modo de ação deste inseticida. Dessa maneira é necessário a realização de estudos, a fim de se verificar de que forma o imidaclopride interage com os neurônios do sistema nervoso central das abelhas africanizadas e o porque estes não expressam a proteína Fos em tais circunstâncias.

Bioensaios controle					
Recém-emergidas			Campeiras		
Tempo	Número de abelhas mortas	Número de abelhas vivas	Tempo	Número de abelhas mortas	Número de abelhas vivas
5 minutos	0	5	5 minutos	0	5
15 minutos	0	5	15 minutos	0	5
30 minutos	0	5	30 minutos	0	5
1 hora	0	5	1 hora	0	5
2 horas	0	5	2 horas	1	4
3 horas	0	5	3 horas	0	4
4 horas	0	5	4 horas	0	4

Tabela 1: Bioensaio controle de abelhas que permaneceram em jejum, foram alimentadas com 1 μ L de solução de açúcar e, posteriormente, foram acondicionadas por 4 horas. Cada grupo de abelhas (recém-emergidas e campeiras) foi representado, neste ensaio, por 5 indivíduos.

Bioensaios de tratamento com 80ng/ μ L					
Recém-emergidas			Campeiras		
Tempo	Número de abelhas mortas	Número de abelhas vivas	Tempo	Número de abelhas mortas	Número de abelhas vivas
5 minutos	0	10	5 minutos	1	9
15 minutos	0	10	15 minutos	0	9
30 minutos	0	10	30 minutos	1	8
1 hora	0	10	1 hora	0	8
2 horas	0	10	2 horas	2	6
3 horas	0	10	3 horas	0	6
4 horas	0	10	4 horas	3	3

Tabela 2: Bioensaio de abelhas que permaneceram em jejum, foram alimentadas com 1 μ L de solução de açúcar contendo 80ng de imidaclopride e, posteriormente, foram acondicionadas por 4 horas. Cada grupo de abelhas (recém-emergidas e campeiras) foi representado, neste ensaio, por 10 indivíduos.

Expressão de Fos nos corpos pedunculados					
Idade	Tratamentos	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas
Recém - emergidas	Controle	0	17	0	0
	Controle	10	0	37	0
	10 ng/abelha	26	0	28	0
	10 ng/abelha	41	91	7	0
	20 ng/abelha	0	214	18	0
	20 ng/abelha	0	17	0	0
	40 ng/abelha	8	5	0	37
	40 ng/abelha	31	9	0	0
	80 ng/abelha	80	16	0	0
	80 ng/abelha	33	0	0	0
Campeiras	Controle	46	7	0	18
	Controle	10	22	0	4
	10 ng/abelha	40	25	0	76
	10 ng/abelha	34	20	60	21
	20 ng/abelha	100	10	0	20
	20 ng/abelha	59	2	0	23
	40 ng/abelha	18	0	24	10
	40 ng/abelha	1	0	12	1
	80 ng/abelha	15	5	0	0
	80 ng/abelha	0	36	13	0

Tabela 3: Análise quantitativa da expressão da proteína Fos nos corpos pedunculados.

Expressão de Fos nos lobos antenais					
Idade	Tratamentos	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas
Recém - emergidas	Controle	0	0	0	217
	Controle	0	0	0	235
	10 ng/abelha	15	0	65	9
	10 ng/abelha	0	0	0	21
	20 ng/abelha	0	0	0	7
	20 ng/abelha	0	0	0	2
	40 ng/abelha	17	0	0	0
	40 ng/abelha	23	24	0	0
	80 ng/abelha	0	0	13	0
	80 ng/abelha	0	0	6	11
Campeiras	Controle	7	0	0	0
	Controle	2	0	0	0
	10 ng/abelha	10	0	31	0
	10 ng/abelha	0	0	0	0
	20 ng/abelha	7	6	0	0
	20 ng/abelha	15	3	0	0
	40 ng/abelha	0	0	6	0
	40 ng/abelha	0	0	8	0
	80 ng/abelha	0	0	22	0
	80 ng/abelha	0	0	0	11

Tabela 4: Análise quantitativa da expressão da proteína Fos nos lobos antenais.

Expressão de Fos nos corpos pedunculados (em porcentagem)					
Idade	Tratamentos	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas
Recém - emergidas	Controle	0	1,440678	0	0
	Controle	0,847458	0	3,135593	0
	10 ng/abelha	2,20339	0	2,372881	0
	10 ng/abelha	3,474576	7,711864	0,59322	0
	20 ng/abelha	0	18,13559	1,525424	0
	20 ng/abelha	0	1,440678	0	0
	40 ng/abelha	0,677966	0,423729	0	3,135593
	40 ng/abelha	2,627119	0,762712	0	0
	80 ng/abelha	6,779661	1,355932	0	0
	80 ng/abelha	2,79661	0	0	0
Campeiras	Controle	3,898305	0,59322	0	1,525424
	Controle	0,847458	1,864407	0	0,338983
	10 ng/abelha	3,389831	2,118644	0	6,440678
	10 ng/abelha	2,881356	1,694915	5,084746	1,779661
	20 ng/abelha	8,474576	0,847458	0	1,694915
	20 ng/abelha	5	0,169492	0	1,949153
	40 ng/abelha	1,525424	0	2,033898	0,847458
	40 ng/abelha	0,084746	0	1,016949	0,084746
	80 ng/abelha	1,271186	0,423729	0	0
	80 ng/abelha	0	3,050847	1,101695	0

Tabela 5: Proporção de células com expressão positiva de Fos nos corpos pedunculados. A média do número de neurônios presentes numa área tecidual de 1001 μm X 1001 μm foi de 1180 para os corpos pedunculados.

