

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PAULO JOSÉ BALSAMO

Ação do Mercúrio no Sistema Hepatonefrocítico de
operárias de *Bombus atratus* (Hymenoptera:
Bombini)

SOROCABA-SP

2020

PAULO JOSÉ BALSAMO

Ação do Mercúrio no Sistema Hepatonefrocítico de operárias de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla

Sorocaba-SP

2020

AGRADECIMENTOS

Com a conclusão do doutorado, encerro um ciclo de aperfeiçoamento que iniciei no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) em março de 2013, sempre sob orientação do Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla. Agradeço muito a sua orientação e acompanhamento nesses mais de 7 anos, todo o tempo investido na minha formação e toda colaboração e incentivo sempre, para participação em congressos, seminários, mesas redondas e parcerias que realizamos nesse período. Todo o conhecimento profissional, pessoal e acadêmico que obtive com você, nos anos de estudos no LABEF, levarei sempre comigo e com muito carinho na memória. Por todos esses anos e por todo o percurso, te agradeço muito, Fábio!

Agradeço também a toda a estrutura da UFSCar Sorocaba, um *campus* excelente, onde pude conhecer pessoas ótimas e que me ajudaram nesse caminhar desde o mestrado. Agradeço todos os professores, alunos e funcionários que pude conviver nesse período, em especial agradeço ao Celso Pessoa e à Roseli Parré.

Agradeço muito às professoras da minha banca, Fabiana Costa, Cleoni Carvalho, Silvia Pierre e Elaine Silva-Zacarin, que aceitaram participar dessa etapa tão importante, num momento tão atípico. Agradeço muito a essa banca transmitindo conhecimento, que fizeram grande diferença no resultado final e que muito colaboraram para conclusão deste trabalho.

No LABEF pude aprender e compartilhar muito com os alunos e amigos que conheci e gostaria de agradecer à Gisele Possignolo, Raquel Salla, ao trio Cíntia, Michele e Vitor, à Leticia Ceschi e ao Caio Domingues. Muito obrigado pela companhia na caminhada.

Agradeço, aqui e sempre, à minha família: meu pai Luiz, minha mãe Neci, meus irmãos Luciana e Junior, meus sobrinhos Erick, Giovana e Laura, ao meu avô Agrippino e aos que tenho sempre próximo, no coração. Vocês são a minha base em todos os momentos.

Agradeço também a toda a equipe da Fatec Sorocaba, onde trabalho, em especial às professoras Joseli, Elaine, Elisabeth, Maíra e Rosa e à Adriana, diretora administrativa, que tanto colaboraram comigo nos momentos em que

participei de congressos e eventos e por todos os ensinamentos e parceria em diversos momentos.

Em nossas vidas sabemos que também podemos contar com pessoas especiais e eu tenho a sorte de poder trazer várias pessoas com muito carinho em meu coração. Agradeço muito à Dani, Bruno, Marielen, Gika, Fabi, Lauren, Piruka, Tuna, Ricardinho, Gustavo, Net, Pixi, Elis, Ká, Suh, Muh, Gaga, Duda, Drika, Summer, Gra e Mari que me mostram, perto ou longe, a importância da amizade, do carinho e da acolhida.

E agradeço, indubitavelmente, a Deus. Sempre.

,

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para isso, cada um de nós deve trabalhar para seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade coletiva por toda a humanidade, sendo nosso dever particular ajudar aqueles a quem achamos que podemos ser mais úteis.”

Marie Curie

RESUMO

Além dos estressores ambientais, as abelhas nativas brasileiras são continuamente expostas a agentes estressores bióticos, como parasitas e patógenos e a estressores abióticos, como pesticidas e metais. Contaminantes metálicos como o mercúrio (Hg), apresentam a capacidade de induzir as abelhas à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), ocasionando o estresse oxidativo. Nesse contexto foi estudada a marcação de enzimas relacionadas à resposta celular, especificamente as chaperonas (Heat Shock Proteins) Hsp70 e Hsp90, o citocromo P450 e a superóxido dismutase (SOD) em células do Sistema Hepatonefrocítico (SHN) de *Bombus atratus*, expostas ao Hg. Operárias de *B. atratus* foram coletadas no município de Sorocaba, SP, durante os meses de fevereiro a março de 2017, 2018 e 2019. Após a coleta, as operárias foram colocadas individualmente em caixas para o ensaio toxicológico e mantidas em incubadora a 26° C, 70% de umidade, no escuro, por 48 horas, conforme recomendações da OECD. Foram utilizadas 11 operárias para cada grupo sendo oferecido a ambos alimentação sólida (extrato de soja, mel e pólen, proporção 1:1:1) e ao grupo exposto 2mL de uma solução de Hg à concentração de 110 µg L⁻¹, (110ppb Hg) e ao grupo controle água não contaminada. Após 48h os animais foram crio-eutanasiados e os tecidos que compõem o SHN foram dissecados e processados para análises morfológicas e de imunofluorescência. Quando comparadas às abelhas controle, o grupo exposto apresentou aumento da marcação de P450 e SOD, indicando o papel dos trofócitos e enócitos na primeira resposta frente à contaminação por metal, representado pelo aumento da expressão de enzimas de desintoxicação de fase I (P450) e de resposta primária ao estresse oxidativo (SOD). As chaperonas Hsp70 e Hsp90 tiveram redução na marcação, fato que pode estar ligado a origem de coleta das abelhas em campo para experimentação. Estes dados corroboram a tese de que o Sistema Hepatonefrocítico é uma região responsiva ao estresse e, portanto, ideal para a avaliação de biomarcadores em nível celular e subcelular e a expressão de enzimas por células desse sistema podem servir como um marcador celular do status fisiológico de abelhas nativas brasileiras.

Palavras chave: Metal, *Bombus atratus*, estresse oxidativo, desintoxicação.

ABSTRACT

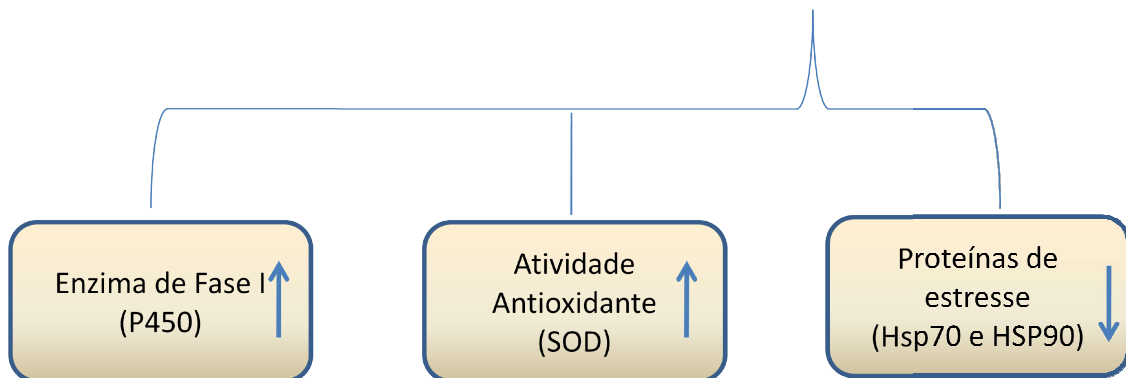
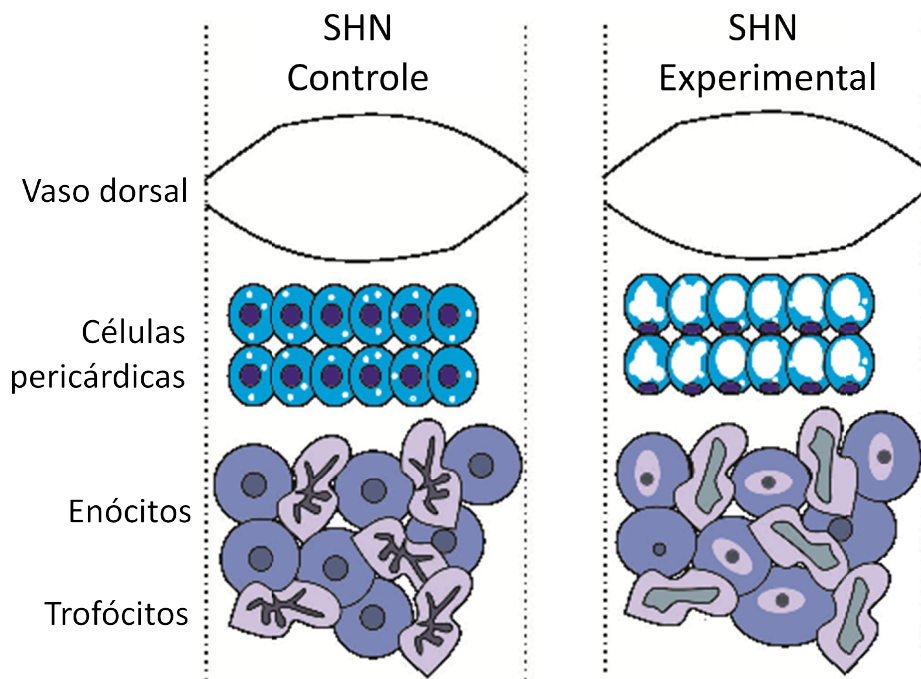
In addition to environmental stressors, native Brazilian bees are continuously exposed to biotic stressors, such as parasites and pathogens, and abiotic stressors, such as pesticides and metals. Metallic contaminants such as mercury (Hg), have the ability to induce bees to generate reactive oxygen species (ROS), causing the formation of oxidative stress. In this context, the labeling of enzymes related to the cellular response was studied, specifically chaperones (Heat Shock Proteins) Hsp70 and Hsp90, cytochrome P450 and superoxide dismutase (SOD) in cells of the Hepato-Nephrocytic System (HNS) of *Bombus atratus*, exposed to Hg. Workers of *B. atratus* were collected in the municipality of Sorocaba, SP, (23°34'53.1"S 47°31'29.5 "W), during the months of February to March 2017, 2018 and 2019. After the collection, the workers were placed individually in boxes for the toxicological test and kept in an incubator at 26° C, 70% humidity, in the dark, for 48 hours, according to OECD recommendations. Eleven workers were used for each group, being offered both solid food (soy extract, honey and pollen, 1: 1: 1 ratio) and the exposed group 2mL of a Hg solution at a concentration of 110 µg L⁻¹, (110ppb Hg) and to the control group uncontaminated water. After 48 hours the animals were cryo-euthanized and the tissues that make up the HNS were dissected and processed for morphological and immunofluorescence analyzes. When compared to control bees, the exposed group showed increased P450 and SOD marking, indicating the role of trophocytes and oenocytes in the first response to metal contamination, represented by the increased expression of phase I detoxification enzymes (P450) and primary response to oxidative stress (SOD). The chaperones Hsp70 and Hsp90 had a reduction in labeling, a fact that may be linked to the origin of the collection of bees in the field for experimentation. These data corroborate the thesis that the Hepatonephrocytic System is a stress biomarker and the expression of enzymes by cells of this system can serve as a cellular marker of the physiological status of native Brazilian bees.

Keywords: Metal, *Bombus atratus*, oxidative stress, detoxification.

RESUMO GRÁFICO



110 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg
48^h



SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2. OBJETIVOS..... | 15 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos | 15 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 3.1 Abelhas como modelo experimental | 16 |
| 3.2 Abelhas do gênero <i>Bombus</i> | 17 |
| 3.3. Ciclo de vida de <i>Bombus atratus</i> | 20 |
| 3.4 Serviços de polinização | 23 |
| 3.5 Sistema Hepatonefrocítico | 27 |
| 3.6 Corpo gorduroso | 28 |
| 3.7 Biomarcadores | 30 |
| 3.8 Mecanismos de desintoxicação | 31 |
| 3.8.1 Atividade do citocromo P450 | 33 |
| 3.8.2 Atividade das enzimas | 35 |
| 3.8.3 Superóxido Dismutase (SOD)..... | 36 |
| 3.8.4 Atividade das chaperonas..... | 37 |
| 3.9 Mercúrio | 38 |
| 3.9.1 Mercúrio em produtos apícolas..... | 40 |
| 3.9.2 Mercurio na cidade de Sorocaba- SP | 40 |
| 3.9.3 Toxicidade do mercúrio e estresse oxidativo | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 Coleta..... | 44 |
| 4.1.2 Parâmetros importantes na definição da metodologia..... | 44 |
| 4.2. Delineamento do experimento | 45 |
| 4.2.1 Manutenção dos animais em condições laboratoriais..... | 45 |
| 4.2.2 Dissecção do SHN..... | 46 |
| 4.2.3 Tratamento do material histológico | 46 |
| 4.3 Procedimento de análise..... | 47 |
| 4.3.1 Análise Morfológica..... | 47 |
| 4.3.2 Coloração com Hematoxilina e Eosina | 47 |
| 4.3.3 Técnicas de coloração Acridine Orange - Fluorescência..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.3.4 Protocolo – Imunofluorescência para detecção de enzimas:..... | 48 |
| 4.3.5 Análises de fluorescência e estatísticas | 49 |
| 5. RESULTADOS | 49 |
| 5.1 Artigo 1..... | 51 |
| 1. Introduction | 52 |
| 2. Materials and Methods..... | 55 |
| 3. Results and Discussion..... | 57 |
| 4. Conclusion | 67 |
| 5. References | 67 |
| 5.2 Artigo 2..... | 73 |
| 1. Introdução | 74 |
| 2. Material e Métodos | 77 |
| 3. Resultados e Discussão | 80 |
| 4. Conclusão..... | 84 |
| 5. Referências..... | 84 |
| 6. DISCUSSÃO | 89 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 93 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 94 |

1. INTRODUÇÃO

Devido à grande diversidade de *habitats* das abelhas e também devido a sua grande capacidade de percorrer longas distâncias e diferentes paisagens geobotânicas, são consideradas espécies bioindicadoras de contaminação ou estresse ambiental (BOGDANOV *et al.*, 2003; FREDES; MONTENEGRO, 2006). Esses organismos possuem sistema de respiração traqueal, onde as trocas gasosas ocorrem por meio de um sistema de túbulos internos (traqueias) que permeiam e penetram os órgãos e tecidos, abrindo-se em perfurações (espiráculos) no tegumento (CRUZ-LANDIM, 2009). Esse sistema permite que os insetos sejam diretamente atingidos por todo tipo de contaminação ambiental por contato e, inclusive, por ingestão de resíduos poluentes, ou xenobióticos (BOGDANOV *et al.*, 2003; CRUZ *et al.*, 2010).

As abelhas do gênero *Bombus*, pertencentes à família Apidae, reúnem aproximadamente 240 espécies eussociais primitivas de vital importância ecológica (WILLIAMS, 2005), visto que, são responsáveis pela manutenção da diversidade e abundância de muitas espécies vegetais em áreas de floresta natural e regiões urbanas (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 2007).

Seu potencial de polinizador de longa distância lhes permite visitar numerosas flores antes do retorno à colônia. Por serem abelhas grandes podem suportar uma maior carga de pólen e forragear mesmo em condições adversas. Além disto, possuem estruturas especializadas que lhes garante aperfeiçoar o processo de polinização, como a presença de uma glossa longa que alcança até mesmo flores com corolas tubulares. Estas abelhas apresentam comportamento de vibração do tórax, agitando as anteras e liberando o pólen; este comportamento é de extrema importância para aumentar a variabilidade ou mesmo para que ocorra a polinização cruzada em determinadas espécies vegetais, como por exemplo, o tomate e maracujá (BENAVIDES, 2008).

Nas regiões tropicais, este gênero de abelha está mais adaptado às regiões de baixa altitude. O Brasil apresenta somente seis espécies deste gênero, constituindo uma área periférica de distribuição do gênero *Bombus* (SAKAGAMI, 1976; MICHENER, 2007).

As espécies *B. morio* e *B. atratus* são abundantes no sul e sudeste do país e as áreas ocupadas por ambas se sobrepõem. Elas ocorrem nos trechos das florestas tropicais e subtropicais, bem como nos campos e cerrados moderadamente secos (BENAVIDES, 2008).

Entre as décadas de 1950 e 2000, 13 espécies de *Bombus* desapareceram dos países do Leste Europeu, sendo que quatro delas estão consideradas extintas (KOSIOR *et al.*, 2007). Na América do Norte, desde 1940, as espécies *B. borealis*, *B. terricola* e *B. variabilis* desapareceram do Estado de Illinois, EUA (GRIXTI *et al.*, 2009) e o mesmo vem ocorrendo com as espécies *B. affinis*, *B. fraternus*, *B. pennsylvanicus* e *B. vagans* (GRIXTI *et al.*, 2009; CAMERON *et al.*, 2011). A espécie *B. affinis* desapareceu do Estado de Illinois e praticamente não é mais encontrada em regiões onde se achavam em abundância, como no Canadá (CAMERON *et al.*, 2011). Populações da espécie *B. occidentalis*, muito utilizada para polinização em estufa nos EUA, estão decrescendo drasticamente (CARSWELL, 2015). No Brasil existem registros do declínio e desaparecimento de *B. bellicosus* no Paraná e Santa Catarina (MARTINS; MELO, 2010).

Nos fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado da UFSCar, *Campus* de Sorocaba, as espécies mais abundantes são *B. morio* e *B. atratus* e recentemente temos encontrado uma prevalência aparentemente alta de larvas endoparasitas de moscas em ambos os gêneros (ABDALLA *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Pouco se tem estudado a respeito do impacto de metais traço nas abelhas nativas e neotropicais que ocorrem no Brasil e raras são as pesquisas utilizando os órgãos internos destas abelhas para a avaliação de biomarcadores em nível celular e/ou subcelular. Os níveis de mercúrio nos produtos apícolas (mel, cera, pólen e própolis) têm preocupado os pesquisadores não só por ser deletério aos seres humanos, mas também às abelhas (BATELKOVÁ *et al.*, 2012; CARRERO *et al.*, 2013; MAGGID *et al.*, 2014).

O mercúrio é um metal extremamente tóxico aos animais, ocorrendo na forma metálica (elementar), orgânica (metilmercúrio) e inorgânica (forma catiônica bivalente ou mercúrica; forma monovalente ou mercurioso). A forma

orgânica tem sido a mais bem estudada em toxicologia e afeta diretamente o sistema nervoso central dos animais. Em contrapartida, o mercúrio catiônico bivalente (ou mercúrico, inorgânico), afeta os rins e o fígado e é igualmente cada vez mais encontrado nos ambientes, apesar das políticas internacionais de restrição do seu uso (MMA, 2013). O mercúrio é biocumulativo, podendo contaminar todas as espécies vegetais, inclusive o néctar e as sementes, como também pode afetar sua germinação e crescimento (ZHOU *et al.*, 2007, MMA, 2013).

Dados na literatura sobre estudos com *Bombus atratus* estão em expansão e a cada ano novas informações são agregadas ao estado da arte sobre essa espécie de abelha. Como exemplo, vários trabalhos recentes apontam a detecção inédita de patógenos em *Bombus atratus* como o nematóide *Sphaerularia bombi* (PLISCHUK; LANGE, 2012), o ácaro *Locustacarus buchneri* (PLISCHUK; POCCO; LANGE, 2013), o vírus Lake Sinai (GAMBOA *et al.*, 2015) e até mesmo uma espécie de microsporídeo até então não catalogado, com nome proposto de *Tubulinosema pampeana sp.* (PLISCHUK *et al.*, 2015). Pode-se citar também o primeiro estudo da expressão de Hsp70 no corpo gorduroso de *Bombus atratus*, que foi realizado no mesmo laboratório onde esta pesquisa foi realizada por Nogueira *et al.* (2019).

A busca em bancos de dados ilustra a razão em se estimular estudos com *Bombus atratus*. Segundo dados do PubMed levantados em 15/06/2020, existem 1.277 trabalhos relacionados ao termo "*Bombus*", mas apenas 17 quando buscado o termo "*Bombus atratus*". Quando pesquisado no banco de dados Mendeley, o termo "*Bombus*" apresenta 5.095 artigos e 125 artigos quando utilizado o termo "*Bombus atratus*". Quando buscado o termo "*Bombus P450*" os mesmos 5 artigos são encontrados nas duas bases de dados. Quando buscado o termo "*Bombus Hsp*" apenas um resultado é obtido, no Mendeley, e nenhum resultado é obtido nessas bases de dados quando procurado os termos "*Bombus SOD*".

Visando colaborar com o desenvolvimento do conhecimento, e contribuir com o aumento das informações sobre *Bombus atratus* o presente trabalho avaliou o impacto de um contaminante metálico nas células do corpo gorduroso

e células pericárdicas do Sistema Hepatonefrocítico, que atuam nos processos de desintoxicação e metabolização das abelhas. Assim, definiu-se a pergunta norteadora deste trabalho: a atividade de desintoxicação de abelhas *Bombus atratus* encontradas na natureza é modificada quando expostas ao mercúrio em concentração residual (concentração encontrada nos potes de mel de abelhas nativas)?

É importante salientar que o estudo se originou da preocupação de que, apesar das políticas de restrição do mercúrio, este está bioacumulado em vários ecossistemas, devido há anos de ingerência e falta de políticas públicas para seu descarte correto (CETESB, 2014; SINIR, 2015; CASTILHOS; DOMINGOS, 2018). É assustador pensar que mesmo em regiões que não estão próximas às regiões mirenadoras, têm-se encontrado mercúrio nos potes de mel de abelhas nativas (TOPORCÁK *et al.*, 1992; CARRERO *et al.*, 2013). A situação de garimpos ilegais na região da Amazônia, os desastres ambientais de barreiras de minério, como ocorrido em Brumadinho (MG), nos fez considerar que o estudo sistêmico do efeito do mercúrio em abelhas nativas faz-se necessário.

A hipótese a ser testada é que as células do Sistema Hepatonefrocítico (trofócitos, enócitos e células pericárdicas) das operárias de *Bombus atratus* respondem de forma protetiva quando são expostas de forma aguda a uma concentração residual de mercúrio, levando a manutenção da homeostase das abelhas.

Para entender como os trofócitos e enócitos atuam na desintoxicação do mercúrio, foram conduzidos experimentos que resultaram em dois artigos. O artigo intitulado “*In situ localization of Hsp70 and Hsp90 and general morphological characteristics of hepato-nephrocytic cells of Bombus atratus workers (Apidae, Bombini) after mercury exposure at 110 ppb*” apresenta os dados referentes a expressão de duas proteínas de estresse (Hsp70 e Hsp90) envolvidas no processo de síntese, dobramento correto e degradação de proteínas, sendo um mecanismo de defesa que permite que a célula se adapte e sobreviva em situações ambientais adversas.

O artigo intitulado “*Marcação de P450 e Superóxido Dismutase em células do corpo gorduroso de operárias de Bombus atratus expostas à*

concentração residual de mercúrio” apresenta os dados referentes a expressão do citocromo P450, uma enzima de Fase I que atua na primeira reação de biotransformação de xenobióticos, e da Superóxido Dismutase (SOD), uma enzima antioxidante que protege contra o radical superóxido, uma das principais espécies reativas de oxigênio.

Assim, para entender como a exposição a quantidade traço de mercúrio atua no organismo das abelhas estudadas, analisou-se o padrão de ocorrência da marcação de P450 envolvida na biotransformação de xenobióticos, da enzima antioxidante (SOD) que atua nos radicais livres gerados durante o processo de biotransformação e de duas chaperonas (Hsp70 e Hsp90) expressas tanto no estresse oxidativo ocasionado pelas reações de biotransformação quanto pela presença do íon mercúrico, devido ao seu poder deletério sobre os microsistemas celulares.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do Mercúrio em células do Sistema Hepatonefrocítico de operárias de *Bombus atratus* (Hymenoptera, Bombini).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Comparar a morfologia das células que compõem o sistema hepatonefrocítico (trofócitos, enócitos e células pericárdicas), de abelhas expostas ao mercúrio ($110 \mu\text{g.L}^{-1}$) e não expostas.

2) Estudar possíveis alterações na expressão das chaperonas Hsp70 e Hsp90, e as enzimas P450, relacionadas a processos de desintoxicação e Superóxido Dismutase (SOD), relacionada a atividade antioxidante, por meio de técnica de imunofluorescência nas células do corpo gorduroso de abelhas expostas ao mercúrio ($110 \mu\text{g.L}^{-1}$) e não expostas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ABELHAS COMO MODELO EXPERIMENTAL

A utilização de abelhas como modelo experimental para estudar doenças humanas apresenta diversas vantagens como a ausência de trâmites para aprovação de protocolos éticos, facilidade e baixo custo de manutenção e manipulação (WANG *et al.*, 2019). Muitos órgãos das abelhas têm funções análogas aos dos vertebrados como o cérebro, o trato gastrointestinal, o corpo gorduroso (fígado e adipócitos dos vertebrados) e células pericárdicas (rins dos vertebrados) (ABDALLA; DOMINGUES, 2015; TOPRAK, 2020).

Muitas rotas metabólicas também se apresentam altamente conservadas ao longo da filogenia, como transporte e metabolismo de glicose, síntese e armazenamento de lipídios, síntese de trealose, via de sinalização de insulina e estresse oxidativo (ARRESE; SOULAGES, 2010; WANG *et al.*, 2019; TOPRAK, 2020).

Popov e Szyszka (2020) apontaram similaridades entre as ondas cerebrais associadas ao processo de aprendizagem de abelhas, humanos e primatas não humanos, apontando a possibilidade de utilização do cérebro das abelhas para estudos de relação entre oscilações cerebrais e cognição, podendo os resultados serem extrapolados para humanos. Wang *et al.* (2019) apresentam a utilização de abelhas *Apis mellifera* como modelo para estudo de doenças humanas relacionadas a microbiota intestinal como obesidade, diabetes e doenças neurodegenerativas. Shpigler *et al.* (2017) utilizaram *Apis mellifera* para estudo de sociobiologia, apontando a conservação de genes correlatos ao distúrbio do espectro autista em humanos com genes associados à responsividade social em abelhas.

O interesse científico pelas abelhas aborda diversos temas como a forma que aprendem e se comunicam, o modo como as abelhas sociais formam um superorganismo, o reconhecimento de padrões durante o vôo e a intensa pesquisa sobre fatores bióticos e abióticos que contribuem para o fenômeno mundial do desaparecimento das abelhas (VANBERGEN; INITIATIVE, 2013; RICHARDSON, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019).

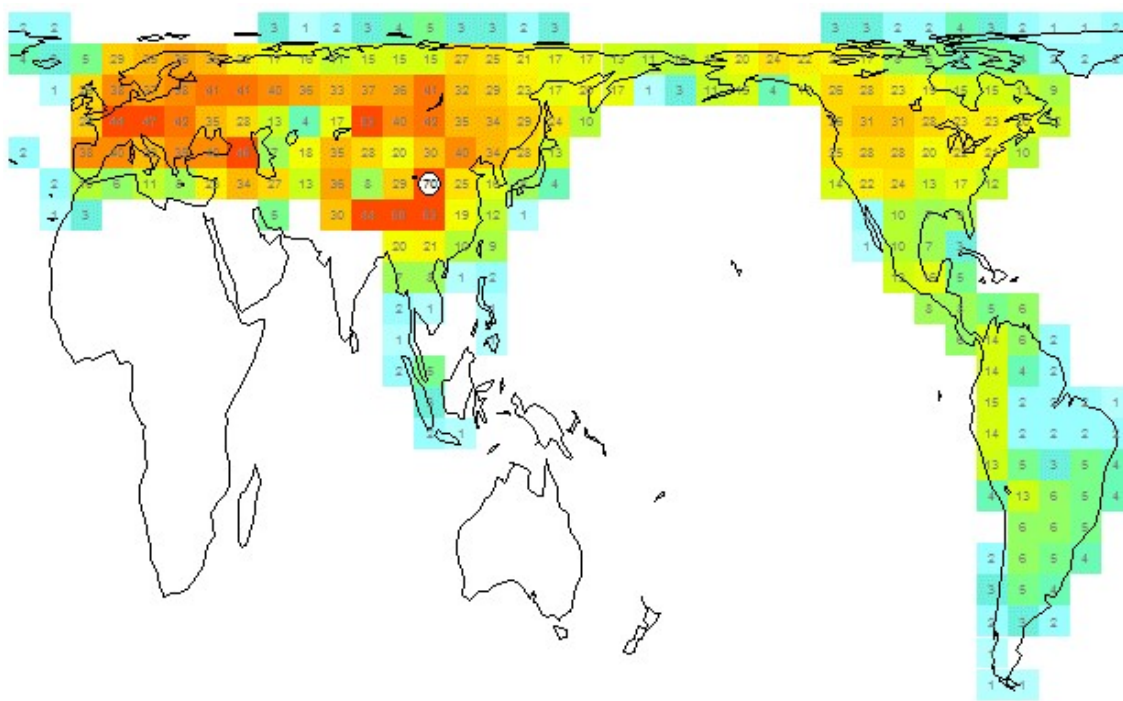
3.2 ABELHAS DO GÊNERO *Bombus*

O gênero *Bombus* pertence à Família Apidae, subfamília Apinae, tribo Bombini, onde encontram-se as mamangavas, cuja etimologia da palavra vem do tupi “Mama’nga”, podendo ser escrita ainda como mamangaba ou mamangá e significa “abelha de grande porte”. Popularmente são conhecidas como “mamangava de toco”, que são as espécies de abelhas não sociais *Xylocopa* e as “mamangavas de chão” que são as abelhas eussociais primitivas do gênero *Bombus* (GARÓFALO, 2005).

