

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
AMBIENTE

**EFEITOS DE NANODOSES DO INSETICIDA TIAMETOXAM
PARA A ABELHA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera,
Apidae): DA ABSORÇÃO AO ORGÃO ALVO**

TATIANE CAROLINE GRELLA

ARARAS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

**EFEITOS DE NANODOSES DO INSETICIDA TIAMETOXAM
PARA A ABELHA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera,
Apidae): DA ABSORÇÃO AO ORGÃO ALVO**

Orientada: Tatiane Caroline Grella

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dissertação apresentada ao programa de pós-Graduação em Agricultura e Ambiente do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras-SP como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Agricultura e Ambiente.

ARARAS, 2017

Grella, Tatiane Caroline

EFEITOS DE NANODOSES DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA
A ABELHA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae): DA
ABSORÇÃO AO ORGÃO ALVO / Tatiane Caroline Grella. -- 2017.
60 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Banca examinadora: Thaisa Cristina Roat, Elaine Silva Zacarin, Roberta
Cornélio Ferreira Nocelli

Bibliografia

1. Intestino. 2. túbulos de Malpighi. 3. proteínas de choque térmico. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tatiane Caroline Grella, realizada em 12/04/2017:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Roberta Cornélio Ferreira Nocelli'.

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Thaisa Cristina Roat'.

Profa. Dra. Thaisa Cristina Roat
UNESP

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin'.

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin
UFSCar

Agradecimentos

A Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação, por toda a ajuda concedida para a realização deste trabalho, além da amizade, meu muito obrigada.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP e CNPQ pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

À Hellen M. S. Lima, pela grande amizade, pelo apoio constante, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação. Muito Obrigada!

À Jéssica Araujo e Adna Dorigo, pela troca de experiências, pela amizade cultivada e pelas boas risadas. Muito Obrigada!

Aos colegas de laboratório Isabella, Priscila, Thaisa, Aline, Elisangela, Annelise, Caio, Dayana, Pâmela, Patrícia, pela convivência, amizade, auxílio, discussões e apoio.

À UFSCar pela oportunidade de cursar uma pós-graduação e a todos os seus funcionários e professores que tornaram essa jornada mais fácil e gratificante.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e ao Prof. Dr. Osmar Malaspina por todo apoio fornecido.

À toda a minha família, principalmente a minha irmã, Ana, aos meus pais, Valdecy e Dirlaine Grella, pela confiança e pelo amor incondicional.

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

Agradeço à Deus.

Resumo

As abelhas brasileiras são responsáveis por polinizar cerca de 40-90% das plantas nativas de acordo com o bioma. Dentre as espécies encontradas no Brasil destaca-se a *Melipona scutellaris*, eussocial, capaz de realizar polinização por vibração. Porém, as populações de abelhas têm sido afetadas por múltiplos agentes/fatores estressantes, principalmente o uso de agrotóxicos, como é o caso do tiametoxam, um inseticida neorotóxico e sistêmico, ou seja, seu órgão alvo é o cérebro e ele pode chegar ao néctar e ao pólen através da seiva da planta. Quando os recursos, como néctar e pólen são ingeridos pelas abelhas, o ingrediente ativo entra em contato primeiramente com o intestino, órgão responsável pela digestão e absorção, e posteriormente cai na hemolinfa podendo atingir os túbulos de Malpighi, responsáveis por sua filtração e excreção, bem como o cérebro, seu órgão alvo. Devido à importância de se entender qual a via metabólica desse composto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam no intestino, túbulos de Malpighi e cérebro de forrageiras de *M. scutellaris*. Para isso as abelhas foram coletadas diretamente da entrada das colônias e expostas, via oral, a doses subletais do tiametoxam, $CL_{50} = 0,0453$ ng i.a./ μ L dieta; $CL_{50/10} = 0,00453$ ng i.a./ μ L dieta e $CL_{50/100} = 0,000453$ ng i.a./ μ L dieta. Em seguida foram dissecadas após os tempos de, 1, 4, 8 e 24h do início da exposição para a avaliação do efeito agudo e submetidas as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), HSP90 (proteína de choque térmico) e Tunel (kit para detecção de morte celular). Através da técnica de HE foi possível observar que as concentrações mais altas ocasionaram alterações na morfologia celular nos três órgãos estudados. Já a técnica de HSP90 mostrou aumento na expressão da família das proteínas de choque térmico de acordo com o aumento da concentração do inseticida, em determinados tempos, e um equilíbrio entre os três órgãos, ou seja, quando a expressão aumenta no intestino e diminui nos túbulos de Malpighi, com exceção da maior concentração, no maior tempo no órgão alvo, que sofreu uma queda, o que pode indicar morte celular, a qual não foi evidenciada pela técnica de Tunel em nenhum órgão. Dessa forma concluímos que nanodoses do inseticida tiametoxam causam danos morfológicos, promovem aumento na expressão da HSP90 e podem levar os indivíduos a morte.

Palavras-chave: Intestino, túbulos de Malpighi, cérebro, fragmentação do DNA, proteínas de choque térmico.

Abstract

The Brazilian bees are responsible for pollinating about 40-90% of native plants according to the ecosystem. Among the species found in Brazil is *Melipona scutellaris*, eussocial, able to perform pollination by vibration. However, bee populations have been affected by the use of pesticides, such as thiamethoxam, a neonicotinoid and systemic insecticide, that is, its target organ is the brain and it can reach nectar and pollen through the sap of the plant. When the resources are ingested, the active ingredient first comes into contact with the intestine, the organ responsible for digestion and absorption, and then passes into the hemolymph, reaching the Malpighi tubules responsible for their filtration and excretion, as well as the brain, organ target. Due to the importance of understanding the metabolic pathway of this compound, the objective of this work was to evaluate the effects of nanodoses of the insecticide thiamethoxam in the intestine, Malpighi tubules and the brain of *M. scutellaris* forages. For this, the bees were collected directly from the colonies and exposed, orally, to sublethal doses of thiamethoxam, $LC_{50} = 0.0453$ ng i.a./ μ L diet; $LC_{50} / 10 = 0.00453$ ng i.a./ μ L diet and $LC_{50} / 100 = 0.000453$ ng i.a./ μ L diet. Then, they were dissected after the start of the exposure times, 1, 4, 8 and 24h, and subjected to the Hematoxylin and Eosin (HE), HSP90 (Thermal Shock Protein) and TUNEL (Cell Death Detection Kit) techniques. Through the HE technique it was possible to observe that the higher concentrations caused alterations in the cellular morphology in the three studied organs, such as increased cellular elimination, strongly stained nuclei, loss of cytoplasmic material and chromatin condensation. The HSP90 technique showed an increase in the expression of the heat shock protein according to the increase in concentration at certain times and a balance in its production between the three organs, that is, when the production increases in one organ it decreases in the other, except for the analysis of the results for the highest concentration, of the longer time in the target organ, which suffered a fall, which may indicate cellular death, which was not evidenced by the TUNEL technique in any organ. Thus, we conclude that nanodoses of the insecticide thiamethoxam cause morphological damage, increase the expression of heat shock proteins and can lead to death.

Key words: Intestine, Malpighi tubules, brain, DNA fragmentation, heat shock proteins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	11
2.1 Objetivos específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material biológico.....	11
3.2 Exposição ao inseticida para análise morfológica e histoquímica.....	11
3.3 Coloração pela Hematoxilina e Eosina	12
3.4 Determinação de escore para quantificação de HE.....	13
3.5 Método Tunel (<i>TUNEL - In situ</i> Cell Death Detection Kit)	13
3.6 Marcação de HSP90.....	14
3.7 Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1 Atribuição dos escores	16
4.2 Alterações morfológicas	18
4.3 Imunomarcação pelos métodos de Tunel e de HSP90.....	24
5. DISCUSSÃO	36
5.1 Alterações morfológicas	36
5.2 Via metabólica	38
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

Nos ecossistemas, as relações entre os indivíduos são extremamente importantes e interdependentes, alimento e abrigo para a fauna só são possíveis graças a presença da flora e vice-versa. Dentre essas relações, a polinização é um dos elementos mais importantes, pois para que a existência das angiospermas seja viável é necessária a existência dos sistemas de polinização, para que elas possam, a partir de suas flores, produzir frutos e disseminar/propagar as sementes (SHEPERD et al., 2003, KLEIN et al., 2007). Este é um processo essencial que garante a reprodução das plantas e permite a variabilidade genética e qualidade de frutos (KEVAN E VIANA 2003, KLEIN et al., 2007 e BROSI E BRIGGS, 2014).

Dentre os sistemas de polinização encontra-se a entomofilia, realizada por insetos, polinizadores da maioria das plantas devido a abundância de indivíduos com adaptações às estruturas florais (NOGUEIRA-COUTO et al., 1990). Os insetos polinizam 90% das angiospermas, sendo 80% desses vegetais de interesse econômico (NOGUEIRA-COUTO, 1998). As abelhas são os polinizadores predominantes na maioria das regiões geográficas (KREMEN et al., 2007). Elas polinizam cerca de 70% das culturas agrícolas, promovem uma produção com maior qualidade dos frutos (KLEIN et al., 2007; GIANNINI et al., 2015) e aumentam a produção de sementes em 41 culturas em todo o mundo (GARIBALDI et al., 2013).

Estes insetos fazem parte da base da cadeia alimentar, possibilitando o fluxo de energia para outras espécies animais e vegetais, pois participam ativamente na reprodução vegetal aumentando a produtividade das plantas que dependem da reprodução cruzada (PRONĪ, 2000). No entanto, esse serviço ecossistêmico prestado pelas abelhas vem diminuindo e essa redução pode variar de impactos não desejáveis, como perda do valor econômico das culturas (KLATT et al., 2013, GARRATT et al., 2014) e futuramente a falta de alimento, até o decréscimo e conseqüentemente extinção de espécies vegetais dependentes das abelhas para a polinização (BRITAIN E POTTS, 2011).

As abelhas são um grupo monofilético originado das vespas (MICHENER, 2007). Pertencem a classe Insecta, e estão inseridas na ordem Hymenoptera (NOGUEIRA-NETO, 1997), reunidas na superfamília Apoidea que contém 13 subfamílias (MOURE, 2007). Mundialmente, existem mais de 20 mil espécies descritas (CAMARGO e PEDRO 1836), sendo a sua maioria representada por espécies solitárias. No entanto, uma pequena parcela das espécies são abelhas eussociais, caracterizadas pela divisão de castas femininas onde as operárias são responsáveis pela limpeza, defesa e forrageamento, e as

rainhas são responsáveis pela postura de ovos. O macho, chamado de zangão, tem a função exclusiva de fecundar a rainha durante o voo nupcial. Dentre as eussociais, está a subfamília Apinae, a qual compreende mais de 500 espécies de abelhas com ferrão atrofiado, os meliponíneos (MICHENER, 2013) e abrange a tribo Meliponini, onde encontramos a espécie do presente estudo (reclassificado por MICHENER, 2007).

Os indivíduos desta tribo possuem um ferrão vestigial sendo incapazes de ferocar, ocorrem na América Neotropical, em grande parte da América Latina e Central e estão divididos em 390 espécies, elas são responsáveis por cerca de 40-90% da polinização das plantas nativas, dependendo do ecossistema considerado (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008). Dentre estas espécies está *Melipona scutellaris*, conhecida popularmente como “uruçu”, “uruçu do Nordeste” ou “uruçu verdadeira” (WEBBEE, 2010),

As operárias dessa espécie possuem corpo robusto, vértice marrom-amarelado, com pelos amarelo-ruivos, frequentemente com alguns mais claros, cor de ouro. O clipeo é levemente convexo, e a face relativamente estreita. Seu tórax é preto no dorso (figura 1), com pelos densos e amarelo-dourados, e face ventral e o abdômen escuro, com cinco listras claras (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O interior do ninho de *M. scutellaris* é feito de uma mistura de cera e própolis. Seu alimento é armazenado em potes com cerca de 4 cm que podem conter néctar ou pólen coletados das flores, fontes de proteínas e açúcares, respectivamente, usados para alimentar suas crias, as quais são mantidas em células com todo o alimento para seu desenvolvimento, desde a postura dos ovos. Estas células são justapostas e após o nascimento, sua cera é usada para outras construções. Por não possuírem veneno, sua única defesa são as mandíbulas e dessa forma é necessário guardar a entrada da colônia e repelir invasores, para isso a entrada das colônias é pegajosa e tem odor desagradável (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 1: Abelhas da espécie *M. scutellaris*, dentro da colônia, alimentando-se de pólen misturado com xarope (50% água e 50% açúcar), complemento alimentar oferecido uma vez por semana.



Fonte: Autoria Própria

Elas são muito usadas para a polinização dentro e fora de estufas, pois são capazes de realizar polinização por vibração de forma eficiente, vibrando a musculatura torácica para liberação do pólen pelas anteras do tipo poricida, como em plantas do gênero *Solanaceae*, como tomate, batata, pepino, entre outros (NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010). Essas abelhas têm habito generalista, colônias perenes, incapacidade de abandonar os ninhos e armazenam uma quantidade considerável de alimento (MALAGODI-BRAGA E KLEINERT, 2000). É uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro, mas bem adaptada ao clima do Estado de São Paulo (VIANA, 2010).

Cada vez mais as abelhas são obrigadas a procurar fontes de recursos em monoculturas, como no caso da cana-de-açúcar, já que as matas nativas estão sendo desmatadas, o que gera a fragmentação do habitat, como é o caso do estado de São Paulo, que atualmente abriga 52,3% dos 7,6 milhões de hectares de toda a área plantada de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) no Brasil, o que corresponde a uma produção aproximada de 655,16 milhões de toneladas (CONAB, 2015) e uma produção vegetal de US\$ 18,386,825,455 (GIANINI et al., 2015). Essa cultura exerce um importante papel na economia devido ao aumento na exportação de açúcar e álcool (GONÇALVES et al., 2003), um biocombustível que ganhou destaque devido ao aumento excessivo do preço do petróleo e ao grande destaque das energias renováveis.