Expressão de Fos nos lobos antenais (em porcentagem)					
Idade	Tratamentos	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas
Recém - emergidas	Controle	0	0	0	116,5101
	Controle	0	0	0	126,1745
	10 ng/abelha	8,053691	0	34,89933	4,832215
	10 ng/abelha	0	0	0	11,27517
	20 ng/abelha	0	0	0	3,758389
	20 ng/abelha	0	0	0	1,073826
	40 ng/abelha	9,127517	0	0	0
	40 ng/abelha	12,34899	12,88591	0	0
	80 ng/abelha	0	0	6,979866	0
	80 ng/abelha	0	0	3,221477	5,90604
Campeiras	Controle	3,758389	0	0	0
	Controle	1,073826	0	0	0
	10 ng/abelha	5,369128	0	16,6443	0
	10 ng/abelha	0	0	0	0
	20 ng/abelha	3,758389	3,221477	0	0
	20 ng/abelha	8,053691	1,610738	0	0
	40 ng/abelha	0	0	3,221477	0
	40 ng/abelha	0	0	4,295302	0
	80 ng/abelha	0	0	11,81208	0
	80 ng/abelha	0	0	0	5,90604

Tabela 6: Proporção de células com expressão positiva de Fos nos lobos antenais. A média do número de neurônios presentes numa área tecidual de 1001 μm X 1001 μm foi de 186,25 para os lobos antenais. A porcentagem dos controles de recém emergidas excederam 100%, pois dependendo da região do lobo antenal em que o corte histológico foi obtido um grande número de núcleos de neurônios ficaram evidentes para contagem, o que pode não ter acontecido nos cortes corados com hematoxilina e eosina que serviram como referência para o cálculo das proporções.