Estas abelhas contam com cerca de 250 espécies diferindo entre si por poucas estruturas anatômicas, sobretudo por diferenças nas ornamentações cuticulares que ocorrem nas genitálias masculinas e femininas, nas venações das asas e a forma da mandíbula (ABRAHAMOVICH *et al.*, 2005; MICHENER, 2007). São abelhas pilosas, com variação nas colorações corporais e com tamanhos variando entre 9 mm a 22 mm de comprimento. (MICHENER, 2007).

O gênero *Bombus* é tipicamente holártico, bem adaptado ao clima frio e com maior diversidade de espécies e subgêneros no paleártico do que no neártico e neotrópico (WILLIAMS, 1998; MICHENER, 2007). Essas abelhas robustas e pilosas possuem adaptações termorregulatórias que envolvem endotermia facultativa (HEINRICH, 1996), o que possibilita a vida em elevadas altitudes e lugares frios. A riqueza de espécies de *Bombus* é alta em áreas montanhosas ou em latitudes elevadas do Oriente e Paleoártico (aproximadamente 175 espécies), declina na América do Norte (aproximadamente 60 espécies) e reduz fortemente na América do Sul (aproximadamente 22 espécies), onde ocupam áreas não montanhosas (WILLIAMS, 1998; FRANÇOSO, 2015). A distribuição natural de abelhas *Bombus* no mundo pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 – Ocorrência natural de abelhas do gênero *Bombus* no mundo. As marcações indicam o número de espécies encontradas na região, com destaque para a região chinesa de Sichuan, marcada pelo círculo branco, local onde é encontrado o maior número de espécies no mundo.



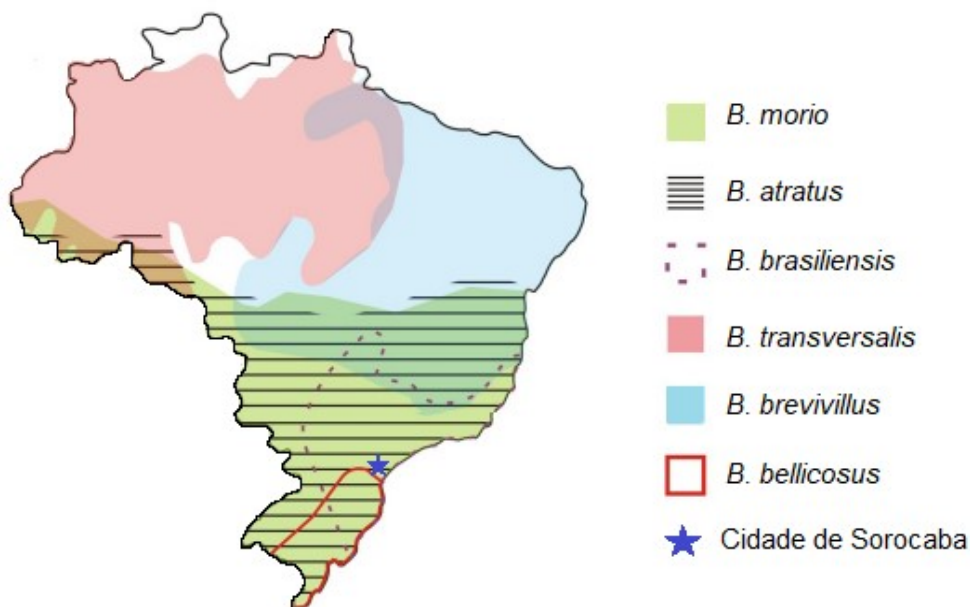
Fonte: Natural History Museum (2020). Disponível em: <<https://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/introduction.html>> Acessado em 10/06/2020.

As abelhas podem ter vários graus de sociabilidade. Abelhas solitárias criam seus ninhos e fornecem alimento para sua prole (alimentação massal), e, após oviposição, os operculam deixando a cria se desenvolver sozinha. Algumas abelhas fornecem alimento e cuidam da prole durante a maturação, deixando-as em seguida, sendo classificadas como abelhas subsociais. Abelhas eussociais apresentam várias características singulares, como uma colônia perene, com produção e armazenamento de alimento, presença de uma rainha morfologicamente diferente das operárias, aonde a rainha não consegue sobreviver sozinha, pois não tem a capacidade de forragear, e as operárias não têm a capacidade de formar novas colônias, pois não conseguem acasalar, por serem inférteis (MICHENER, 2007).

Algumas abelhas apresentam o comportamento que pode ser classificado como eussocial primitiva, onde pode-se incluir a tribo Bombini. Nesta situação as colônias se iniciam com uma única abelha, que desenvolve todas as funções necessárias para construir o ninho, forrageamento, ovoposição e alimentação das larvas. Após a emergência das abelhas filhas, ocorre a divisão do trabalho entre a fundadora do ninho (rainha) e as operárias. Neste caso, a rainha e operárias são morfologicamente iguais, diferindo no tamanho, fisiologia e comportamento. Essas colônias são tidas como temporárias, com duração de aproximadamente um ano, pois com a maturidade das operárias e emergência de novas rainhas, a colônia se separa e pode definir e acabar (MICHENER, 2007).

As abelhas do gênero *Bombus* constituem um grupo de abelhas eusociais primitivas e apresentam-se amplamente distribuídas pelo mundo, adaptadas a vários ambientes tendo distribuição geográfica desde o nível do mar até os 4400m de altitude nos Andes. Na América do Sul, contam com uma distribuição de 21 espécies, sendo que no Brasil são observadas seis espécies, onde listam-se *B. atratus*, *B. bellicosus*, *B. brasiliensis*, *B. brevivillus*, *B. morio* e *B. transversalis*. (GARÓFALO, 2005, BENAVIDES, 2008). A Figura 2 apresenta a distribuição dessas espécies no Brasil.

Figura 2. Distribuição das seis espécies de *Bombus* encontradas no Brasil.



Fonte: Adaptado de Françoso (2015).

3.3. CICLO DE VIDA DE *Bombus atratus*

Em regiões temperadas as abelhas do gênero *Bombus* apresentam ciclo de vida anual (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006), já no Brasil não se sabe ao certo se apresentam um ou dois ciclos anuais (GARÓFALO, 2005). As colônias de *Bombus* não são perenes, apresentando duas fases diferentes, uma inicial ou solitária e outra, após o surgimento das primeiras operárias.

A Figura 3 representa a estrutura do ninho de abelhas *Bombus atratus*, indicando as células de ovoposição, potes de pólen, pupa operculada, rainha e operárias. Na imagem é possível observar a diferença entre os tamanhos das operárias em comparação a rainha.

Figura 3 – Estrutura de colônia de *Bombus atratus*.



Fonte: Adaptado de Padilla *et al.* (2017).

O ciclo biológico da colônia começa com uma rainha jovem solitária fecundada que após hibernação, nos países de clima tropical (período que ocorre na primavera), inicia a atividade de forrageamento, buscando um local para realizar a construção e aprovisionamento de seu ninho (geralmente cavidades no solo) para iniciar uma nova colônia. As espécies desse gênero

nidificam em substratos naturais diferentes, como no solo, ou em câmaras de saueiros abandonados, ocos de madeiras e também em cupinzeiros (BENELLI, 2013; NEIVA, 2015).

Depois de construído o ninho, a rainha irá ovipositar seus primeiros ovos diplóides, originando as primeiras operárias. No início da fundação do ninho a rainha forrageia a procura de néctar e pólen, porém após a emergência das primeiras operárias, ela se mantém dentro do ninho e passa a realizar somente a função reprodutiva (GOULSON, 2010; BENELLI, 2013). Da ovoposição a emergência, o tempo de desenvolvimento médio é de trinta dias, podendo variar de acordo com a temperatura e disponibilidade de alimento (PADILLA *et al.*, 2017).

Com o estabelecimento do ninho, a rainha cessa suas atividades, dando lugar as primeiras operárias, que se encontram agora aptas a realizar a manutenção, coleta de alimentos e crescimento da colônia. A fase eussocial, ocorre como o surgimento da segunda geração de operárias (GOULSON, 2010; BENELLI, 2013).

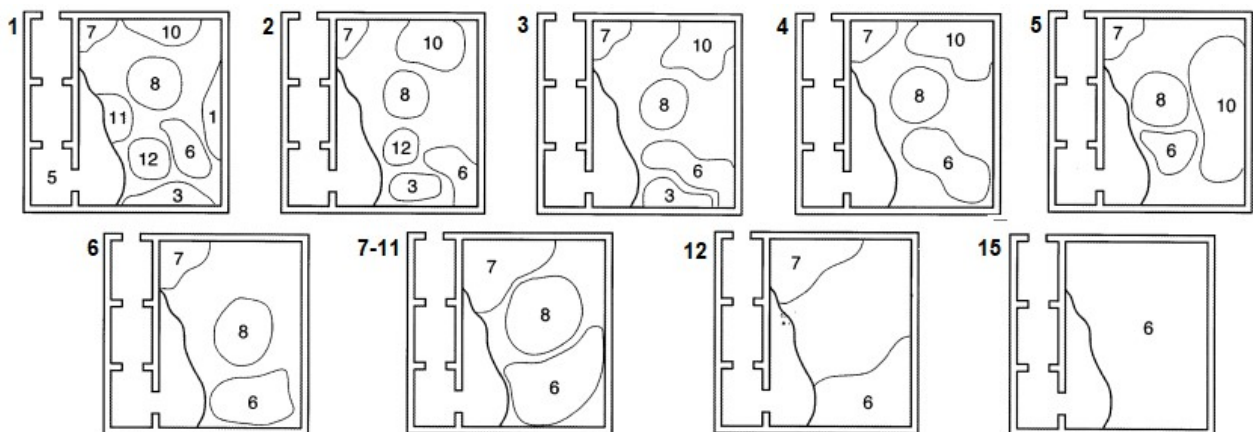
A dominância da rainha sobre as operárias é realizada através de agressões físicas não ritualizadas e ausência de feromônios, diferentemente do que ocorre nos meliponíneos e em *Apis*, respectivamente (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006). À medida que a colônia vai aumentando, a rainha perde sua dominância e operárias com ovários desenvolvidos começam a ovipositar ovos haplóides que originarão machos. Nesta fase, as operárias não poedeiras podem comer os ovos postos por outras operárias e a organização social da colônia é desestruturada. A rainha, então, começa a produzir rainhas que irão se acasalar com os machos de outros ninhos próximos e fundar outra colônia. Os machos filhos das operárias saem do ninho após 3-4 dias de emergência, podendo variar entre as espécies deste gênero (GARÓFALO, 2005, BENAVIDES, 2008).

Segundo Garófalo (2005) as rainhas novas podem ser separadas em três grupos: um deles é formado por aquelas que logo abandonam a colônia para estabelecer seus próprios ninhos; o outro grupo é formado pelas rainhas que após acasalarem iniciam posturas no ninho materno e, o último grupo é formado pelas rainhas que permanecem na colônia trabalhando como se

fossem operárias. Essas rainhas podem ser fecundadas e, em média, permanecem na colônia por trinta dias embora algumas possam permanecer por até setenta dias. A rainha velha pode ser morta pelas operárias antes ou após a emergência das rainhas filhas (GARÓFALO, 2005; VELTHUIS; VAN DOORN, 2006; BENAVIDES, 2008). O ciclo de vida termina com a chegada do inverno, onde as futuras rainhas entram na fase de hibernação (GOULSON, 2010).

A Figura 4 apresenta os resultados obtidos por Cameron e Jost (1998) mostrando as novas rainhas e seus territórios dentro do ninho, no decorrer de 15 dias.

Figura 4 – Evolução da dominância de jovens rainhas em colônia de *B. atratus*. Os números apresentam as rainhas numeradas e os dias estão representados ao lado das caixas. Pode-se notar a existência de 9 rainhas no dia 1 e a dominância da rainha 6 a partir do dia 15.



Fonte: Adaptado de Cameron e Jost (1998).

Independentemente de seu ciclo biológico ou grau de socialidade, todas as abelhas estão sujeitas a exposição a agentes contaminantes. No entanto, é durante a fase solitária e a fase das atividades de forrageamento das primeiras operárias, que as abelhas da espécie *Bombus* apresentam uma taxa de risco muito superior à das abelhas eussociais avançadas (meliponíneos e *Apis*), ao se levar em consideração o comprometimento da integridade e sobrevivência da colônia. Sendo consideradas as maiores responsáveis pela manutenção da diversidade e abundância de muitas espécies vegetais em áreas de floresta

natural e regiões urbanas, devido as suas atividades de polinização (WILLIAMS, 2000; GRIXTI *et al.*, 2009; LIMA; ROCHA, 2012), esta grande suscetibilidade aos toxicantes presentes nos ambientes que visitam é muito preocupante pois, em tese, uma rainha recém-fecundada morta é um ninho potencialmente extinto.

3.4 SERVIÇOS DE POLINIZAÇÃO

As mamangavas têm muita importância na polinização, atuando na vegetação nativa e também nos cultivares. Comparadas às abelhas *Apis mellifera* são mais ágeis, podendo visitar mais flores durante o forrageamento e seu tamanho favorece que consigam carregar mais pólen e também conseguem um melhor contato com os estames e pistilos do que insetos de menores tamanhos (HEINRICH, 2000; KOPPERT, 2007).

As distâncias percorridas pelas abelhas em atividades de forrageamento variam no tempo e no espaço com base na disponibilidade de recursos do ambiente em que estão (TORNÉ-NOGUERA *et al.*, 2014). Há indícios que a diversidade floral seja mais importante que a densidade floral para que as abelhas definam seus locais de forrageamento (JHA;KREMEN, 2012; POPE; JHA, 2017). Além disso, áreas vegetais muito fragmentadas não são atrativas para espécies de *Bombus*, demonstrando que algumas espécies são mais vulneráveis á fragmentação do habitat (MAYER *et al.*, 2012).

A distância de forrageamento das abelhas está relacionada com seu tamanho (GREENLEAF *et al.*, 2007; TORNÉ-NOGUERA *et al.*, 2014) e, apesar de Goulson *et al.* (2010) terem analisado dados referentes a espécies de *Bombus* com atividade de forrageamento entre 3 e 10 Km, as distâncias mais comuns de forrageamento são entre 250m e 2 Km, (KNIGHT *et al.*, 2005; HAGEN *et al.*, 2011; JHA; KREMEN, 2012; REDHEAD *et al.*, 2016).

A polinização é considerada um serviço ecossistêmico e seu valor pode ser mensurado quando comparado a dados sobre a produção de alimentos. Em 2016, um relatório da Plataforma Intergovernamental de Políticas Científicas em Serviços de Biodiversidade e Ecossistemas quantificou os valores dos serviços de polinização mundial, sendo estimado entre US\$235 e

US\$577 bilhões anuais e ainda que, na falta de polinizadores, seria detectado uma perda líquida anual entre US\$160 e US\$490 bilhões (IPBES, 2016).

Das 191 plantas silvestres e cultivadas, relacionadas a alimentação brasileira, Giannini *et al.* (2015) analisaram 85 cultivares dependentes de polinização e estimaram que a polinização relacionada a produção agrícola no Brasil é de aproximadamente US\$12 bilhões. Mais recentemente, um relatório da Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecosistêmicos, analisando dados de 67 cultivares nacionais dependentes de polinizadores, estimou o valor da polinização na produção de alimentos no país, em 2018, em cerca de R\$43 bilhões (BPBES, 2019).

Devido sua resistência a doenças e alta capacidade produtiva de mel, no Brasil, a abelha *Apis mellifera* é amplamente utilizada para obtenção de produtos apícolas e, conseqüentemente, é mais facilmente e amplamente utilizada como polinizadora de cultivares (MORAIS *et al.*, 2012; PÉREZ-MÉNDEZ *et al.*, 2020), porém essas abelhas não são necessariamente as espécies polinizadoras mais eficientes, uma vez que não maximizam a polinização de algumas culturas em comparação às abelhas nativas (GARIBALDI *et al.*, 2013; GRASS *et al.*, 2018).

Esse fato pode ser exemplificado na Figura 5, que apresenta um exemplo de polinização do maracujazeiro, realizado por abelhas do gênero *Bombus*. Devido ao seu tamanho, ao visitar a flor, o tórax da abelha entra em contato com as anteras, onde fica aderido o pólen. Ao visitar a próxima flor, o tórax coberto de pólen entra em contato com os estigmas dessa flor, realizando a polinização. (SILVA *et al.*, 2014a). Abelhas *A. mellifera* podem visitar essas flores, porém não conseguem polinizá-la devido seu menor tamanho (BPDES, 2019).

Figura 5 – Polinização da flor de maracujá, aonde a abelha coleta o pólen em seu dorso na antera da planta A e a leva até o estigma da planta B.



Fonte: adaptado de Silva *et al.* (2014a).

A polinização realizada por *Bombus atratus* é efetiva para diversas culturas como maracujá (*Passiflora edulis*), berinjela (*Solanum melongena*) (SILVA *et al.*, 2014b), girassol (*Helianthus annuus*) (CORTOPASSI- LAURINO *et al.*, 2003) bem como a vegetação nativa, visitando e polinizando benjoeiro (*Styrax ferrugineum*), jurubeba ou joá-manso (*Solanum paniculatum*), fruta de lobo (*Solanum lycocarpum*), picão (*Bidens segetum*) (SILVA *et al.*, 2014b), assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) e topete de cardeal (*Calliandra tweedii*) (CORTOPASSI- LAURINO *et al.*, 2003).

As abelhas *B. atratus* apresentam o comportamento de vibração do tórax durante a polinização. Esse comportamento auxilia na polinização vibracional de espécies vegetais que possuem anteras poricidas, que é o caso da família Solanaceae que representa muitas culturas economicamente importantes como tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*) e pimentão (*Capsicum sp.*) (CORREIA; GIMENES, 2016). As *B. atratus* também podem ser observadas polinizando cultivares de morango, no Rio Grande do Sul (PIOVESAN *et al.*, 2019) bem como café, abóbora, abobrinha (BPBES, 2019).

No cultivo de pimentão, a utilização de *Bombus atratus* na polinização aumentou em 30% o tamanho e o peso seco do fruto e 60% o número de sementes em comparação aos cultivares com autopolinização, onde foi detectado que 30% da produção de frutos apresentavam malformação (RIANO

et al., 2015). Quando avaliada a produção de dois tipos de morango (Camino Real e Ventana) a polinização realizada por *B. atratus* resultou em frutos 28% maiores e 103% mais pesados, com até 81% mais sementes quando comparados aos morangos gerados de flores não polinizadas (POVEDA CORONEL *et al.*, 2018).

Pérez-Méndez *et al.* (2020) analisaram cultivares de maçãs com três tipos de polinização: manual, por *Apis mellifera* e por *Bombus atratus* e concluíram que macieiras produziam menos da metade de maçãs quando não eram polinizadas por *B. atratus*, mesmo quando polinizadas por *A. mellifera*. Quando convertido em valores monetários, a presença de *B. atratus* mais que dobrou o lucro, apresentando um rendimento médio de US\$16.302 por hectare em comparação ao rendimento médio de US\$6.774 por hectare dos outros cultivares.

A perda alarmante da diversidade de polinizadores em todo o mundo pode reduzir a produtividade de culturas dependentes de polinizadores, o que pode levar a impactos econômicos negativos (GOULSON *et al.*, 2015; PÉREZ-MÉNDEZ *et al.*, 2020)

A problemática da diminuição de polinizadores, em especial das abelhas já foi reportada em várias partes do mundo com relatos de colônias de *Apis mellifera* e de espécies do gênero *Bombus* no hemisfério Norte (POTTS *et al.*, 2010; CAMERON *et al.*, 2011; GOULSON *et al.*, 2015), e teve seus primeiros registros na literatura a partir de 1869, porém este fenômeno deixou de ser um caso natural e esporádico, havendo relatos cada vez mais frequentes de casos drásticos (UNDERWOOD; VANENGELSDORP, 2010).

No Brasil, a falta de monitoramento de polinizadores em longo prazo dificulta a avaliação da manutenção de suas populações, embora o declínio, por questões climáticas, já tenha sido previsto em estudos de modelagem (GIANNINI *et al.*, 2017) e detectado como consequência de diversas atividades como desmatamento, alteração e perda de habitats, uso indiscriminado de agrotóxicos e atividades de mineração e industriais (FITZPATRICK *et al.*, 2007; SANTOS, 2010; BPBES, 2019).

Assim, o crescente desaparecimento de populações das abelhas se relaciona diretamente ao declínio na polinização, comprometendo tanto a qualidade ambiental quanto a produtividade agrícola, uma vez que estes polinizadores são utilizados em diversas monoculturas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010). Ainda, as abelhas do gênero *Bombus* constroem seus ninhos no solo, podendo ser destruídos decorrente de atividades agrícolas e agropecuárias (BENAVIDES, 2008).

De acordo com Porrini *et al.* (2003), estudos de toxicologia clássica, com dados sobre mortalidade e sobrevivência não são suficientes para se avaliar os efeitos reais que xenobióticos geram nos indivíduos, uma vez que, se tratando de doses subletais, tipicamente não é observada a morte do grupo experimental (BALSAMO *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Estudos ecotoxicológicos com abelhas nativas brasileiras, como *Bombus atratus* são ainda pouco explorados, sendo a maior parte dos trabalhos voltados às abelhas *Apis mellifera*. Aliado a isto, pouco se sabe sobre os efeitos de estressores ambientais nos órgãos internos dessas abelhas (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). O Sistema Hepatonefrocítico (SHN) é um órgão relevante para essa análise, uma vez que o conjunto de células associadas nesse sistema atuam em processos de desintoxicação e estão diretamente em contato com os contaminantes circulantes na hemolinfa (ABDALLA; DOMINGUES, 2015; SKALDINA; SORVARI, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019).

3.5 SISTEMA HEPATONEFROCÍTICO

Conforme apresentado por Abdalla e Domingues (2015), o SHN é formado por uma associação de tecidos localizados ao redor do vaso dorsal, apresentando um arranjo espacial definido, sendo identificado na porção mais externa a camada do corpo gorduroso, constituído da associação de trofócitos e enócitos que envolve uma camada de células pericárdicas e permeando entre esses tecidos, encontram-se os hemócitos.

Esse sistema desempenha funções importantes na regulação da homeostase da hemolinfa, assim como na remoção e/ou inativação de toxicantes e prevenção contra o estresse oxidativo, preservando os órgãos

internos e o cérebro da contaminação por toxicantes. Dessa forma, as células do SHN são altamente responsivas a substâncias tóxicas, como os metais e outros xenobióticos, tornando-se um eficiente biomarcador para estudos de monitoramento ambiental (ABDALLA; DOMINGUES, 2015, BERTOLI, 2020).

O distúrbio do Sistema Hepatonefrocítico após a exposição a doses subletais de xenobióticos não está necessariamente associado a um aumento nas taxas de mortalidade, uma vez que as abelhas expostas podem responder aos xenobióticos por meio do SHN e manter assim, a sua sobrevivência (DOMINGUES *et al.*, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019). Assim, hipoteticamente, as abelhas podem manter sua homeostase através do SHN, com as atividades de filtração, desintoxicação e biodisponibilidade dos xenobióticos para os túbulos de Malpighi (GREGORC *et al.*, 2016). Por esse motivo, as abelhas expostas a um determinado xenobiótico ou a um estressor biótico podem não morrer agudamente, uma vez que o SHN pode mascarar os efeitos tóxicos de tais estressores (DOMINGUES *et al.*, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019).

Assim, o estudo da SHN permite entender os mecanismos que a abelha emprega para manter a homeostase. Isso pode ser usado para determinar as implicações mais prováveis causadas por um estressor específico, considerando que as células que compõem o SHN têm múltiplas funções (ADAMCZYK *et al.*, 1996; ROMA *et al.*, 2010; CHAPMAN, 2013), e atuam em múltiplos órgãos e sistemas das abelhas, como o sistema nervoso, metabolismo intermediário, desenvolvimento dos ovários, respostas imunes, sistema de proteção antioxidante e metaloproteínas (ABDALLA; DOMINGUES, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; SKALDINA; SORVARI, 2017).

3.6 CORPO GORDUROSO

O corpo gorduroso é um tecido de preenchimento distribuído pelo corpo do inseto, presente em duas formas: uma camada perivisceral, localizada ao redor dos órgãos e camada parietal, localizada adjacente ao tegumento. Está presente no interior de apêndices externos, cabeça, tórax e abdomen, sendo neste último mais abundante (CRUZ-LANDIM, 2009; CHAPMAN, 2013).

Esse tecido apresenta um desenvolvimento na fase embrionária por meio de uma hiperplasia e especialização de células existentes e recebe esse

nome devido a sua grande capacidade de armazenar os nutrientes provenientes do alimento ingerido no estágio larval (LOCKE, 1998; CHAPMAN, 2013). Está localizado na hemocele, conectado por músculos, tecido conjuntivo e traqueias e a facilidade de comunicação entre estes sistemas permite um contato direto com a hemolinfa, otimizando a troca de metabolitos (CRUZ-LANDIM, 2009; CHAPMAN, 2013).

O corpo gorduroso dos insetos é descrito na literatura como equivalente a combinação das funções de armazenamento (tecido adiposo) e funções metabólicas (fígado e rins dos vertebrados) (DEAN; LOCK; COLLINS, 1985; ABDALLA; DOMINGUES, 2015).

A comparação deste tecido ao fígado dos vertebrados vêm da função do corpo gorduroso na neutralização e armazenamento de substâncias não utilizadas no metabolismo do inseto, absorvendo e acumulando o excesso de nutrientes presentes na hemolinfa, bem como realizando processos de desintoxicação e também liberando na hemolinfa outros compostos metabolitos úteis ao organismo (CHAPMAN, 2013). Com isso, atua tanto na metabolização de xenobióticos (LYCETT *et al.*, 2006; ABDALLA; DOMINGUES, 2015), como na regulação da composição química da hemolinfa (CRUZ-LANDIM, 2009), podendo também atuar nos processos de muda da cutícula (POSTLETHWAIT; GIORGI, 1985; VALLE, 1993).

Nas abelhas o corpo gorduroso é constituído basicamente pelos trofócitos e pelos enócitos (CRUZ-LANDIM, 2009). Os trofócitos possuem um formato irregular, assumindo formas arredondadas ou poligonais, e possuem um núcleo grande, irregular, geralmente deslocado da região periférica da célula, com diferentes tipos de substâncias armazenadas em seu citoplasma (CRUZ-LANDIM, 2009; CHAPMAN, 2013).

Apresentam como característica ultraestrutural serem suportados por uma fina lâmina basal e com seu citoplasma possuindo retículo endoplasmático rugoso predominantemente e regiões de complexo de Golgi, bem como várias mitocôndrias, peroxissomos e lisossomos (ROMA *et al.*, 2010).

Os enócitos apresentam uma origem ectodérmica e aparecem distribuídos entre os trofócitos, sendo presentes no corpo gorduroso parietal e

perivisceral. São células esféricas ou ovaladas, com citoplasma acidófilo, possuindo um núcleo central, poucas mitocôndrias e grandes áreas com retículo endoplasmático agranular e vacúolos digestivos. As funções metabólicas realizadas pelos enócitos ainda não foram totalmente definidas, mas acredita-se que estas células atuem sintetizando lipídios ou complexos lipoproteicos (ROMA *et al.*, 2010).