A cana-de açúcar se adaptou muito bem ao Brasil e devido a isso tem uma alta produtividade, que pode ser comprometida por alguns fatores, como as pragas, dentre as quais se destaca a cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854), que interfere na qualidade tecnológica (DINARDO-MIRANDA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003).

Na tentativa de controlar essas pragas, os agricultores usam diversos agrotóxicos, dentre eles inseticidas, como o tiametoxam, eficiente no controle da cigarrinha e que consequentemente evita perdas da produção (PEIXOTO, 2004; DINARDO-MIRANDA; GIL, 2007). Com o crescimento da área usada para o plantio da cana-de-açúcar e fragmentação do habitat (NUNES et al., 2007), as abelhas estão ficando sem recursos florais e acabam coletando a substância açucarada proveniente do corte da cana, que pode estar contaminada com o agente químico utilizado no controle de pragas. Além disso, os poucos remanescentes de matas nativas estão inseridos na matriz agrícola, e podem receber a deriva da pulverização da cultura.

O inseticida tiametoxam, nome químico 3- (2-clori-tiazol-5-ilmetil) -5-metil[1,3,5] oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina, que contém o grupo nitro (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012), pode ser pulverizado sobre as folhas por pulverizador terrestre e aéreo, usado em tratamentos de sementes ou aplicado no solo sendo absorvido pela raiz. De acordo com a Syngenta (2010) o tiametoxam é altamente bioconcentrável em peixes, altamente persistente no meio ambiente, altamente tóxico para organismos aquáticos e para abelhas. Esse inseticida é um neonicotinoide, ou seja, seu órgão alvo é o sistema nervoso dos insetos. Eles foram desenvolvidos nos anos 90 e atualmente existem vários ingredientes ativos registrados para uma grande variedade de culturas (FAIRBROTHER et al., 2014), estando entre os mais utilizados nas últimas três décadas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014).

Ele apresenta elevada solubilidade em água e baixa sorção no solo, assim como classificação toxicológica III (medianamente tóxico) (AGROFIT, 2003^a; REUNIÃO, 2015). Em relação aos efeitos ambientais, apresenta potencial de periculosidade I (altamente perigoso ao meio ambiente), sendo muito tóxico para abelhas, e persistente em matrizes ambientais.

O mecanismo de ação dos neonicotinoides consiste em mimetizar a acetilcolina na ligação ao seu receptor pós-sináptico. Sendo assim, no momento da transmissão do impulso nervoso a molécula do inseticida se liga ao receptor nicotinérgico e o impulso passa constantemente, uma vez que a enzima acetilcolinesterase não é capaz de degradar

suas moléculas, como faria com a acetilcolina, causando hiperexcitação, podendo levar à morte do inseto (MARÇON, 2002).

Porém, não são as doses letais utilizadas nas culturas que vem preocupando o mundo, doses que não conseguem matar os insetos de imediato podem ser tão ou mais prejudiciais que a dose letal. Muitos testes vêm sendo feitos com doses subletais, onde o indivíduo é exposto a dosagens mais baixas que as DL_{50} (dose letal média) determinadas, em 24 e 48 horas e os sintomas são observados e analisados durante esse tempo (CRESSWEL, 2011). Os resultados têm demonstrado que doses subletais dos neonicotinoides podem acarretar perda de memória e alterações no comportamento das abelhas (DESNEUX et al., 2007), o que implica na redução da eficiência no processo de polinização (FELTHAN et al., 2014), na reprodução desses insetos (FAUSER-MISLIN et al., 2013) e na sua capacidade de retornar para a colônia (HENRY et al., 2012). Segundo Brittain e Potts (2011) efeitos subletais podem ser mais perigosos para a sobrevivência da colônia quando comparados aos efeitos letais. Adicionalmente a exposição desses insetos a doses subletais pode desencadear alterações morfofisiológicas (SOARES, 2013; JACOB, 2013; CATAE, et al., 2014; COSTA, 2015), que podem ser bons indicadores de exposição (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006)

As abelhas podem entrar em contato com este inseticida via oral, pois o tiametoxam é um ingrediente ativo sistêmico, dessa forma ele pode ser translocado pela planta e chegar ao néctar e pólen, assim as abelhas terão contato com ele via oral durante sua alimentação individual (GOULSON, 2013). Outra forma da abelha entrar em contato com esse inseticida é através da aplicação foliar, quando é pulverizado sobre a planta ou através da deriva proveniente da aplicação nas sementes (FAIRBROTHER et al., 2014) ou seja, é um inseticida sistêmico por contato e ingestão (IUPAC, 2015), podendo afetar todos os indivíduos da colônia que se alimentarão desses recursos potencialmente contaminados. Além do inseticida em si, metabólitos destes compostos também já foram encontrados no néctar, no pólen coletado pelas forrageiras e na cera produzida pelas operárias (BLACQUIERE et al., 2012).

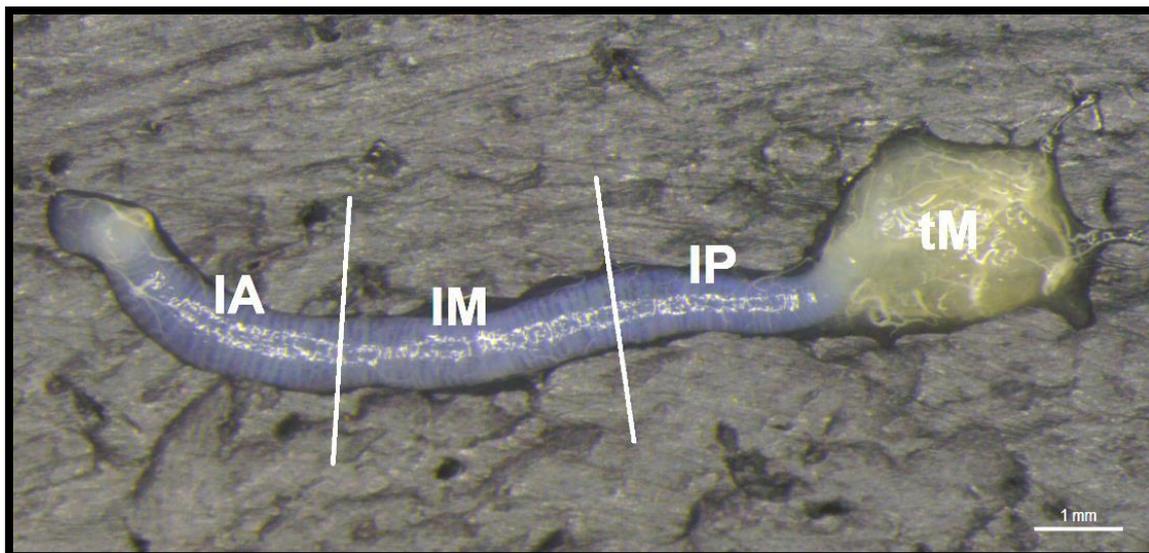
O sistema digestório é o primeiro a entrar em contato com os agrotóxicos quando ingeridos. Nas abelhas o trato digestório foi descrito para *A. mellifera* por Snodgrass (1956). Ele é composto por um tubo alimentar dividido em três partes, o intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Figura 2). Dentre os três, o único que tem origem endodérmica é o intestino médio, os demais têm origem ectodérmica. No intestino médio, também conhecido como ventrículo, é onde ocorre a maior parte da digestão e absorção

de nutrientes e por isso também chamado de estômago funcional (SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIN, 2009; ROSSI, 2013).

O intestino é um tubo cilíndrico, grosso e longo que possui dobras na sua extensão. Externamente, a superfície do ventrículo apresenta anelações, que fazem com que seu aspecto fique parecido com o de uma mola. Internamente seu epitélio é constituído por três tipos de células, sendo elas, as digestivas, que são maioria e tem a função de sintetizar enzimas digestivas, os componentes da membrana peritrófica e absorver nutrientes, as endócrinas que ficam espalhadas e produzem hormônios e as regenerativas que são as células de renovação (CRUZLANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996). Elas formam os ninhos de células regenerativas, células indiferenciadas que tem a função de substituir as células principais quando estas sofreram desgaste e são eliminadas para o lúmen. Em toda a extensão do ventrículo, também existe uma borda em escova apical bem desenvolvida, essas características foram facilmente observadas através da técnica de hematoxilina e eosina, que coram tanto o citoplasma quanto os núcleos das células e por isso nos permitem detalhar alterações morfológicas no interior do órgão (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996; CRUZ-LANDIN, 2009).

Recobrando as microvilosidades que formam o bordo em escova, encontra-se a membrana peritrófica, uma camada que apresenta, entre outras funções, a de proteger o epitélio contra o impacto direto do alimento, promover uma barreira física contra parasitas e bactérias e controlar o fluxo de substâncias entre os compartimentos externos e internos da membrana (CRUZ-LANDIN, 2009). Os danos causados nessa membrana podem alterar o funcionamento do órgão e prejudicar o metabolismo das abelhas, colocando em risco o indivíduo, podendo se estender a toda colônia (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; CRUZ et al., 2010).

Figura 2: Intestino de *M. scutellaris* sob estereomicroscópio (Leica). Túbulos de Malpighi (tM); Intestino Posterior (IP); Intestino Médio (IM) e Intestino Anterior (IA).



Fonte: Aatoria própria

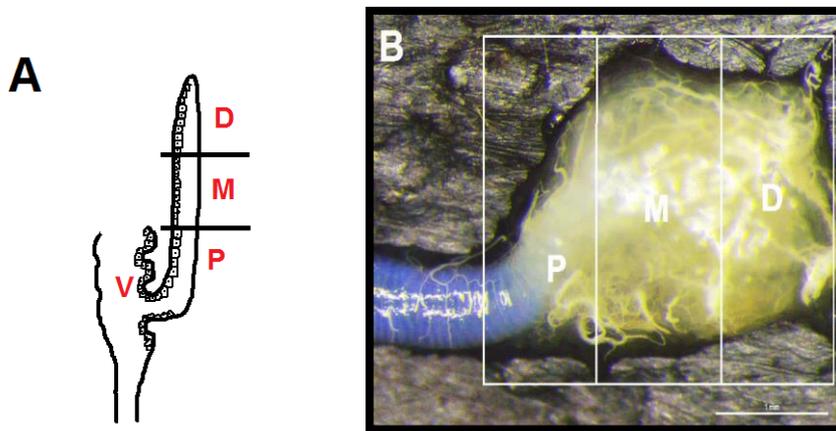
Após absorvido pelo intestino, o inseticida atinge o vaso dorsal no abdômen que o conduzirá até a cabeça, quando não for absorvido, o mesmo irá para a hemolinfa, onde poderá ser absorvido pelos túbulos de Malpighi. Nas abelhas os túbulos de Malpighi são longos, finos e numerosos nos indivíduos adultos. Eles são compostos basicamente por uma camada de células apoiada sob uma lamina basal. Ao longo dos túbulos é possível distinguir três diferentes regiões (Figura 3), a proximal, média e distal, sendo que o número de células diminuí conforme se afasta da inserção no intestino e as células que compõe essas diferentes regiões tem morfologias distintas (MEYRAN, 1982).

O sistema excretor das abelhas é composto por um número variável de túbulos de Malpighi, que eliminam metabólitos, substâncias não metabolizadas ou em excesso no organismo e, por isso, são extremamente importantes no processo de desintoxicação (HABIB, 2003). Dentro da cavidade abdominal, os túbulos ficam soltos a fim de aumentar sua área de contato com a hemolinfa e facilitar a filtração da mesma. Inicialmente esse composto filtrado se caracteriza como um fluido iso-osmótico, que carrega produtos tóxicos e íons. Depois de filtrado recebe o nome de urina primária que é excretada pelas abelhas junto com suas fezes (revisado por NOCELLI R. C. F. et al., 2016).

A parede do túbulo possui microvilosidades em sua região apical para aumentar a superfície de contato e transportar maior quantidade de água e íons entre o citoplasma e o lúmen, enquanto que a região basal apresenta invaginações perpendiculares à lâmina basal o que aumenta a absorção de água e íons presentes na hemolinfa para as células do túbulo (BRADLEY, 1985). Tanto o intestino quanto os túbulos de Malpighi sofrem

alterações morfológicas induzidas pelo tiametoxam pelo tiametoxam, como demonstrado pelo trabalho de Catae et al. (2014) para *A. mellifera*.

Figura 3: Esquema (A) e foto (B) das regiões do túbulo de Malpighi inserido no ventrículo. Ventrículo (V); Região proximal (P); Região mediana (M) e Região distal (D).



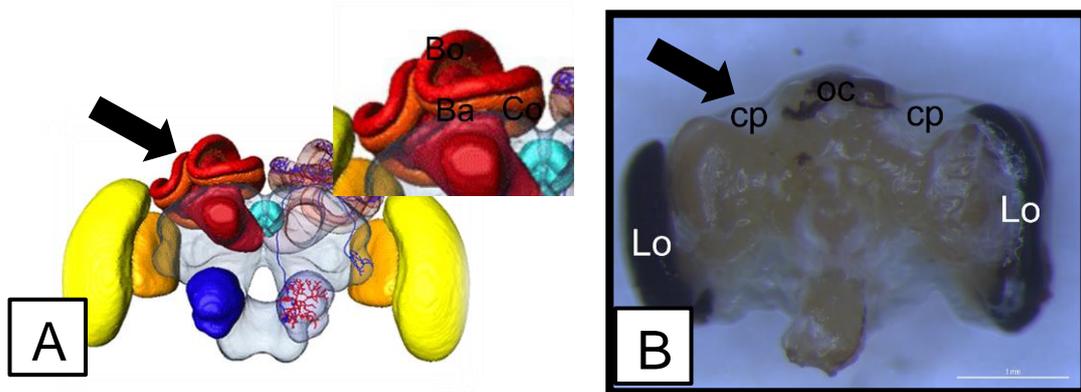
Fonte: Autoria própria.

Uma vez na hemolinfa, uma parcela do inseticida ingerido alcança o cérebro, órgão alvo da molécula, o qual é protegido pela barreira hematopoiética. O cérebro é o centro de associação dos insetos, ele recebe estímulos de órgãos sensoriais da cabeça e de partes posteriores do corpo por meio de interneurônios que compõe a cadeia nervosa ventral. Nas abelhas é composto por regiões que contém corpos celulares, que são chamadas de somata ou prolongamentos celulares, chamadas de neurópilas (CHAPMAN, 1998).