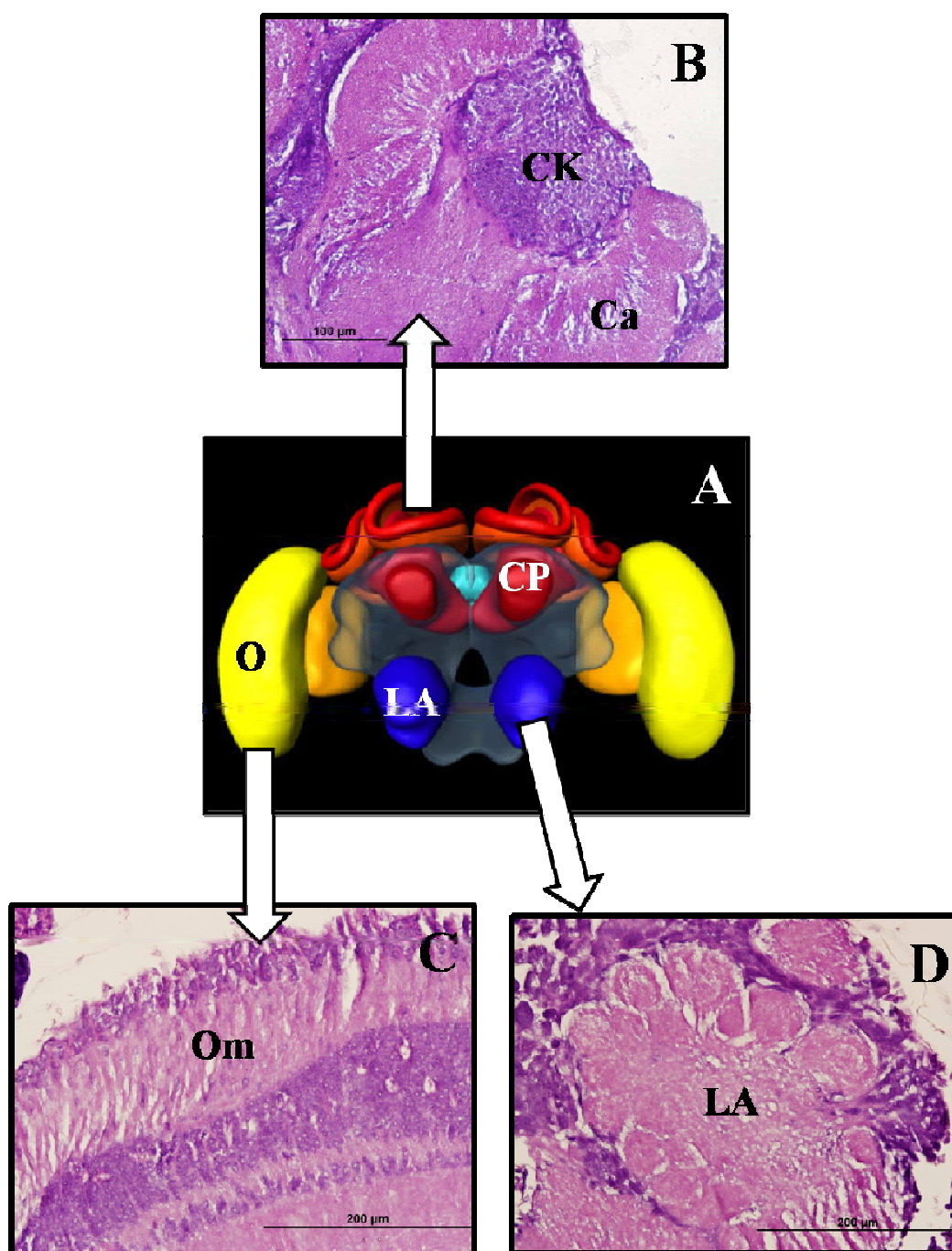


Figura 1: A- representação esquemática do cérebro de abelhas *Apis mellifera* (fonte: BRANDT et al., 2005), evidenciando as principais regiões analisadas no presente trabalho (O - Olhos, CP - Corpo Pedunculado e LA - Lobo Antenal); B- corte histológico do corpo pedunculado, corado com hematoxilina e eosina (HE), no qual CK representa os corpos celulares das Células de Keyon e Ca representa o Cálice.

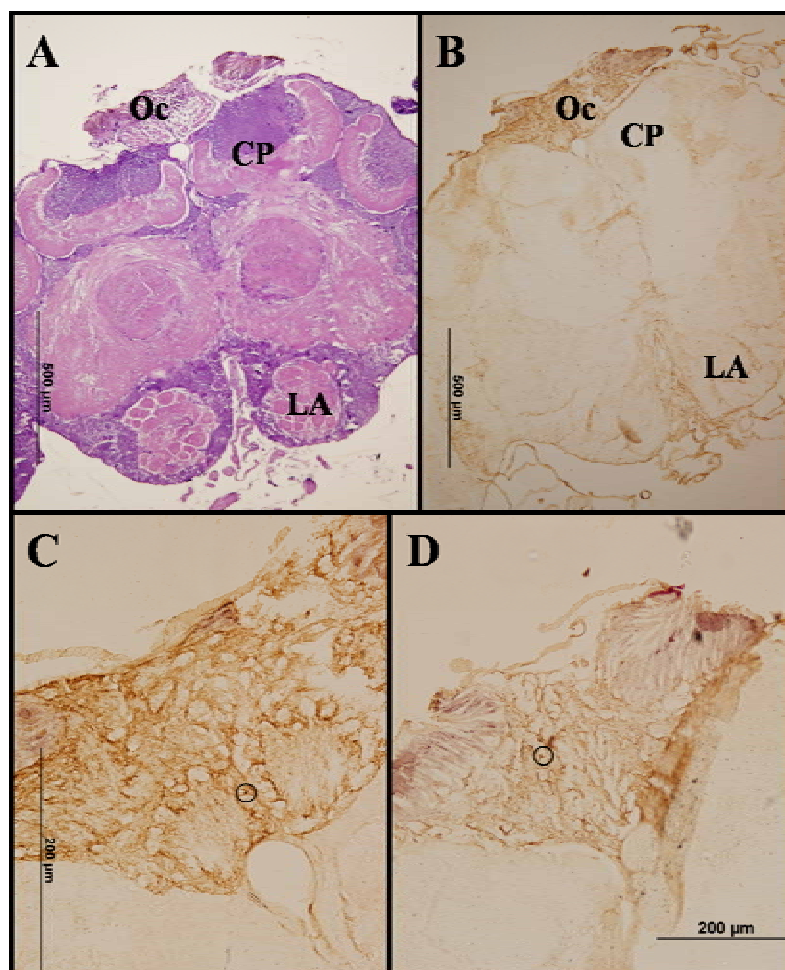


Figura 2: A- corte histológico do cérebro de *Apis mellifera*, HE, mostrando os Corpos Pedunculados (CP), os Lobos Antenais (LA) e os Ocelos (Oc); B- corte histológico do cérebro de *Apis mellifera*, tratada com 40ng/μL de imidaclopride (tempo de 1 hora), submetido à reação imunohistoquímica evidenciando que os Ocelos (Oc) tiveram marcação positiva para a proteína Fos (coloração mais intensa) enquanto que as demais regiões não reagiram ao anticorpo anti c-Fos; C- detalhe do ocelo do corte histológico anterior; D- ocelo de operária tratada com 20ng/μL há 15 minutos. Os círculos indicam núcleos de neurônios com expressão positiva para Fos.