Devido a sua capacidade de adaptação às necessidades fisiológicas, as células do corpo gorduroso podem modificar suas atividades em resposta a sinais nutricionais e hormonais como, por exemplo, o suprimento das necessidades de crescimento, metamorfose e reprodução do inseto (ARRESE; SOULAGES, 2010). Assim, no caso do contato das abelhas com algum xenobiótico e processo de intoxicação, esse tecido reage, tentando regular a homeostasia do indivíduo, bem como iniciando o processo de desintoxicação, tornando as células desse tecido um ótimo biomarcador (ABDALLA; DOMINGUES, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019).

3.7 BIOMARCADORES

A investigação e detecção de um composto tóxico no ambiente pode confirmar a presença do xenobiótico, porém não indica os efeitos prejudiciais que esse contaminante possa provocar nos organismos daquele ambiente (RAMSDORF, 2007; FRANCO, 2012). Pode-se então, estabelecer comparações entre os efeitos adversos gerados nesses organismos frente os níveis de exposição do contaminante, usando de bioindicadores para avaliar os efeitos do xenobiótico nos organismos expostos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; RAMSDORF, 2007).

Um biomarcador pode ser definido como uma alteração na resposta biológica (variando de respostas moleculares a respostas celulares e, fisiológicas a alterações comportamentais) que pode estar relacionada à exposição ou efeitos tóxicos de produtos químicos, evidenciando uma alteração do estado normal do organismo que não é verificada em organismos não expostos ao agente (WHO, 1993). Eles podem ser divididos em três tipos.

Os biomarcadores de exposição podem ser utilizados para avaliar uma exposição individual ou em grupo, para um xenobiótico ou seu metabólito, que

é medido dentro de um compartimento de um organismo, observando uma relação entre a exposição externa e a quantificação interna (POHL *et al.*, 2000; AMORIM, 2013).

Os biomarcadores de efeito são definidos como qualquer alteração bioquímica, fisiológica ou outra mensurável dentro de um organismo, geradas a partir da exposição e absorção de um xenobiótico, podendo ser utilizado para verificação dos efeitos adversos das substâncias nos organismos (POHL *et al.*, 2000; AMORIM, 2013).

Os biomarcadores de susceptibilidade são indicadores de uma limitação inerente ou adquirida da capacidade de um organismo em responder à exposição ao xenobiótico, utilizada para entender o grau de resposta à essa exposição (POHL *et al.*, 2000; AMORIM, 2013).

Portanto, podemos definir a utilização da análise e marcação de enzimas envolvidas no processo de desintoxicação de abelhas como biomarcadores de efeito frente à exposição de xenobióticos.

3.8 MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO

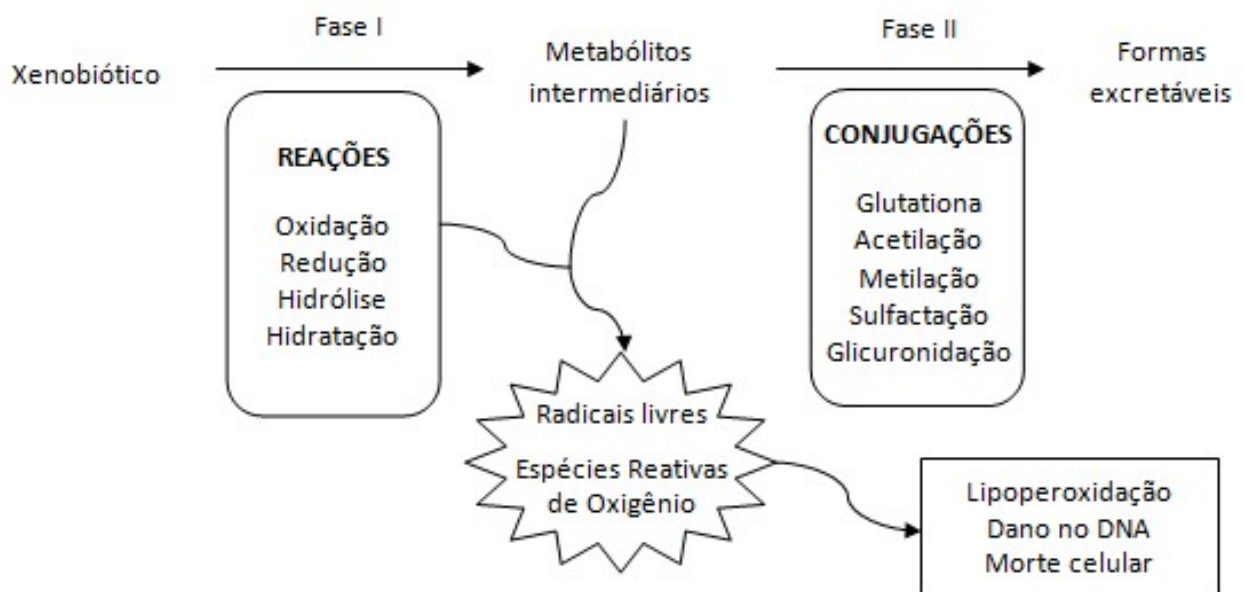
Um organismo tem duas maneiras principais de eliminar um xenobiótico. Pode ser excretado na sua forma original ou ser biotransformado pelo organismo. A biotransformação geralmente ocorre para formar um composto mais hidrofílico, para ser mais facilmente excretado (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O processo de desintoxicação do xenobiótico envolvendo a conversão de substâncias lipossolúveis em metabólitos excretáveis solúveis em água pode ser dividido em duas fases (ITO, 2014). Na desintoxicação da Fase I, a estrutura da toxina é enzimaticamente alterada e torna-se incapaz de interagir com os locais-alvo lipofílicos, por meio de reações como oxidação e hidrólise. Essa metabolização é realizada principalmente pelas monooxigenases do citocromo P450 (P450) e carboxilesterases (CCE), embora outras enzimas, incluindo monooxigenases dependentes de flavina e ciclooxigenases também possam contribuir (ITO, 2014; BARENBAUM; JOHNSON, 2015).

Os metabólitos resultantes são passíveis de alterações adicionais, chamadas reações de Fase II, que envolvem tipicamente a conjugação de

produtos da desintoxicação da Fase I com moléculas hidrofílicas volumosas, como ácido glucurônico e a glutatona, para solubilização e transporte. As Glutathione-S-transferases (GST) são as principais enzimas da Fase II, embora também possam funcionar como enzimas da Fase I. Outras enzimas da Fase II em insetos incluem glicosiltransferases, fosfotransferases, sulfotransferases, aminotransferases e glicosidases (XU *et al.*, 2013; ITO, 2014). Podemos ainda contar uma terceira fase da desintoxicação, que envolve o transporte de conjugados da Fase II para fora das células para excreção. Entre as proteínas envolvidas nesse processo estão proteínas de resistência a múltiplas drogas e transportadores ABC (ATP binding cassette) (BERENBAUM; JOHNSON, 2015). As reações principais envolvidas no processo de biotransformação de xenobióticos podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6: Mecanismos da rota da biotransformação de xenobióticos até formas excretáveis.



Fonte: Adaptado de Torres (2017).

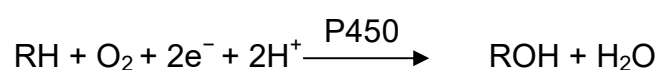
Nos insetos, o citocromo P450 (P450) está envolvido na biossíntese e no metabolismo de substâncias endógenas, incluindo feromônios, hidrocarbonetos e hormônios cuticulares e desintoxicação de substâncias exógenas, incluindo fitoquímicos e inseticidas (FEYEREISEN, 2012). Caracterizar a função de P450s específicos é complicado por essa diversidade e, como conseqüência,

são conhecidos poucos substratos aonde atuam as P450s de insetos (MAO *et al.*, 2015). Ainda, a expressão de P450 varia de acordo com o tecido estudado e tem relação também com a idade-comportamento das abelhas (MAO *et al.*, 2015).

Os humanos possuem 57 genes que codificam P450 e as abelhas 46 genes (FEYEREISEN, 2011) e alguns autores hipotetizam que as abelhas podem compartilhar com os seres humanos uma dependência de um subconjunto de P450 de atividade relativamente generalizada para a maioria das reações de desintoxicação do xenobiótico (poucos genes de P450 para uma grande variedade de compostos) (GUENGERICH, 2015; MAO *et al.*, 2017). Assim como os seres humanos são vulneráveis às interações entre alimentos e medicamentos, as abelhas também podem ser vulneráveis às interações entre produtos químicos sintéticos e dietéticos ingeridos (MAO *et al.*, 2017).

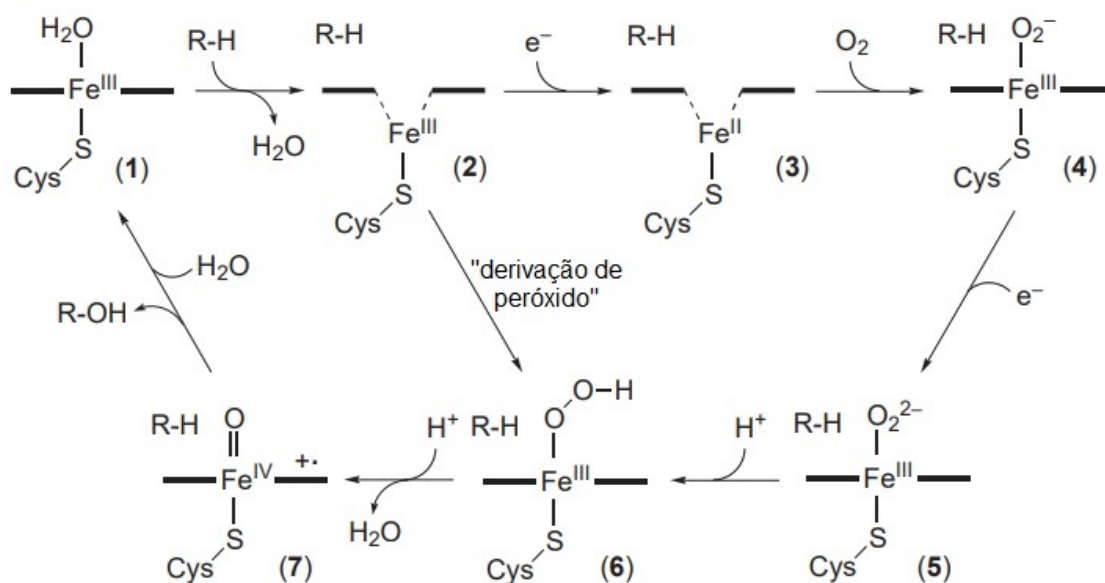
3.8.1 ATIVIDADE DO CITOCROMO P450

Os citocromos P450 são uma superfamília de enzimas monooxigenases contendo um grupo heme ligado ao tiolato de cisteína (R-S-Cys), que catalisam a transferência de um átomo de oxigênio do oxigênio molecular (O₂) para uma ampla variedade de substratos biológicos, com o segundo átomo de oxigênio sendo reduzido por dois elétrons para uma molécula de água (NAM, 2003). A equação da reação é:



O ciclo catalítico do citocromo P450 pode ser observado na Figura 7.

Figura 7: Possível rota de reações catalisada pela P450.



Fonte: Adaptado de Nam (2003).

A seguir são descritos os processos ilustrados na Figura 7, de acordo com o descrito por Nam (2003). No estado de repouso, livre de substrato, o citocromo P450 contém um estado férrico de baixa rotação com seis coordenadas (1), com água como ligante distal deslocável. A ligação do substrato (R-H) ao estado de repouso gera um estado férrico de alta rotação e cinco coordenadas, (2), que agora possui um local de coordenação vago para a ligação do dióxigênio (O_2). A conversão do heme férrico de baixo spin para o heme férrico de alto spin altera o potencial redox, facilitando assim a redução do heme férrico, para gerar um heme ferroso de alto spin e cinco coordenadas (3) ao heme ferroso para formar o heme ferroso-dióxido de oxigênio ($\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$) ou ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2$), (4) Adição do segundo elétron a (4), presumidamente a etapa de limitação da taxa em o ciclo catalítico, produz uma espécie de ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^{2-}$), (5), que é protonada para dar um complexo férrico-hidropeóxido (6). (6) resulta em clivagem heterolítica da ligação OO para liberar uma molécula de água e gerar uma espécie de valência Fe^{IV} (7).

A etapa final do ciclo de reação P450 é a transferência de um átomo de oxigênio de (7) para o substrato, para fornecer o produto álcool seguido pela regeneração do estado de repouso, ligado à água (1). Em uma reação

conhecida como “derivação de peróxido”, doadores de átomos de oxigênio únicos, como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de alquila, perácidos e iodosilbenzenos também podem ser usados para gerar produtos oxigenados ignorando os intermediários (3) - (5) (NAM, 2003).

A biotransformação de xenobióticos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), que correspondem aos produtos da redução incompleta do oxigênio molecular, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Essas ERO são oxidantes extremamente potentes, capazes de reagir com macromoléculas celulares críticas, possivelmente levando à inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos no DNA e, finalmente, a morte celular (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A peroxidação lipídica é o resultado da atuação dos radicais livres sobre as membranas biológicas que são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (BARBOSA *et al.*, 2010). Assim, a geração de ERO, mediada pelo citocromo P450 durante o processo de biotransformação, pode ser considerada uma “reação colateral” indesejada das enzimas de biotransformação de xenobióticos (LACKNER, 1998).

3.8.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS

O perfil básico das enzimas antioxidantes dos insetos é análogo aos mamíferos, porém os insetos não possuem GPx selênio dependente (VALKO *et al.*, 2005).

Por meio da reação de dismutação, a SOD catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) atuam impedindo o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. Por meio de reações de Fenton, o H_2O_2 pode gerar radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) contra os quais não existe defesa enzimática. A Glutathione Peroxidase, Glutathione-S-Transferase (GST) e Glutathione Redutase (GR) são necessárias para remover radicais hidroperóxido lipídico (LOOH \cdot) e a lipoperoxidação (BARBOSA *et al.*, 2010; NABI, 2014).

3.8.3 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD)

A primeira linha de defesa contra a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é a indução da Superóxido Dismutase (SOD) (VALKO *et al.*, 2005). Estão classificadas no grupo das metaloenzimas e considera-se que as SODs desempenham um papel antioxidante essencial; propõe-se que todos os eucariotos tenham uma forma citosólica e mitocondrial de SOD, caracterizados pela presença de íons de cobre e zinco (Cu/ZnSOD) ou manganês (MnSOD), respectivamente (NABI, 2014). Também há evidências para essa localização dupla e a existência de SODs com diferentes íons metálicos que foram relatadas para várias espécies de Lepidópteros (AHMAD *et al.*, 1991; GUNTHER *et al.*, 2002).

Em abelhas *Apis mellifera*, foi descrita a presença de um gene MnSOD mitocondrial, que apresenta 62,33% de similaridade ao gene MnSOD mitocondrial encontrado em humanos, bem como foi detectada a presença de quatro genes que codificam enzimas Cu/ZnSOD (CORONA; ROBINSON, 2006).

A taxa de dismutação de O_2^- catalisada por SOD se aproxima do limite de difusão, tornando-a uma das enzimas mais ativas descritas (VAN DER OOST, *et al.*, 2003, NABI, 2014). A reação que demonstra a conversão do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular, catalisada pela SOD pode ser descrita como (VAN DER OOST, *et al.*, 2003):



Além de participar na proteção enzimática contra os radicais livres, a SOD pode contribuir com a habilidade de abelhas rainhas armazenarem esperma na spermateca por anos, sem que estes percam a viabilidade (COLLINS *et al.*, 2004). Como observado na Figura 6, a geração de espécies reativas de oxigênio pode levar a danos celulares.

Alguns sinais podem ser gerados como resposta ao estresse oxidativo e a danos do DNA, ocasionando mudanças no meio intra e extracelular. Esses sinais desencadeiam uma resposta biológica que envolve alterações conformacionais, multimerização e alteração na localização das proteínas. Todos estes parâmetros são sujeitos à regulação pelas chaperonas (Hsp), que

constituem um mecanismo fundamental de proteção celular (CASTRO *et al.*, 2013).

3.8.4 ATIVIDADE DAS CHAPERONAS

As HSP (Heat Shock Proteins) são uma classe de proteínas altamente conservadas, encontradas em procariontos e eucariotos. São chaperonas moleculares possuindo a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana (MEYER; SILVA, 1999; KARP, 2005).

Elas são agrupadas em famílias, divididas com base nos seus pesos moleculares. Assim, enzimas de peso molecular na faixa de 70kD são enquadradas na família de Hsp70, sendo a mesma divisão para classificá-las em Hsp 27, Hsp47, Hsp 60, Hsp90 e Hsp110 (MEYER; SILVA, 1999).

Inicialmente as Hsp foram identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (RITOSSA, 1962) e são descritas como mecanismo de defesa complexo e altamente conservado, atuando na síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, preservando a sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (GUPTA *et al.*, 2007, CASTRO *et al.*, 2013).

Agentes estressores, como alteração no equilíbrio osmótico, temperatura, estresse oxidativo, e xenobióticos como metais atuam como “caotopos protéicos”, modificando a estrutura das proteínas e conseqüentemente sua função (MEYER; SILVA, 1999). Frente a essas condições adversas, os níveis de Hsp são aumentados, auxiliando, desta forma, a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (MEYER; BUKAU, 2005; CASTRO *et al.*, 2013). As Hsp também atuam identificando e “redobrando” proteínas danificadas ou induzem a um sistema proteolítico adequado, facilitando a eliminação de proteínas cujos danos não são passíveis de restauração (MEYER; BUKAU, 2005; CASTRO *et al.*, 2013).

As Hsp70 interagem diretamente com elementos da via apoptótica, tanto de natureza intrínseca ou extrínseca, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (CASTRO *et al.*, 2013).

O papel das Hsp70 no dobramento de proteínas em sua conformação não nativas pode ser dividido em três atividades relacionadas: prevenção da agregação, promoção do dobramento para o estado nativo e solubilização e redobragem de proteínas agregadas (MEYER; BUKAU, 2005).

As Hsp90 têm um papel significativo agindo seletivamente na ativação e regulação de uma variedade de proteínas envolvidas em vias de sinalização tais como cinases, fatores de transcrição essenciais para reprodução e desenvolvimento, como, por exemplo, receptores de hormônios estrogênicos (XU *et al.*, 2010; EBONG *et al.*, 2011). Hormônios estrogênicos têm um papel essencial na regulação de diversas vias celulares. Uma dessas vias é a síntese de vitelogenina (SIQUEIRA, 2014).

As Hsp90, diferente do observado nas Hsp70, não atuam no dobramento de proteínas nascentes, mas sim no dobramento final de proteínas nativas (YOUNG *et al.*, 2003; MEYER; BUKAU, 2005; SIQUEIRA, 2014).

3.9 MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) é um metal não essencial aos seres vivos e altamente tóxico, sendo reconhecido pela comunidade científica como um poluente global (D'ITRI, 1991). Se apresenta líquido na temperatura ambiente e possui alta volatilidade, representando um perigo à integridade dos ecossistemas devido ao risco de contaminação, pois o mercúrio não apresenta uma fonte de degradação natural capaz de eliminá-lo e apresenta capacidade de bioacumulação e biomagnificação, sendo a sua concentração aumentada à medida que percorre a cadeia alimentar, acumulando-se no nível trófico mais elevado e podendo permanecer no ambiente por um longo período de tempo (AZEVEDO, 2003; LAMBORG *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2009; BERTOLI, 2020).

O Hg comercializado no Brasil é importado ou oriundo da reciclagem. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (BRASIL. MDIC, 2013) apontam que entre janeiro e abril de 2013 foram importados 24.939 kg de Hg metálico, dos quais 18.113 kg foram procedentes dos Estados

Unidos, 5.003 kg do Reino Unido, 960 kg da Alemanha e 863 kg do Japão (CETESB, 2014).

O Hg metálico destina-se a produção de cloro-soda, fabricação de lâmpadas, instrumentos não-eletrônicos e utensílios para uso médico, cirúrgico, odontológico e de laboratórios, amalgamação de ouro e para fins religiosos (IBAMA, 2012). O Hg obtido da descontaminação de lâmpadas pode ser reutilizado para fabricação de novas lâmpadas (AVANT, 2013). Dentre os equipamentos contendo Hg utilizados nos Serviços de Saúde do Brasil, 55% são termômetros, 35% esfignomanômetros e 10% produtos químicos de laboratórios (BRASIL. MMA, 2010). A maior quantidade de mercúrio metálico importada pelo Estado de São Paulo, entre 2002 e 2012, ocorreu em 2003 com 34.171 kg de Hg. De janeiro a fevereiro de 2013 o estado importou 960 kg de Hg (CETESB, 2014).

Segundo dados oficiais do Ministério do Meio Ambiente apresentados no relatório final do Inventário Nacional de emissões e liberações de mercúrio no âmbito da Mineração Artesanal e de Pequena Escala no Brasil (CASTILHOS; DOMINGOS, 2018), das 26 cooperativas de mineração entrevistadas, apenas uma admitiu a compra de mercúrio com nota fiscal de um fornecedor do estado de São Paulo.

O levantamento ainda calcula a quantidade de mercúrio possivelmente perdida para o ambiente durante o processo de garimpo levando em conta dois cenários: com apenas atividades legalizada e atividades legalizadas e atividades ilegais. Com isso, há a estimativa de liberação de 7,5 t de mercúrio para a atmosfera e 11t para solo e águas, totalizando 18,5 t de mercúrio perdidas para o meio ambiente na perspectiva de atividades legalizadas. Quando consideradas atividades legalizadas e ilegais, há a estimativa de 60t de mercúrio liberadas para a atmosfera e 161,5t liberadas para solo e águas, totalizando 221,5t de mercúrio liberadas para o meio ambiente (CASTILHOS; DOMINGOS, 2018).

3.9.1 MERCÚRIO EM PRODUTOS APÍCOLAS

Os metais podem ser liberados no ambiente por fontes naturais ou antrópicas e o aumento da industrialização aumentou o potencial e a ocorrência dos metais como contaminantes ambientais (AGGARWAL, 2018).

As abelhas podem se contaminar com metais pela aderência de partículas suspensas na atmosfera, bem como pela coleta de néctar, pólen e água contaminados (MAGGID *et al.*, 2014; AGGARWAL, 2018). Com isso, os metais podem ser acumulados nas abelhas e em seus produtos como mel, própolis e cera, contaminando a colônia e seu alimento, e a presença de mercúrio já foi detectado em favos e potes de mel de abelhas de várias espécies (CARRERO *et al.*, 2013; MAGGID *et al.*, 2014; TOTH *et al.*, 2016).

Assim, a presença de mercúrio nas abelhas e seus produtos está relacionada a contaminação ambiental, que pode ter origem em diversas fontes como, utilização de pesticidas, atividades de mineração, queima de combustíveis fósseis e a emissão por fábricas (MAGGID *et al.*, 2014; AGGARWAL, 2018). Dessa forma, é muito importante conhecer as fontes de liberação dos contaminantes metálicos no meio ambiente.

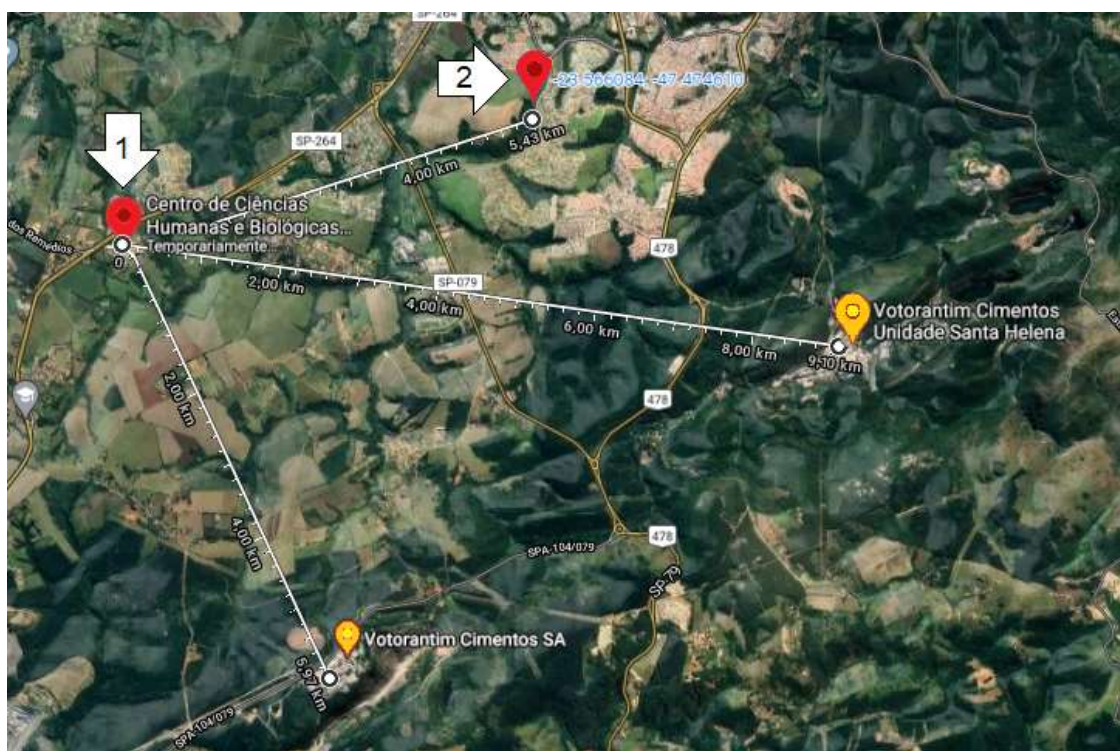
3.9.2 MERCURIO NA CIDADE DE SOROCABA- SP

Castro (2002), analisando a ocorrência de mercúrio no músculo de peixes (traíra, pirambeba, cascudo, lambari, cará, tilápia e bagre) capturados ao longo do Rio Sorocaba, identificou a presença de mercúrio em traíras, em concentrações abaixo de 0,5 mg/kg (limite máximo para ingestão humana em pescados segundo a Anvisa) e não foi detectada a presença de mercúrio nos demais peixes (utilizando um equipamento com limite de detecção de 0,05mg/kg).

Morgano *et al.* (2005), analisaram níveis de mercúrio total em amostras de músculo peixes de água doce, procedentes de pesqueiros e pisciculturas de 39 regiões do estado de São Paulo, num total de 293 amostras. Na região de Sorocaba, foi detectada a presença de mercúrio nos peixes estudados (pacu e traíra) sendo encontrada em Sorocaba a maior contaminação em relação às outras regiões do estado analisadas: 0,217 mg/kg de Hg em uma espécie de tilápia (217ppb).

A Figura 8 apresenta os pontos de coleta de abelhas *Bombus atratus* deste trabalho. Considerando o *Campus* da UFSCar de Sorocaba como o principal ponto de coleta, a partir deste ponto existem duas fábricas de cimento, uma a 9km e outra a 6km. Segundo dados da empresa Votorantim, em 2017 existiam 35 fornos com emissão de mercúrio para o ambiente, com um total de emissão de 553kg/ano, gerando aproximadamente 22mg de Hg para cada tonelada de clínquer (precursor do cimento, resultado da queima da matéria prima) (VOTORANTIM CIMENTOS, 2017).

Figura 8 – Áreas de coletas de *Bombus atratus* (marcações vermelhas) sendo 1- *Campus* da UFSCar de Sorocaba e 2- Área de preservação do bairro Alphaville Votorantim, e os dois locais (marcações amarelas) que apresentam indústria de produção de cimento. As finas linhas laranja do mapa marcam as rodovias.



Fonte: Google Maps, autoria própria (2020).

Como apresentado na seção 3.3, a possibilidade das abelhas coletadas para experimentação estarem visitando os locais onde as fábricas de cimento estão instaladas é remota devido a diversidade e densidade floral do *Campus* UFSCar e da área de preservação do bairro Alphaville Votorantim, porém a emissão de mercúrio pelas referidas fábricas se dá pelo ar, por meio das

chaminés de exaustão das fábricas (VOTORANTIM CIMENTOS, 2017). Esse mercúrio volatilizado pode permanecer na atmosfera e ser transportado por longas distâncias, tanto como mercúrio isolado quanto associado ao material particulado, contaminando os locais em que precipitarem (CETESB, 2014; CASTILHOS; DOMINGOS, 2018), sendo os dois locais de coleta possíveis locais de contaminação pela poluição atmosférica de mercúrio.

Segundo os dados de dezembro de 2018, disponíveis no site da Cetesb, em Sorocaba, 53 áreas são cadastradas como contaminadas ou com risco de contaminação, tendo 20 dessas áreas metais como contaminantes.