Ele é formado pela fusão de três gânglios, o tritocérebro, deutocérebro e protocérebro. É neste último que se encontram os lobos ópticos, uma estrutura que se apresenta em camadas devido à disposição das células e seus prolongamentos. Essa região é composta pela retina e por células fotorreceptoras e responsável pelo processamento visual, os lobos ópticos direito e esquerdo estão interligados pela ponte cerebral, formada por uma massa de neurópilas (RIBI et al., 2008). O proteocérebro também contém os corpos pedunculados (Figura 4), os centros mais importantes de processamento, aprendizagem e memória, distribuídos em dois pares com grande volume e grande quantidade de células e sinapses (CRUZ-LANDIN, 2009). Cada corpo pedunculado é constituído por uma neurópila em forma de cálice e preenchido por corpos celulares, chamados células de Kenyon (FARRIS, 2005; FAHRBACH, 2006; SOUZA, 2009). O

cálice é dividido em anéis de neurópila que ficam em torno dos corpos celulares, sendo eles os lábios, que formam a borda do cálice, o colar e o anel basal, que é o fundo do cálice de onde partem os pedúnculos (figura 4).

Figura 4: Esquema (A) e foto (B) do cérebro de abelha *M scutellaris*. A seta indica um dos dois pares de corpos pedunculados presentes na estrutura.



Fonte: www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain/ (RYBAK et al., 2010) (A). Autoria própria (B).

Devido a sua relação com a aprendizagem e memória em abelhas, os corpos pedunculados tem sido alvo de muitos estudos, como o desenvolvido por Rossi (2013) que observou um maior dano nessa estrutura em *A. mellifera* quando exposta ao imidacloprido em doses altas e por períodos mais longos. Existem estudos relacionando danos ao cérebro realizados com abelhas brasileiras, como o de Soares (2013) que observou a morte dos neurônios devido a exposição de indivíduos da espécie *Scaptotrigona postica* ao inseticida imidacloprido e Jacob et al. (2015) que utilizaram fipronil.

Os inseticidas neonicotinoides causam danos morfofisiológicos que são o reflexo das alterações celulares, assim, estudos em nível celular podem ser extremamente importantes para avaliar os efeitos tóxicos (MALASPINA E SILVA-ZACARIN, 2006) e como as células são impactadas (GREGORC E ELLIS, 2011). Um dos impactos observados pode ser a alteração na expressão de proteínas de choque térmico as HSPs (GREGORC A; ELIIS J. D. 2011).

As HSPs atuam, principalmente, na proteção e manutenção de processos celulares vitais, como transporte de proteínas para dentro dos compartimentos celulares como retículo endoplasmático e mitocôndria, dobramento de proteínas, impedimento da

agregação indesejável de proteínas, degradação de proteínas instáveis, controle de proteínas reguladoras, entre outras (MARIMOTO et al., 1994 e YOKOYAMA et al., 2000; GARRIDO et al., 2001; FRYDMAN, 2001; KREGEL, 2002). As HSPs também são usadas para fins de monitoramento do microambiente celular, uma vez que altos níveis de sua expressão tem a finalidade de proteger a célula e indicam presença de algum agente tóxico (BIERKENS J.G.E.A. 2000).

Elas são classificadas de acordo com sua massa molecular, HSP90, HSP70, HSP60, entre outras (GARRIDO et al., 2001). No caso da família HSP90, utilizada neste estudo, ainda não está definido se quais membros são anti-apoptóticas ou pro-apoptóticas, pois isso depende do estímulo que ocorre para o desencadeamento da morte celular (GARRIDO et al., 2001), pois ela está vinculada a diversas proteínas de sinalização, por isso podem gerar diversas respostas na célula (LINDQUIST S. 1988).

Quando o inseto é exposto a doses de inseticidas, a produção anti-apoptótica de HSP aumenta e isso pode impedir a morte celular. Caso a morte celular ocorra, haverá a quebra do DNA durante o processo, o que dará origem a extremidades 3'-OH, as quais são detectadas através da técnica de Tunel (SILVA-ZACARIN et al., 2006; TAVARES, 2015). Dessa forma o uso de técnicas que detectam variações na expressão de HSP e quebras na cadeia de DNA podem nos indicar quais os danos causados pelas doses subletais e qual a sua extensão. As informações obtidas podem nos permitir refletir sobre as doses utilizadas nas culturas e o real impacto que elas podem trazer a longo prazo e elaborar documentos para regulamentar a dose, o modo, o período e fora correta de utilização.

Devido à grande importância desses órgãos para a manutenção do indivíduo e da sua colônia e a escassez de estudos com a espécie *M. scutellaris*, principalmente ao nível celular, o objetivo desta pesquisa foi identificar os possíveis danos causados por nanodoses do inseticida tiamentoxam às células prismáticas do intestino, na região mediana dos túbulos de Malpighi e nos corpos pedunculados, traçando assim, uma linha metabólica.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha nativa *M. scutellaris*.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Acompanhar as alterações provocadas pelo inseticida ao longo do tempo através de técnica morfológica.
- 2- Analisar possível morte celular por quebra de DNA no intestino, túbulo de Malpighi e corpo pedunculado de *M. scutellaris* após exposição a doses subletais de tiametoxam.
- 3- Analisar a expressão de HSP90 no intestino, túbulo de Malpighi e corpos pedunculados de *M. scutellaris* após exposição a doses subletais de tiametoxam através do alimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Abelhas operárias campeiras da espécie *M. scutellaris* foram coletadas na entrada de 3 colônias, no meliponário da Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* de Rio Claro. As abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL (10 abelhas por pote/concentração) previamente furados para entrada de ar e com suprimento de alimento (solução de sacarose 50% v/v) (Figura 5). Os experimentos foram conduzidos em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) com temperatura a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura aproximada do interior do ninho de melíponas) e umidade relativa de 70% +- 5%, de acordo com o protocolo adaptado da OECD (1998b) estabelecido para a espécie *Apis mellifera*.

3.2 Exposição ao inseticida para análise morfológica e histoquímica

Os tempos de coleta e as concentrações de inseticida utilizadas para a produção do alimento contaminado foram baseados em trabalhos em andamento (Proteção de polinizadores: toxicidade do Tiametoxam para *M. scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – Processo Fapesp 2013/21833-0 – Lucas Miotelo), que foi de 1, 4, 8 e 24 horas após o início da ingestão de alimento, ad libidum, contaminado com doses de $CL_{50} = 0,0453 \text{ ng i.a./}\mu\text{L}$ dieta; $CL_{50/10} = 0,00453 \text{ ng i.a./}\mu\text{L}$ dieta e $CL_{50/100} = 0,000453 \text{ ng i.a./}\mu\text{L}$ dieta. Nos tempos de exposição citados foram coletados: ventrículo; túbulos de Malpighi e cérebro dos indivíduos.

Figura 5: Forrageiras de *M.scutellaris* se alimentando da solução de sacarose (50% água + açúcar v/v).



Fonte: Lourenço,2012

Para cada grupo/tempo do bioensaio e técnica, foram dissecadas 5 abelhas, que tiveram os órgãos propostos retirados, fixados em paraformoldeído tamponado a 4% por 24 horas e estabilizados em Tampão Fosfato de Sódio (PBS), pH 7,4 e 0,1 M também por 24 horas. Em seguida seguiu-se o protocolo padrão para inclusão em historesina Leica para análises morfológicas. As secções de 5 μ m de espessura obtidas em micrótomo (Leica) foram colocadas em lâminas histológicas, as quais passaram pela dupla coloração com Hematoxilina e Eosina, na mesma lâmina.

Os órgãos de outras 5 abelhas de cada grupo foram fixados em paraformoldeído 4% por 4 horas e em seguida foram colocados em PBS, na sequência foram incluídas em agarose do tipo II. As secções de 100 μ m de espessura obtidas em Vibrátomo (Leica) – Processo Fapesp 2012/13370-8 -, foram colocadas em lâminas Starfrost (Knittel Glass), as quais foram submetidas às técnicas de Tunel e HSP 90 e foram analisadas no microscópio confocal de varredura a laser (Leica).

3.3 Coloração pela Hematoxilina e Eosina

De acordo com o protocolo estabelecido por JUNQUEIRA; JUNQUEIRA (1983), as lâminas foram mergulhadas em água destilada por 1 minuto, coradas com hematoxilina aquosa por 10 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos, e com água corrente

por 1 minutos. Após estes procedimentos, foram coradas com eosina por 5 minutos e novamente lavadas com água corrente por 1 minutos. Posteriormente, foram secas e montadas em DPX, meio de montagem permanente. Após a secagem das lâminas, os cortes foram analisados e fotografados em foto-microscópio de luz Leica utilizando-se o programa DP Controller para aquisição das imagens.

3.4 Determinação de escore para quantificação de HE

A descrição e os valores estabelecidos para as alterações foram adaptados a partir do protocolo estabelecido por Bernet et al. (1999). Os fatores de impactos foram determinados com base na importância dos danos patológicos, de acordo com o grau em que a lesão afeta a função do órgão e a sobrevivência do indivíduo.

As alterações foram previamente classificadas em três graus de importância, sendo eles: grau 1 que representa uma lesão patológica mínima e facilmente reversível quando exposta a um agente tóxico; grau 2 que representa uma lesão moderada, a qual é possível a reversão na maioria dos casos, e grau 3 representa uma lesão grave, geralmente irreversível, que pode causar um dano parcial ou total no órgão analisado.

O grau de importância foi multiplicado pela frequência da alteração que foi de 0 a 6, baseada em 9 indivíduos sendo 3 da cada colônia, dos quais foram analisados 18 cortes não sequenciais (6 cortes de 3 diferentes lâminas) distintos. Dessa forma, 0 era não ocorrência, 2 simbolizava uma ocorrência leve, 4 era uma ocorrência moderada e 6 era uma frequência acentuada, todas as análises foram efetuadas em comparação ao controle. O valor final da multiplicação foi usado para o cálculo da estatística. Esse método gerou uma análise dos danos causados nos órgãos que incluem sua extensão, sua significância e sua importância patológica.

3.5 Método Tunel (*TUNEL - In situ Cell Death Detection Kit*)

Depois da retirada dos órgãos, os mesmos foram colocados em fixador (paraformaldeído 4%) por 4 horas e posteriormente em Tampão Fosfato de Sódio por até 7 dias. Em seguida as lâminas foram recobertas com solução de proteinase K (20 µg/mL em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, a temperatura ambiente e câmara úmida. Em seguida, lavadas em 4 banhos de PBS de 2 minutos cada.

Posteriormente foi colocado 50 µL da solução de Tunel, realizada de acordo com o protocolo do Kit, AP “In Situ Cell Death Detection” (Roche), sobre as secções histológicas tratadas, enquanto que a secção controle recebeu 50 µL da solução 1, que

contem no Kit, sem a enzima. As secções foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos a 37°C e posteriormente lavadas 3 vezes em PBS, 2 minutos cada troca. Em seguida as lâminas foram montadas com o meio de montagem Prolong Gold Prolong® Gold Antifade (Molecular Probes).

Para a realização desta técnica foram feitos controles positivo e negativo. No controle positivo foi adicionada a DNase, que tem a função de realizar a quebra do DNA, para que ocorra marcação. Neste controle, a DNase é adicionada e o protocolo normal no Tunel é seguido com as aplicações dos anticorpos. Já no controle negativo é adicionado apenas o anticorpo sem a enzima, pois dessa forma testaríamos o Kit para verificar sua viabilidade e funcionalidade.

A marcação foi visualizada no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5) e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF. Todas as fotos adquiridas para o intestino foram realizadas com os mesmos parâmetros, sendo eles Smart Gain: 910.0 V; Smart Offset: 1.0%; Pinhole: 67.97 µm; Line: 8; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400Hz; Lazer 14% Satndy; Number of steps: 5 e Z-size = 20 µm.

Já para os túbulos de Malpighi e para o cérebro os parâmetros foram: Smart Gain: 910.0 V; Smart Offset: 1.0%; Pinhole: 67.97µm; Line: 8; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400Hz; Lazer 14% Satndy e Number of steps: 1.

3.6 Marcação de HSP90

Os órgãos foram colocados em fixador (paraformaldeído 4%) por 4 horas e posteriormente em Tampão Fosfato de Sódio por até 7 dias. Em seguida foram permeabilizados com Triton X-100 a 0,5% por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois passaram por 4 banhos de PBS de 2 minutos e foram incubados em solução com o anticorpo primário anti-HSP 90 monoclonal (Invitrogen), diluído em PBS (1:100), incubados durante a noite a 4° C e mantidos 1 hora a 37° C, ambos em câmara úmida. As secções foram lavadas 3 vezes em PBS, incubadas com anticorpo secundário conjugado com Cy5 diluído em PBS (1:500) por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes de 5 minutos cada com PBS. Para finalizar, as lâminas foram montadas com o meio de montagem Prolong® Gold Antifade (Molecular Probes). Para a realização desta técnica foi feito controle negativo, no qual houve apenas aplicação do anticorpo secundário.

A análise da marcação foi realizada no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5) e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF.

A marcação foi visualizada no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5) e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF. Todas as fotos adquiridas para o intestino foram realizadas com os mesmos parâmetros, sendo eles Smart Gain: 910.0 V; Smart Offset: 1.0%; Pinhole: 67.97 μm ; Line: 8; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400Hz; Lazer 14% Standby; Number of steps: 5 e Z-size = 20 μm .

Já para os túbulos de Malpighi e para o cérebro os parâmetros foram: Smart Gain: 910.0 V; Smart Offset: 1.0%; Pinhole: 67.97 μm ; Line: 8; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400Hz; Lazer 14% Standby e Number of steps: 1.