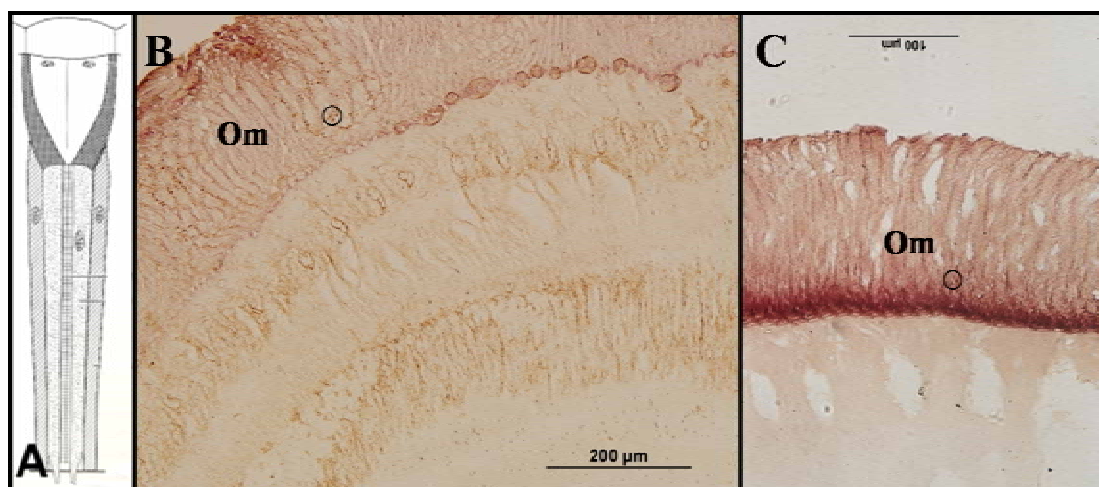


Figura 3: A- representação esquemática de um omatídeo que constitui a retina dos olhos compostos de *Apis mellifera* (fonte: CHAPMAN, 1998); B- corte histológico do olho de operária tratada com 40ng/μL de imidaclopride (tempo de 1 hora), submetido à reação imunohistoquímica, evidenciando a região dos Omatídeos (Om) que teve marcação positiva para a proteína Fos (coloração mais intensa); C- Corte histológico do olho de operária tratada com 20ng/μL de imidaclopride (tempo de 1 hora) evidenciando resultado semelhante à imagem anterior. Os círculos indicam núcleos de neurônios com expressão positiva para Fos.