O Rio Sorocaba é represado em Votorantim, formando o reservatório de Itupararanga e bem junto ao mesmo existem duas grandes indústrias de cimento e uma grande fábrica de alumínio. Pelas informações da literatura, é de se supor que essas empresas possam ser potenciais emissores de mercúrio para a atmosfera, e que boa parte dele possa se precipitar na superfície do reservatório de Itupararanga e ser transferida para a biota aquática, bioconcentrando-se nos peixes e em aves ribeirinhas, bem como contaminando animais que utilizam dessa fonte para sedentação. A ingestão do mercúrio pode levar a vários graus de exposição (CASTRO, 2002; CETESB, 2014).

3.9.3 TOXICIDADE DO MERCÚRIO E ESTRESSE OXIDATIVO

A toxicidade do mercúrio está relacionada com a forma eletrônica que se apresenta e os compostos aos quais está ligado, determinando o grau de biodisponibilidade, absorção pelas membranas celulares e distribuição e ligação a macromoléculas celulares (BEYERSMANN; HARTWIG 2008, CAROCCI *et al.*, 2013). Devido a sua forma monoatômica sem carga o Hg^0 é altamente difusível e lipossolúvel, atravessando a barreira bilipídica das células (MUTTER *et al.*, 2010, CAROCCI *et al.*, 2013).

Íons mercúricos (Hg^{++}) têm uma grande afinidade para se ligar a átomos de enxofre reduzidos, especialmente aos grupos tiol (R-SH) das moléculas como glutathiona, cisteína e metalotioneína. Assim, os efeitos biológicos do mercúrio inorgânico estão relacionados a sua interação com os grupos sulfidrilas (SH). Um dos efeitos intracelulares do mercúrio é a indução e ligação

às metalotioneínas, pequenas proteínas intracelulares (6 – 7 kDa) contendo vários resíduos de cisteína, com a capacidade de se ligar a vários metais, como o mercúrio inorgânico (VALKO *et al.*, 2005). Puràc *et al.* (2018) identificaram uma metalotioneína em *Apis mellifera*, homóloga em *Bombus terrestris* e *Bombus impatiens* composta de 48 aminoácidos, com 15 resíduos de cisteína.

Em sua forma inorgânica, o mercúrio é absorvido e no meio intracelular o Hg^{++} é gerado a partir da oxidação metabólica do Hg^0 (mercúrio elementar). Este íon mercúrico reage com as moléculas intracelulares como GSH (glutathiona reduzida), tubulinas e canais iônicos. Essa interação inibe a ação destas moléculas, interferindo nas funções regulares das células e, mesmo a baixas concentrações, o Hg^{++} induz ao estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (MUTTER *et al.*, 2010; CAROCCI *et al.*, 2013).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem o anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). As ERO são produzidas pelas células durante seu metabolismo normal, porém, em situações de estresse e por fontes exógenas, como metais, os níveis de ERO podem aumentar muito, gerando um desequilíbrio entre alta produção de compostos oxidantes e insuficiente mecanismos antioxidantes. Assim ocorre o estresse oxidativo, processo que leva à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BOELSTERLI, 2003; BARBOSA *et al.*, 2010).

Diversos estudos sugerem que a exposição de modelos experimentais a formas de mercúrio orgânicas e inorgânicas é acompanhada pela indução de estresse oxidativo. A administração de Hg^{++} resulta em diminuição de glutathiona e aumento na formação de H_2O_2 e peroxidação lipídica (VALKO *et al.*, 2005).

O mecanismo da formação de H_2O_2 pelo $HgCl_2$ ainda não é totalmente entendido, porém devido a sua alta reatividade, pode-se supor que ocorra uma resposta celular com a proliferação de peroxissomas, onde enzimas produzirão H_2O_2 pela redução direta de O_2 . Outra explicação possível é que o Hg^{++} rompa a integridade da membrana mitocondrial, levando a uma alteração na

permeabilidade dos íons, liberando no citoplasma H_2O_2 e O_2 da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (LUND *et al.* 1991; NABI, 2014).

Nesse contexto, pode-se estudar as alterações morfológicas dos trofócitos e enócitos do corpo gorduroso e células pericárdicas do sistema hepato nefrocítico das abelhas frente ao mercúrio administrado na forma inorgânica ($HgCl_2$), bem como utilizar as alterações nas expressões de enzimas e proteínas como ferramenta para o estudo de ecotoxicologia terrestre, utilizando como modelo experimental as abelhas *Bombus atratus* (NOGUEIRA *et al.*, 2019 ; BALSAMO *et al.*, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA

Operárias de *Bombus atratus* (Franklin, 1913) foram coletadas nos fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado na área que compreende o Campus de Sorocaba da UFSCar (23°34'53.1"S 47°31'29.5"W) Sorocaba (SP) e em área de preservação localizado no bairro de Alphaville, Votorantim (SP) (23°33'57.9"S 47°28'28.6"W) nos meses de fevereiro a março, nos anos de 2017, 2018 e 2019. A captura foi realizada com a utilização de uma rede entomológica e imediatamente transferiu-se as abelhas para tubos Falcon plásticos de 50 mL (um indivíduo por tubo), com a tampa furada para circulação de ar. Para evitar estresse nos espécimes, todos os tubos Falcon foram mantidos em uma caixa térmica abrigada da luz direta.

4.1.2 PARÂMETROS IMPORTANTES NA DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA

Devido ao ciclo da colônia de *Bombus atratus*, as replicatas do experimento foram realizadas nos anos de 2017, 2018 e 2019, totalizando 22 abelhas coletadas por ano, visto que a coleta de muitos indivíduos pode prejudicar o delicado equilíbrio ecológico dos espécimes encontrados no *Campus*.

Durante a coleta, em períodos em que não foram encontrados animais suficientes para o experimento, abelhas foram coletadas em uma área de preservação ambiental da cidade de Votorantim (SP). Cabe ressaltar que

Sorocaba e Votorantim são cidades limítrofes e geograficamente, os pontos de coleta distavam 5 Km entre si.

A utilização de solução de mercúrio à concentração de $110 \mu\text{g.L}^{-1}$ segue o valor médio aproximado encontrado em potes de mel de abelhas nativas do Brasil, Argentina, Venezuela e Austrália (CARRERO *et al.*, 2013).

As abelhas foram coletadas em atividade de forrageamento em árvores de Quaresmeira (*Tibouchina granulosa*) (Melastomataceae) e Acácias (*Acacia sp.*) (Fabaceae) que, segundo Cortopassi-Laurino *et al.* (2002) são os tipos florais mais visitados por *Bombus atratus*, juntamente com árvores da Família Asteraceae.

4.2. DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Após coletadas, as abelhas foram mantidas no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), UFSCar, Campus de Sorocaba, Sorocaba (SP), isoladamente, em caixas especiais para este fim, em estufa B.O.D., a 26°C e umidade relativa de 70%, por 10 minutos, período no qual era realizado o preparo das caixas experimentais.

4.2.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Para realização do experimento, as abelhas foram transferidas para potes plásticos redondos Rioplast® 530 mL, 11 cm x 7 cm, contendo alimento sólido, formado da mistura de partes iguais de mel, pólen e extrato de soja orgânica. As abelhas foram divididas em dois grupos, de 11 indivíduos cada, denominados Controle (CTRL) e Experimental (EXP). Ao grupo Controle foram fornecidos 2 mL de água mineral e, ao grupo Experimental, 2 mL de solução contendo mercúrio na concentração de $110 \mu\text{g.L}^{-1}$ (110ppb Hg) (HgCl_2 – Sigma-Aldrich 99,5% pureza) durante 48h e os ensaios foram realizados em triplicata. Todas as abelhas foram mantidas em frascos individuais, devidamente etiquetados e identificados. As caixas foram vistoriadas diariamente para reposição de água e alimento sólido, bem como para verificação do estado em que as abelhas se encontravam.

4.2.2 DISSECÇÃO DO SHN

Após 48h de exposição, as abelhas foram anestesiadas por resfriamento em geladeira (4°C) e eutanaziadas. Com o auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4HD), os abdomens foram dissecados por meio de uma secção longitudinal na cutícula do lado ventral, e o vaso dorsal, contendo o corpo gorduroso associado foi coletado.

Os órgãos foram colocados individualmente em microtubos cônicos (tipo eppendorf) contendo solução fixadora tamponada (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4), devidamente separados e etiquetados.

4.2.3 TRATAMENTO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

4.2.3.1 PREPARO DO MATERIAL PARA EMBLOCAMENTO EM HISTORESINA

O material foi lavado duas vezes em tampão fosfato 0,1 M por 30 minutos e, em seguida, desidratado conforme a metodologia descrita por Silva-Zacarin *et al.* (2012). Dessa forma, os órgãos foram desidratados em banhos refrigerados à 4°C em soluções alcoólicas de concentrações crescentes de 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 60 minutos cada, sendo a última concentração realizada por duas vezes consecutivas. Por fim, o material processado foi embebido (overnight a 10°C) em historesina líquida Leica® e, posteriormente, emblocado em historesina de inclusão (historesina de embebição acrescida de catalisador – Hardner - na proporção 15mL: 5mL). Após a polimerização e confecção dos blocos de historesina, esses foram submetidos à microtomia (micrótomo Leica® - RM 2255) para a confecção de lâminas histológicas contendo 12 secções de 2µm de espessura. Por fim, as lâminas contendo as secções histológicas foram submetidas a técnicas específicas de coloração. As técnicas de coloração utilizadas são descritas nos itens subsequentes.

4.2.3.2 PREPARO DO MATERIAL PARA EMBLOCAMENTO EM PARAFINA

O material recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente para historesina, porém após os banhos com álcool, o tecido foi imerso em solução de xilol+álcool (1:1) e em dois banhos de xilol por 60 minutos cada. Em

seguida, o órgão passou por três banhos em parafina de 1 hora cada, sendo então colocado em parafina líquida e mantido em temperatura ambiente durante um dia, até sua solidificação e procedeu-se com a microtomia.

4.3 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

4.3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a microtomia, as secções histológicas foram submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfológica. Após secas, as lâminas foram montadas com ERV-Mount, analisadas e fotodocumentadas ao microscópio de luz (Microscópio Leica - DM1000) onde os grupos experimentais puderam ser comparados com o grupo controle por meio do programa Leica Application Suite V3.8 (LASV3.8).

4.3.2 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA

O princípio desta técnica de rotina é diferenciar estruturas celulares basófilas coradas pela hematoxilina e estruturas celulares acidófilas coradas pela eosina. Com essa finalidade, as lâminas contendo as secções histológicas foram hidratadas em água destilada por 12 segundos no micro-ondas e, posteriormente, ficaram imersas em hematoxilina por 40 minutos à temperatura de 56°C na estufa. Em seguida, as lâminas foram imersas em água por 10 minutos e lavadas em água corrente por 20 minutos para a hematoxilina reagir. Na próxima etapa, as lâminas ficaram imersas em eosina por 13 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas em água destilada até a remoção do excesso do corante. Após secas à temperatura ambiente, as lâminas foram seladas com ERV-Mount.

4.3.3 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO ACRIDINE ORANGE - FLUORESCÊNCIA

O material emblocado em parafina foi seccionado (5-7 µm) e colocado sequencialmente nas lâminas, previamente tratadas com polilisina para adesão, sendo armazenadas a 4°C até sua utilização. Os procedimentos seguintes foram: I) As lâminas contendo o material foram colocadas em uma cubeta para serem desparafinizadas (procedimento para remover a parafina) por meio de baterias de banhos de xilol durante 20min.; xilol + álcool (1:1), durante 5min.; álcool 100% durante 10min. II) Em seguida, realizou-se a hidratação das lâminas, numa bateria decrescente de álcool (95%, 70% e

50%), durante 5min. III) Após isso, as lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e lavadas com água destilada (3 banhos) e transferidas para uma cubeta, contendo 250mL de água destilada e 125µL de TRITON, durante 10min. IV) Após, as lâminas foram lavadas com água destilada (3 banhos) e novamente colocadas em uma cubeta, contendo solução tampão citrato (pH:2,5) a 75°C durante 5min. V) Decorrido esse tempo, as lâminas foram novamente colocadas na câmara úmida, coradas com o Acridine Orange (AO) e cobertas com uma lamínula plástica, durante 25min. VI) Em seguida, as lâminas passaram por banhos com água destilada (3 banhos, 1min. cada). Após esses procedimentos as lâminas histológicas passaram por desidratação, numa bateria crescente de acetona (50%, 70% e acetona pura), durante 1min. cada e seladas com Ervmount. Depois armazenadas na geladeira, no escuro e posteriormente observadas, analisadas e fotodocumentadas no microscópio de fluorescência Leica® (DM4000).

4.3.4 PROTOCOLO – IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE ENZIMAS:

O mesmo protocolo foi seguido para marcação de Hsp70, Hsp90, citocromo P450 e Superóxido Dismutase – SOD. Os anticorpos primários, secundários e marcador fluoróforo serão discriminados por técnica, utilizando a sequencia alfabética apresentando P450(a), SOD(b), Hsp70(c) e Hsp90(d).

Para este procedimento, as lâminas foram inicialmente tratadas como descrito na metodologia anterior, com I) desparafinização, II) hidratação e III) imersão em solução de Triton e lavadas com tampão PBS (3 banhos). Após isso, adicionou-se o soro fetal bovino 3% - (30min. em temperatura ambiente), e as laminas forma lavadas com 3 banhos em tampão PBS. Após isso o anticorpo primário para cada técnica: (a) Anti- Cytochrome P450 2E1 (ab28146 - polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, United Kingdom), (b) Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody (ab13498 - polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, United Kingdom), (c) Hsp70 (polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology INC., USA) e (d) Hsp90 (monoclonal antibody, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany); foram colocados e mantidos nas lâminas cobertas com a lamínula de plástico por 2h dentro da câmara úmida fechada em banho-maria (37°C). Decorrido o tempo de incubação, a caixa foi retirada do banho-maria e as lâminas passaram por 3 banhos com tampão PBS. O anticorpo secundário

Goat Anti Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor ® 488) (ab150077) foi utilizado nas técnicas (a) Anti-Cytochrome P450 e (b) Anti-Superoxide Dismutase Mouse e o anticorpo secundário Anti-Goat Igg-FITC, 1/50 foi utilizado nas técnicas (c) Anti-Hsp 70 e (d) Anti-Hsp90 e mantidos nas lâminas por 1h dentro da câmara úmida fechada em banho-maria (37°C) Após esse tempo as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS (3 banhos). Após esses procedimentos as lâminas histológicas passam por desidratação, numa bateria crescente de acetona (50%, 70% e acetona pura), durante 1min. cada e foram seladas com Evmount e armazenadas na geladeira, no escuro e posteriormente observadas, analisadas e fotodocumentadas no microscópio de fluorescência Leica® (DM4000).

4.3.5 ANÁLISES DE FLUORESCÊNCIA E ESTATÍSTICAS

Para medição da intensidade de fluorescência as fotomicrografias obtidas foram processadas no programa ImageJ, marcando 11 pontos de cada imagem e processando pela análise de histograma de intensidade de fluorescência. Os valores obtidos foram compilados em tabelas de Excel e os dados foram transcritos e analisados estatisticamente por meio do programa GraphPad Prism5, utilizando-se One-Way ANOVA com test post-hoc de Tukey.

5. RESULTADOS

A partir do resultado da comparação das análises morfológicas, histoquímicas e de imunofluorescência, foi possível comparar os efeitos do mercúrio sobre as células que compõem o sistema hepatonefrocítico do grupo controle em relação ao grupo exposto em indivíduos de *Bombus atratus*.

Os resultados obtidos foram compilados em dois artigos separados apresentados nesta seção. O Artigo 1 intitulado "*In situ localization of Hsp70 and Hsp90 and general morphological characteristics of hepato-nephrocytic cells of Bombus atratus workers (Apidae, Bombini) after mercury exposure at 110 ppb*" foi submetido à revista "*Environmental Pollution*" no ano de 2019, porém foi retornada com solicitação de algumas alterações. Assim, a forma apresentada aqui apresenta as correções de 3 revisores.

O artigo 2, intitulado “*Marcação de P450 e Superóxido Dismutase em células do corpo gorduroso de operárias de *Bombus atratus* expostas à concentração residual de mercúrio*” está em formatação próxima à sua versão final e será submetido após correções necessárias.

Na seção “6. Discussão” os resultados apresentados nos dois artigos são reunidos, confrontados e discutidos.

5.1 ARTIGO 1

In situ localization of Hsp70 and Hsp90 and general morphological characteristics of hepato-nephrocytic cells of *Bombus atratus* workers (Apidae, Bombini) after mercury exposure at 110 ppb

ABSTRACT

We analyzed the effect of mercury on the hepato-nephrocytic system (HNS) of *Bombus atratus* worker bees at average concentration similar to those found in honey pots of neotropical bees (110 ppb). The bees were divided into control and experimental groups. A solid mixture of honey, pollen and organic soy was offered to both, *ad libitum*. The control group received distilled water and the exposed group received a 110 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (110 ppb) mercury solution. After 48 h of exposure, the bees were cryo-anesthetized, and the dorsal vessel dissected directly in 4% paraformaldehyde. The material was prepared for routine morphological analysis (HE), fluorescent histochemical staining (Acridine Orange and F-actin + DAPI, 4' 6-diamidino-2-phenylindole), and for *in situ* immunohistochemical labelling (Hsp70 and Hsp90). The results showed that both the trophocytes and oenocytes of bees exposed to mercury exhibited chromatin damages. Trophocytes deactivation of the nucleus-cytoplasm exchange had occurred in *B. atratus* exposed to mercury as a result of branched contour loss of the nuclei. The pericardial cells were comprised predominantly of stage IV cells with pyknotic nuclei. Although the fluorescence intensity of both Hsp70 and Hsp90 was reduced in the exposed group compared to the control group, the proteins were present, indicating a possible relation with misfolded proteins. In conclusion, 110 ppb mercury severely damaged the HNS of *B. atratus* worker bees, a concentration that can be found in the honey pots of *B. atratus*.

Keywords: *Bombus atratus*, mercury, Hsp70, Hsp90.

1. INTRODUCTION

The hepato-nephrocytic system (HNS) of bees is formed with the combination of the fat body outer layer that surround an inner layer of pericardial cells. Both tissues form a concentric shelter around the entire dorsal vessel. Hemocytes are isolated cells dispersed among both tissues (Abdalla; Domingues, 2015). During the systole and diastole of the heart, the hemolymph enters dorsal vessel through small openings. Due to valve systems of the vessel, the hemolymph is taken in a one-way direction from the distal portion of the abdomen to the posterior portion into the head, where the vessel opens (Cruz-Landim, 2009). Therefore, before the hemolymph enters the dorsal vessel, it must pass through these three systems in a sequential way (Abdalla; Domingues, 2015). During this process, toxicants may be taken up by pericardial cells, metabolized by the trophocytes and/or modified by oenocytes by enzymes of the cytochrome P450 NADPH reductase family (Roma *et al.*, 2010; Martins; Ramalho-Ortigão, 2012; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013). This process results in the solubilization of several metabolites to be excreted by the Malpighian tubules, minimizing damage to the bee brain and other internal organs. Therefore, the HNS is considered a novel and precise biomarker of risk assessment of bees. Further they do not present behavior that shows signs of intoxication nor does mortality significantly rise immediately after contact with toxicants (Abdalla; Domingues, 2015; Domingues *et al.*, 2017; Skaldina; Sorvari, 2017; Abdalla *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2019). In addition to the invaluable pollination services of the bees, the HNS of these insects make them useful as bioindicators, providing precise information regarding environmental disturbances via analysis of the cells comprising the HNS through several methods of analysis (Celli; Maccadnani, 2003; Abdalla; Domingues, 2015; Domingues *et al.*, 2017; Skaldina; Sorvari, 2017; Abdalla *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2019).

Regarding the genus *Bombus*, sudden population declines, and the loss of the populations of several species have been recorded worldwide (Gallai *et al.*, 2009; Grixti *et al.*, 2009; Carswell, 2015; Goulson *et al.*, 2015; Woodcock *et al.*, 2016; Rhoades *et al.*, 2016; Martins; Melo, 2010; USA-Fish and Wildlife Service, 2016). Agrochemicals have been considered the main cause of the

accelerated decline of bees (Goulson *et al.*, 2015; Dicks *et al.*, 2016), however the declining bee population is also related to other factors (Carswell, 2015; Goulson *et al.*, 2015; Potts *et al.*, 2016), such as the presence of non-essential, toxic trace metals in combs and honey pots in bee colonies (Duruibe *et al.*, 2007; Roman, 2010; Sims *et al.*, 2013; Carrero *et al.*, 2013).

According to Carrero *et al.* (2013), average mercury (Hg) levels in the honey of the six stingless bee species studied was 103.43 ppb. The lowest levels were observed in *Austroplebeia symei* (Rayment, 1932) and highest in Brazilian *Melipona manaosensis* Schwarz, 1932 with Hg reaching 12.96 and 145.21 ppb, respectively. Therefore, we selected an average concentration for testing of 110 ppb, which we determined to be a Hg concentration that could be found the honey pots of bees in the field.

Non-essential trace metals, such as mercury (Hg) have been found in the nectar, resin, pollen and nests of both *Apis* spp. and stingless bees (Roman, 2010; Carrero *et al.*, 2013). These trace metals have potent toxic effects on bees, and even in trace quantities they can negatively impact entire populations (Rice *et al.*, 2014). Trace metals and other toxicants accumulate as a result of the collection of contained clay, contaminated plant nectar and pollen, and contaminated water (Roman, 2010; Sims *et al.*, 2013; Johnson, 2015; Potts *et al.*, 2016). Concentrations of trace metals have been increasing in the environment (Duruibe *et al.*, 2007; Sims *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2015) and correspondingly, have become increasingly threatening to bee populations (Roman, 2010; Carrero *et al.*, 2013; Potts *et al.*, 2016). Fossil fuels are one of the most significant causes of environmental contamination by Hg. Contamination of the air leads to subsequent contamination of the soil and water (Castilhos; Domingos, 2018).

Brazil does not produce Hg, since the country does not have great reserves of cinnabar (HgS). Environmental contamination by Hg in Brazil is alarming nonetheless, due to the caustic soda production industry and gold mining, mainly in the Amazon Rain Forest (Malm, 1998). Mercury is used as raw material for products such as thermometers, barometers, sphygmomanometers, fluorescent tubes, electrical and electronic switches, thermostats, pressure switches and agricultural fungicides (Rice *et al.*, 2014,

SINIR-Brazil, 2015). The disposal of mercury-containing materials and the precarious treatment policy for solid waste makes landfills an important source of Hg contamination (SINIR-Brazil, 2015).

Mercury exists in multiple oxidative states, including as an inorganic salt and as a part of organic complexes, with all forms being highly toxic. Elemental mercury can also be converted to an oxidative form by the action of gut bacteria (Moyer, 1999). Oxidative mercury is a cationic element, producing toxic effects by influencing protein precipitation, enzyme inhibition, and producing corrosive effects (Broussard *et al.* 2002; Rice *et al.*, 2014). Mercury not only binds to the sulfhydryl groups (-SH) of cysteine residues, but also to phosphoryl, carboxyl, amide, and amine groups, inhibiting and/or interfering with the enzymatic and DNA functions. These cause general metabolic disturbances, neural and endocrine disruption, mutagenesis, cell death and cyto- and genotoxicity (Broussard *et al.*, 2002; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013; Rice *et al.*, 2014).

Mercury and other metals (arsenic, cadmium and lead) are also components of pesticides (Ballantyne, 2003; Gupta, 2018), enhancing their presence in the environment and harmful effects of such toxicants on entomofauna, especially bees (Al-Alam *et al.*, 2019).

In Brazil, the concentration of trace metals allowed in the water is regulated by the Brazilian Environmental Council (CONAMA, 2005), which considers a concentration of 0.2 ppb Hg to be environmentally safe for all classes of water. Both in the countryside and in urban areas, bees have access to these waters, providing a source of trace metal contamination of bees, possibly contributing to the elevated levels of Hg observed in honeycombs (Carrero *et al.*, 2013).

Heat shock proteins (HSP) are ubiquitous, ATP-dependent, molecular chaperones, which are essential for the maintenance of cellular function and homeostasis in almost all living beings (Silva-Zacarin *et al.*, 2006; Pratt *et al.*, 2011). They are classified according to their molecular weight and the most studied HSP proteins belong to the Hsp70 protein family (Pratt *et al.*, 2011). Hsp70 is constitutively present in both the cytoplasm and nucleus of all eukaryote cells and facilitates protein folding. In eukaryote cells under stress

conditions, expression of Hsp70 increases, which prevents protein misfolding, mitochondrial damage and nuclear fragmentation (Pratt *et al.*, 2011).

In the salivary glands of honeybees under stressful conditions, Hsp70 seems to function as an effective antiapoptotic protein, while the normal function of Hsp70 is related to protein folding (Silva-Zacarin *et al.*, 2006).

Further, Hsp90 also functions to facilitate protein folding and also contributes to various cellular processes, including signal transduction, intracellular transport, and protein degradation (Pratt *et al.*, 2011). Hsp90 has substrate proteins, and consequently, several functions. In general, the Hsp90 family has functions that are related to controlling cell survival, proliferation, and apoptosis (Pratt *et al.*, 2011; Li; Buchner, 2013). In humans, synthetic inhibitors of Hsp90 have shown promising antitumoral activities. Conversely, increased expression of Hsp90 proteins in tumor cells play a crucial role in tumor cell survival (Li; Buchner, 2013). Taken together, these findings indicate that Hsp70 and Hsp90 are effective molecular biomarkers for stress in ecotoxicology.

Morphological, histochemical and immunohistochemical tests examining the hepato-nephrotoxic system of *B. atratus* workers were used to study the effects of average mercury concentration, found by Carrero *et al.* (2013) in the honey of native stingless bees from Brazil, Argentina, Venezuela and Australia, since we have not studies in average concentration of Hg in hives of *Bombus* species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bee collection

B. atratus workers were collected from the remaining fragments of the semi-deciduous forest and Cerrado (23°34'53.1"S, 47°31'29.5"W") of the Federal University of São Carlos at the Sorocaba Campus, in the city of Sorocaba, state of São Paulo, Brazil. All workers were collected from flowers of *Cassia* sp. Linnaeus (1753), between 9 am and 11:30 am. Bees were collected individually with an entomological net and immediately transferred to a 50 mL Falcon tube (one bee per tube). All Falcon tubes containing bees were kept in a thermic box in the dark to avoid stress.

2.2 ECOTOXICOLOGICAL EXPERIMENTAL DESIGN

The workers were kept individually in 10 x 14 x 10 cm plastic boxes. The boxes were equipped with two feeders that were glued to the bottom of each box (close to the box wall); one for food and another for water or aqueous solution containing mercury. Boxes were placed in an incubator (26°C, RH 70%, in the dark). They were fed *ad libitum* with a solid mixture of honey, dehydrated pollen and organic soy flour. The boxes were divided into two groups, the control and experimental groups (n = 11 for each) and the bioassays were conducted in replicate. The control group was offered 2 mL of mineral water while the experimental group was given 2 mL of mercury in water at a concentration of 110 µg.L⁻¹ (110 ppb) mercury chloride. The mercury solution calculation was made using only the molecular weight of mercury and Sigma-Aldrich mercury chloride of ≥ 99.5% purity was used to make stock solutions. After 48 hours of exposure, all bees were euthanized, and the dorsal vessels of bees were dissected. No formal permission or ethical form submission was required in the areas where the bees were collected. Replicates of the bioassays were done throughout the years of 2018 and 2019.

2.3 MORPHOLOGICAL ASSESSMENT, HISTOCHEMISTRY, AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUES

Dorsal vessels were fixed in 4% paraformaldehyde. After fixation, materials were embedded in JB-4 (Polysciences) resin, according to manufacturer's recommendations, and in paraffin (for Acridine Orange, F-actin + DAPI, Hsp70 and Hsp90 immunohistochemistry). Histological sections of 2 µm thickness (resin) and 6 µm thickness (paraffin) were cut with a Leica microtome (RM2255). For fluorescence techniques, a paraffinized histological section of 6 µm thickness was used. The material was stained with hematoxylin and eosin for routine morphological analysis. For histochemical analyses, the material was stained with Acridine Orange (AO) to check for both chromatin condensation and the presence of cytoplasmic RNA. Immunofluorescence for detection of Hsp70 (polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology INC., USA)

and Hsp90 (monoclonal antibody, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were performed using primary antibodies from goat and secondary from mouse (Mouse Anti-Goat IgG-FITC, 1/50). In order to avoid non-specific binding, bovine serum albumin was used before binding by the primary antibody for Hsp70. For F-actin and DAPI staining, we used the F-actin-stain™, 488 phalloidin, after the same material was incubated with 100 nM DAPI in PBS, according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher INC., USA). For morphological analyses, material was stained with hematoxylin and eosin (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) and visualized using a Leica photomicroscope (DM1000). Visualization of Acridine Orange, Hsp70, and Hsp90 was performed using a Leica Fluorescence photomicroscope (DM4000) with B/G/R fluorescence optical system, ultraviolet (BP 465/20), blue (BP 530/30) and green (BP 640/40) excitation bands.