3.7 Análise estatística

Para a técnica de morfologia os valores gerados após o cálculo da multiplicação do escore com a frequência de ocorrência foram submetidos a análise estatística comparativa, utilizando o teste Tukey. Para as técnicas de imunistoquímicas os valores submetidos a análise estatística foram gerados pelo próprio programa de captura das imagens, o LAS AF Lite.

Os valores analisados foram gerados por 3 ROIs (áreas demarcadas) em cada imagem, sendo que seu tamanho foi de 100 μm x 100 μm para o intestino; 100 μm x 80 μm . para os túbulos de Malpighi e 20 μm x 20 μm para o cérebro, devido aos diferentes tamanhos dos órgãos. Para cada concentração foram analisados 9 indivíduos, e para cada um deles foram fotografadas 3 regiões do órgão, dos quais, em cada região foram analisados 3 ROIs. A estatística foi gerada utilizando os escores obtidos a partir da análise de todas as alterações juntas, para que assim possamos ter um panorama geral da concentração e do tempo de exposição que causa maior dano.

Para ambas as técnicas os valores foram submetidos a testes estatísticos realizados pelo programa Sigma Plot13. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Quando os valores eram normais foram submetidos ao método de Holm-Sidak,

porém quando os valores não passavam no teste de normalidade eram submetidos ao teste Tukey.

As análises foram feitas seguindo duas linhas de comparação: 1) comparamos as diferentes concentrações dentro do mesmo tempo e 2) comparamos os diferentes tempos para a mesma concentração, incluindo o controle. A partir desses resultados foram gerados os boxplots para todas as comparações que deram diferença significativa entre si, ou seja, $p < 0,05$. As comparações que não foram estatisticamente significantes não estão sendo apresentadas nos boxplots.

4. RESULTADOS

4.1 Atribuição dos escores

Para cada alteração morfológica identificada foi atribuído um determinado escore (quadros 1, 3 e 5) de acordo com a severidade e reversibilidade do dano que a alteração poderia vir a causar nas três estruturas analisadas.

Em seguida os valores atribuídos foram multiplicados pela frequência com a qual cada alteração foi observada (quadros 2, 4 e 6) em cada indivíduo, sendo que foram analisados 9 indivíduos de cada concentração.

Quadro 1: Escore estabelecido para as alterações nas células do intestino.

FREQUENCIA DAS ALTERAÇÕES NAS CÉLULAS DO INTESTINO	ESCORE
Aumento da secreção apócrina	1
Aumento da eliminação de células	1
Esferocristais	1
Alteração no Bordo em escova	2
Vacuolização / perda de material citoplasmático	2
Picnose	3
Perda dos ninhos de células regenerativas	3

Exemplo do cálculo:

Para o tempo de 1 hora foram analisados 9 indivíduos do controle. A alteração observada foi eliminação de células. Para os três indivíduos da primeira colônia não foi observada ocorrência da alteração, portanto a média dos três, deu o valor de frequência 0, para os três indivíduos da segunda colônia também não foi observado, repetindo o 0, já para os três indivíduos da terceira colônia, houve ocorrência, porém, observada em baixa frequência, dessa forma, tirando a média dos três indivíduos, o valor atribuído foi 2.

Em seguida esses 3 valores foram multiplicados pelo escore dessa alteração, que é 1.

Quadro 2: Escore estabelecido para as alterações nos túbulos de Malpighi

ALTERAÇÃO NOS TÚBULOS DE MALPIGHI	ESCORE
Secreção apócrina	1
Aumento de eliminação de células	1
Esferocristais	1
Presença/altura do bordo em escova	2
Perda de material citoplasmático	2
Picnose	3

Quadro 3: Escore estabelecido para as alterações nos corpos pedunculados.

ALTERAÇÃO NOS CORPOS PEDUNCULADOS	ESCORE
Picnose	3
Perda de contato celular	3

4.2 Alterações morfológicas

Para as análises estatísticas das alterações na morfologia dos três órgãos estudados foram encontradas diferenças significativas apenas quando comparamos as diferentes concentrações dentro de um mesmo tempo, já para a comparação entre os tempos para cada uma das concentrações, incluindo o controle, não foram encontradas diferenças significativas.

Para o intestino médio as principais alterações morfológicas observadas foram eliminação de células para o lúmen (figura 6C), perda de material citoplasmático (figura 6B e 6D), condensação cromatínica, aumento da secreção apócrina (figura 6E e 6F), perda dos ninhos de células regenerativas e perda da borda em escova (figura 6B e 6C). Nota-se que essas se intensificam de acordo com o aumento da concentração de tiametoxam a qual as abelhas foram expostas (gráfico 1).

As análises estatísticas das alterações morfológicas mostraram que houve diferença significativa em todos os tempos analisados, sendo que para os tempos de 1, 4 e 24 horas (gráfico 1A, 1B e 1D) a diferença ocorreu quando comparamos a CL₅₀ com todas as outras concentrações as quais os indivíduos foram expostos, inclusive o controle. Já para o tempo de 8 horas (gráfico 1C) a diferença significativa ocorreu quando comparamos controle e CL_{50/100} com CL_{50/10} e CL₅₀ (gráfico 1).

Figura 6: Intestino de *M. scutellaris* nas condições experimentais tratado com tiametoxam. Controle 24 horas 40x (A); CL₅₀ por 24 horas 40x (B); CL_{50/10} por 8 horas 40x (C) e CL_{50/10} por 8 horas 100x (D); CL₅₀ 24 por horas 100x (E) e CL₅₀ por 24 horas 100x (F). Coloração Hematxilina e Eosina. (ce) Célula eliminada, (ep) epitélio, (L) Lúmen, (m) membrana basal, (n) núcleo, (be) Borda em escova, (pbe) perda da borda em escova, (nCr) ninho de Células regenerativas e (sa) secreção apócrina. A seta indica perda de material citoplasmático.

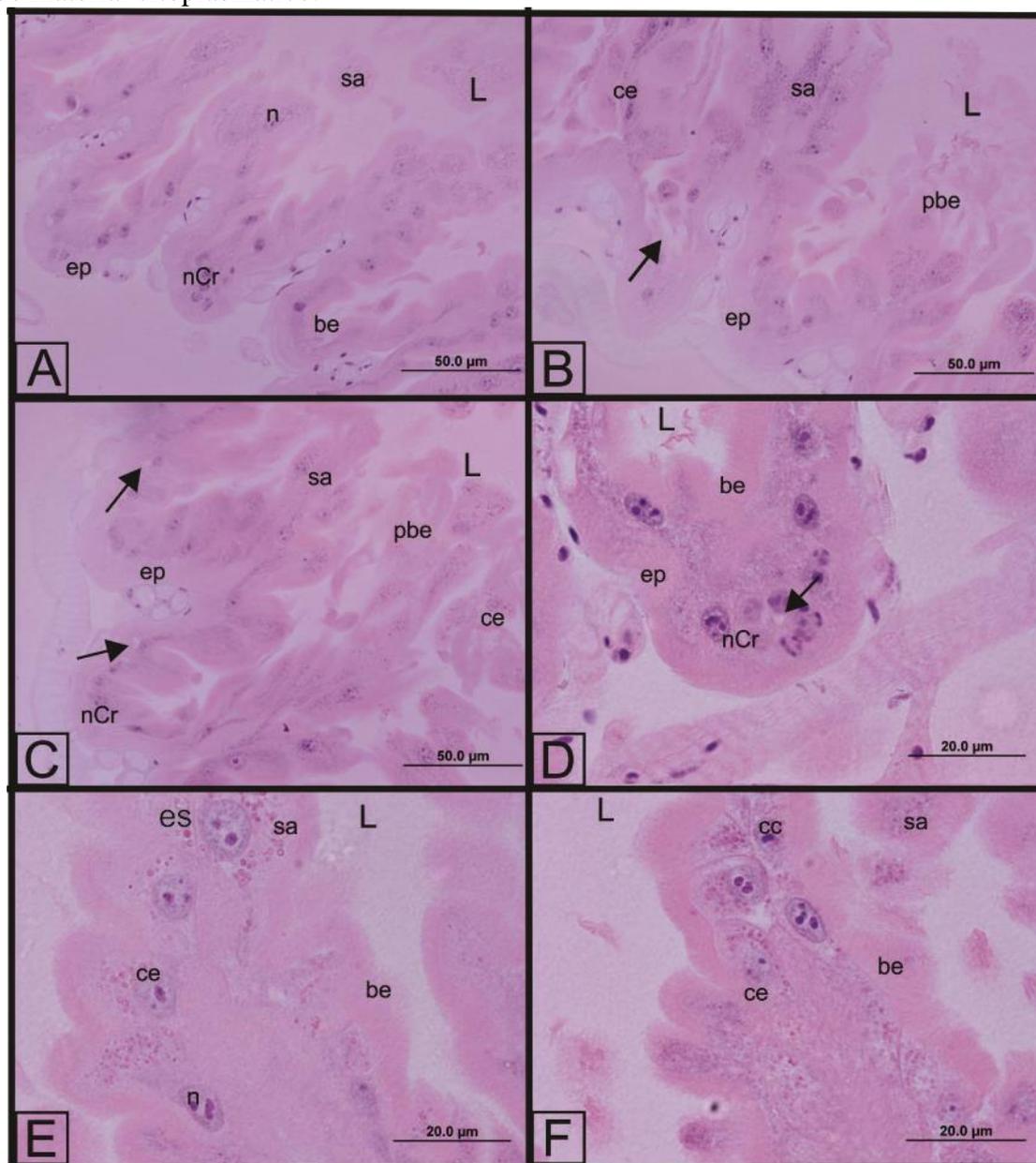
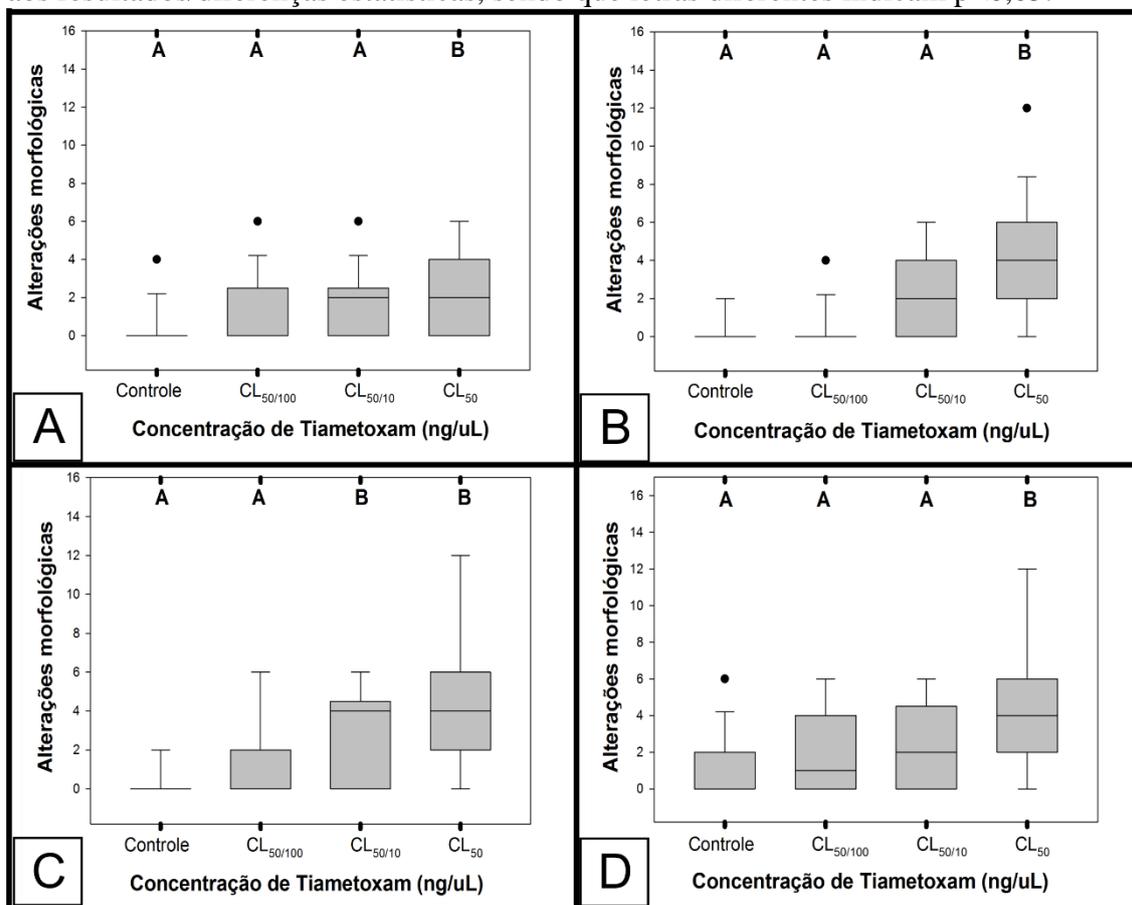


Gráfico 1: alterações morfológicas de acordo com o aumento da concentração, no intestino de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. 1 hora (A); 4 horas (B); 8 horas (C) e 24 horas (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



Os túbulos de Malpighi também sofreram alterações com a exposição a subdoses do tiametoxam, como núcleos deslocados para a periferia do órgão (figura 7D e 7F) com indícios de picnose, perda de material citoplasmático (figura 7C) e células eliminadas para o lúmen (figura 7F).

De acordo com as análises estatísticas realizadas nos resultados dos túbulos de Malpighi podemos constatar que para os tempos de 1 e 4 horas (gráfico 2A e 2B) houve diferença significativa apenas entre a CL₅₀ e as demais concentrações, incluindo o controle. Já para os tempos de 8 e 24 horas (gráfico 2C e 2D) foi possível observar uma diferença significativa a partir da CL_{50/10} em relação ao controle e a CL_{50/100}.

Figura 7: Túbulos de Malpighi de *M. scutellaris* nas condições experimentais controle 40x (A); CL₅₀ por 24 horas 100x (B); CL_{50/10} por 8 horas 40x (C) e CL_{50/10} por 8 horas 40x (D); CL₅₀ 24 por horas 100x (E) e CL₅₀ por 24 horas 100x (F). Coloração Hematoxilina e eosina. (Ce) Célula eliminada, (ep) epitélio, (sa) secreção apócrina, (pbe) perda da borda em escova, (n) núcleo, (m) membrana e (L) Lúmen. As setas indicam perda de material citoplasmático e os círculos indicam núcleos na periferia do órgão.