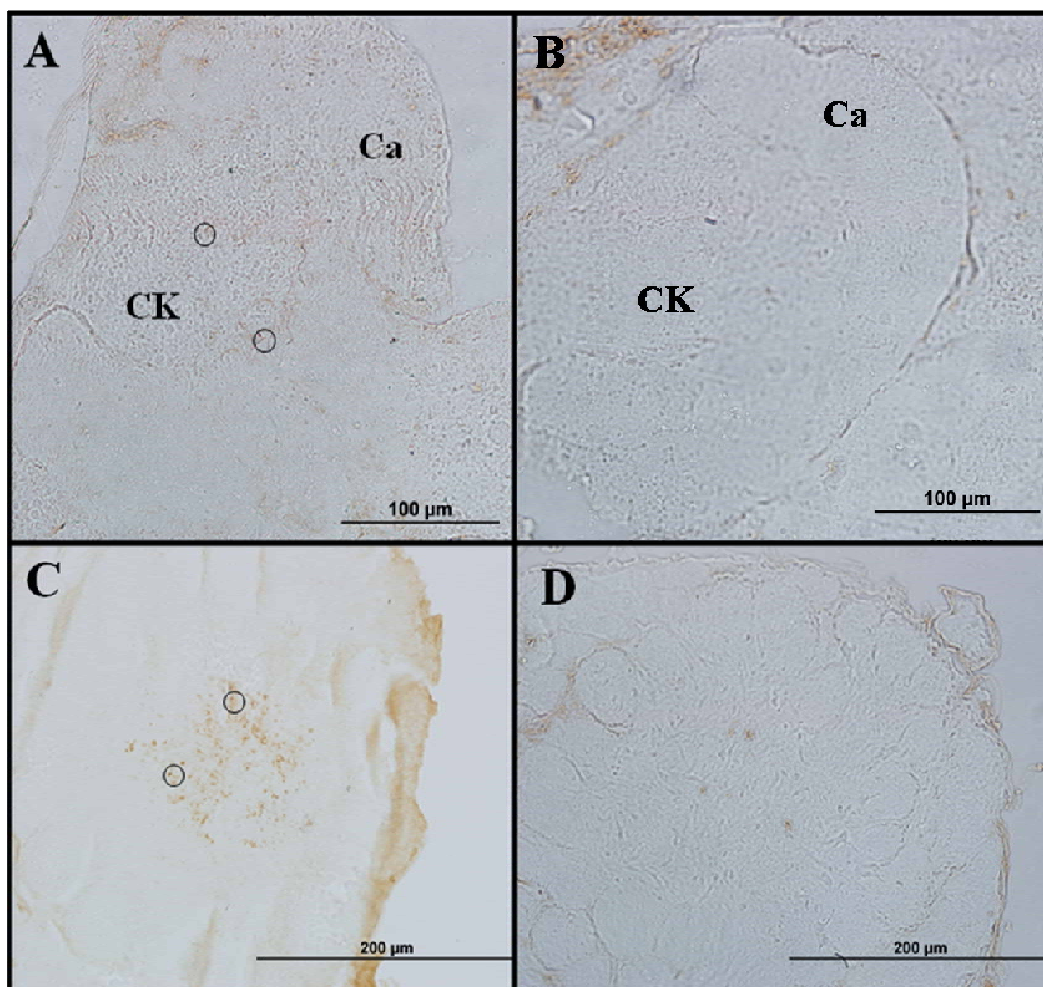


Figura 4: Comparação entre resultados obtidos pelo presente trabalho. Os círculos em preto indicam a marcação positiva para Fos. A e B – Corpos pedunculados de recém-emergidas tratadas com 10 ng/μL de imidaclopride (cérebros dissecados 30 minutos após a ingestão do inseticida), mostrando as Células de Kenyon (CK) e o Cálice (Ca). Na figura B aparece parte do Ocelo (Oc). C- Lobo antenal de recém-emergida controle (cérebro dissecado 4 horas após a ingestão de 1 μL de solução de açúcar). D- Lobo antenal de recém-emergida controle (cérebro dissecado 30 minutos após a ingestão de 1 μL solução de açúcar).

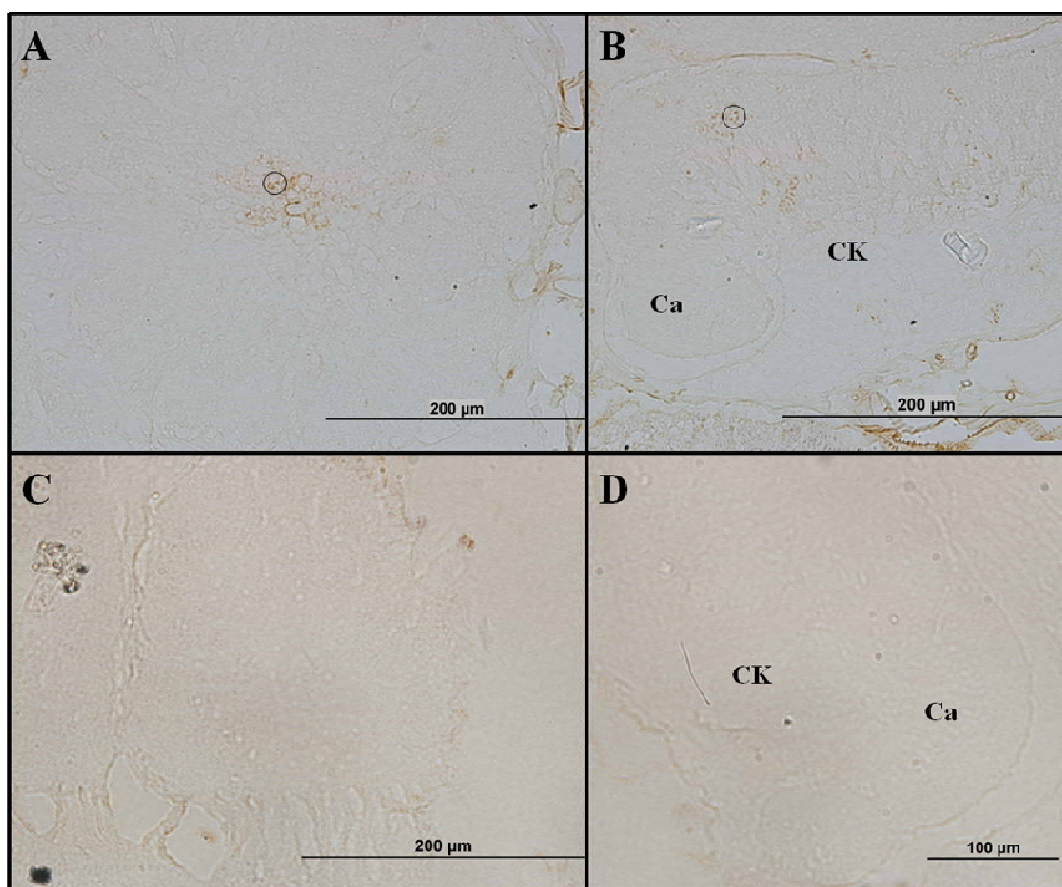


Figura 5: Comparação dos resultados obtidos pelo presente trabalho e daqueles obtidos no trabalho de Jacob (2008). A e B – cérebro de campeira com 35 dias de idade e que foram expostas à 30 segundos de aplicação de dióxido de carbono no 5º instar de desenvolvimento. A imagem A mostra o lobo antenal e a imagem B o corpo pedunculado. Os círculos em preto indicam a marcação positiva para Fos. C- Lobo antenal de campeira tratada com 80ng/μL de imidaclopride (cérebro dissecado 1 hora após a ingestão do inseticida). D- Corpo pedunculado de campeira tratada com 80ng/μL de imidaclopride (cérebro dissecado 15 minutos após a ingestão do inseticida), mostrando as Células de Kenyon (CK) e o Cálice (Ca).