2.3 FLUORESCENCE INTENSITY

For measuring the green fluorescence of pericardial and fat body cells, ImageJ (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) automatic analysis software for RGB histogram intensity determination was used. The green fluorescence intensity of pericardial and fat body cells of individuals from control (n=11) and experimental (n=11) groups were measured. Differences in the average green fluorescence intensities were compared using the Mann-Whitney variance test (GraphPad Prism V5.04 software) for non-parametric data.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 TROPHOCYTES

The trophocytes are directly involved with the intermediary metabolism of bees, i.e., they play an important role in the storage of molecules such as lipids, carbohydrates, proteins, and even iron (Cruz-Landim, 2009; Roma *et al.*, 2010). They also produce vitellogenin precursors, important for ovary development, and the antioxidative protection of the bees (Havukainen *et al.*, 2013; Sun; Zhang, 2015). In the fat body of *B. atratus*, trophocytes were closely associated with oenocytes, despite such cells having different embryologic origins and

functions (Cruz-Landim, 2009). Generally, trophocytes supply substrates and energetic molecules, as glycogen, to other cells, including oenocytes (Keeley, 1985). Iron metabolism is a representative example of the association of trophocyte, oenocytes and pericardial cells. Trophocytes store iron from the hemolymph, while oenocytes synthesize stress-responsive proteins that use iron as cofactor, such as P450 proteins, and pericardial cells can also uptake and recycle iron from hemolymph (Locke; Nichol, 1992).

Bees of the control group had trophocytes that were large cells of heteromorphic shape, containing extensively branched nuclei (Fig. 1A–C). The cytoplasm of these cells had some vacuoles and basophilic granules (Fig. 1A). The chromatin was well preserved, producing a strong green fluorescent signal after acridine orange (AO) staining (Fig. 1B). According to our results, all the morpho-physiological characteristics revealed by HE and AO stains were corroborated by F-actin + DAPI staining (Fig. 1A–C), i.e., the trophocytes of the control group presented a very extensive, branched nuclei, with non-fragmented or otherwise damaged chromatin (Fig. 1C, Fig. 2C).

In bees exposed for 48h to 110 ppb Hg, trophocytes showed signs of cell damage. Cell morphology was predominantly spherical with loss of cell contouring characteristic of healthy cells (Fig. 1D). At the same time, nuclear branching had been eliminated, also having a spherical morphology that lacked the characteristic branched nuclear contouring of healthy cells (Fig. 1D). The chromatin of the trophocytes was presented orange fluorescent by AO (Fig. 1E), meaning serious chromatin damage (condensation and fragmentation) and consequently inactivity of such cells. The loss of the nucleus shape and even chromatin condensation were confirmed by F-actin + DAPI (Fig. 1F). The loss of the nuclear branch contours is a classical morphological indication of cell damage, since the metabolic activity between nucleus and cytoplasm is disrupted by the loss of surface area used to exchange material between the cytoplasm and nucleus.

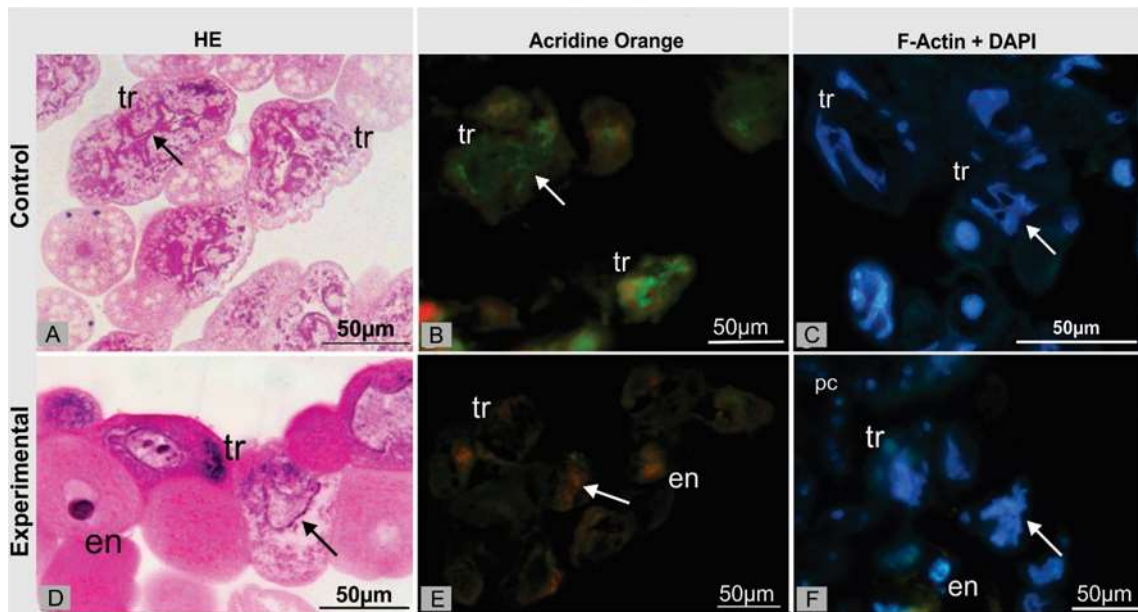


Figure 1. Morphology, histochemistry and immunohistochemistry of the trophocytes of control (A, B, C) and experimental (D, E, F) groups. A) The branched nucleus (arrow) of the trophocyte (tr). B) Green fluorescence of the nucleus (arrow) of the trophocyte (tr). C) Detailed view of trophocytes (tr) showing extensively branched nuclei with decondensed chromatin (arrow). DAPI stain is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green. D) Trophocytes (tr) with spherical cell shape and nuclei (arrow). E) Chromatin fragmentation and condensation within the trophocyte's nuclei (arrow) is shown in orange. F) Loss of branching patterns in trophocytes (tr) and chromatin condensation (arrow). DAPI stain is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green. en = oenocytes, pc = pericardial cells.

3.2 OENOCYTES

In *B. atratus* worker bees, the oenocytes of the control group were spherical with central spheroid nuclei (Fig. 2A). The nuclei of oenocytes showed a strong green fluorescent signal using AO staining (Fig. 2B), demonstrating that the chromatin integrity of the control group was intact. The oenocyte cytoplasm background was orange-red, as expected when using an excitation/emission range between 495 nm and 517 nm (Fig. 2B). F-actin +

DAPI staining revealed that oenocytes had decondensed chromatin (Fig. 2C), corroborating the results of morphological and histochemical tests.

Similar to effects seen in trophocytes, 110 ppb mercury severely impacted oenocytes. In workers exposed to Hg, oenocytes had an altered cell morphology, becoming increasingly ellipsoid and possessing irregular cell contouring (Fig. 2D). The nuclei of oenocytes were pyknotic, with some nuclei vacuolization surrounding very condensed chromatin (Fig. 2D). The chromatin damage was confirmed using AO staining in which the nuclei of the oenocytes staining appeared darker than background (Fig. 2E), since the chromatin compaction is so efficient that very few AO molecules can bind to the DNA. F-actin + DAPI staining revealed that that chromatin of oenocytes was very condensed, with some condensed chromatin situated at the periphery of the nucleus (Fig. 2F). The orange-red, non-specific background cytoplasm staining decreased in exposed groups, in which cytoplasm appeared to fluoresce green (Fig. 2E).

B. atratus worker bees exposed to 110 ppb mercury had both trophocyte and oenocyte cells that were negatively impacted. In bees exposed to environmentally safe concentrations of Hg (0.2 ppb), the collapsing of the HNS cells was more drastic with trophocytes and oenocytes becoming a mass of indistinguishable cells (Nogueira *et al.*, 2019), something that did not happen at Hg levels of 110 ppb. This was not the first time that trace and sublethal concentrations of toxins have been observed to cause more damage to HNS cells than higher concentrations of the same trace metal (Domingues *et al.*, 2017).

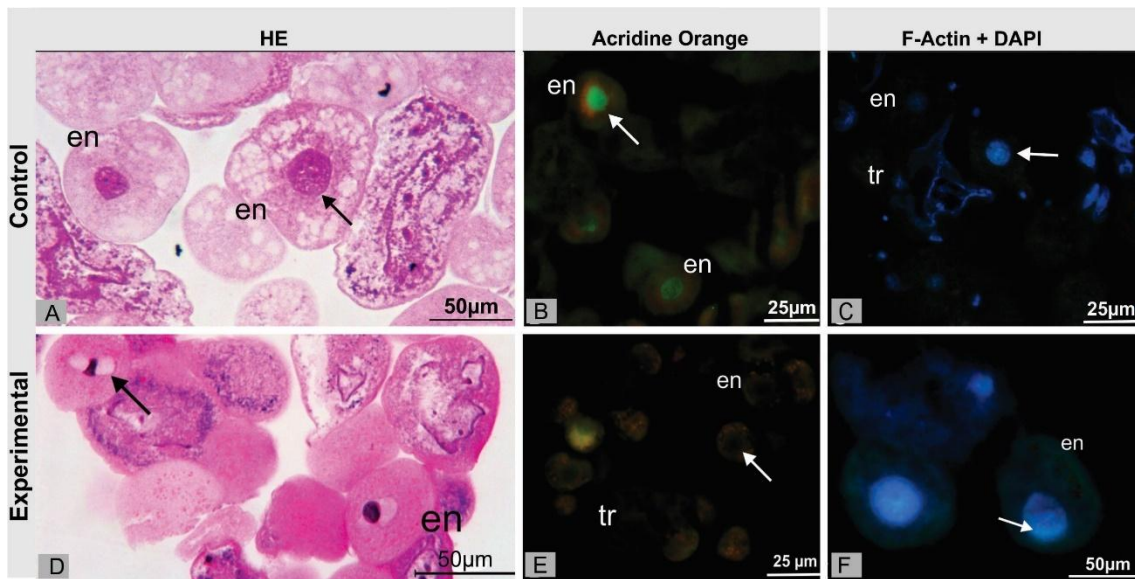


Figure 2. Morphology, histochemistry and immunohistochemistry of oenocytes of the control (A, B, C) and experimental (D, E, F) groups. A) Depiction of a detailed view of oenocytes (en) with a spheroidal shape and a central, spherical nucleus (arrow). B) Depiction of oenocytes (en) with spherical, green-florescent nuclei (arrow). C) Comparison between the nuclei of spherical oenocytes (en) (arrow) and the extensively branched nuclei of a trophocyte (tr). DAPI staining is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green. D) Detailed view of oenocytes (en) with vacuolated nuclei and very condensed chromatin (arrow). E) Detailed view of oenocytes (en) with pale, blurry green nuclei (arrow). F) Detailed view of oenocytes (en) with condensed chromatin (arrow). Notice that the very condensed chromatin appears to be segregated at the periphery of the nucleus (arrow). tr = trophocytes. DAPI staining is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green.

3.3 PERICARDIAL CELLS

In *B. atratus* worker bees, the pericardial cells of the control group were comprised of predominantly stage I cells (Fig. 3A), i.e., non-vacuolated cells with epithelioid arrangement (Mills; King, 1965). When visualized with an AO stain, the nuclei of pericardial cells showed a strong green fluorescent signal (Fig. 3B). Regarding chromatin integrity, the same was observed by staining with F-actin + DAPI (Fig. 3C).

The exposed group revealed that an extreme inversion of pericardial cell stage predominance had occurred in which we observed a clear and remarkable predominance of stage IV cells, i.e., cells were undergoing pinocytosis at maximum capacity (Fig. 3D). A similar phenomenon was observed when *B. morio* was exposed to both 1 ppb cadmium (Abdalla; Domingues, 2015), and 0.2 ppb mercury (Nogueira *et al.*, 2019). Curiously, when cells reach stage IV, their nuclei become pyknotic, showing signs of cellular death (Fig. 3D). AO staining strongly fluoresced orange in the cells of the exposed group (Fig. 3E), confirming that chromatin damage had occurred in pericardial cells in this stage. The DAPI+F-Actin staining provided evidence that the chromatin of pericardial cell nuclei was condensed (Fig. 3F) and a strong fluorescent green halo indicated that actin of the cytoplasm had aggregated around a single large vacuole (Fig. 3F). Up take of the hemolymph into pericardial cells can lead to many internal organ complications, because the hemolymph is the main pathway for the distribution of nutrients and hormones in bees (Cruz-Landim, 2009).

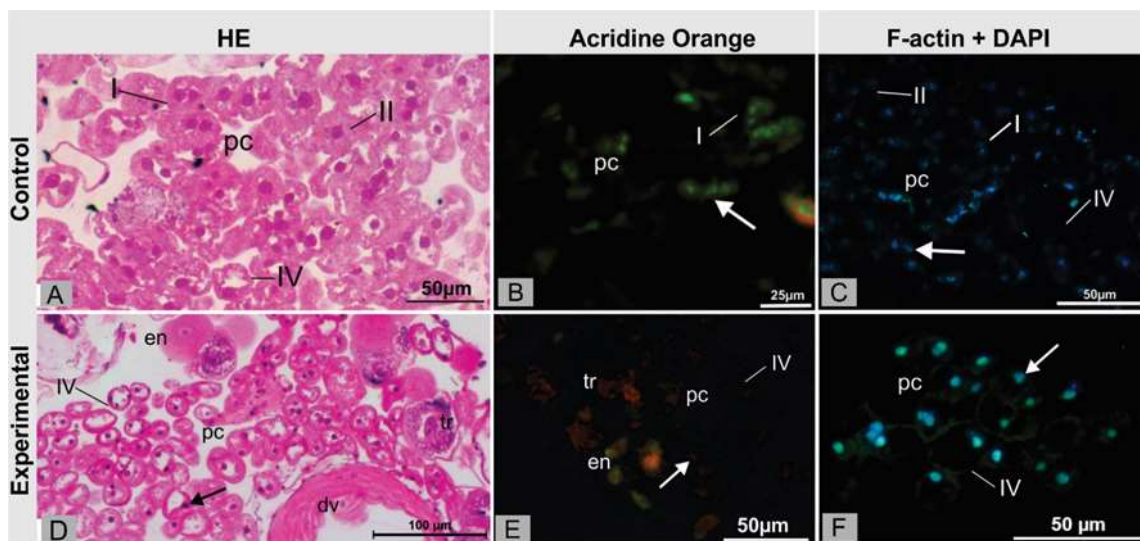


Figure 3. Morphology, histochemistry and immunohistochemical of the pericardial cells in the control (A, B, C) and experimental (D, E, F) groups. A) A detailed view of pericardial cells (pc) in the epithelioid arrangement, stage I (I), which show a spherical morphology and a central nucleus (stage II) and have a large, single vacuole that occupies nearly all of the cell cytoplasm and moves from the nucleus to the periphery of the cell at

stage IV. B) Comparison between stages I (I) and IV (IV) of pericardial cells (pc). Notice the green nuclei of pericardial cells in stage I (arrow). C) Epithelioid arrangement of the pericardial cells (pc) in stage I (I). Notice the nuclei with uncompacted chromatin (arrow). DAPI staining is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green. D) A detailed view of pericardial cells (pc) that shelter the dorsal vessel (dv). Notice that pericardial cells predominantly in stage IV (IV) with pyknotic nuclei (arrow) that fluoresce orange (arrow). E) A detailed view of stage IV (IV) pericardial cells (pc). F) A detailed view of pericardial cells (pc) with a cell cytoplasm with a green halo, indicating that actin aggregation surrounding the vacuole and the peripheral pyknotic nucleus (arrow) has occurred, which is indicative of stage IV (IV) cells. en = oenocyte, tr = trophocyte. DAPI staining is shown in blue, while the F-Actin stain is shown in green.

3.4 HSP70 AND HSP90

In the control group, trophocytes, oenocytes, and pericardial cells had labelled Hsp70 in the cytoplasm (Fig. 4A, Fig. 4C). In trophocyte (Fig. 4B) we did not observe Hsp70 labelling within their nuclei of trophocytes, while in some oenocytes and pericardial cells weak Hsp70 was present both in cytoplasm and nucleus (Figs. 4A, C). The green fluorescent intensities of control trophocytes, oenocytes and pericardial cells were 34.7 (std. dev. = 11.9), 101.2 (std. dev. = 28.5) and 23.9 (std. dev. = 6.6), respectively. As observed in a study by Nogueira *et al.* (2019), oenocytes show a higher level of green fluorescence than trophocytes, followed by pericardial cells. The same results were obtained in this study, indicating that oenocytes could be the primary cells involved in Hsp70-mediated cellular responses.

The intensity green fluorescence of exposed trophocyte, oenocyte and pericardial cells were 27.0 (std. dev. = 8.9), 97.6 (std. dev. = 35.4) and 28.6 (std. dev. = 8.9), respectively. In bees exposed to Hg, HNS cells had a lower level of green fluorescence than the control cells, with the exception of pericardial cells (Fig. 4). These results agree with Nogueira *et al.* (2019), which showed that Hsp70 labelling was reduced in *B. atratus* cells exposed to 0.2 ppb Hg, with the exception of pericardial cells that did not differ significantly between

control and exposed groups ($P < 0.05$). Curiously, using the same 0.2ppb Hg concentration, *B. morio* did show an expansive increase in Hsp70 in all HNS cells (Nogueira *et al.*, 2019).

Despite showing reductions in the activity of Hsp70, the cells of the experimental group were labelled with Hsp70 antibodies, providing evidence that the proteins are in fact present in the nuclei and cytoplasm of oenocytes (Figs. 4C), but absent from trophocyte nuclei (Figs. 4B, D). Regarding the pericardial cells, we can suppose that they are undergoing apoptosis, since they did not lose membrane integrity and had Hsp70 present in both the cytoplasm and nucleus (Fig. 4D). These results suggest that HNS collapses after exposure to 110 ppb mercury, since there was no increase of Hsp70 in the exposed group, and may have had Hsp70 produced before the mercury exposure, i.e., the residual Hsp70 may have been functional even in cells undergoing apoptosis, since HSP70 proteins are very resistant to changing environmental conditions in both fat body and pericardial cells (Fig. 4D).

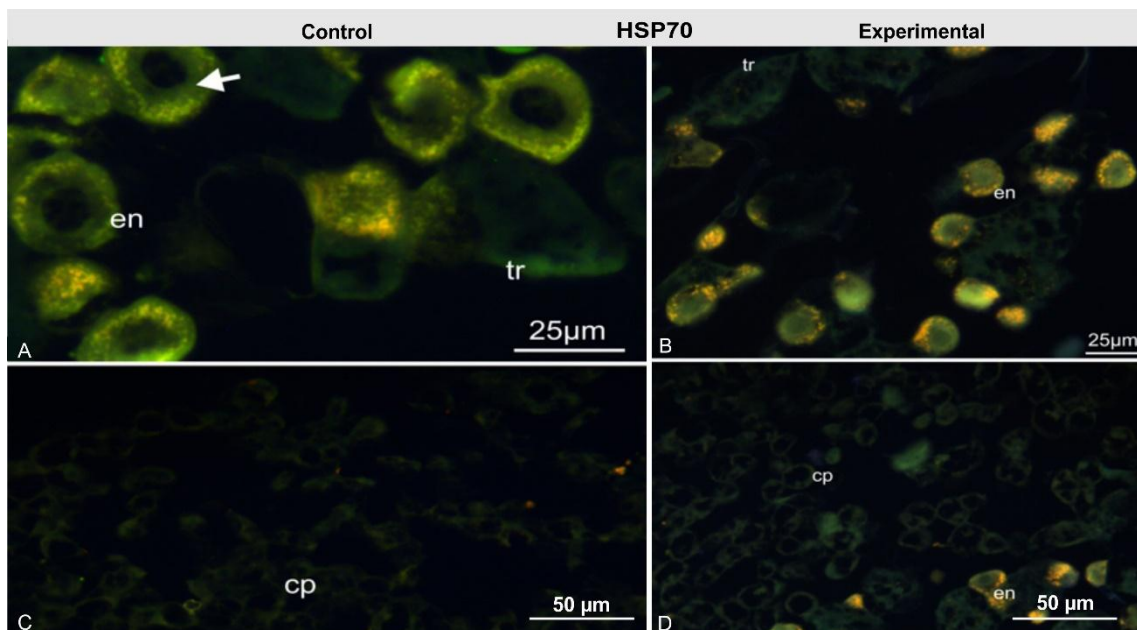


Figure 4. *in situ* localization of Hsp70 in HSN cells in control (A, B) and experimental (C, D) groups. A) Trophocytes (tr) and oenocytes (en) labelled using Hsp70 antibodies. Notice the green fluorescence in trophocytes and oenocytes. Oenocytes (en) show a yellow background indicating non-specific fluorescence, but in the perinuclear region, the Hsp70 signal is very

evident. B) Pericardial cells (cp) show a green fluorescence. C) Trophocytes (tr) and oenocytes (en) labelled for Hsp70 antibodies are shown. Notice the green fluorescence in both trophocytes and oenocytes. Oenocytes (en) have a yellow unspecific background signal, but in the perinuclear region, Hsp70 is very evident. D) Pericardial cells (cp) showing green fluorescence.

The results showed that Hsp90 was also present in trophocytes, oenocytes and pericardial cells of the control group (Fig. 5A, Fig. 5C), showing the same pattern of distribution as Hsp70, but a lower-intensity signal (Fig. 5A, Fig. 5B). The green fluorescence intensities of control trophocytes, oenocytes and pericardial cells were 23.7 (std. dev. = 5.6), 89.7 (std. dev. = 31.8) and 16.4 (std. dev. = 2.8), respectively. Like Hsp70, Hsp90 accumulates to much higher levels in oenocytes than the other cells examined ($P > 0.05$).

The green fluorescence intensities of exposed trophocyte, oenocyte and pericardial cells were, 12.6 (std. dev. = 1.7), 30.3 (std. dev. = 4.2) and 17.3 (std. dev. = 4.4), respectively. Our results showed that after 48h of exposure to 110 ppb Hg, Hsp90 fluorescence produced in the exposed group drastically decreased, in all cell types tested except pericardial (Fig. 5B, Fig. 5D). We suppose that the Hsp proteins labeled in the cytoplasm of exposed cells originate from residual pools of cytoplasm proteins produced before being exposed to mercury, since the nuclear activity of exposed cells were compromised. Both could be involved in cell degradation via proteasome-ubiquitination and other mechanisms used to promote apoptosis (Silva-Zacarin *et al.*, 2006; Pratt *et al.*, 2011; Li; Buchner, 2013). The relationship between Hsp70 and Hsp90 is also poorly understood with respect to bee toxicology, but results here are in accordance with the literature, showing that since Hsp90 establishes a cleft of the Hsp70-dependent proteins involved in the ubiquitin-mediated, proteasomal degradation pathway (Li; Buchner, 2013). We didn't notice Hsp90 labelling in the cell nuclei in either control or exposed groups (Figs. 5A–C).

Labelled Hsp70 in the oenocyte nuclei of exposed bees likely indicates that misfolded proteins are directly evolved in protection against DNA damage at 110 ppb Hg. When exposed to 0.2 ppb mercury, however, there is insufficient

Hsp70 labelling in the nuclei (Nogueira *et al.*, 2019). For this reason, we conclude that the *in situ* localization of Hsp is a very useful biomarker for use in ecotoxicology.

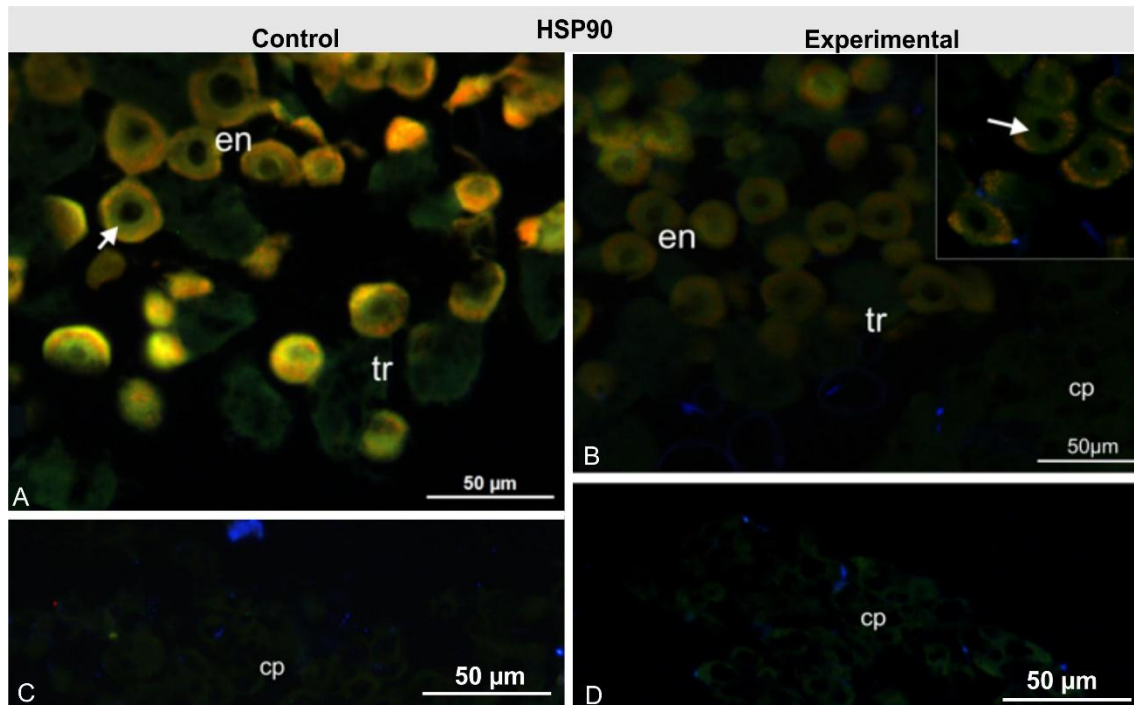


Figure 5. Hsp90 labeling and intensity of green fluorescence in HSN cells of both control and exposed groups of bees. A) Trophocytes (tr) and oenocytes (en) labeled with Hsp90 antibodies. Notice the green fluorescent signal in trophocytes and oenocytes that also contain a yellow, non-specific, background signal. B) Pericardial cells (cp) presenting green fluorescence, indicating the presence of Hsp90. C) Trophocytes (tr) and oenocytes (en) labeled with Hsp90 antibodies. Notice the green fluorescence present in both trophocytes and oenocytes. Oenocytes (en) have a yellow, non-specific, background signal, but in the perinuclear region Hsp90 is very evident (arrow). D) Pericardial cells (cp) with green fluorescent signal indicating the presence of Hsp90.

In early 2019, the Brumadinho dam collapse in Brazil, State of Minas Gerais, contaminated 75 miles (120 kilometers) of the Paraopeba River with heavy metals. This man-made disaster impacted riverside towns, according last bulletin of the Water Management in the affected state of Minas Gerais Brumadinho (IGAM, 2019). According to the IGAM bulletin (*Institute of Water*

Management of Minas Gerais State), the concentration of total lead peaked soon after the disaster. Levels of Hg, which had not been detected historically in the Paraopeba River basin, started accumulating to historically high values shortly after the rupture of the dam as well. The ecotoxicological studies in laboratory conditions are methods that begin to investigate possible impacts on bees in regions near environmental disasters, since we don't have systematic studies monitoring bees, or the general entomofauna, in cases of dam collapses and other environmental disasters, like the illegal gold mining activity in Amazon Rain Forest. Additionally, study of terrestrial ecotoxicology in Brazil is still developing.

Such a collapse of HNS may disrupt the intermediary metabolism, the oxidative protection of the system, ovary development, hemolymph filtration and even cause disruptions in the immune and sensory systems of studied bees. In addition, *Bombus* colonies are small and non-perennial, beginning with a solitary mated queen (Garófalo, 1978). Therefore, these bees very sensitive to the hazardous effects of trace amounts of xenobiotics, such as Hg.