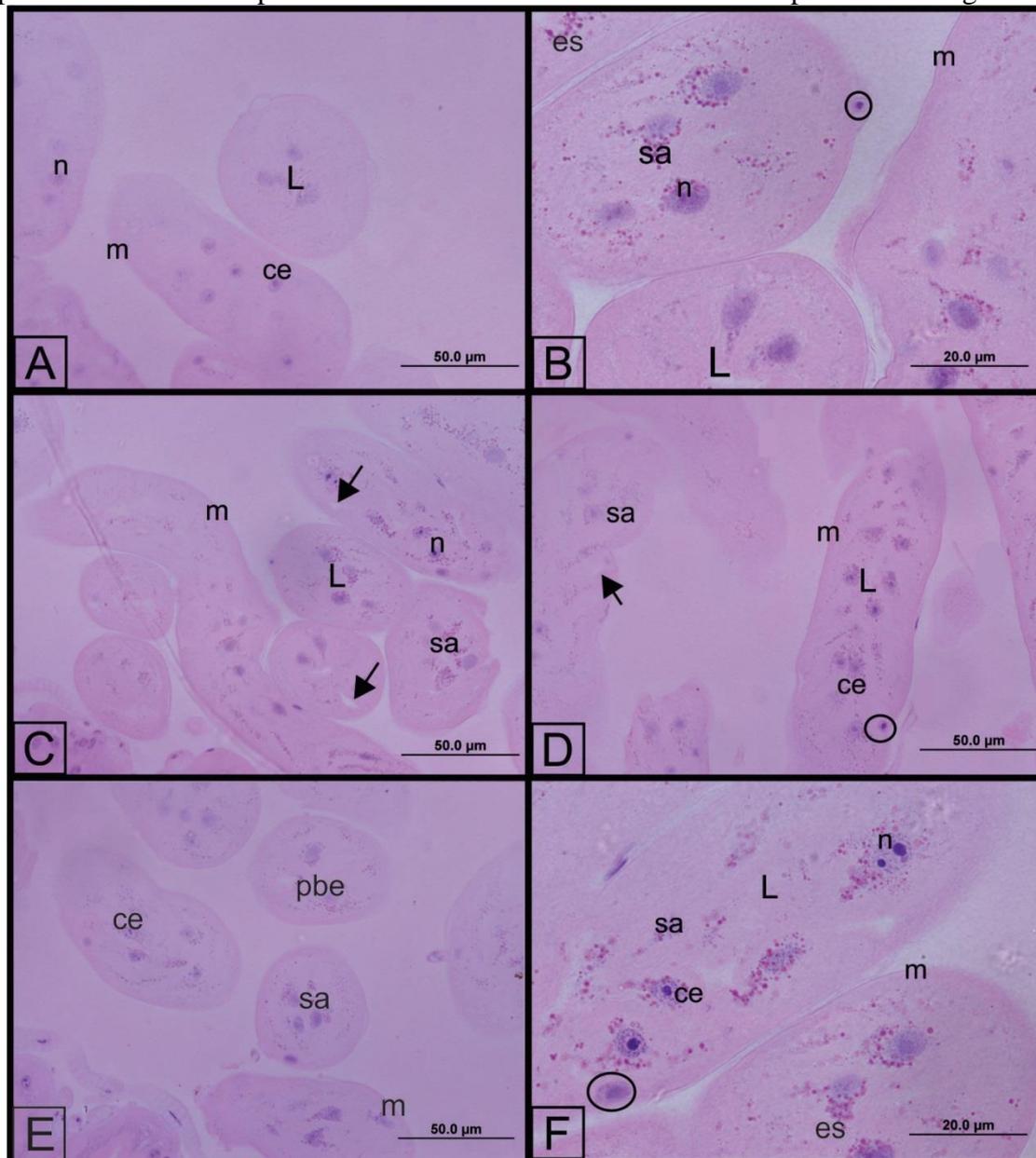
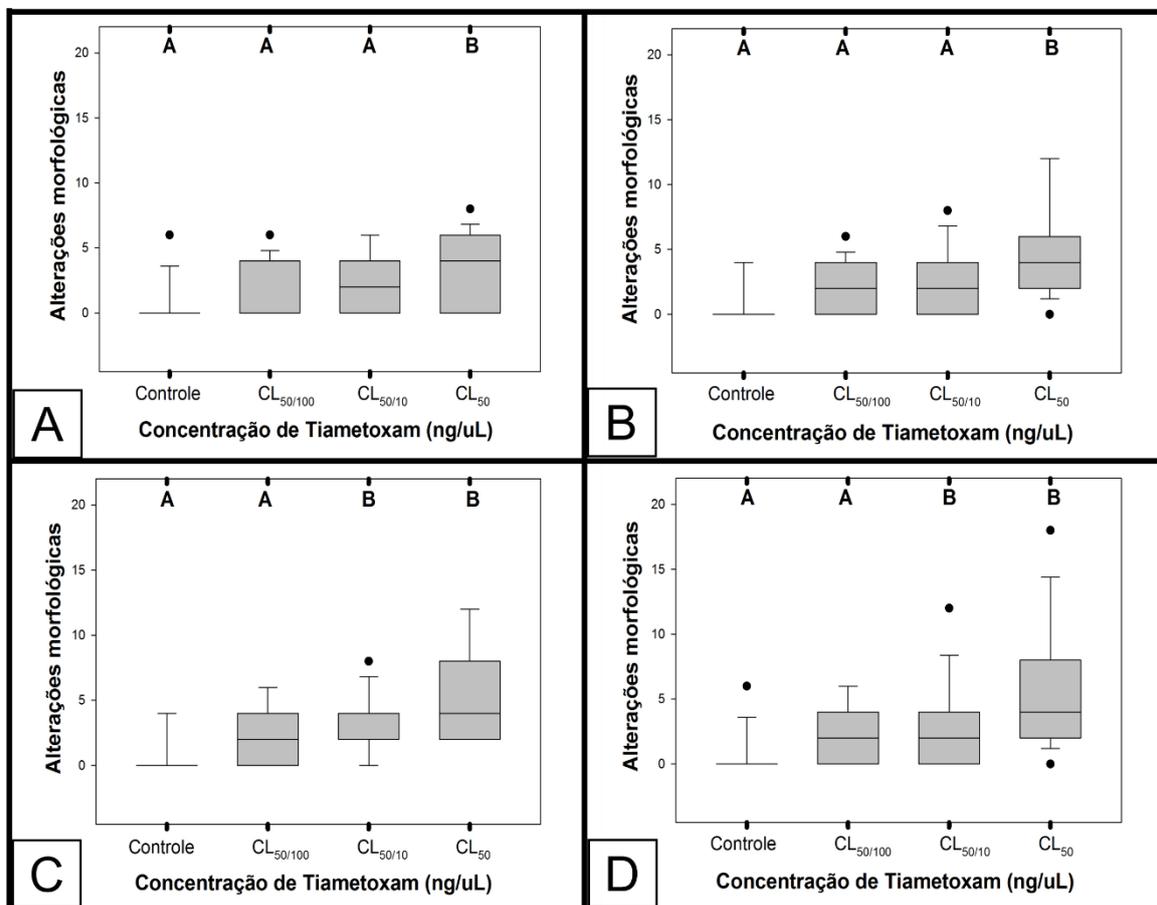


Gráfico 2: Alterações morfológicas de acordo com o aumento da concentração, nos túbulos de Malpighi, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. 1 hora (A); 4 horas (B); 8 horas (C) e 24 horas (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



Nos corpos pedunculados, as alterações observadas foram núcleos fortemente corados (figura 8) e espaçamento entre as células de Kenyon (figura 8). Segundo as análises estatísticas realizadas para os resultados obtidos no cérebro, não houve diferença significativa entre nenhuma das concentrações para os tempos de 1, 4 e 8 horas (gráfico 3A, 3B e 3C). A diferença significativa ocorreu apenas quando analisamos os indivíduos expostos a 24 horas (gráfico 3D) e se deu entre a CL_{50} e as demais concentrações incluindo o controle.

Figura 8: Cérebro de *M. scutellaris* nas condições experimentais controle 40x (A); Controle 100x (B); CL_{50/10} por 8 horas 40x (C) e CL_{50/10} por 8 horas 100x (D); CL₅₀ 24 por horas 40x (E) e CL₅₀ por 24 horas 100x (F). Coloração Hematoxilina e eosina. Colar (Co); Borda (Bo); Base (Ba); células de Kenyon (CK); células de Kenyon compactas (CKc) e células de Kenyon não compactas (CKn). As setas indicam espaçamento entre as células de kenyon e a cabeça da seta indica núcleos com cromatina condensada.

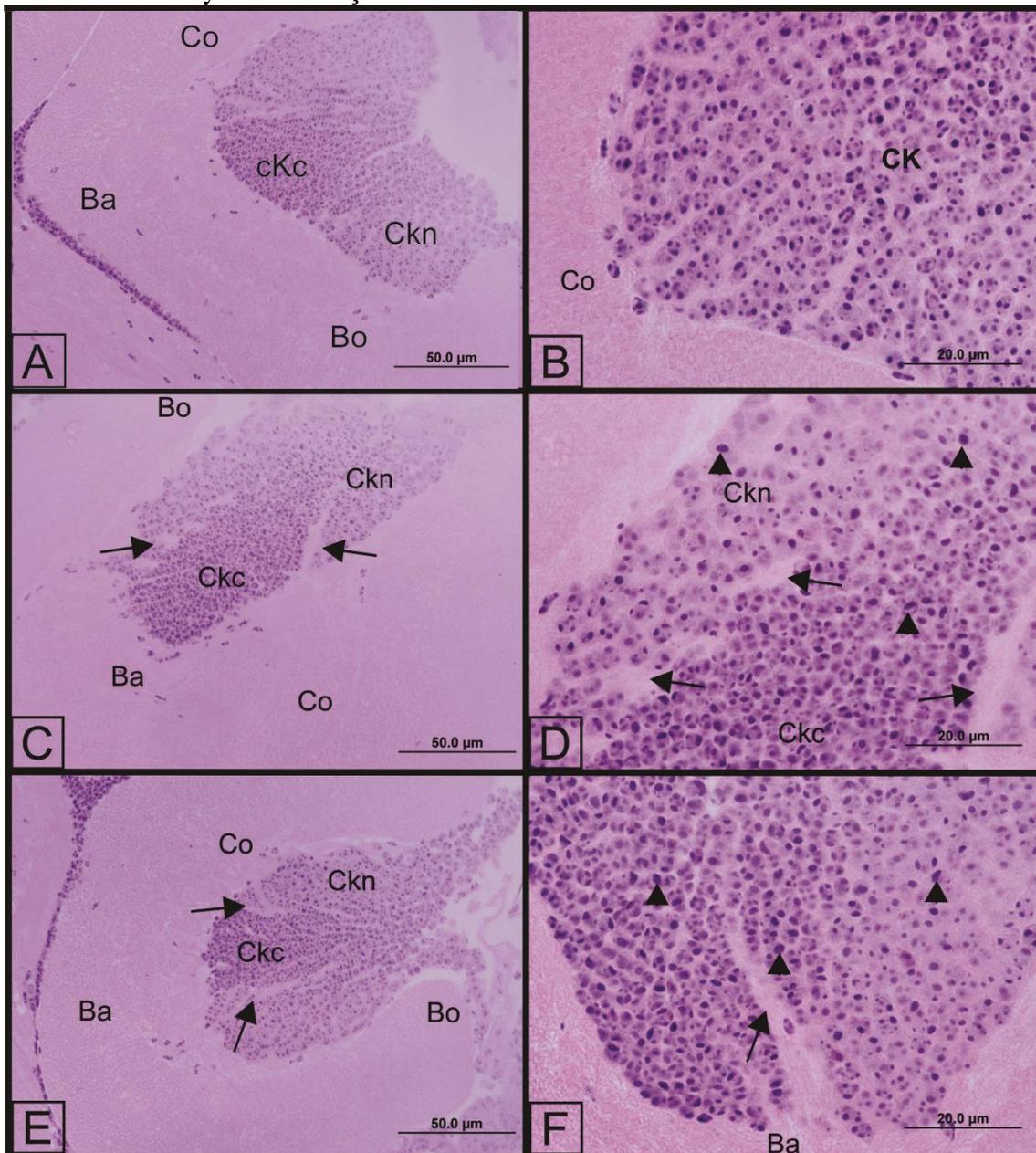
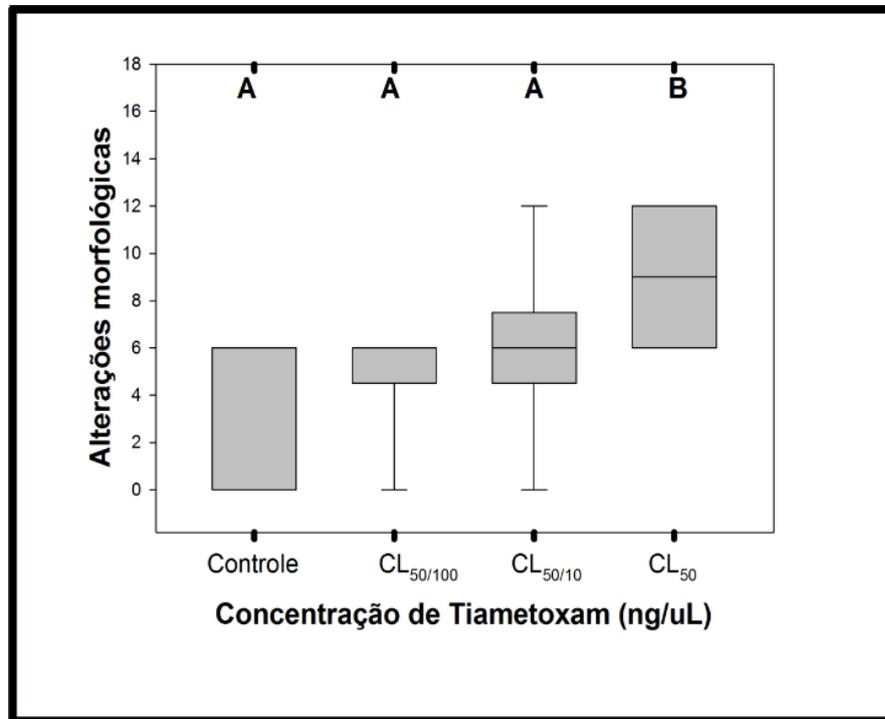


Gráfico 3: Média alterações morfológicas de acordo com o aumento da concentração, nos corpos pedunculados, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam por 24 horas. As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



4.3 Imunomarcção pelos métodos de Tunel e de HSP90

A marcação pelo método de Tunel mostrou-se negativa para os três órgãos avaliados, indicando possível ausência de morte celular por quebra de DNA (figura 9, 10 e 11). Porém a técnica foi considerada válida, uma vez que os controles negativos e positivos reagiram da forma esperada, ou seja, o controle positivo (figura 9A, 10A e 11A) apresentou marcação, ao contrário do controle negativo (figura 9B, 10B e 11B).