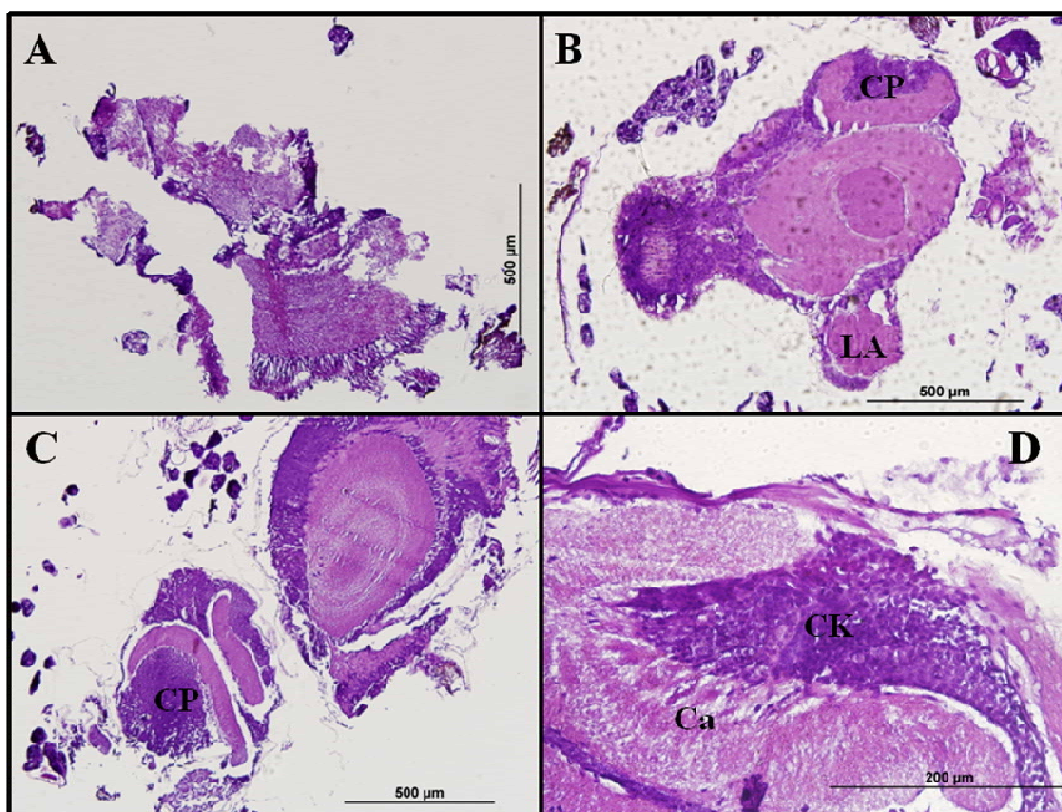


Figura 6: Cortes histológicos corados com HE, evidenciando a dificuldade de obtenção de cérebros intactos. A- cérebro de campeira tratada com 10ng/µL de imidaclopride e dissecado 15 minutos após a ingestão do inseticida. B- cérebro de campeira tratada com 40ng/µL de imidaclopride e dissecado 4 horas após a ingestão do inseticida. C- Corpo pedunculado de campeira tratada com 10ng/µL de imidaclopride (cérebro dissecado 15 minutos após a ingestão do inseticida), mostrando as Células de Kenyon (CK) se desprendendo do Cálice (Ca). D- cérebro de recém-emergida tratada com 80ng/µL de imidaclopride e dissecado 15 minutos após a ingestão do inseticida.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1 - A expressão da proteína Fos não é um bom indicador dos efeitos neurotóxicos das doses subletais de imidaclopride sobre o cérebro de operárias recém-emergidas e campeiras de *Apis mellifera* africanizadas.

2 – No entanto, durante a realização dos experimentos pode-se verificar que as abelhas tratadas com imidaclopride apresentaram reações adversas ao mesmo, tais como hiperexcitação, tremores e desorientação. Desta forma, são necessários estudos utilizando diferentes metodologias para se verificar qual o modo de interação do imidaclopride com o sistema nervoso deste inseto.