4. CONCLUSION

A concentration of 110 ppb mercury can be found in the row material and food of a colony, contaminating the bee pollen and honey. This concentration reduces the levels of Hsp70 and Hsp90 in the fat body and pericardial cells of the bees, and histopathological analysis indicates that mercury intoxication can collapse the HNS of *Bombus atratus* worker bees.

Acknowledgements: We would like to thank the São Paulo Research Foundation FAPESP (grant 2017/03653-6), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development CNPq (grant 302812/2016-4) and the Coordination Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

5. REFERENCES

Abdalla, F. C., Domingues, C. E. C., 2015. Hepato-Nephrotoxic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental

Biomonitoring. PLoS ONE, 10(7): 1-9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132349>.

Abdalla, F.C., Pedrosa, M., Domingues, C.E.C., Balsamo, P.J., 2018. Effect of Cadmium on Worker Ovary Morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 13: 28-37.
<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2018.28.37>.

Al-Alam, J., Chbani, A., Faljoun, Z., Millet, M., 2019. The use of vegetation, bees, and snails as important tools for the biomonitoring of atmospheric pollution — a review. Environmental Science and Pollution Research, 26(10): 9391-9408. <https://doi:10.1007/s11356-019-04388-8>.

Ballantyne, B., 2003. Toxicology of fungicides. In: Marrs, T.C., Ballantyne, B. (Eds.), Pesticide Toxicology and International Regulation. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <http://dx.doi.org/10.1002/0470091673.ch6>.

Broussard, L. A., Hammett-Stabler, C. A., Winecker, R. E., Roper-Miller, J. D., 2002. The toxicology of mercury. Lab Med, 33(8): 614-625.

Carrero, P., Rondón, C., Saavedra, A. R., Vit-Olivier, P., 2013. A study of Hg and Pb content in pot-honey (Apidae: Meliponini). In: Vit P, Roubik DW, editors. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Mérida: Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. 1-5. Available: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>.

Carswell, C., 2015. Bumblebees being crushed by climate change. Science AAC, <https://doi.org/10.1126/science.aac8824>.

Castilhos, Z. C., Domingos, L. M. 2018. Inventário nacional de emissões e liberações de mercúrio no âmbito da mineração artesanal e de pequena escala no Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 56p

Celli, G., Maccagnani, B., 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. Bull Insectology, 56(1): 137-139. Available: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol56-2003-137-139celli.pdf>. Accessed 27 November 2016.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil)., 2005. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Available: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

Cruz-Landim, C. 2009. Abelhas: morfologia e funções de sistemas. 1. ed. São Paulo: UNESP - Brasil. 416 p.

Dicks, L. V., Viana, B., Bommarco, R., Brosi, B., Arizmendi, M. D. C., Cunningham, S. A., Galetto, L., Hill, R., Lopes, A. V., Pires, C., Taki, H., Potts,

S., 2016. Ten policies for pollinators. *Science*, 354(6315): 975-976. <https://doi.org/10.1126/science.aai9226>.

Domingues, C. E. C., Abdalla, F. C., Balsamo, P. J., Pereira, B.V. R., Hausen, M. A., Costa, M. J., Silva-Zacarin, E. C. M., 2017. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*, 86: 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>.

Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Ekwurugwu, J. N., 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5): 112-118. Available: <http://www.academicjournals.org/IJPS>.

Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., Vaissière, B. E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3): 810-821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.

Garófalo, C.A., 1978. Bionomics of *Bombus* (Fervidobombus) *morio*. II. body size and length of life of worker. *Journal of Apicultural Research*, 17: 130-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099918>.

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957-1-1255957-9. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

Grixti, J. C., Wong, L. T., Cameron, S. A., Favret, C., 2009. Decline of bumblebees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological Conservation*, 142(1): 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.027>.

Gupta, P. K., 2018. Toxicity of Fungicides. *Veterinary Toxicology*, 569–580. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00045-3>.

Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., Amdam, G. V., 2013. Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39): 28369-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>.

IGAM. Instituto Mineiro de Gestão de Águas., 2019. Qualidade da água do Rio Paraopeba - Resumo da qualidade das águas nos locais monitorados ao longo do Rio Paraopeba, após o desastre na barragem 1 no complexo da Mina Córrego Feijão da Mineradora Vale/SA, município de Brumadinho - Minas Gerais, Brasil. Available: http://www.meioambiente.mg.gov.br/images/stories/2019/DESASTRE_BARRAGEM_B1/Boletim_informativo_do_cidad%C3%A3o/Boletim_Igam_Final_B__Boletim_Informativo_ao_Cidad%C3%A3o.pdf

- Johnson, R. M., 2015. Honeybee toxicology. *Annual Review of Entomology*, 60: 415-434. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>.
- Keeley, L. L., 1985. Physiology and Biochemistry of the fat body. In: Kirkut, G. A., Gilbert, L. I., editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. New York: Pergamon Press, 211–248.
- Li, J., Buchner, J., 2013. Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Biomedical Journal*, 36(3): 106-117. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.113230>.
- Locke, M., Nichol, H., 1992. Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annual Review Entomology*, 37: 195-215. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001211>.
- Malm, O., 1998. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 77(2): 73–78. <https://doi.org/10.1006/enrs.1998.3828>.
- Martín, J. A. R., Arana, C. D., Ramos-Miras, J. J., Gil, C., Boluda, R., 2015. Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal. *Environmental Pollution*, 196: 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.014>.
- Martins, A. C., Melo, G. A. R., 2010. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil?. *Journal of Insect Conservation*, 14(2): 207-210. <https://doi.org/10.1007/s10841-009-9237-y>.
- Martins, G. F., Ramalho-Ortigão, J. M., 2012. Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9 (2): 139-152. Available: <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ271.pdf>.
- Mills, R. P., King, R. C., 1965. The pericardial cells of *Drosophila melanogaster*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 106 (3): 261-268.
- Moyer, T. P., 1999. In: Burtis and Ashwood, eds, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed, 992-993.
- Nogueira, F. L. A., Balsamo, P. J., Costa, M. J., Abdalla, F. C., 2019. Exposure to Mercury at trace concentrations leads to collapse of the hepato-nephrotoxic system in two Neotropical species of Bumblebee. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 14: 1-10. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2019.1.10>.
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Ngo, H. T., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., *et al.*, 2016. IPBES: Summary for policymakers of the assessment report of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food

production. In: Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Ngo, H. T., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., Vanbergen, A. J., Aizen, M. A., Cunningham, S. A., Eardley, C., Freitas, B. M., Gallai, N., Kevan, P. G., Kovacs-Hostyanszki, A., Kwapong, P. K., Li, J., Li, X., Martins, D. J., Nates-Parra, G., Pettis, J. S., Rader, R., Viana, B. F., editors. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Germany: Bonn, 1-36.

Pratt, W. B., Morishima, Y., Peng, H. M., Yoichi, O., 2011. Proposal role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 235(3): 278–289. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009250>.

Rhoades, P. R., Koch, J. B., Waits, L. P., Strange, J. P., Eigenbrode, S. D., 2016. Evidence for *Bombus occidentalis* (Hymenoptera: Apidae) Populations in the Olympic Peninsula, the Palouse Prairie, and Forests of Northern Idaho. *Journal of Insect Science*, 16(1): 20. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev155>.

Rice, K. M., Walker, E. M., Wu, M., Gillette, C., Blough, E. R., 2014. Environmental mercury and its toxic effects. *Journal of preventive medicine and public health = Yebang Uihakhoe chi*, 47(2): 74–83. <https://doi.org/10.3961/jpmp.2014.47.2.74>.

Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I., 2010. Morphophysiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron*, 41(5): 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>.

Roman, A., 2010. Levels of Copper, Selenium, Lead, and Cadmium in Forager Bees. *Polish J of Environ Stud.*; 19(3): 663-669.

Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3): 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.

Silva-Zacarin, E. C. M., Gregorc, A., Silva-de-Moraes, R. L. M., 2006. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. *Apidologie*, 37: 507–516. <https://doi.org/10.1051/apido:2006030>.

Sims, D. B., Hooda, P. S., Gillmore, G. K., 2013. Mining activities and associated environmental impacts in arid climates: A Literature Review. *Environmental Pollution*, 2(4): 22-43. <https://doi.org/10.5539/ep.v2n4p22>.

SINIR. Sistema Nacional de Informações sobre a gestão dos Resíduos Sólidos., 2015. Brasil. Available: <http://www.sinir.gov.br/web/guest/acordo>

setorial-de-lampadas-fluorescentes-de-vapor-de-sodio-e-mercurio-e-de-luz-mista. Accessed 04 February 2015.

Skaldina, O., Sorvari, J., 2017. Biomarkers of ecotoxicological effects in social insects. In: Kesari, K. (Ed.) *Perspectives in Environmental Toxicology*. Springer International Publishing, Switzerland, 203-214. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46248-6>.

Sun, C., Zhang, S., 2015. Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients*, 7(10): 8818-29. <https://doi.org/10.3390/nu7105432>.

USA - Fish and Wildlife Service., 2016. Endangered and Threatened Wildlife and Plants; Endangered Species Status for Rusty Patched Bumble Bee. Federal Register, 81 (184). Available: <https://www.fws.gov/midwest/Endangered/insects/rpbb/pdf/FRProposedListingRule22Sept2016.pdf>

Woodcock, B. A., Isaac, N. J. B., Bullock, J. M., Roy, D. B., Garthwaite, D. G., Crowe, A., Pywell, R. F. P., 2016. Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications*, 7(12459): 1-8. Available: <http://www.nature.com/articles/ncomms12459>. Accessed 27 September 2018.

5.2 ARTIGO 2

Marcação de P450 e Superóxido Dismutase em células do corpo gorduroso de operárias de *Bombus atratus* (Apidae, Bombini) expostas à concentração residual de mercúrio

RESUMO

O papel dos contaminantes ambientais de natureza metálica nas recentes perdas de abelhas é controverso, pois os estudos de campo geralmente não conseguem detectar os efeitos previstos por estudos de laboratório. A exposição a mercúrio (Hg) inorgânico apresenta um alto potencial indutor de estresse oxidativo, sendo a monooxidase P450 uma enzima atuante na Fase I do processo de desintoxicação. Este processo pode gerar radicais livres e frente a espécies reativas de oxigênio (ERO) induzido por cloreto de mercúrio, a ação da superóxido dismutase (SOD) fornece a primeira linha de defesa contra ERO. Assim foi analisado o efeito do mercúrio no Sistema Hepatonefrocítico (SHN) de abelhas operárias de *Bombus atratus* em concentração média semelhante à encontrada em potes de mel de abelhas nativas (110 ppb). As abelhas foram divididas em grupos controle e experimental. Uma mistura sólida de mel, pólen e extrato de soja orgânica foi oferecida a ambos. O grupo controle recebeu água destilada e o grupo exposto recebeu uma solução de mercúrio de $110 \mu\text{g.L}^{-1}$ (110 ppb). Após 48 h de exposição, as abelhas foram anestesiadas por criogenia e o SHN foi dissecado e fixado em paraformaldeído a 4%. O material foi preparado para marcação por imunofluorescência do citocromo P450 e SOD. Os resultados mostraram que tanto os trofócitos quanto os enócitos das abelhas expostas ao mercúrio responderam com aumento na marcação dessas enzimas, indicando uma efetiva ação de desintoxicação e proteção contra o estresse oxidativo. Os resultados colaboram para o estabelecimento das células do Sistema Hepatonefrocítico para avaliação de biomarcadores em nível celular para compreender o processo de desintoxicação das abelhas e podem servir como ferramenta para acompanhamento da saúde das abelhas encontradas naturalmente em campo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, *Bombus atratus*, metal.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas do gênero *Bombus* Latreille (1802) são grandes e pilosas (Goulson, 2015) e popularmente conhecidas como mamangavas. Apresentam coloração diferenciada no tórax e abdômen variáveis de acordo com a espécie e subespécie (Rasmont *et al.*, 2008). O gênero é composto por abelhas sociais com distribuição geográfica geralmente em regiões com clima temperado. Ocorrem em todos os continentes à exceção da Oceania e Antártida (Michener, 2007). No Brasil há registro de mamangavas em 23 estados e são ausentes no Piauí, Sergipe e Tocantins, sendo observada a ocorrência de seis espécies, dentre elas a *Bombus atratus* (Moure; Mello, 2008).

Semelhantemente ao que vem ocorrendo com a espécie *A. mellifera*, vários relatos de declínio súbito e mesmo desaparecimento de populações inteiras de várias espécies do gênero *Bombus* são anualmente registrados por pesquisadores, principalmente nos Continentes Europeu e Americano (Biesmeijer *et al.*, 2006; Martins; Melo, 2010; Cameron *et al.*, 2011).

A análise morfológica e histoquímica dos impactos do metal traço, como o mercúrio, podem fornecer subsídio para entender o fenômeno do desaparecimento e diminuição das populações do gênero *Bombus* no Brasil e em outras localidades onde muitas das espécies deste gênero estão ameaçadas.

Contudo, há poucos estudos na literatura envolvendo abelhas nativas e neotropicais que ocorrem no Brasil e, quase todos esses estudos, não abordam os órgãos internos destas abelhas como bioindicadores de efeito do estresse ambiental frente à ação de xenobióticos, como os metais traço (Abdalla; Domingues, 2015). Portanto, é neste contexto que a problemática do estudo se insere: verificar o efeito do mercúrio sobre a morfologia de órgãos internos específicos da espécie *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini), principalmente no que concerne ao corpo gorduroso. O conjunto deste tecido associado a células pericárdicas e ao vaso dorsal é denominado por Abdalla e Domingues (2015) como Sistema Hepatonefrocítico, um sistema sensível e responsivo ao estresse induzido por xenobióticos e, portanto, uma região ideal para avaliação de biomarcadores em nível celular, como as enzimas de

desintoxicação, para análise do impacto do estresse ambiental sobre o organismo das abelhas.

Quando expostas a xenobióticos, as abelhas possuem três mecanismos distintos para desenvolver resistência ao composto: mecanismos comportamentais como percepção e alteração do comportamento para evitar a fonte de exposição; mecanismos fisiológicos como aumento da excreção e mecanismos bioquímicos como aumento da taxa de desintoxicação. As enzimas de desintoxicação são as esterases e monooxidasas que catalizam o xenobiótico tornando-o mais hidrossolúvel, e o metabolismo secundário segue com reações de conjugação incluindo as ações da Glutathione S-Transferase (GST) e Superóxido Dismutase (SOD) (Zarevúcka, 2013).

Durante os processos de desintoxicação podem ser geradas espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO incluem espécies químicas como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^-) (Boelsterli, 2003). As ERO são formadas como um subproduto natural de metabolismo normal do oxigênio e têm papéis importantes na sinalização celular. No entanto, durante períodos de estresse ambiental, os níveis de EROs podem aumentar drasticamente, e assim resultar em danos significativos às estruturas celulares, gerando uma situação conhecida como estresse oxidativo (Nabi, 2014).

As ERO também são geradas por fontes exógenas, como metais e radiações ionizantes, embora sejam produzidas em nível basal pela cadeia respiratória mitocondrial e nos processos de oxidação mediada pelo citocromo P450 (Boelsterli, 2003), as células possuem antioxidantes endógenos (por exemplo, citocromo oxidase, superóxido dismutases, catalases, peroxidases e glutathione), como um meio de controlar essas substâncias (NABI, 2014).

As ERO podem danificar moléculas celulares vitais, como DNA, proteínas, lipídios e o excesso de sua produção pode ser letal para a célula (Nabi, 2014).

Nos insetos, o citocromo P450 está envolvido em processos de biossíntese e metabolismo de substâncias endógenas, incluindo feromônios, hidrocarbonetos e hormônios cuticulares e desintoxicação de substâncias

exógenas, incluindo fitoquímicos e inseticidas (Feyereisen, 2012). Em função dessa variedade é difícil caracterizar a função de enzimas P450 específicas uma vez que os animais podem entrar em contato com uma diversidade grande de substâncias, que serão metabolizados por relativamente poucas P450 (Mao *et al.*, 2015).

Como a forma orgânica do mercúrio (Metilmercúrio – [CH₃Hg]⁺) apresenta alta toxicidade, muitos trabalhos foram desenvolvidos para entender sua toxicologia e toxicocinética em diversos modelos experimentais, e assim, ensaios ecotoxicológicos utilizando formas inorgânicas de mercúrio (HgCl₂, Hg₂Cl₂) são escassos (Zhang *et al.*, 2016). Quando comparados os efeitos das formas inorgânicas de mercúrio, constata-se que a forma mercúrica (HgCl₂; Hg⁺⁺) produz mais efeitos negativos quando comparada à forma mercuriosa (Hg₂Cl₂; Hg₂⁺) uma vez que a forma mercúrica induz maior geração de H₂O₂ (Stacey; Kappus 1982; Lund *et al.* 1991, Valko *et al.*, 2005).

O mercúrio pode reagir com sulfidrilas (-SH) comumente presente em proteínas. Durante esta interação, pode ocorrer estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. A Superóxido Dismutase (SOD) é uma enzima de defesa contra as ERO. A SOD cataliza a dismutação do radical superóxido produzindo H₂O₂ (Nikolic *et al.*, 2015; Won *et al.*, 2016). A expressão de SOD aumenta durante a vida das abelhas, servindo como uma excelente proteção contra o estresse oxidativo, gerado pela presença de metais como o mercúrio (Corona *et al.*, 2005; Nikolic *et al.*, 2015).

O genoma de *Bombus atratus* e *Bombus impatiens* contem 44 genes de citocromo P450 monooxigenase funcionais, similares ao complemento de 46 genes de P450 do genoma de *Apis mellifera*, sendo 27 genes de CYP3, 4 genes de CYP4, 7 genes de CYP2 e 6 genes de P450 mitocondriais (Saad *et al.*, 2015). Os genes CYP4 são associados à sínteses e quebras funcionais das moléculas de feromônios, os quais acredita-se serem produzidos nos enócitos. Também estão envolvidos na rota metabólica da ecdisona, precursor do principal hormônio para muda em insetos; os genes que codificam P450 mitocondriais também estão envolvidos com funções fisiológicas essenciais e apresentam-se super expressados em linhagens de insetos resistentes a inseticidas (Feyereisen, 2011; Calla *et al.*, 2017).

Os genes CYP3 estão envolvidos com metabolismo de xenobióticos e resistência a inseticidas e os genes CYP2 estão envolvidos com funções fisiológicas essenciais, como o metabolismo hormonal e o desenvolvimento geral. (Feyereisen, 2011; Calla *et al.*, 2017) sendo dessa família de genes os anticorpos utilizados nesta pesquisa (Anti-Cytochrome P450 CYP 2E1, 451 policlonal, abcam, ab28146), por serem reativas a condições patofisiológicas, podendo estar envolvidos na aceleração da resposta apoptótica das células frente ao estresse metabólico.

Assim, foram utilizadas técnicas de imunofluorescência para marcação de P450 e Superóxido Dismutase nos enócitos e trofócitos do corpo gorduroso de operárias de *Bombus atratus* (Apidae, Bombini) expostas à concentração residual de mercúrio ($110 \mu\text{g.L}^{-1}$).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de abelhas

As operárias de *B. atratus* (Swederus, 1787) foram coletadas dos fragmentos remanescentes da floresta semidecídua e do Cerrado ($23^{\circ}34'53.1''\text{S}$, $47^{\circ}31'29.5''\text{W}$) no *Campus* Universidade Federal de São Carlos, na cidade de Sorocaba, estado de São Paulo, Brasil. As abelhas foram coletadas no período da manhã, com o auxílio de rede entomológica e imediatamente transferidas individualmente para tubos Falcon plásticos de 50 mL, com a tampa perfurada para ventilação. Os tubos foram mantidos no escuro, em caixa térmica para evitar estresse e levadas para o Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), UFSCar, *Campus* de Sorocaba, Sorocaba (SP) para realização dos experimentos.

2.2 Procedimento experimental ecotoxicológico

As operárias foram mantidas individualmente em recipientes plásticos (Rioplast® 530 mL, 11cm x 7cm) forrados com papel-filtro (11cm). Foram inseridos dois alimentadores colados ao fundo de cada caixa, sendo um para alimentação sólida (Extrato de soja orgânico, pólen desidratado, mel na razão 1:1:1) para garantir o aporte de aminoácidos e proteínas, e outro alimentador para soluções de água mineral ou água contaminada. Os recipientes contendo

as abelhas foram mantidos em estufa incubadora do tipo B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $70\pm 10\%$ de umidade.

As caixas foram divididas em dois grupos, os grupos controle e experimental ($n = 11$ para cada) e os bioensaios foram realizados em replicata. Ao grupo controle foi administrado 2 mL de água mineral e ao grupo experimental foi ofertado 2 mL de uma solução de mercúrio na concentração de $110 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (HgCl_2 - Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99,5\%$). A exposição foi realizada por 48h, sendo administrado duas vezes nesse período os 2mL de solução contaminada ou água (ofertada em 0h e 24h).

Após 48h do início do experimento as abelhas foram crio-eutanaziadas (4°C , por 5 minutos) e submetidas a dissecação. Os abdomens foram dissecados para remoção dos órgãos internos por meio de uma secção longitudinal na cutícula do lado ventral, com o auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4HD). Desta forma foi possível a remoção do vaso dorsal e do corpo gorduroso.

Os órgãos foram colocados individualmente em microtubos cônicos (tipo eppendorf) contendo solução fixadora tamponada (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4), devidamente separados e etiquetados.

2.3 Preparo do material para emblocamento em Parafina

O material foi lavado duas vezes em tampão fosfato 0,1 M por 30 minutos e, em seguida, desidratado conforme a metodologia descrita por Silva-Zacarin *et al.* (2012). Dessa forma, os órgãos foram desidratados em banhos refrigerados à 4°C de soluções alcoólicas de concentrações crescentes de 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 60 minutos cada, sendo a última concentração realizada por duas vezes consecutivas. Posteriormente, o tecido foi imerso em solução de xilol+álcool (1:1) e em dois banhos de xilol por 60 minutos cada. Após esse período, as amostras foram submetidas a três banhos em parafina, 1 hora cada para remoção do xilol. Em seguida as amostras foram colocadas em cassetes contendo parafina líquida, sobre chapa de aquecimento e incluídos na parafina. Após isso, a chapa foi desligada e os materiais foram deixados por um dia, até sua completa solidificação. Com isso procedeu-se com a realização dos cortes histológicos

em micrótomo Leica (RM2255). As seções histológicas foram realizadas com 6 µm de espessura e os cortes foram colocados sobre laminas, previamente banhadas em polilisina. As lâminas foram armazenadas em geladeira até o momento de realizar a coloração.

2.4 Técnicas de imunofluorescência

As lâminas contendo o material foram desparafinizadas em baterias de banhos de: xilol durante 20min.; xilol + álcool (1:1) por 5min. e álcool 100% durante 10min. Assim, procedeu-se com a re-hidratação das lâminas, numa bateria decrescente de álcool (95%, 70% e 50%), durante 5min. Após isso, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (3 banhos) e transferidas para uma cubeta, contendo 250mL de água destilada e 125µL de TRITON, durante 10min. Após isso, as lâminas foram colocadas em câmara úmida e lavadas novamente com 3 banhos de tampão PBS. Após a retirada do PBS, adicionou-se albumina de soro bovino 3% durante 30min. em temperatura ambiente, e cobriu-se as lâminas com uma lamínula plástica. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas com tampão PBS (3 banhos). Após isso cobriram-se as lâminas com 100µL do anticorpo primário para cada técnica: Anti- Cytochrome P450 2E1 antibody (ab28146) e Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody (ab13498), colocando as lamínulas de plástico e mantidas por 2h dentro da câmara úmida fechada, em banho-maria (37°C). Decorrido o tempo de incubação, a caixa foi retirada do banho-maria e as lâminas passam lavadas com 3 banhos de tampão PBS. O anticorpo secundário Goat Anti Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor ® 488) (ab150077) foi administrado e as lâminas permaneceram por 1h dentro da câmara úmida fechada em banho-maria (37°C). Após esse tempo as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS (3 banhos). Após esses procedimentos as lâminas histológicas passaram por desidratação, numa bateria crescente de acetona (50%, 70% e acetona pura), durante 1 minuto cada e seladas com Erymount e observadas, analisadas e fotodocumentadas no fotomicroscópio de fluorescência Leica® (DM4000) com sistema óptico de fluorescência B / G / R, ultravioleta (BP 465/20), azul (BP 530/30) e verde (BP 640 / 40) bandas de excitação

2.5 Medição da intensidade de fluorescência

Para medição da intensidade de fluorescência as fotomicrografias obtidas foram processadas no programa ImageJ, marcando 11 pontos de cada imagem e processando pela análise de histograma de intensidade de verde. Os valores obtidos foram analisados estatisticamente por meio do programa GraphPad Prism5, utilizando-se One-Way ANOVA com test post-hoc de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as células do corpo gorduroso dos animais expostos a doses de $110 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Hg tiveram alteradas as expressões enzimáticas de SOD e P450. Quanto a análise de intensidade de fluorescência, observou-se que para o grupo controle, a superóxido dismutase (SOD) e P450 são mais expressas (apresentam maior intensidade de fluorescência) nos enócitos do que nos trofócitos e quando expostos ao mercúrio na concentração de 110ppb aumentam a expressão das enzimas.

Os aumentos nas expressões enzimáticas podem ser observados na Figura 1 apresentando as micrografias para a expressão do grupo exposto de P450 (Fig 1B) e SOD (Fig 1D), podendo-se notar a maior incidência de marcação fluorescente comparado ao grupo controle (Fig 1A, 1C).

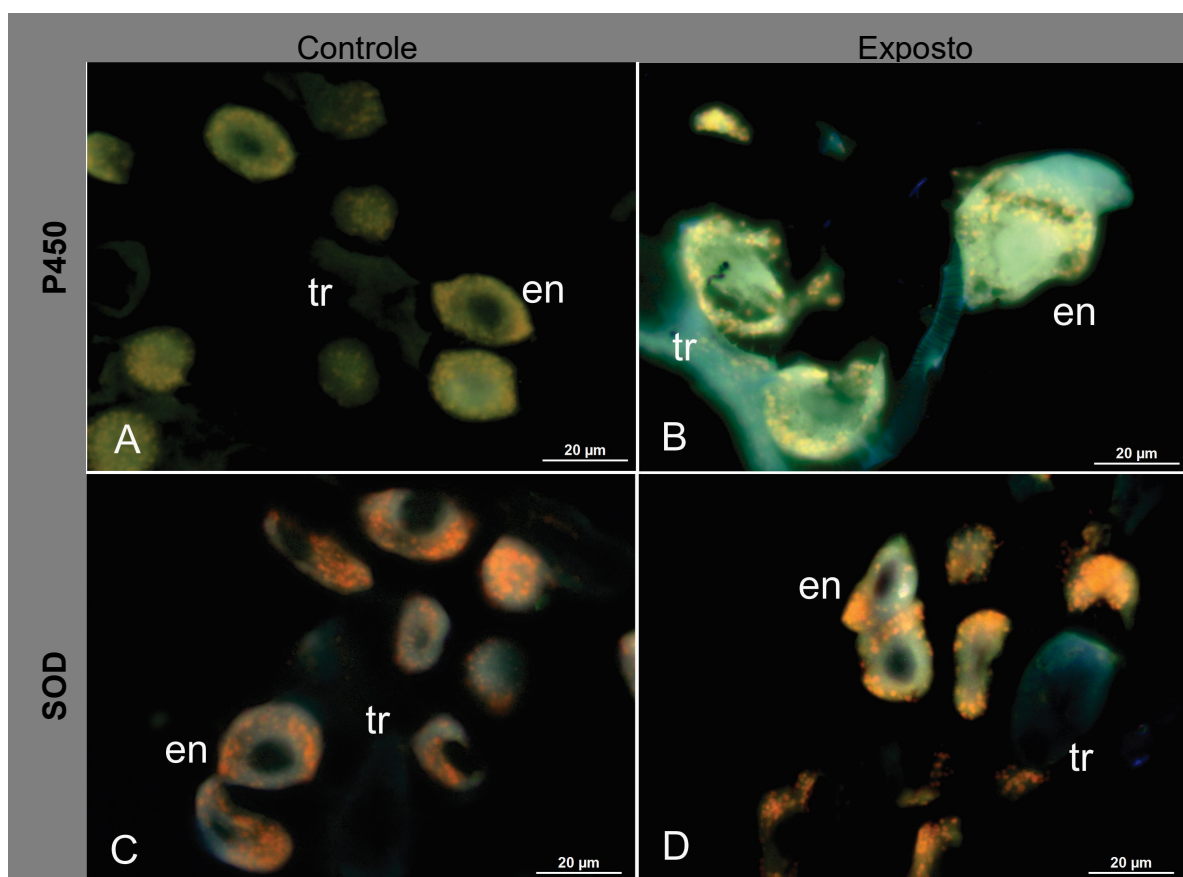


Figura 1 –Microscopia de fluorescência em enócitos (en) e trofócitos (tr) do sistema hepato nefrocítico de *Bombus atratus*. A e C apresentam o grupo controle; B e D representam o grupo exposto a 110ppb de Hg, onde A e B apresentam marcação para expressão de P450 e C e D para expressão de SOD

Como apresentado na Figura 2 A, o aumento na marcação de P450 nos enócitos do grupo exposto a 110 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Hg foi significativo quando comparado ao grupo controle. Os trofócitos do grupo exposto não apresentam uma elevação significativa na marcação da enzima quando comparado ao grupo controle. Os animais experimentais que receberam a dose de 110 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Hg também apresentaram uma elevação na marcação de SOD ($p < 0,05$), tanto nos enócitos como nos trofócitos do grupo exposto em comparação ao grupo controle, sendo essa expressão significativamente maior nos trofócitos (Fig 2B).