Figura 9: Intestino de *M. scutellaris* com aplicação da técnica de TUNEL. Controle Positivo (A); Controle negativo (B). Lúmen (L); Células eliminadas para o lúmen (Ce); epitélio (ep) e seta preenchida indica ninhos de células regenerativas.

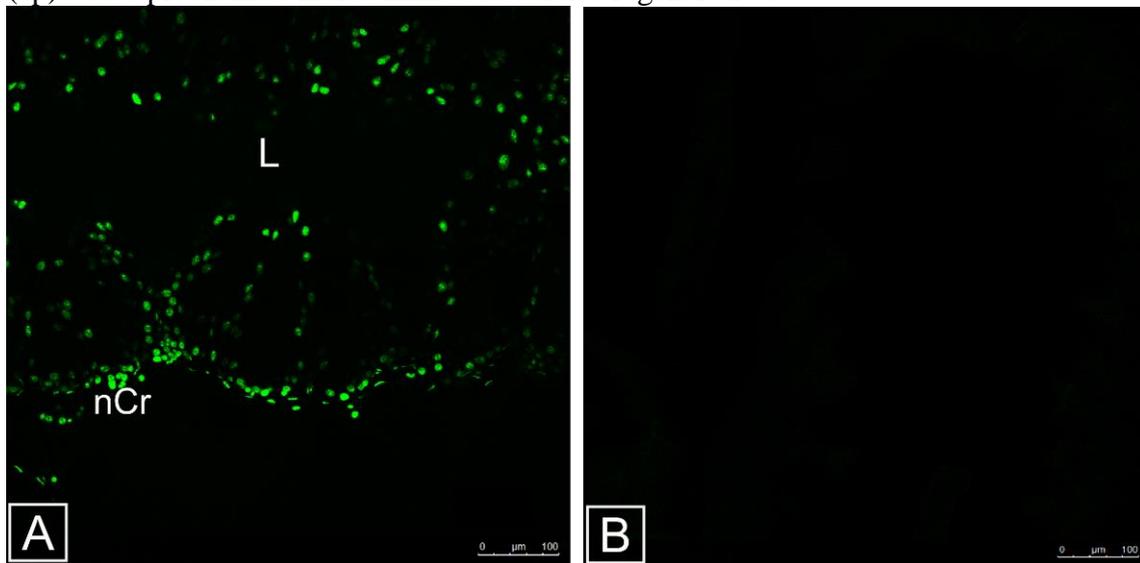


Figura 10: Túbulos de Malpighi de *M. scutellaris* com aplicação da técnica de TUNEL. Controle Positivo (A); Controle negativo (B). Lúmen (L) e membrana (m).

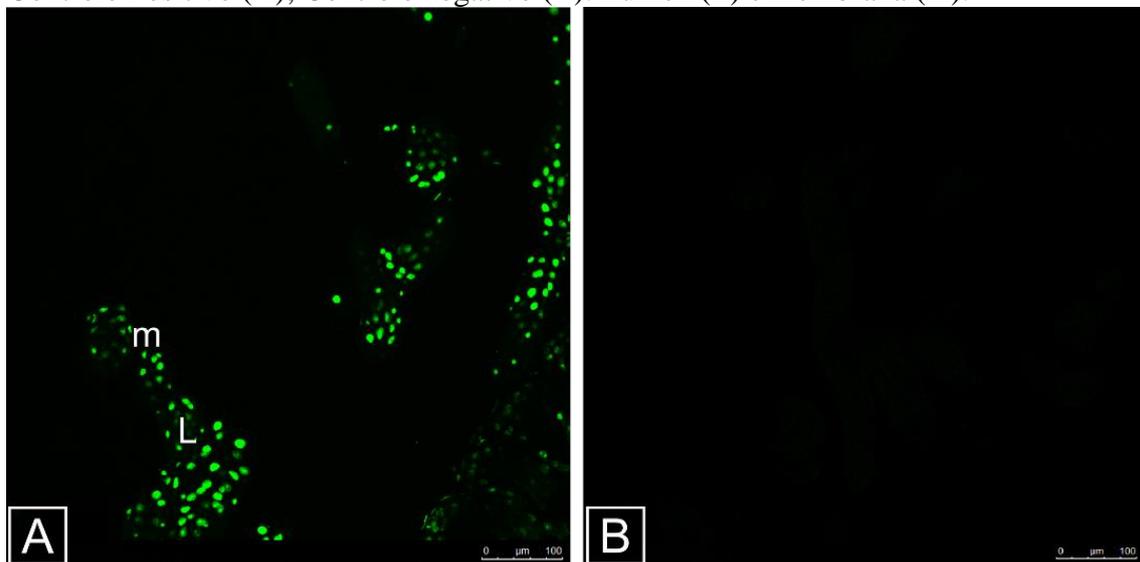
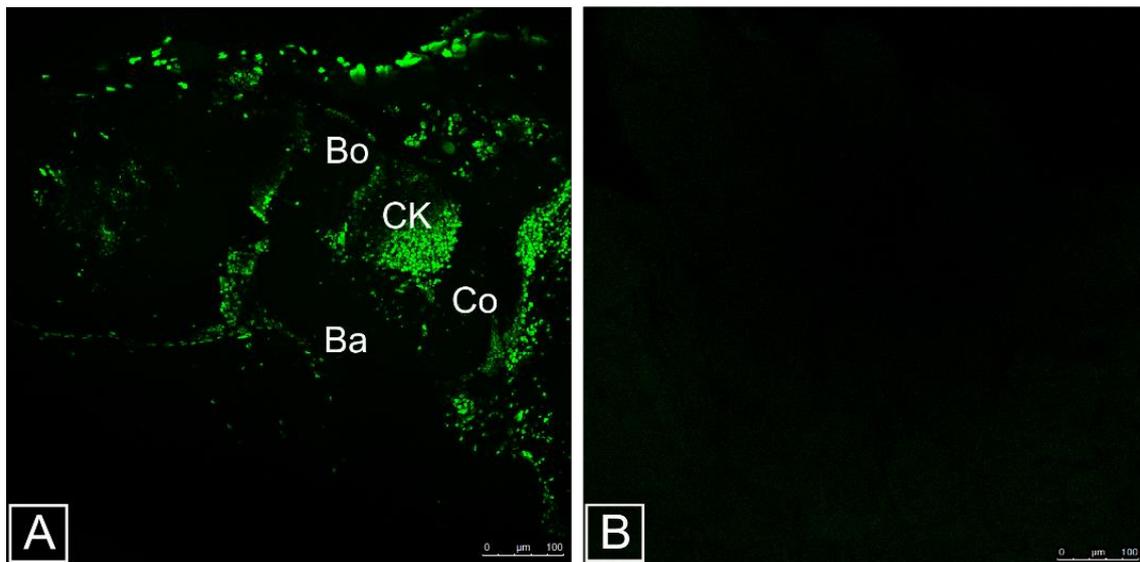


Figura 11: Corpo pedunculado (cp) de *M. scutellaris* com aplicação da técnica de Tunel. Controle Positivo (A); Controle negativo (B). Colar do cálice (c); anel do cálice (a); borda do cálice (b) e células somáticas (a).



A marcação por meio da técnica de HSP90 apresentou variações entre os tempos e concentrações.

Para o intestino, a imunomarcação de HSP90 mostrou que para todos os tempos houve diferença estatística entre determinadas concentrações (gráfico 4). Para 1 e 4 horas (gráfico 4A e 4B), a quantidade de HSP90 nos intestinos foi significativamente menor quando estes entraram em contato com a concentração de $CL_{50/100}$ e foram maiores para as concentrações $CL_{50/10}$ e CL_{50} , quando comparado ao controle. Comparando-se com o grupo controle, em 8 horas a imunomarcação de HSP90 aumentou para a concentração $CL_{50/100}$, enquanto que em 24 horas tanto a $CL_{50/100}$ quanto a $CL_{50/10}$ apresentaram aumento dessa família.

Quando analisamos as comparações realizadas entre os tempos para as mesmas concentrações podemos observar que existe uma tendência de queda na expressão de HSP90 com o aumento do tempo, tanto para o controle (gráfico 5A) quanto para a $CL_{50/100}$ (gráfico 5B). Já nas concentrações mais altas, essa tendência sofre uma leve alteração uma vez que para a concentração de $CL_{50/10}$ (gráfico 5C) a expressão dessa proteína de choque térmico aumenta em 24h. Já para a concentração de CL_{50} (gráfico 5D) ela se mantém alta nos tempos de 1 e 4 horas em relação aos tempos de 8 e 24 horas.

Figura 12: Intestino de *M. scutellaris* nas condições experimentais controle 4 horas (A); Controle negativo 24 horas (B); CL_{50/10} por 1 hora (C) e CL_{50/10} por 4 horas (D); CL₅₀ por 8 horas (E) e CL₅₀ por 24 horas (F). Técnica de HSP90. (Ce) Célula eliminada; (n) núcleo e (L) Lúmen. As setas indicam imunomarcação.

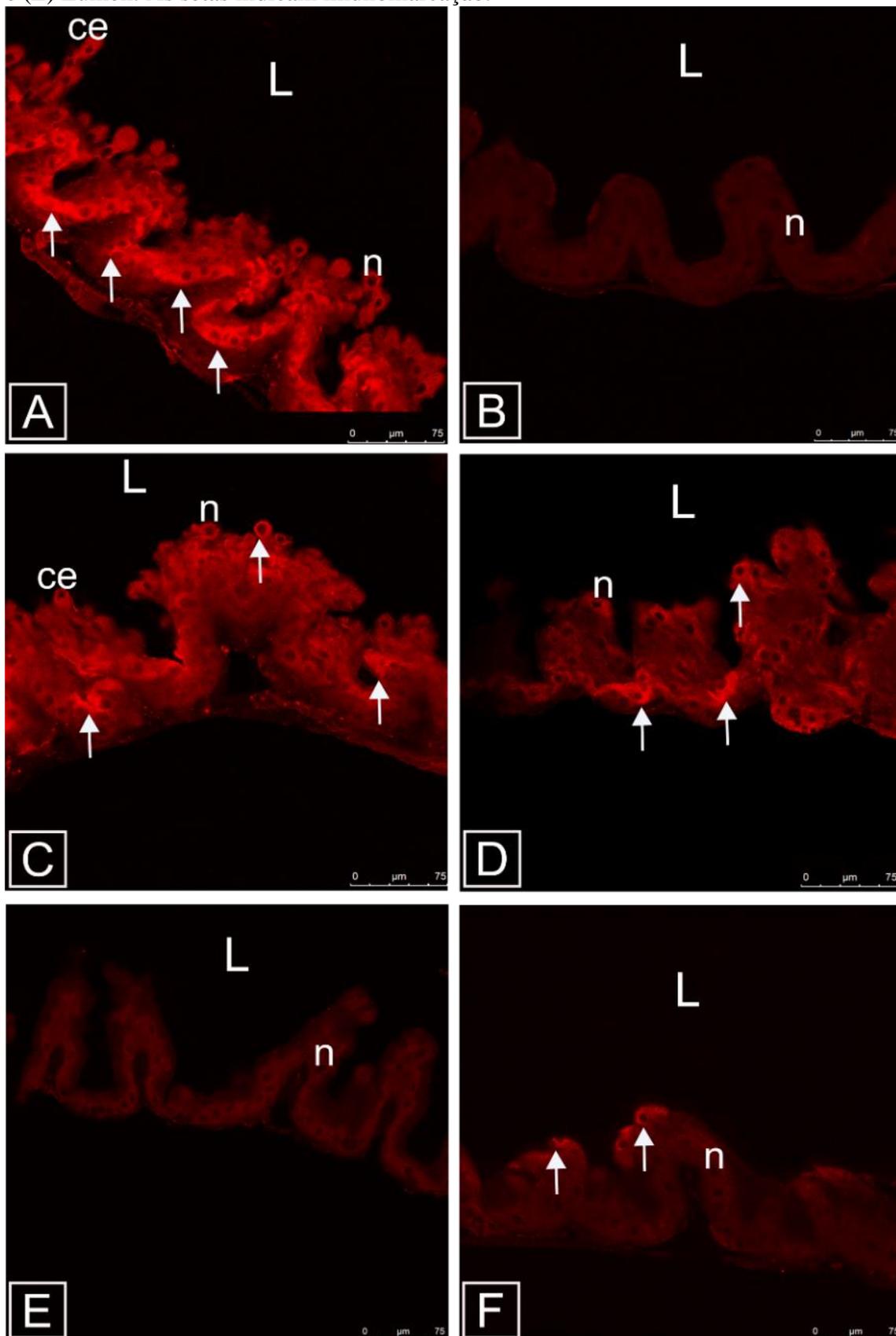


Gráfico 4: expressão de HSP90 entre as concentrações, no intestino de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. 1 hora (A); 4 horas (B); 8 horas (C) e 24 horas (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.