3 – Estudos envolvendo inseticidas devem levar em consideração o modo de metabolização dos mesmos no organismo do inseto, uma vez que seus metabólitos podem ter ações potencializadores e/ou antagonistas à molécula do inseticida original. O imidaclopride é parcialmente metabolizado em olefina e 5-hidroxiimidaclopride que podem ter ações diferentes da molécula pura e agir em tempos diferentes daqueles previstos para imidaclopride.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMENGAUD, C; AIT-OUBAH, J; CAUSSE, N; GAUTHIER, M. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the Honeybee brain. **Neuroscience Letters**. 304: 97-101, 2001.
- BARBARA, G. S; GRUNEWALD, B; PAUTE, S; GAUTHIER, M; RAYMOND-DELPECH, V. Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. **Invert. Neurosci**. 8:19-29, 2008.
- BIDMON, H.J.; GRANGER, N.A.; STUMPF, W.E. Co-localization of ecdysteroid receptors and *c-fos*-like protein in the brain of *Manduca sexta* larvae. **Developmental Genes and Evolution**. 200(3): 149-155, 1991.
- BRANDT, R; ROHLFING, T; RYBAK, J.R; KROFCZIK, S MAYE, A; WESTERHOFF, M; HEGE, H.C; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of Comparative Neurology**. 492:1–19, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxico Fitossanitários (Agrofit)**. Brasília.
- Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan.2008.
- BROGDON, W.G; McALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging infectious diseases**. 4(4):605-613, 1998.
- CAPALDI, E. A; ROBINSON, G. E; FAHRBACH, S.E. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. **Annual Review of Psychology**. 50:651-682, 1999.
- CAPOWIEZ, Y.; BÉRARD, A. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolophora ictoria*) using 2D terraria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 64: 198-206, 2006.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. Elsevier Publishing. 5ª Edição, 1998.
- CHEN, Y. F; CHIANG, H. M; TAN, T. W; LAI, J. S; TSAI, H.Y. The Influence of Noise Stress-Induced Pain-Threshold Increase on Central Monoaminergic Neurons. **Mid. Taiwan J. Med**. 7: 135-45, 2002.
- COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide of Biochemistry Physiology**. 46:47–54, 1993.
- CRUZ-LANDIM, C. **Morfologia de Abelhas**. Editora UNESP. 2009. Em impressão.

- CURRAN,T.; PETERS,G.; VAN BEVEREN,N.M.; VERNA,I.M. The FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. **Journal of Virology**. 44:674-682, 1982.
- CURRAN, T.; MacCORNEILL, W. P.; van SRAATEN, F.; VERNA, I. M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: Molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. **Molecular Cell Biology**. 3: 914-921, 1983.
- CURRAN, T.; FRANZA, B. R. Jr. "Fos and jun: The AP-1 connection". **Cell**. 55: 395-397, 1988.
- CYMBOROWSKI, B.; KING, V. Circadian regulation of Fos-like expression in the brain of the blow fly *Calliphora vicina*, **Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology, Endocrinology**. 115(3):239-246, 1996.
- DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, C.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; GAUTHIER, M.; PHAM-DELEGUE, M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide of Biochemistry Physiology**. 78: 83-92, 2004.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAS, S.; PHAM-DELEGHE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 48: 242-250, 2005.
- DÉGLISE, P; GRUNEWALD, B; GAUTHIER, M. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. **Neuroscience Letters**. 321: 13–16, 2002.
- FARRIS, S. M; ROBINSON, G. E; DAVIS, R. L; FAHRBACH, S.E. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**. 417: 303-314, 2004.
- FFRENCH-CONSTANT,R.H; DABORN, P.J; GOFF, G.L. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in genetics**. 20 (3):163-170, 2004.
- FONTA, C.; GASCUEL, J.; MASSON, C. Brain FOS-like expression in developing and adult honeybees. **NeuroReport**. 6: 745-749, 1995.
- FOSTER, S. P; DENHOLM, I; THOMPSON, R. Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Pest Management Science**. 59: 166–173, 2003.

- FREE, J.B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. 79p.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVEZ, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v.10)
- GUEZ, D.; SUCHAIL, S.; GAUTHIER, M.; MALESZKA, R.; BELZUNCES, L.P. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8- day-old honeybees (*Apis mellifera*). **Neurobiology of Learning and Memory**. 76: 183-191, 2001.
- GUEZ, D.; BELZUNCES, L.P.; MALESZKA, R. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 75: 217-222, 2003.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. Abelhas sociais e flores – análise polínica como método de estudo. In: PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/ FAPESP, 1993. p.17-30.
- JACOB, C.R.O. **Avaliação da neurotoxicidade do dióxido de carbono no sistema nervoso de *Apis mellifera***. Projeto de iniciação científica CNPQ- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.22p.
- JEMEC, A.; TISLER, T.; DROBNE, D.; SEPCIC, K.; FOURNIER, D.; TREBSE, P. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**. 68: 1408–1418, 2007.
- KLOPPENBURG, P. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). **The Journal of Comparative Neurology**. 363(2): 333-343, 1995.
- KOVÁCS, K.J. Measurement of immediate-early gene activation c-fos and beyond. **Journal of Neuroendocrinology**. 20: 880-884, 2008.
- LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S.; GAUTHIER, M. Imidacloprid-Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 48: 129-134, 2001.
- LANCET, D. Vertebrate olfactory reception. **Annual Review of Neuroscience**. 9:329-355, 1986.
- LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Editora Manole, 1999. 230p.