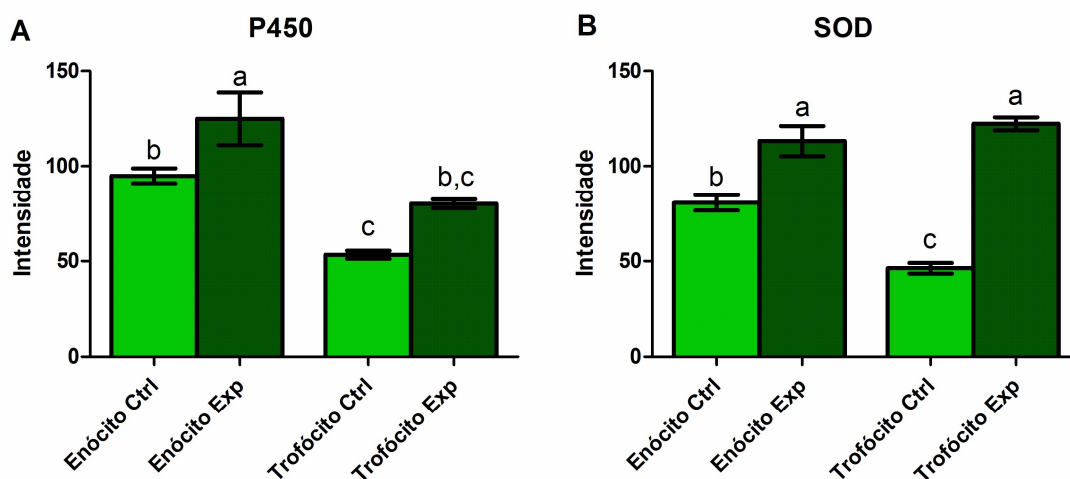


Figura 2 – Histograma da expressão de enzimas P450 (A) e SOD (B) em células do corpo gorduroso de *Bombus atratus* dos grupos controle (Ctrl) e exposto a 110ppb de Hg (Exp). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as colunas ($p < 0,05$) enquanto que letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os grupos.

Poucos trabalhos estudam a interferência de metais na expressão do citocromo P450 monooxidase em insetos. Poupardin *et al.* (2008) identificaram que a exposição de larvas de *Aedes aegypti* a doses subletais de cobre induziu a expressão de 11 genes diferentes que codificam enzimas P450 e também utilizando doses subletais de cobre, Bernabò *et al.* (2017) detectaram o

aumento da expressão de enzimas P450 monooxidase em larvas do mosquito *Chironomus riparus*. O estudo do cobre em insetos se deu devido a presença desse metal em inseticidas.

Korashy *et al.* (2005) identificaram que o Hg_2^+ induz a expressão de um gene da família P450 (CYP1A1) em células de hepatocarcinoma murino após 3 horas de exposição, e a expressão se manteve elevada por pelo menos 24 horas, além de ter gerado espécies reativas de oxigênio (ERO). Independente do modelo utilizado, os artigos levantados afirmam que a interação entre os metais e as enzimas da família P450 dos insetos, apesar de evidente, ainda não é completamente entendida.

Tollefsen *et al.* (2017) também relataram o aumento da expressão de dois genes codificadores de citocromo P450 (CYP24a1 e CYP 12b1) no invertebrado marinho copépoda *Calanus finmarchicus*. Amara *et al.* (2013) utilizaram o cloreto de mercúrio em coração de ratos C57B e detectaram aumento na expressão de 14 genes que codificam enzimas P450, (Cyp1a1, Cyp1b1, Cyp2b9, Cyp2b10, Cyp2b19, Cyp2c29, Cyp2c38, Cyp4a10, Cyp4a12, Cyp4a14, Cyp4f13, Cyp4f15, Cyp4f16 e Cyp4f18).

Zhang *et al.* (2013) utilizando alfafa (*Medicago sativa*) engenheiradas geneticamente para expressarem a CYP2e1 e GST, demonstraram que a expressão dessas enzimas aumentaram a resistência das plantas à contaminação por mercúrio e tricloroetileno. Assim utilizando o marcador de CYP2e1, os achados estão de acordo com o esperado e observado em diversos trabalhos, utilizando como modelos experimentais mamíferos e invertebrados e até mesmo plantas transgênicas.

Nikolic *et al.* (2015) estudaram a expressão e atividade de SOD e catalase em *Apis mellifera* na Sérvia e detectaram não só uma maior expressão de SOD em abelhas de áreas urbanas e industriais, comparadas à áreas rurais como uma maior reatividade da SOD, que podem ocorrer devido à maior exposição destas abelhas a poluição ambiental (com a presença de metais Pb e Zn), gerando maior quantidade de radical superóxido.

O mesmo foi observado por Gizaw *et al.* (2020) em áreas urbanas da Coreia do Sul, em comparação a áreas agrícolas e de montanha. Há uma

maior expressão de SOD por *Apis mellifera* de áreas urbanas, sendo neste estudo avaliado também a quantidade de mercúrio encontrado no mel (3,249mg Hg/kg) e nas abelhas (0,489 mg Hg/kg) de *Apis mellifera* de áreas urbanas. Os autores ainda citam que a presença de estradas e atividades industriais e de mineração, além das atividades de queima de combustível influenciam a contaminação ambiental por metais (Nikolic *et al.*, 2015; Gizaw *et al.*, 2020). Assim, é importante salientar que o local de coleta das abelhas para este experimento apresenta em seu entorno uma rodovia, bem como duas plantas industriais de produção de cimento, atividade conhecida por liberar Hg durante sua produção (Gworek *et al.*, 2017).

Gizaw *et al.* (2020) também indicaram a alta expressão de enzimas P450 nas abelhas das áreas urbanas em comparação às áreas agrícolas, chegando a expressar até três vezes mais genes de P450 do que as abelhas dos outros grupos, indicando que isto pode ocorrer devido a respostas destes organismos a xenobióticos gerados pela atividade industrial da área de coleta.

Uma comparação interessante com o trabalho de Gizaw *et al.* (2020), é que a P450 em abelhas pode ser induzida pela exposição a pesticidas (DE SMET *et al.*, 2017). Assim é esperado que abelhas de áreas com atividades agrícolas impactadas por pesticidas apresentem uma maior expressão de P450, o que não foi observado, levando a inferir que os metais presentes na poluição ambiental de áreas urbanas se mostram como agentes extressores mais impactantes na expressão de enzimas de desintoxicação.

A expressão de P450 nas células do corpo gorduroso foi aumentada e mais evidente nos enócitos, uma resposta coerente já que essas células estão relacionadas a produção de enzimas de desintoxicação (Locke; Nichol, 1992; Lycett *et al.*, 2006).

Esses dados levantados durante a pesquisa apontam que a avaliação da marcação de P450 e SOD no corpo gorduroso pode ser uma ferramenta útil de avaliação do estresse oxidativo, além disso, a análise pode ser mais explorada para a exposição a xenobióticos inorgânicos, uma vez que a literatura aponta principalmente para a ação desta enzima sobre moléculas orgânicas, sendo escassos os trabalhos que estudam a expressão de P450 em abelhas expostas a metais.

4. CONCLUSÃO

Os trofócitos e os enócitos do corpo gorduroso de *Bombus atratus* responderam à intoxicação por mercúrio com o aumento da expressão de P450 e SOD, visualizado pela marcação por imunofluorescência destas enzimas, indicando que o corpo gorduroso de *Bombus atratus* responde a contaminação por metais elevando a expressão de enzimas relacionadas com processos de desintoxicação e de proteção antioxidante.

5. REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C., DOMINGUES, C. E. C., 2015. Hepato-Nephrotoxic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. **PLoS ONE**, 10(7): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132349>.

AMARA, I. E. A., ANWAR-MOHAMED, A., ABDELHAMID, G., & EL-KADI, A. O. S. Mercury modulates the cytochrome P450 1a1, 1a2 and 1b1 in C57BL/6J mice: in vivo and in vitro studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 266(3), 419–429. 2013. doi:10.1016/j.taap.2012.11.027

BERNABÒ, P., GAGLIO, M., BELLAMOLI, F., VIERO, G., & LENCIONI, V. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, 173, 235–244. 2017 doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.052

BIESMEIJER, J.C., ROBERTS, S.P.M., REEMER, M., OHLEMÜLLER, R., EDWARDS, M., PEETERS, T., SCHAFFERS, A.P., POTTS, S.G., KLEUKERS, R., THOMAS, C.D., SETTELE, J. & KUNIN, W.E.. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Journal of Insect Conservation** 313:351-354. 2006

BOELSTERLI UA (2003) The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. In: Mechanistic toxicology, 2nd edn. Taylor and Francis, London/ New York, p 314

CALLA, B., NOBLE, K., JOHNSON, R. M., WALDEN, K. K. O., SCHULER, M. A., ROBERTSON, H. M., & BERENBAUM, M. R. Cytochrome P450

diversification and hostplant utilization patterns in specialist and generalist moths: Birth, death and adaptation. **Molecular Ecology**, 26(21), 6021–6035. 2017 doi:10.1111/mec.14348

CAMERON, S.A., LOZIER, J.D., STRANGE, J.P., KOCH, J.B., CORDES, N., SOLTER, L.F. & GRISWOLD, T.L.. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108:662-667. 2011

CORONA M, HUGHES KA, WEAVER DB, ROBINSON GE. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. **Mech Ageing Dev** 126(11):1230–1238. 2005.

FEYEREISEN, R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, 236–316. 2012. doi:10.1016/b978-0-12-384747-8.10008-x

FEYEREISEN, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1814(1), 19–28. 2011. doi:10.1016/j.bbapap.2010.06.012

GIZAW, G., KIM, Y., MOON, K., CHOI, J. B., KIM, Y. H., & PARK, J. K. Effect of environmental heavy metals on the expression of detoxification-related genes in honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**. 2020 doi:10.1007/s13592-020-00751-8

GOULSON D, NICHOLLS E, BOTÍAS C, ROTHERAY EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science** 347(6229):1255957-1-1255957-9. 2015
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1255957>

GWOREK B, DMUCHOWSKI W, BACZEWSKA AH, BRĄGOSZEWSKA P, BEMOWSKA-KAŁABUN O, WRZOSEK-JAKUBOWSKA J. Air Contamination by Mercury, Emissions and Transformations—a Review. **Water Air Soil Pollut.** 228(4):123. 2017. doi:10.1007/S11270-017-3311-Y

KORASHY, H. M., & EL-KADI, A. O. S. Regulatory Mechanisms Modulating the Expression of Cytochrome P450 1A1 Gene by Heavy Metals. **Toxicological Sciences**, 88(1), 39–51. 2005. doi:10.1093/toxsci/kfi282

LOCKE, M. NICHOL, H. Iron economy in insects: transport, metabolism and storage. **Ann. Ver. Entomol.** 37: 195-215. 1992.

LUND, B.O., MILER DM, WOODS JS Mercuryinduced H₂O₂ formation and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem Pharmacol** 42:181–187. 1991

LYCETT GJ, MCLAUGHLIN LA, RANSON H, HEMINGWAY J, KAFATOS FC, LOUKERIS TG, et al. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. **Insect Mol. Biol.** 15: 321-327, 2006.

LYCETT GJ, MCLAUGHLIN LA, RANSON H, HEMINGWAY J, KAFATOS FC, LOUKERIS TG, et al. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. **Insect Mol. Biol.** 15: 321-327, 2006.

MAO, W., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. **Insect Molecular Biology**, 24(5), 582–588 2015. doi:10.1111/imb.12183

MARTINS, A.C.; MELO, G.A.R.. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **Journal of Insect Conservation** 14:207-210. 2010

MICHENER, C. D. The Bees of the World. 2nd. ed. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, 913 p, 2007.

MOURE, J. S.; MELO, G. A. R. Bombini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. ., 2008 Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.

NABI, S. Toxic Effects of Mercury. Springer India. 2014. 265p.

NIKOLIĆ, T. V., PURAĆ, J., ORČIĆ, S., KOJIĆ, D., VUJANOVIĆ, D., STANIMIROVIĆ, Z., ... BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental effects on Superoxide Dismutase and Catalase activity and expression in honey bee.

Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 90(4), 181–194.
2015. doi:10.1002/arch.21253

POUPARDIN, R., REYNAUD, S., STRODE, C., RANSON, H., VONTAS, J., & DAVID, J.-P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38(5), 540–551. 2008doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.004

RASMONT, P., COPPÉE, A., MICHEZ, D., DE MEULEMEESTER, T., An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). **Ann. soc. entomol. Fr.** (n.s.). Vol. 44, N° 1 2008, pp. 243-250. 2008

SADD, B.M., BARRIBEAU, S.M., BLOCH, G. *et al.* The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. **Genome Biol** 16, 76 2015. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0623-3>

SILVA-ZACARIN, E. C. M. ; CHAUZAT, M. P. ; ZEGGANE, S. ; DRAJNUDEL, P. ; SCHURR, F. ; FAUCON, J. P. ; MALASPINA, O. ; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 696-703.

STACEY, N.H., KAPPUS, H. Cellular Toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 63, 29-35. 1982

VALKO, M., MORRIS, H., & CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, 12(10), 1161–1208. 2005 doi:10.2174/0929867053764635

WON EJ, RA K, KIM KT, LEE JS, LEE YM. Three novel superoxide dismutase genes identified in the marine polychaete *Perinereis nuntia* and their differential responses to single and combined metal exposures. **Ecotoxicol Environ Saf** 107:36–45. 2014

ZAREVUCKA, M.. "Insecticide Resistance of Bumblebee Species," Chapters, in: **Rolando Chamy (ed.), Biodegradation - Life of Science, IntechOpen.** 2013

ZHANG, Q.-F., LI, Y.-W., LIU, Z.-H., & CHEN, Q.-L. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. **Aquatic Toxicology**, 181, 76–85. 2016. doi:10.1016/j.aquatox.2016.10.029

ZHANG, Y., LIU, J., ZHOU, Y., GONG, T., WANG, J., & GE, Y. Enhanced phytoremediation of mixed heavy metal (mercury)–organic pollutants (trichloroethylene) with transgenic alfalfa co-expressing glutathione S-transferase and human P450 2E1. **Journal of Hazardous Materials**, 260, 1100–1107. 2013.

6. DISCUSSÃO

Para auxiliar na discussão, os dados sobre os resultados obtidos e apresentados nos artigo 1 e artigo 2 foram compilados na Quadro 1 sendo divididos por técnica de coloração e as células do corpo gorduroso (trofócito e enócito) dos grupos exposto e controle.

Quadro 1: Os resultados obtidos nos artigos 1 e 2 da seção 5 deste trabalho foram aqui compilados.

| Técnica | Trofócito | | Enócito | |
|-----------------|--|--|---|---|
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| H.E | Células alongadas Núcleos ramificados | Células arredondadas Núcleos arredondados | Células esféricas Núcleo esférico Cromatina descondensada | Células elipsóides Núcleos picnóticos com vacuolização Cromatina condensada |
| Acridine Orange | Fluorescente verde | Fluorescente laranja | Fluorescente verde | Fluorescente laranja |
| Hsp 70 | 34,7 ± 5,9 | 27,0 ± 4,4 (↓) | 101,2 ± 14,2 | 97,6 ± 17,7 |
| Hsp 90 | 23,7 ± 2,8 | 12,6 ± 0,85 (↓) | 89,7 ± 15,9 | 30,3 ± 2,1 (↓) |
| SOD | 46,2 ± 2,4 | 122,4 ± 3,5 (↑) | 80,6 ± 4,5 | 113,2 ± 8 (↑) |
| P450 | 53,1 ± 2,6 | 80,1 ± 2,6 (↑) | 94,9 ± 4,7 | 125 ± 13,5 (↑) |

De acordo com os dados compilados na Tabela 1, pode-se inferir que os enócitos apresentam uma maior expressão de Hsp 70 em relação aos trofócitos, em conformidade com os resultados obtidos por Nogueira *et al.* (2019), bem como podemos perceber a maior expressão de P450 pelos enócitos também de acordo com Locke e Nichol (1992). Lycett *et al.* (2006) apresentam que os enócitos do corpo gorduroso são elementos chaves na expressão de P450 para metabolização de xenobióticos e resistência a inseticidas.

Como apresentado por Goasduff e Cederbaum (2000), ao utilizar a depleção da chaperona Hsp90, foi observada a prevenção na degradação do citocromo P450 no citosol de células do fígado. Como observado, há uma diminuição na expressão de Hsp90 pelos enócitos e trofócitos, o que permite entender que o mercúrio pode aumentar a expressão de P450, ao passo que a diminuição da expressão de Hsp90 leva a conservação do citocromo produzido em excesso e não utilizado na metabolização do metal.

Nogueira *et al.* (2019) administraram uma concentração de 0,2 ppb Hg para *Bombus atratus* e *Bombus morio* o que resultou num aumento da expressão de Hsp70 em *B. morio* porém a expressão dessa chaperona foi reduzida em *B. atratus* em comparação ao controle, indicando que organismos do mesmo gênero podem apresentar mecanismos de desintoxicação diferentes. O aumento de expressão de Hsp70 após administração de cloreto de mercúrio foi observado utilizando como modelo experimental *Danio rerio*, truta e rato (ZHANG *et al.*, 2016).

Vários estudos utilizando insetos como modelos experimentais apresentam aumento de Hsp70 frente a agentes estressores. Silva-Zacarin *et al.* (2006) utilizando abelhas *Apis mellifera* detectaram aumento da expressão de Hsp70 frente a pesticidas, assim como Doganlar e Doganlar (2015) expondo *Drosophila melanogaster* à várias combinações de pesticidas. Porém esses trabalhos citados apresentam uma diferença deste. Os animais foram obtidos de criadouros de referência, onde os animais não estão expostos a contaminação ambiental.

Augustyniak *et al.* (2009) avaliaram a expressão de Hsp70 em crias de gafanhotos, sendo as genitoras coletadas em locais com e sem poluição. Os gafanhotos gerados por ovoposição de fêmeas coletadas em locais poluídos apresentaram menores expressões de Hsp70 comparados a gafanhotos de locais de referência (sem poluição). Além disso, quando os ovos eram colocados em areia contaminadas por zinco, os gafanhotos originados de fêmeas de locais sem poluição apresentaram um aumento na expressão de Hsp70 super pronunciado, enquanto os originados por fêmeas de ambientes poluídos o nível de expressão de Hsp70 ou não foi alterado ($100 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$) ou

foi reduzido ($500 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$), inferindo que a expressão dessa chaperona possa estar ligada à algum tipo de “herança maternal”.

Considerando que as abelhas *Bombus atratus* utilizadas neste experimento foram coletadas em campo, é possível inferir que estes animais estavam em contato com os mais diversos tipos de agentes estressores, tanto na coleta de pólen, néctar ou água, bem como o contato com material particulado suspenso no ar, contaminantes de solo e água que as abelhas possam ter entrado em contato.

Assim os resultados de supressão obtidos na análise da intensidade de imunomarcacão de Hsp70 e Hsp90 podem ter sua origem devido a reações que as abelhas já realizavam e metabolismos que poderiam ter como forma de defesas frente a outros xenobióticos.

Como apresentado na Figura 8, o local de coleta das abelhas para este experimento possui em seu entorno uma rodovia de tráfego intenso de veículos, bem como duas plantas industriais de produção de cimento, atividades conhecidas por liberar Hg para o ambiente (CETESB, 2014; CASTILHOS; DOMINGOS, 2018)

O mercúrio emitido pela produção de cimento se apresenta nas formas gasosas elementar (80%), oxidado (15%) e complexado ao material particulado (5%) (GWOREK *et al.*, 2017). A forma elementar por ser pouco hidrossolúvel pode permanecer na atmosfera por até um ano e as formas oxidadas e associadas ao material particulado são facilmente removidas do ar por deposição seca ou úmida, com tempo de residência na atmosfera de algumas horas ou dias (EUROPEAN COMMISSION, 2001; GWOREK *et al.*, 2017).

A cidade de Sorocaba apresenta uma tendência de diminuição da poluição atmosférica, incluindo a emissão de material particulado (CETESB, 2019), porém apresenta episódios de aumento desses poluentes excedendo até 100% do nível considerado como limite pela Organização Mundial da Saúde (MORAES, 2014). Mesmo com uma qualidade do ar considerada boa, alguns estudos relacionam a poluição atmosférica da cidade com maior número de internações por pneumonia (NEGRISOLI; NASCIMENTO, 2013; SOUZA; NASCIMENTO, 2016) e, ainda mais alarmante, segundo dados do Instituto

Saúde e Sustentabilidade (2014) as mortes na cidade por doenças atribuídas à má qualidade do ar no ano de 2011 foi 77% maior que a soma das mortes no trânsito e por homicídios dolosos registradas naquele ano.

Com a possibilidade da deposição de mercúrio pela contaminação atmosférica pelas duas indústrias próximas da região de coleta das abelhas estudadas, propõe-se, como ações futuras, realizar análises para detecção da quantidade de mercúrio presente nas amostras de flores aonde as *Bombus atratus* foram coletadas, bem como realizar a medição da quantidade do metal presente nas próprias abelhas, que servirão tanto para complementação dos dados obtidos neste trabalho como também para colaborar com o registro de áreas contaminadas por metais na cidade de Sorocaba.

Porrini *et al.* (2003), já prediziam que estudos de ecotoxicologia clássica, baseados em mortalidade e sobrevivência não são suficientes para avaliar os efeitos de organismos frente a xenobióticos. No caso das abelhas, vários estudos indicam que doses subletais possuem efeitos deletérios e ainda, que doses subletais mais baixas possuem uma capacidade maior de danificar as células do sistema hepatonefrocítico (DOMINGUES *et al.*, 2017; BALSAMO *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2019; BERTOLI, 2020).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho e os observados por Nikolic *et al.* (2015) e Gizaw *et al.* (2020), podemos inferir que as respostas de organismos de uma mesma espécie podem ser diferentes de acordo com a origem destes organismos e os agentes estressores encontrados no ambiente destes organismos. Isso indica a necessidade de cruzar dois conhecimentos gerados pela pesquisa básica (acadêmica) nas áreas biológicas: os que utilizam modelos experimentais de origem controladas e os que utilizam modelos experimentais coletados em campo.

Analisar o corpo gorduroso como um mecanismo de resposta celular das abelhas se mostra cada vez mais eficaz, a medida que este conjunto de células começou a ser compreendido como parte de um sistema a partir de 2015 (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). Compreender a resposta ao estresse celular nas abelhas frente a intoxicação por contaminantes metálicos é evidentemente importante, pois influencia a resposta do organismo e de toda a colônia frente a

diferentes estressores, podendo indicar sua capacidade de sobrevivência, declínio ou morte.

Entender a resposta do organismo frente a apenas ao xenobiótico e a resposta de organismos frente ao mesmo xenobiótico, mas que estão em contato com uma gama de outros contaminantes ambientais, fornecerá, no caso das abelhas, melhor compreensão para determinar ações que auxiliem a proteção e conservação destes indispensáveis polinizadores.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos através desta pesquisa, pode-se observar os efeitos negativos que o mercúrio, na forma inorgânica de cloreto de mercúrio (HgCl_2) impacta nas células do corpo gorduroso de abelhas *Bombus atratus*.

Como definido em outros trabalhos, os trofócitos e enócitos reagem a xenobióticos estressores, respondendo ao processo de desintoxicação do organismo das abelhas. Através das análises de morfologia, coradas por Hematoxilina e Eosina ficam evidente os danos a essas células quando administrado doses de $110 \mu\text{g.L}^{-1}$ Hg, onde os enócitos apresentam seus núcleos picnóticos e os núcleos dos trofócitos perdem sua forma ramificada.

A condensação da cromatina dos núcleos dos enócitos indicam o processo de morte celular e a perda da forma dos núcleos dos trofócitos indicam perda da função destas células, sendo o processo de morte celular confirmado pela coloração por Acridine Orange.

A imunomarcagem de SOD e P450 foram aumentadas nas duas células e sugerem um aumento da expressão gênica de forma a aumentar a quantidade de enzimas como uma resposta das células ao xenobiótico, de forma a promover a metabolização do mercúrio, como também uma resposta ao estresse oxidativo gerado pelo metal no metabolismo das abelhas.

Estes dados ajudam a entender a atuação das células do corpo gorduroso frente a ação de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, e a intensa participação das células do corpo gorduroso frente ao xenobiótico,

indicado pela resposta na produção de SOD pelos trofócitos que se equipara ao enócito e a expressão de P450 pelos enócitos.

Assim, podemos apresentar as células do Sistema Hepatonefrocítico como um bom biomarcador para avaliar os impactos de metais em abelhas *Bombus atratus*.

Como prospecção de continuação deste trabalho e complementação de dados sugere-se o estudo de identificação dos contaminantes metálicos existentes nas flores e folhas das árvores onde as abelhas para este estudo foram coletadas, bem como uma análise dos metais presentes no corpo das abelhas, utilizando, por exemplo, a metodologia de análise por meio de espectroscopia de emissão óptica com plasma (ICP-OES).

Por fim, além dos objetivos alcançados nesta tese, definidos e apresentados na seção 2, espera-se que este trabalho contribua frente a sociedade com a popularização e circulação do conhecimento produzido nas Universidades, instigado por questões socioambientais, buscando promover a educação ambiental e a conscientização pública da conservação, para que, como sociedade, consigamos estar alinhados e cumprir o que dita o Artigo 225 da Constituição Brasileira: “Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-Nephrocytic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. **PLoS ONE**, 10(7): 1-9. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0132349.

ABDALLA, F. C.; PEDROSA, M.; DOMINGUES, C. E. C.; BALSAMO, P. J. Effect of cadmium on worker ovary morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). **Am. J. Agricultural Biological Sci.**, 13: 28-37. 2018. DOI: 10.3844/ajabssp.2018.28.37

ABRAHAMOVICH, A. H., DÍAZ, N. B.; LUCIA, M. Las especies del género *Bombus* Latreille en Argentina (Hymenoptera: Apidae). Estudio taxonómico y claves para su identificación. **Neotrop. Entomol.** 34 (2): 235-250 [241, 242] 2005.

ADAMCZYK, J. J.; FESMYER, H. W. et al. Sex-specific and hormone controlled expression of a vitellogenin-encoding gene in the gypsy moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, 31(3):237-256. 1996.

ADOLFI, A.; POULTON, B.; ANTHOUSI, A.; MACILWEE, S.; RANSON, H.; LYCETT, G. J. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 116 (51) 25764-25772. 2019. doi:10.1073/pnas.1914633116

AGGARWAL, I. Detection of heavy metals in honey samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. **Young Scientists Journal**. 2018. Disponível em: < <https://ysjournal.com/detection-of-heavy-metals-in-honey-samples-using-inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry/>> Acessado em 10/06/2020

AHMAD S., DUVAL D.L., WEINHOLD L.C., PARDINI R.S. Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity, **Insect Biochem.** 21, 563–572. 1991.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.** 6 (2) 158-170. 2003.

ARRESE E.L., SOULAGES J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.** 55 , 207–225. 2010.

AUGUSTYNIAK, M., TARNAWSKA, M., BABCZYŃSKA, A., & AUGUSTYNIAK, M. Hsp70 level in progeny of aging grasshoppers from variously polluted habitats and additionally exposed to zinc during diapause. **Journal of Insect Physiology**, 55(8), 735–741. 2009. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.04.009

AVANT. Meio ambiente. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.avantsp.com.br/pt/meio-ambiente>> Acessado em 10/06/2020.

- AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. 1. Ed. São Carlos: **RiMa**, 292p. 2003
- BALSAMO P. J.; DOMINGUES, C. E. E.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. GREGORC, A.; IRAZUSTA, S. P.; SALLA, R. F.; COSTA, M. J.; ABDALLA, F. C. Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrotoxic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**. 01-12. 2019. doi: 10.1080/00218839.2019.1686575
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23(4), 629-643. 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- BATELKOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I.; CELECHOVSKÁ, O.; VORLOVÁ, L. BARTÁKOVÁ, K. Polycyclic hydrocarbons and risk elements in honey from the South Moravian region (Czech Republic). **Acta Vet. BRNO**, v. 81, p. 169-174, 2012.
- BENAVIDES, M. A. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bombus morio* (swederus) e *Bombus atratus* Franklin (hymenoptera, apidae). Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em entomologia – Universidade Federal de Viçosa. p. 12-13, 2008.
- BENELLI, S. M. As abelhas eussociais e o parasitismo intraespecífico: uma revisão. Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) Ribeirão Preto – SP. 2013. 33p.
- BERENBAUM, M. R., & JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, 10, 51–58. 2015. doi:10.1016/j.cois.2015.03.005
- BERTOLI, L. C. Padronização e aplicação do ensaio cometa em abelhas da espécie *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI). 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- BEYERSMANN D, HARTWIG A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanism. **Arch Toxicol**. 82:493–512, 2008.

BOELSTERLI, U. A. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. In: **Mechanistic toxicology**, 2nd edn. Taylor and Francis, London/ New York, p 314. 2003.

BOGDANOV, S.; IMDORF, A.; CHARRIERE, J.; FLURI, P. & KILCHENMANN, V. The Contaminants of the bee Colony. **Swiss Bee Research Center**, Bern, Switzerland, pp: 12, 2003.

BPBES. Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. **Rede Brasileira de Interações Planta Polinizador**. 93p. 2019.

BRASIL. MDIC. Consulta. Importação 1996 – 2013. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/index.php/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/base-de-dados-do-comercio-exterior-brasileiro-arquivos-para-download>> Acessado em 10/06/2020.

BRASIL. MMA. Gerenciamento dos resíduos de mercúrio nos serviços de saúde. Brasília: MMA: ANVISA, 2010. 46 p.

CAMERON, S. A.; LOZIER J. D.; STRANGE J. P.; KOCH J. B.; CORDES N.; SOLTER L. F. et al. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)**. 108, 662-667, 2011.

CAROCCI, A., ROVITO, N., SINICROPI, M. S., & GENCHI, G. Mercury Toxicity and Neurodegenerative Effects. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 1–18. 2013. doi:10.1007/978-3-319-03777-6_1

CARRERO, P., RONDÓN, C., SAAVEDRA, A. R., VIT-OLIVIER, P. A study of Hg and Pb content in pot-honey (Apidae: Meliponini). In: Vit P, Roubik DW, editors. **Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Mérida: Facultad de Farmacia y Bioanálisis**, Universidad de Los Andes. 1-5, 2013. Available: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>.

CARSWELL, C. Bumblebees being crushed by climate change. **Science, American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. [s.l.], p.1-2, 2015.

CASTILHOS, Z. C.; DOMINGOS, L. M. Inventário nacional de emissões e liberações de mercúrio no âmbito da mineração artesanal e de pequena escala no Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 2018. 56p.

CASTRO, N. Cádmiu, chumbo, cromo, mercúrio e níquel nos rios do estado de São Paulo e em peixes do Rio Sorocaba (São Paulo, Brasil) Dissertação (Mestrado em Conservação Ambiental) Universidade Estadual Paulista, Centro de Estudos Ambientais, 2002.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque térmico Hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.4, p.261-271, 2013.

CETESB (São Paulo) Qualidade do ar no estado de São Paulo 2018 [recurso eletrônico] / CETESB ; Equipe técnica Clarice Aico Muramoto ... [et al.] ; Mapas Thiago De Russi Colella. - - São Paulo : CETESB, 2019. 210 p.

CETESB. Contaminação por mercúrio no estado de São Paulo. São Paulo. CETESB, 2014. 39 p.

CHAPMAN, R. F. The insect: structure and function. 5th. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 959 p, 2013.

COLLINS A.M., WILLIAMS V., EVANS J.D. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera* . **Insect Mol. Biol.** 13 (2), 141–146. 2004.

CORONA, M., & ROBINSON, G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. **Insect Molecular Biology**, 15(5), 687–701. 2006. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x

CORTOPASSI-LAURINO, M.; KNOLL, F. R. N.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros. In: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma, 2003.

- CRUZ, A.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology** 26:165–176, 2010.
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. 1a ed. São Paulo: Fundação, Editora da UNESP, p.416, 2009.
- D'ITRI, F. M. Mercury contamination - what we learned since Minamata. **Environmental Monitoring and Assessment**, East Lansing, v. 19, 3, p. 165-182.. 1991.
- DEAN, R. L.; LOCKE, M. & COLLINS, J. V. Structure of fat body. In: Kerbut, G. A. & Gilbert, L. I. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford, **Pergamon**. v.3, p.155-210. 1985.
- DOGANLAR, O., & DOGANLAR, Z. B. Effects of a Mixture of Volatile Organic Compounds on Total DNA and Gene Expression of Heat Shock Proteins in *Drosophila melanogaster*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 68(2), 395–404. 2014. doi:10.1007/s00244-014-0089-4
- DOMINGUES, C.E.C.; ABDALLA, F.C.; BALSAMO, P.J.; PEREIRA B.V.R.; HAUSEN M. A. et al. Thiamethoxam and picoxistrobin reduce the survival and overload the Hepato-Nephrotoxic System of the africanized honeybee. **Chemosphere**, 186: 994-1005. 2017. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.133
- EBONG, I.; MORGNER, N.; ZHOU, M.; SARAIVA, M. A.; DATURPALLI, S.; JACKSON, S. E.; ROBINSON, C. V. Heterogeneity and dynamics in the assembly of the Heat Shock Protein 90 chaperone complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 108(44): 17939-17944. 2011.
- EUROPEAN COMMISSION. Ambiente air pollution by Mercury (Hg) Position Paper. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. 218p.
- FEYEREISEN, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1814(1), 19–28. 2011. doi:10.1016/j.bbapap.2010.06.012

FEYEREISEN, R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, 236–316. 2012. doi:10.1016/b978-0-12-384747-8.10008-x

FITZPATRICK, Ú.; MURRAY, T.E.; PAXTON, R.J.; BREEN, J.; COTTON, D.; SANTORUM, V.; BROWN, M.J.F. Rarity and decline in bumblebees – a test of causes and correlates in the Irish fauna, **Biol. Conserv.**136, 185–194, 2007.

FRANCO, M. F. Avaliação de biomarcadores de contaminação em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas aos herbicidas Combine *500SC (Tebutiurum) e Velpar K® WG (Diurom + Hexazinona). Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) 75f. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2012.

FRANÇOSO, E. Filogeografia de *Bombus morio* e *B. pauloensis* (Hymenoptera, Apidae). Tese de doutorado (Programa de Pós Graduação em Genética). 2015. 28p. doi: 10.11606/T.41.2015.tde-22052015-101014

FREDES, C.; MONTENEGRO, G. Heavy metal and other trace elements contents in honey bee in Chile. **Cien. Inv. Agric.**, 33: 50-58, 2006.

GARIBALDI, L. A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZEN, M. A.; BOMMARCO, R.; CUNNINGHAM, S. A.; ... KLEIN, A. M. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, 339(6127), 1608–1611. 2013. doi:10.1126/ science.1230200

GARÓFALO, C. A.. *Bombus*, as mamangavas de chão e sua importância como agentes polinizadores. Apacame . **Mensagem Doce** nº80. 2015 Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/msg80.htm>> Acessado em 10/06/2020.

GELLER B.L., WINGE D.R. Subcellular distribution of superoxide dismutase in rat liver, **Methods Enzymol.** 105, 105–114. 1984.

GIANNINI TC, COSTA WF, CORDEIRO GD, et al. Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. **Plos One** . 12(8):e0182274. 2017. doi: 10.1371/journal. pone.0182274

- GIANNINI, T. C., CORDEIRO, G. D., FREITAS, B. M., SARAIVA, A. M., & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 108(3), 849–857. 2015. doi:10.1093/jee/tov093
- GIZAW, G., KIM, Y., MOON, K., CHOI, J. B., KIM, Y. H., & PARK, J. K. Effect of environmental heavy metals on the expression of detoxification-related genes in honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**. 2020 doi:10.1007/s13592-020-00751-8
- GOASDUFF, T., AND CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 degradation by in Vitro reconstituted systems: Role of the molecular chaperone hsp90, **Arch. Biochem. Biophys.** 379, 321-330. 2000.
- GOULSON, D. Bumblebees. Behaviour, ecology and conservation. Oxford Univ Press. 317 p. 2010.
- GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, 347(6229): 1255957-1-1255957-9. 2015 <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.
- GRASS, I., MEYER, S., TAYLOR, P. J., FOORD, S. H., HAJEK, P.; TSCHARNTKE, T. Pollination limitation despite managed honeybees in South African macadamia orchards. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. 260, 11–18. 2018. doi: 10.1016/j.agee.2018.03.010
- GREENLEAF, S.S., WILLIAMS, N.M., WINFREE, R. *et al.* Bee foraging ranges and their relationship to body size. **Oecologia** 153, 589–596 (2007). doi:10.1007/S00442-007-0752-9
- GREGORC, A., SILVA-ZACARIN, E. C., CARVALHO, S. M., KRAMBERGER, D., TEIXEIRA, E. W., & MALASPINA, O. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: a comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, 147, 328–336. 2016.
- GRIXTI, J. C.; WONG L. T.; CAMERON S. A. & FAVRET C. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. **Biological Conservation** 142, 75-84, 2009.

GUENGERICH FP Human cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, ed Ortiz de Montellano PR (Springer, New York), 4th Ed, pp 523–785. 2015.

GUNTER W.; COLLINS, A. WILLIAMS, V.. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, Springer Verlag. 33 (1), pp.3-14. 2002. doi:10.1051/apido:2001001 hal-00891910

GUPTA S C., SIDDIQUE H R., MATHUR N., VISHWAKARMA A L., MISHARA R K., SAXENA D K., CHOWDHURI D K. Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1770(9): 1382-1394. 2007.

GWOREK B, DMUCHOWSKI W, BACZEWSKA AH, BRĄGOSZEWSKA P, BEMOWSKA-KAŁABUN O, WRZOSEK-JAKUBOWSKA J. Air Contamination by Mercury, Emissions and Transformations-a Review. **Water Air Soil Pollut**. 228(4):123. 2017. doi:10.1007/S11270-017-3311-Y

HAGEN, M.; WIKELSKI, M.; KISSLING, W. D. Space Use of Bumblebees (*Bombus spp.*) revealed by Radio-Tracking. **PLoS ONE**, 6(5), e19997. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0019997

HEINRICH, B. How the honey bee regulates its body temperature. **Bee World**, 77(3), 130–137. 1996. doi:10.1080/0005772x.1996.11099304

IBAMA. Mercúrio metálico. Brasília, DF, 2012. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/mercurio-metalico>> Acessado em 10/06/2020.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 59-62, 2010.

INSTITUTO SAÚDE E SUSTENTABILIDADE. O perigo está no ar. 2014. Disponível em < <https://www.saudeesustentabilidade.org.br/noticias/o-perigo-esta-no-ar/>> Acessado em 15/06/2020.

IPBES (2016). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, and H. T. Ngo (eds). **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn, Germany. 552 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3402856>>

ITO, S. Biotransformation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 96(3), 281–283. 2014. doi:10.1038/clpt.2014.133

JHA, S.; KREMEN, C. Resource diversity and landscape-level homogeneity drive native bee foraging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(2), 555–558. 2012. doi:10.1073/pnas.1208682110

KARP G. Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos. 3a Ed. Editora Manole, São Paulo, p.832. 2005.

KLEIN, A. M.; VAISSIERE, J. H.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 274, n. 1, p. 303-313, 2007.

KNIGHT, M. E.; MARTIN, A. P.; BISHOP, S.; OSBORNE, J. L.; HALE, R. J.; SANDERSON, R. A.; GOULSON, D. An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. **Molecular Ecology**, 14(6), 1811–1820. 2005. doi:10.1111/j.1365-294x.2005.02540.x

KOSIOR A.; CELARY, W.; OLEJNICZAK, P.; FIJAL, J.; KRO´LW; SOLARZ, W. & PONKA, P. The decline of bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of western and central Europe. **Oryx** 41:79–89, 2007.

LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) Fish ecotoxicology. Basel, Switzerland, **Birkhäuser Verlag**, p. 203-224. 1998.

LAMBORG, C. H.; FITZGERALD, W. F.; O’DONNELL, J.; TORGERSEN, T. A non–steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. **Pergamon**, Groton, v. 66, n. 7, p. 1105-1108. 2002.

LOCKE, M. NICHOL, H. Iron economy in insects: transport, metabolism and storage. **Ann. Ver. Entomol.** 37: 195-215. 1992.

LOCKE, M. The cell biology of fat body development. In *Insect Biology in the Future* (ed. M. Locke and D. S. Smith),. New York, London: **Academic Press**. pp. 227–252. 1980.

LUND BO, MILER DM, WOODS JS . Mercury induced H₂O₂ formation and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem Pharmacol** 42:181–187. 1991.

LYCETT, G. J., MCLAUGHLIN, L. A., RANSON, H., HEMINGWAY, J., KAFATOS, F. C., LOUKERIS, T. G., & PAINE, M. J. I. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. **Insect Molecular Biology**, 15(3), 321–327. 2006. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00647.x

MAGGID, A. D.; KIMANYA, M. E.; NDAKIDEMI, P. A. The Contamination and Exposure of mercury in honey from Singida, Central Tanzania. **American Journal of Research Communication**, vol 2, p. 127-139, 2014.

MAO, W., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(10), 2538–2543. 2017. doi:10.1073/pnas.1614864114

MAO, W., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. **Insect Molecular Biology**, 24(5), 582–588. 2015 doi:10.1111/imb.12183

MAYER, C., MICHEZ, D., CHYZY, A., BRÉDAT, E.; JACQUEMART, A.-L. The Abundance and Pollen Foraging Behaviour of Bumble Bees in Relation to Population Size of Whortleberry (*Vaccinium uliginosum*). **PLoS ONE**, 7(11), e50353. 2012.

MEYER M P. & BUKAU B. Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62(6): 670- 684. 2005.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev Ass Med Brasil** 45(2): 181-188. 1999.

MICHENER, C. D. The Bees of the World. 2nd. ed. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, 913 p, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: MMA - Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio no Brasil. Brasília, 2013.

MORAES, A. Poluição é 100% maior que limite da OMS. *Jornal Cruzeiro do Sul*, Sorocaba. 2014. Disponível em <<https://www2.jornalcruzeiro.com.br/materia/545798/poluicao-e-100-maior-que-limite-da-oms>> Acessado em 15/06/2020.

MORAIS, M.M.; DE JONG, D.; MESSAGE, D.; GONÇALVES, L.S. Perspectivas e desafios para o uso das abelhas *Apis mellifera* como polinizadores no Brasil. In: **Polinizadores no Brasil**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pp 203–236. 2012.

MORGANO, M A.; GOMES, P. C.; MANTOVANI, D. M. B.; PERRONE, A. A. M.; SANTOS, T. F. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 25, n. 2, p. 250-253, 2005. doi: 10.1590/S0101-20612005000200011

MOURE, J. S.; SAKAGAMI, S. F. As mamangavas sociais do Brasil (*Bombus Latr.*) (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomologica**, Curitiba, v. 51, n. 1-4, p. 65-194. 1962.

MUTTER, J.; CURTH, A.; NAUMANN, J.; DETH, R.; WALACH, H. Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and a integrated molecular mechanism. **J Alzheimer Dis** 22: 357 – 374 (10). 2010. doi:10.3233/JAD-2010-100705

NABI, S. Toxic Effects of Mercury. Springer India. 2014. 265p.

NAM, W. Cytochrome P450. **Comprehensive Coordination Chemistry II**, 281–307. 2003. doi:10.1016/b0-08-043748-6/08145-7

NEGRISOLI, J.; NASCIMENTO, L. F. C. Atmospheric pollutants and hospital admissions due to pneumonia in children. **Revista Paulista de Pediatria**, 31(4), 501–506. 2013. doi:10.1590/s0103-05822013000400013

NIKOLIĆ, T. V.; PURAĆ, J.; ORČIĆ, S.; KOJIĆ, D.; VUJANOVIĆ, D.; STANIMIROVIĆ, Z.; ... BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental effects on Superoxide Dismutase and Catalase activity and expression in honey bee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 90(4), 181–194. 2015. doi:10.1002/arch.21253

NOGUEIRA, F. L. A.; BALSAMO, P. J.; JONES, M. C.; ABDALLA, F. C. Exposure to Mercury at Trace Concentrations Leads to Collapse of the Hepato-Nephrotic System in Two Neotropical Species of Bumblebee. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. 14, 1-10p. 2019. doi:10.3844/ajabssp.2019.1.10.

PADILLA, S. C., CURE, J. R., RIAÑO, D. A., GUTIERREZ, A. P., RODRIGUEZ, D., & ROMERO, E. Gyne and Drone Production in *Bombus Atratus* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Apicultural Science**, 61(1), 55–72. 2017. doi:10.1515/jas-2017-0005

PÉREZ-MENDEZ, N., ANDERSSON, G. K. S., REQUIER, F., HIPÓLITO, J., AIZEN, M. A., MORALES, C. L., GARCIA, N.; GENNARI, G. P.; GARIBALDI, L. A. The economic cost of losing native pollinator species for orchard production. **Journal of Applied Ecology**. 00: 01-10. 2020. doi:10.1111/1365-2664.13561

PIOVESAN, B; PADILHA, A. C; BOTTON, M.; ZOTTI, M. J. Entomofauna and potential pollinators of strawberry crop under semi-hydroponic conditions. **Hortic. Bras.** [online]. 37 (3), 324-330. 2019. doi: 10.1590/s0102-053620190311.

PLISCHUK, S.; LANGE, C. E. *Sphaerularia bombi* (Nematoda: Sphaerulariidae) parasitizing *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) in southern South America. **Parasitol Res.** 2012;111(2):947-950. doi:10.1007/s00436-012-2853-6

PLISCHUK, S.; SANSCRAINTE, N. D.; BECNEL, J. J.; ESTEP, A. S.; LANGE, C. E. *Tubulinosema pampeana* sp. n. (Microsporidia, Tubulinosematidae), a

pathogen of the South American bumble bee *Bombus atratus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 126, 31–42. 2015. doi:10.1016/j.jip.2015.01.006

PLISCHUK, S.; POCCO, ME.; LANGE, C.E. The tracheal mite *Locustacarus buchneri* in South American native bumble bees (Hymenoptera: Apidae). **Parasitol Int.** 2013;62(6):505-507. doi:10.1016/j.parint.2013.07.006

POHL *et al.* Biomarkers of Exposure and Effect. **Toxicology and Industrial Health**, 16(3-5), 165–168. 2000. doi:10.1177/074823370001600309

POPE, N. S., JHA, S. Seasonal Food Scarcity Prompts Long-Distance Foraging by a Wild Social Bee. **The American Naturalist**. 191(1): 45-57. 2018.

POPOV, T.; SZYSZKA, P. Alpha oscillations govern interhemispheric spike timing coordination in the honey bee brain. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 287(1921), 20200115. 2020. doi: 10.1098/rspb.2020.0115

PORRINI, C.; SAATINI, A. G.; GIROTTI, S.; GHINI, S.; MEDRZYCHI, P.; GRILLENZONI, F.; ORTOLOTTI, L.; GATTAVECCHIA, E.; CELLI, G. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. **Apiacta**, v. 38, p. 63- 70, 2003. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/228848146_Honey_bees_and_bee_products_as_monitors_of_the_environmental_contamination>.

POSTLETHWAIT, J. H.; GIORGI, F. Vitellogenesis in insects. In *Developmental Biology – A Comprehensive Synthesis* (ed. E. Browder), pp. 85-126. New York, NY: Plenum Press. 1985

POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, H. R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 15-22, 2010.

POVEDA CORONEL, C. A.; RIANO JIMENEZ, D.; AGUILAR BENAVIDES, L.; CURE, J. R. Eficiencia de polinización de colocias huérfanas de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) em fresa (*Fragaria x ananassa*) bajo cubierta. **Acta biol.Colomb.** [online]. vol.23, n.1 [cited 2020-06-15], pp.73-79. 2018. doi:10.15446/abc.v23n1.61648.

PURAC, J., NIKOLIĆ, T. V., KOJIĆ, D., ĆELIĆ, A. S., PLAVŠA, J. J., BLAGOJEVIĆ, D. P., & PETRI, E. T. Identification of a metallothionein gene in honey bee *Apis mellifera* and its expression profile in response to Cd, Cu and Pb exposure. **Molecular Ecology**. 2018. doi:10.1111/mec.14984

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp b* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2007.

REDHEAD, J. W.; DREIER, S.; BOURKE, A. F. G.; HEARD, M. S.; JORDAN, W. C.; SUMNER, S.;... CARVELL, C. Effects of habitat composition and landscape structure on worker foraging distances of five bumble bee species. **Ecological Applications**, 26(3), 726–739. 2016. doi:10.1890/15-0546

RIANO, J. D.; PACATEQUE, E. J.; CURE, J. R.; RODRIGUEZ, D. Comportamiento y eficiencia de polinización de *Bombus atratus* Franklin en pimentón (*Capsicum annum* L.) sembrado bajo invernadero. **Rev.colomb.cienc.hortic.** [online]. 9 (2) pp.259-267. 2015. doi: 10.17584/rcch.2015v9i2.4182.

RICHARDSON, L. A. A Swarm of Bee Research. **PLoS Biol** 15(1): e2001736. 2017. doi:10.1371/journal.pbio.2001736

RITOSSA F M.. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**.18: 571-573. 1962.

ROMA, G.C., O.C. BUENO AND M.I. CAMARGO-MATHIAS, Morphophysiological analysis of the insect fat body: A review. **Micron**, 41: 395-401. 2010. doi: 10.1016/j.micron.2009.12.007

SAKAGAMI, S. F. Specific differences in the bionomic characters of bumblebees. A comparative Review. **Journal of the Faculty of Science**, Hokkaido, v. 20, n. 1, p. 390- 447. 1976.

SANTOS, C. M. Armazenamento de embalagens de agrotóxicos utilizados na atividade agrícola em Catalão (GO) e seus impactos ambientais. 2010, 157 p., Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2010.

SHPIGLER, H. Y., SAUL, M. C., CORONA, F., BLOCK, L., CASH AHMED, A., ZHAO, S. D.; ROBINSON, G. E. Deep evolutionary conservation of autism-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(36), 9653–9658. 2017.

SILVA(a), C. I.; MARCHI, P.; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B. M.; GARÓFALO, C. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Manejo dos polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro. Instituto de Estudos Avançados da USP/ Ministério do Meio Ambiente. 2014. 59p.

SILVA(b), C. I.; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B. FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ FONSECA, V. L. Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. São Paulo- SP. 2014. 50p.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. ; CHAUZAT, M. P. ; ZEGGANE, S. ; DRAJNUDEL, P. ; SCHURR, F. ; FAUCON, J. P. ; MALASPINA, O. ; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 696-703.

SILVA-ZACARIN, E. C. M., GREGORC, A., SILVA-DE-MORAES, R. L. M.. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. *Apidologie*, 37: 507–516. 2006. doi: 10.1051/apido:2006030

SINIR. Sistema Nacional de Informações sobre a gestão dos Resíduos Sólidos., 2015. Brasil. Disponível em <<http://www.sinir.gov.br/web/guest/acordo-setorial-de-lampadas-fluorescentes-de-vapor-de-sodio-e-mercurio-e-de-luz-mista>> Acessado em 10/06/2020

SIQUEIRA, T. C. S. Identificação de genes codificantes de proteínas de choque térmico na abelha *Melipona interrupta* (Hymenoptera, Meliponini). Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – AM 2014. 82f.

SKALDINA, O; SORVARI, J. Biomarkers of Ecotoxicological Effects in Social Insects. **Perspectives In Environmental Toxicology**, Springer International Publishing. [s.l.], p.203-214, 2017.

SOUZA, L. S. V.; NASCIMENTO, L. F. C. Air pollutants and hospital admission due to pneumonia in children: a time series analysis. **Rev Assoc Med Bras.** 62(2):151-156, 2016.

STEGEMAN, J.J; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: **HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335.**

TEIXEIRA, D.; BERNARDES, G.; SANTIAGO, L. E.; VILELA, O.; Ecotoxicologia do Mercúrio. 2009.

TOLLEFSEN, K. E., SONG, Y., HØGÅSEN, T., ØVERJORDET, I. B., ALTIN, D., & HANSEN, B. H. Mortality and transcriptional effects of inorganic mercury in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 80(16-18), 845–861. 2017. doi:10.1080/15287394.2017.1352198

TOPORCÁK J, LEGÁTH J, KUL'KOVÁ J. Koncentrácia ortute vo vzorkách vciel a medu, pochádzajúcich z priemyselne exponovanej a neexponovanej oblasti [Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination]. **Vet Med (Praha)**. 37(7):405-412. 1992.

TOPRAK U. The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. **Front Physiol.** 2020;11:434. 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00434

TORNÉ-NOGUERA, A.; RODRIGO, A.; ARNAN, X.; OSORIO, S.; BARRIL-GRAELLS, H.; DA ROCHA-FILHO, L. C.; BOSCH, J. Determinants of Spatial Distribution in a Bee Community: Nesting Resources. **PLoS ONE** 9(5): e97255. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097255>

TORRES, A. Quanto tempo leva para o mercúrio sair do corpo? 2017. Disponível em <<http://andriatorres.com/blog/2017/4/3/quanto-tempo-o-mercurio-leva-para-sair-do-corpo>> Acessado em 10/06/2020.

TÓTH, G., HERMANN, T., DA SILVA, M. R., & MONTANARELLA, L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environment International**, 88, 299–309. 2016. doi:10.1016/j.envint.2015.12.017

UNDERWOOD, R. M.; VANENGELSDORP, D. Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before? . 2010. Disponível em: <<http://ento.psu.edu/pollinators/publications/underwood>> Acessado em 10/06/2020.

VALKO, M., MORRIS, H., & CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, 12(10), 1161–1208. 2005. doi:10.2174/0929867053764635

VALLE D. Vitellogenesis in Insects and Other Groups -a Review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.** ;88:1–26. 1993

VAN DER OOST, R., BEYER, J., & VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13(2), 57–149. 2003. doi:10.1016/s1382-6689(02)00126-6

VANBERGEN, A. J.; INITIATIVE, the I. P. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, 11(5), 251–259. 2013.

VELTHUIS, H. H. W.; VAN DOORN, A. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**, 37(4), 421–451. 2006. doi:10.1051/apido:2006019

VOTORANTIM CIMENTOS. Relatório integrado. 62p. 2017. Disponível em :<<https://www.votorantimcimentos.com.br/wp-content/uploads/2018/08/relatorio-integrado-vc-2017.pdf>> Acesso em 10/05/2020.

WANG, X., ZHANG, X., ZHANG, Z., LANG, H.; ZHENG, H. Honey bee as a model organism to study gut microbiota and diseases. **Drug Discovery Today: Disease Models**. 2019. doi:10.1016/j.ddmod.2019.08.010

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Mercury: environmental aspects / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. 2013.

WILLIAMS, P. H. An Annotated Checklist of Bumble Bees with an Analysis of Patterns of Description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of the Natural History Museum Entomology** 67(1):79-152, 1998.

XU, P. J.; XIAO, J. H.; XIA, Q. Y.; MURPHYS, B.; HUANG, D.W. *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. 2010. **Insect Molecular Biology**. 19(4): 593-597.

YOUNG, J. C.; HOOGENRAAD, N. J.; HARTL, F. U. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. **Cell Press**. 112(1): 41-50. 2003.

ZHANG, Q.-F., LI, Y.-W., LIU, Z.-H., & CHEN, Q.-L. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. **Aquatic Toxicology**, 181, 76–85. . 2016. doi:10.1016/j.aquatox.2016.10.029

ZHOU Z. S.; GUO, K.; ELBAZ, A. A.; YANG, Z. M. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. **Environ Exp Bot**. 65:27–34, 2007.