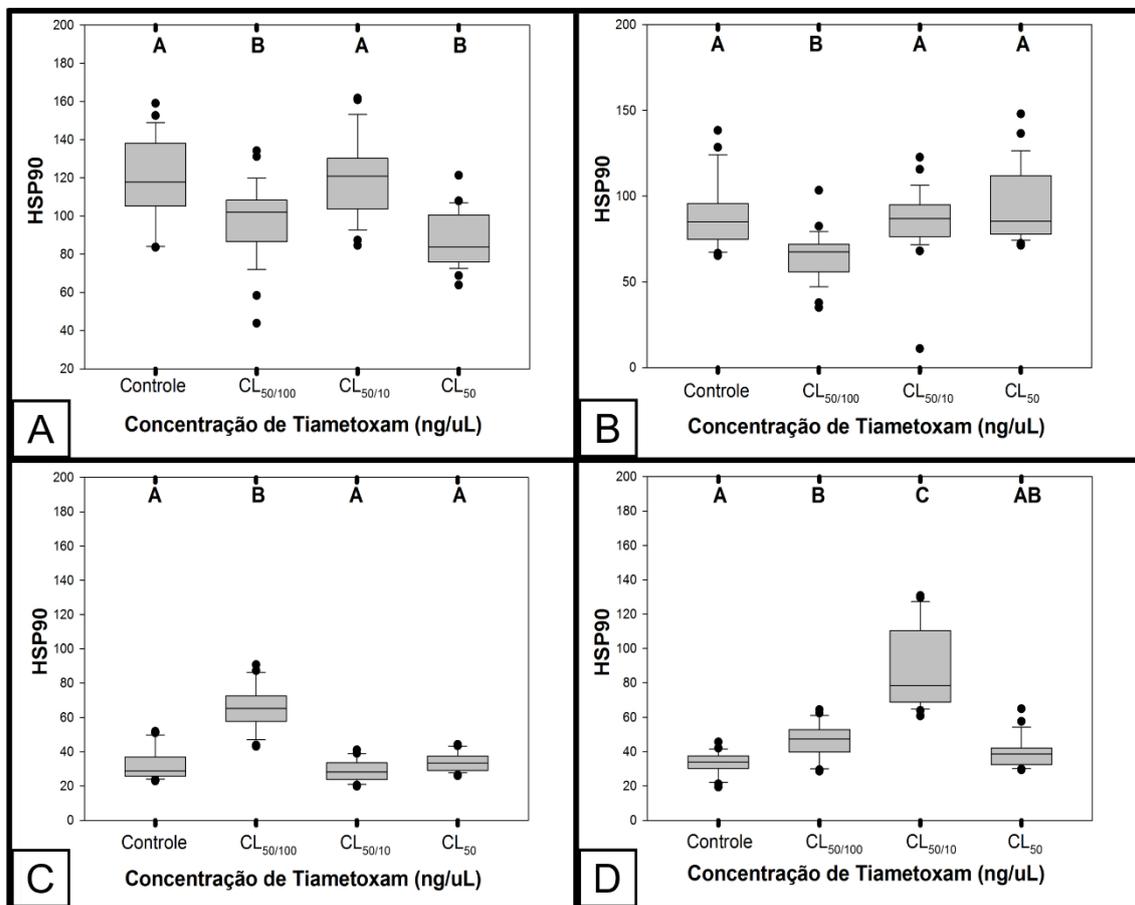
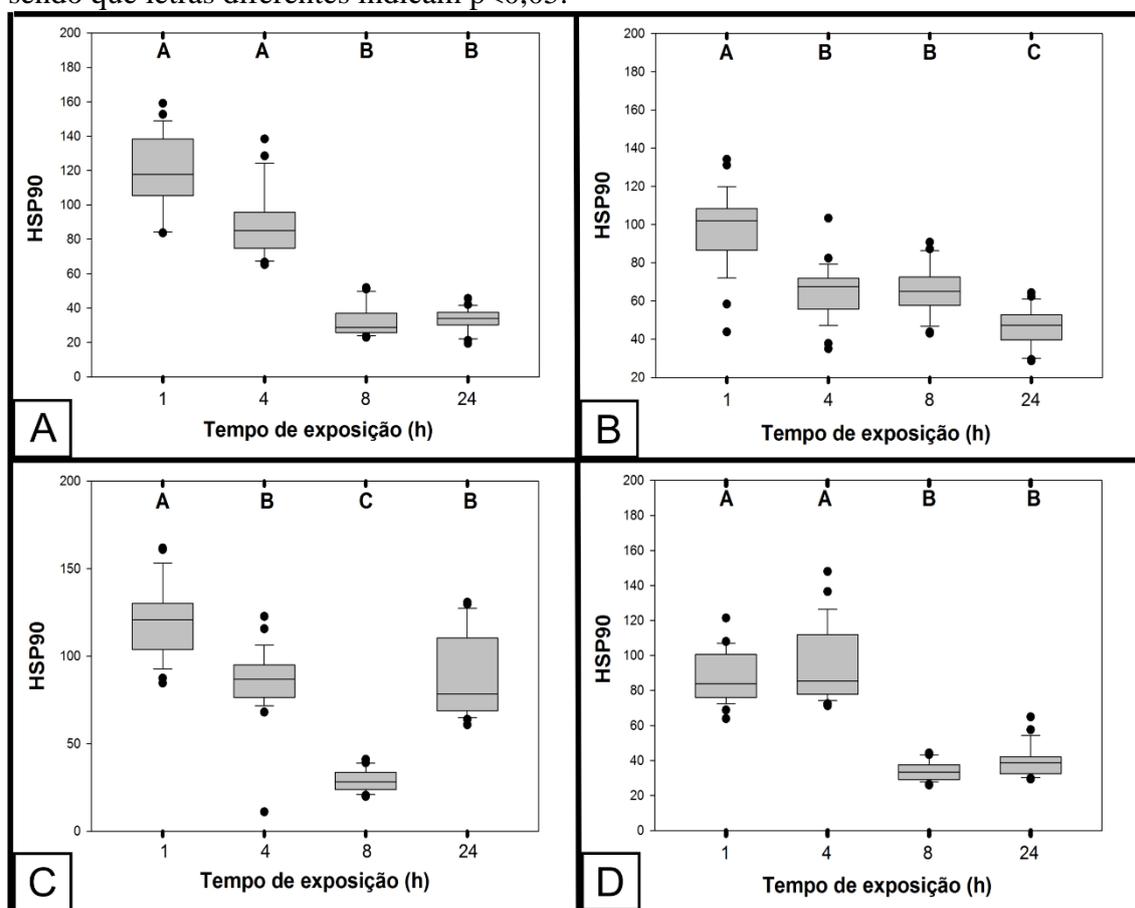


Gráfico 5: expressão de HSP90 ao longo do tempo no intestino de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. Controle (A); CL_{50/100} (B); CL_{50/10} (C) e CL₅₀ (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



Para os túbulos de Malpighi, quando analisamos as diferenças estatísticas obtidas nas comparações entre as diferentes concentrações dentro de um mesmo tempo, podemos observar que para o tempo de 1 hora (gráfico 6A) houve diferença significativa, já para o tempo de 4 horas (gráfico 6B) a mesma não ocorreu. Quando analisamos o tempo de 8 horas (gráfico 6C) é possível observar que houve uma diferença estatística da CL_{50/100} em relação as demais concentrações e para o tempo de 24 horas (gráfico 6D) a diferença entre as concentrações se evidenciou, sendo que a expressão de HSP90 foi maior na concentração de CL_{50/10} e teve uma queda na CL₅₀, que ficou, estatisticamente semelhante ao controle.

Quando comparamos os diferentes tempos dentro da mesma concentração, foi possível observar que no grupo controle (gráfico 7A) houve uma queda na expressão de HSP90 com o passar do tempo, já no grupo CL_{50/100} (gráfico 7B) não encontramos diferença significativa entre os tempos. A partir do grupo CL_{50/10} (gráfico 7C) um dos

tempos sofre um aumento, como é o caso de 24 horas para CL_{50/10} e de 4 horas para CL₅₀ (gráfico 7D).

Figura 13: Túbulos de Malpighi de *M. scutellaris* nas condições experimentais controle 4 horas (A); Controle negativo 24 horas (B); CL_{50/10} por 1 hora (C) e CL_{50/10} por 4 horas (D); CL₅₀ por 8 horas (E) e CL₅₀ por 24 horas (F). Técnica de HSP90. (n) núcleo; (m) membrana e (L) Lúmen. As setas indicam imunomarcação.

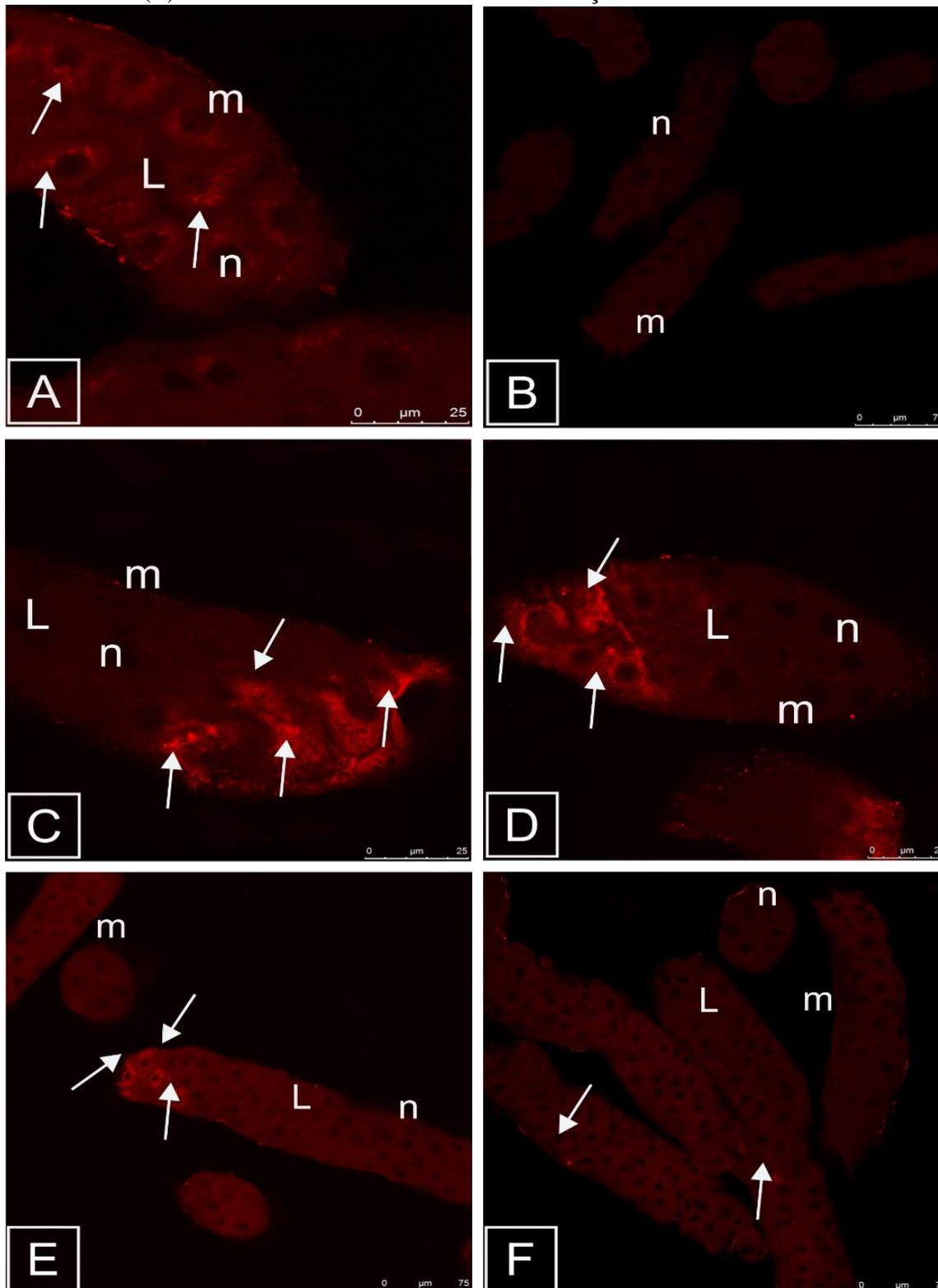


Gráfico 6: expressão de HSP90 entre as concentrações, nos túbulos de Malpighi, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. 1 hora (A); 4 horas (B); 8 horas (C) e 24 horas (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.