- LEE, S.J.; TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 51: 2646-2652, 2003.
- LIU, Z; WILLIAMSON, M.S; LANSDELL, S.J; DENHOLM, I. HAN, Z; MILLAR, N.S. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). **PNAS**. 102(24):8420-8425, 2005.
- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. 23(3/4): 303-309, 2006.
- MARÇON, P.G. **Modo de ação de inseticidas e acaricidas**. Brasil: IRAC-BR (Comitê brasileiro de ação a resistência a inseticidas). Disponível em: <http://www.irac-br.org.br> . Acesso em 20 jun 2009.
- MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. São Paulo: Nobel, 1983. 305p. (6ª edição, v.1)
- MEDRZYCKI, P.; MONTANARI, R.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A. G.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**. 56(1): 59-62, 2003.
- MORETTO, A. Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. **Toxicology Letters**. 102-103: 509 -513, 1998.
- MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; CURRAN, T. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. **Science**. 237: 192-197, 1987.
- MUTERO, A; PRALAVORIO, M; BRIDE, J.M; FOURNIERT, D. Resistance-associated point mutations in insecticideinsensitive acetylcholinesterase. **Genetics**. 91: 5922-5926, 1994.
- NARAHASHI, T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 294(1): 1-26, 2000.
- NAUEN, R; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U; SCHMUCK, R. **Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Pest Management Science. 57:577-586, 2001.
- NOCELLI, R.C.F; CÉSAR-TOGNOLI, L.M.M; SILVA-ZACARIN, E.C.M; SOARES, H.M; JACOB, C.R.O; ROAT, T.C; PALMA, M.S; MALASPINA, O. **Expression of the Fos protein in the brain of the *Apis mellifera* forager**. 14p. 2009. Artigo submetido para publicação.

NOVOS (outros) grupos de inseticidas. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO AGRÍCOLA SUPERIOR ABEAS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA- UFV. **Curso de especialização por tutoria à distância**: módulo 8:8.1- Toxicologia e impacto ambiental de inseticidas e acaricidas. Brasília: ABEAS, Viçosa: UFV, 1999. p.26-33. Tutor: Gilberto Casadei de Baptista.

OMOTO, C. **Princípios e práticas de manejo da resistência de pragas a pesticidas**. Brasil: IRAC-BR. Comitê brasileiro de ação a resistência a inseticidas. Disponível em: <http://www.irac-br.org.br>. Acesso em 20 jun 2009.

PERKINS, K.K.; DAILEY, G.M.; TJIAN, R. Novel Jun and Fos related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. **The EMBO Journal**. 7(13): 4265-4273, 1988.

RAMIREZ-ROMERO, R; CHAUFAX, J; PHAM-DELÈGUE, M. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie** . 36: 601–611, 2005.

ROAT, T. C.; LANDIM, C. C. Comparative study of the brain of workers, queens and males of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). In: Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Águas de Lindóia. **Brazilian Journal of Morphological Science**, 2005.

ROAT, T. C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008. 183p.

ROSSI, C.A. **Efeitos das doses subletais do inseticida imidaclopride associados às alterações morfológicas no cérebro de abelha *Apis mellifera* africanizada**. Projeto de iniciação científica. CNPQ- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007. 13p.

ROUSSEAU, E; GOLDSTEIN, E.S. The gene structure of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human proto-oncogene *fos*. **Gene**. 272: 315-322. 2001.

RYBAK, J; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**. 334(3): 444-465, 1993.

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

- SCHMUCK, R; NAUEN, R; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. **Bulletin of Insectology**. 56(1): 27-34, 2003.
- SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-Fos and other immediate early gene in the nervous system. **Neuron**. 4: 477-485, 1990.
- SMIRLE, M.J; WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Can. J. Zool.** 66:1938-1942, 1988.
- SOUZA, T. F. **Efeito das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) por meio de análises morfológicas e comportamentais**. Tese de mestrado em Ciências Biológicas. Fapesp 2007/01691-6, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.
- SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**. 60: 291-296, 2003.
- THOMPSON, H. Behavioral effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**. 12:317-330, 2003.
- TRATNER, I.; TOGNI, P.; SASSONE-CORSI, P.; VERMA, I.M. Characterization and purification of human Fos protein generated in insect cells with a baculoviral vector. **Journal of Virology**. 64(20): 499-508, 1990.
- ZHANG, A; KAYSER, H; MAIENFISCH, P; CASIDA, J.S. Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [³H]imidacloprid binding site. **J. Neurochem**. 75:1295-1303, 2000.
- ZHAO, J.Z; BISHOP, B.A; GRAFIUS E.J. Inheritance and synergism of resistance to imidacloprid in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**. 93(5): 1508-1514, 2000.

ASSINATURAS

Hellen Maria Soares

Aluna

Osmar Malaspina

Orientador

Roberta C. F. Nocelli

Co-orientadora