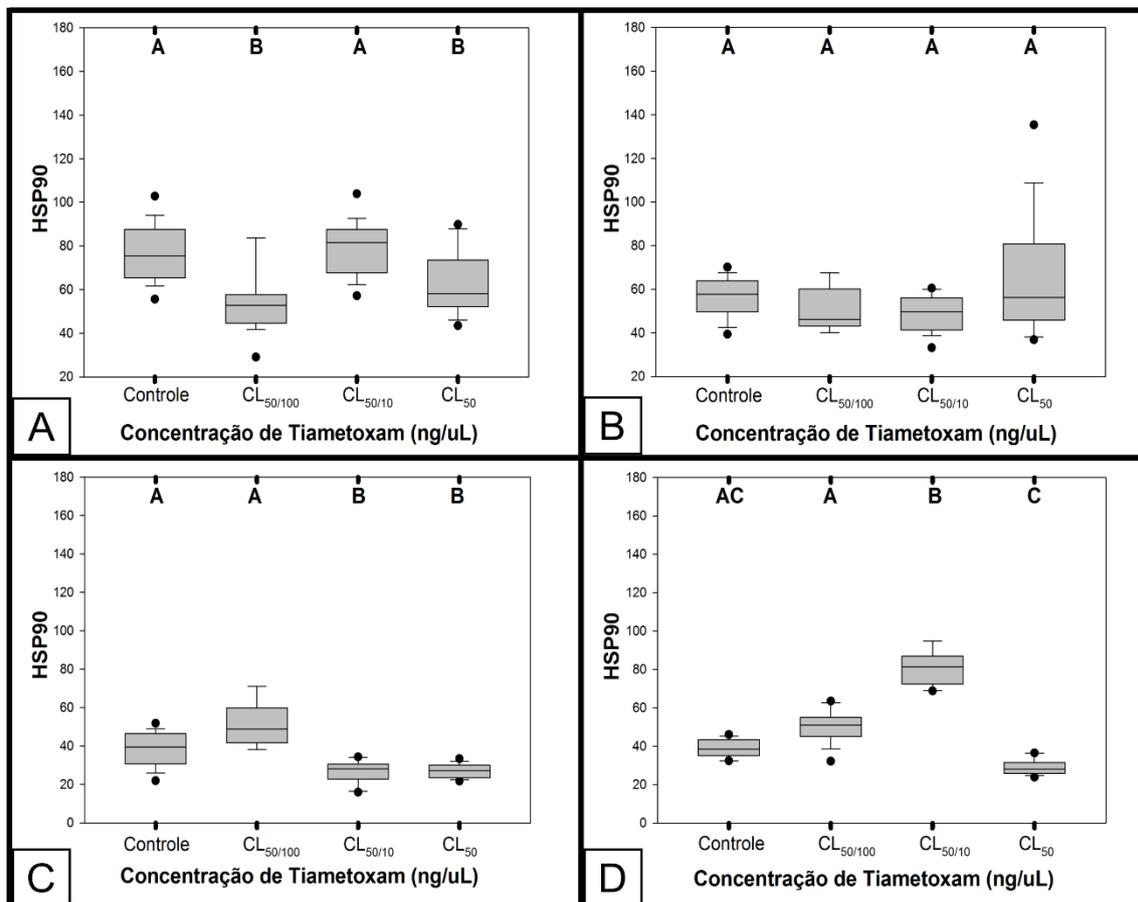
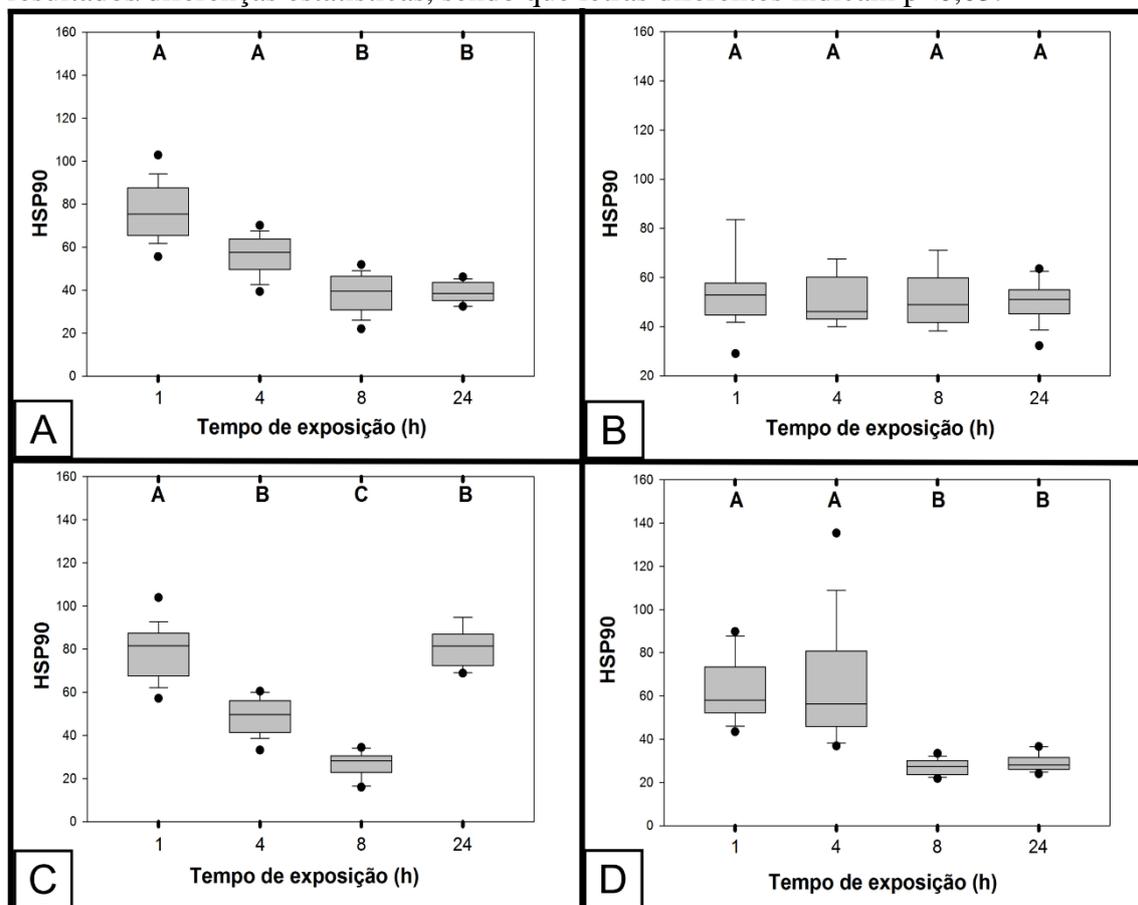


Gráfico 7: expressão de HSP90 ao longo do tempo, nos túbulos de Malpighi, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. Controle (A); CL_{50/100} (B); CL_{50/10} (C) e CL₅₀ (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



Segundo as análises estatísticas da imunomarcção de HSP90 para o cérebro, nos tempos de 1, 4 e 8 horas (gráfico 8A, 8B e 8C) as diferenças estatísticas foram observadas entre as concentrações. Já para o tempo de 24 horas (gráfico 8D) o grupo controle e a CL₅₀ foram estatisticamente iguais e mais elevados que as concentrações de CL_{50/100} e CL_{50/10}.

Quando comparamos os diferentes tempos dentro da mesma concentração observamos que para o controle (gráfico 9A) houve diferença significativa apenas quando comparamos o tempo de 8 horas com os demais. Já para a concentração de CL_{50/100} (gráfico 9B) houve uma diminuição na expressão, do tempo de 1 hora até o tempo de 8 horas e, em seguida, um aumento em 24 horas.

Na análise dos diferentes tempos na concentração de CL_{50/10} (gráfico 9C) é possível observar que houve uma tendência de queda na expressão de HSP90 com o aumento do tempo. Na análise da expressão de HSP90 no decorrer do tempo para a

concentração de CL₅₀ (gráfico 9D) a sua expressão foi igualmente elevada para os tempos de 4 e 24 horas.

Figura 14: Cérebro de *M. scutellaris* nas condições experimentais controle 4 horas (A); Controle negativo 24 horas (B); CL_{50/10} por 1 hora (C) e CL_{50/10} por 4 horas (D); CL₅₀ por 8 horas (E) e CL₅₀ por 24 horas (F). Técnica de HSP90. Colar (Co); Borda (Bo); Base (Ba); células de Kenyon (CK). As setas indicam imunomarcação.

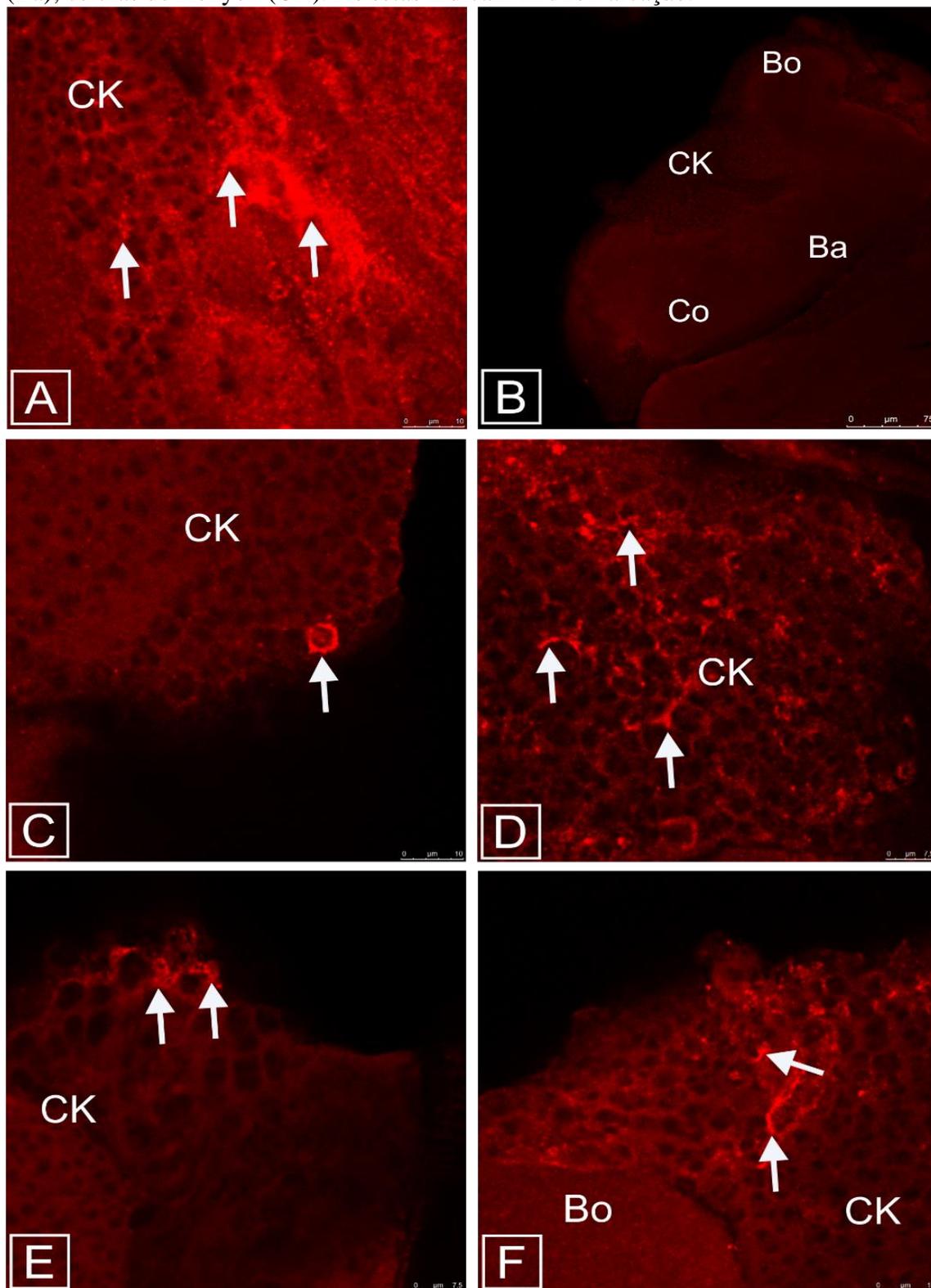


Gráfico 8: Expressão de HSP90 de acordo com o aumento da concentração, nos corpos pedunculados, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. 1 hora (A); 4 horas (B); 8 horas (C) e 24 horas (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.

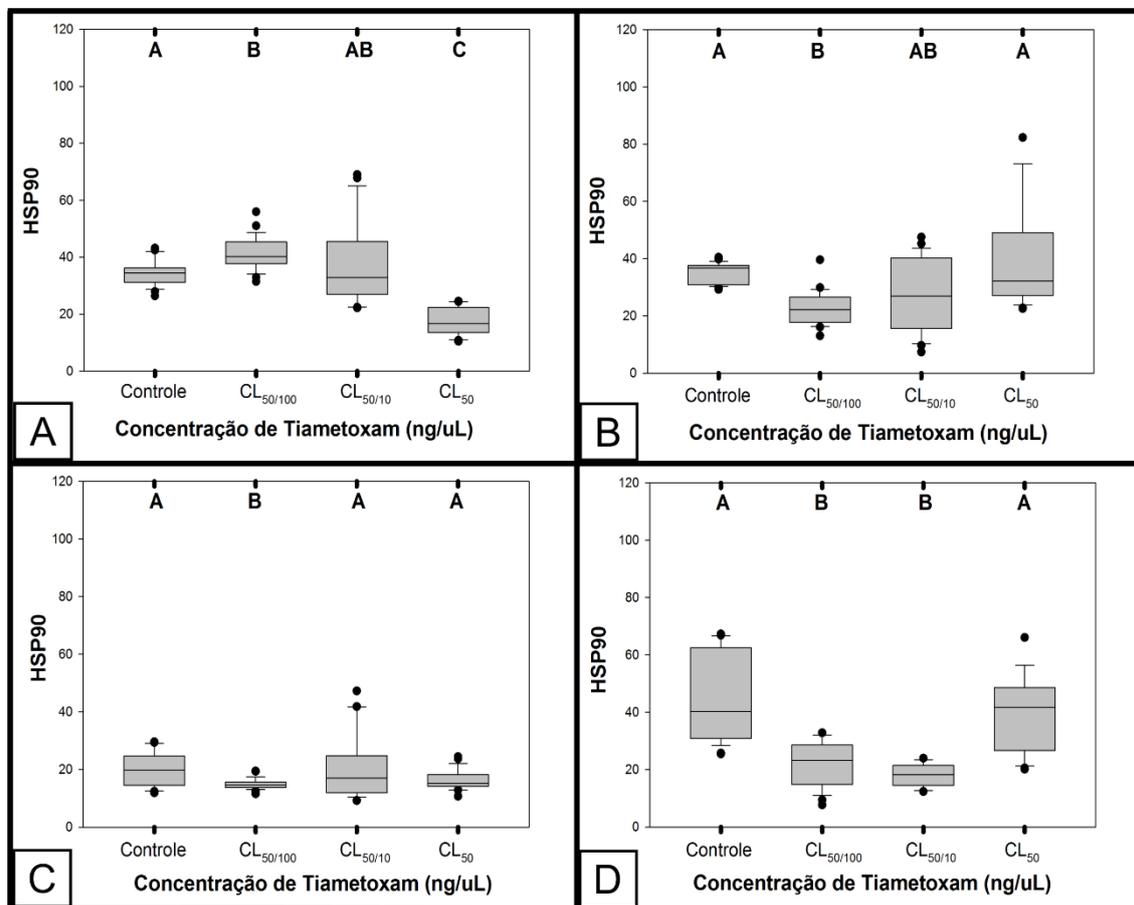
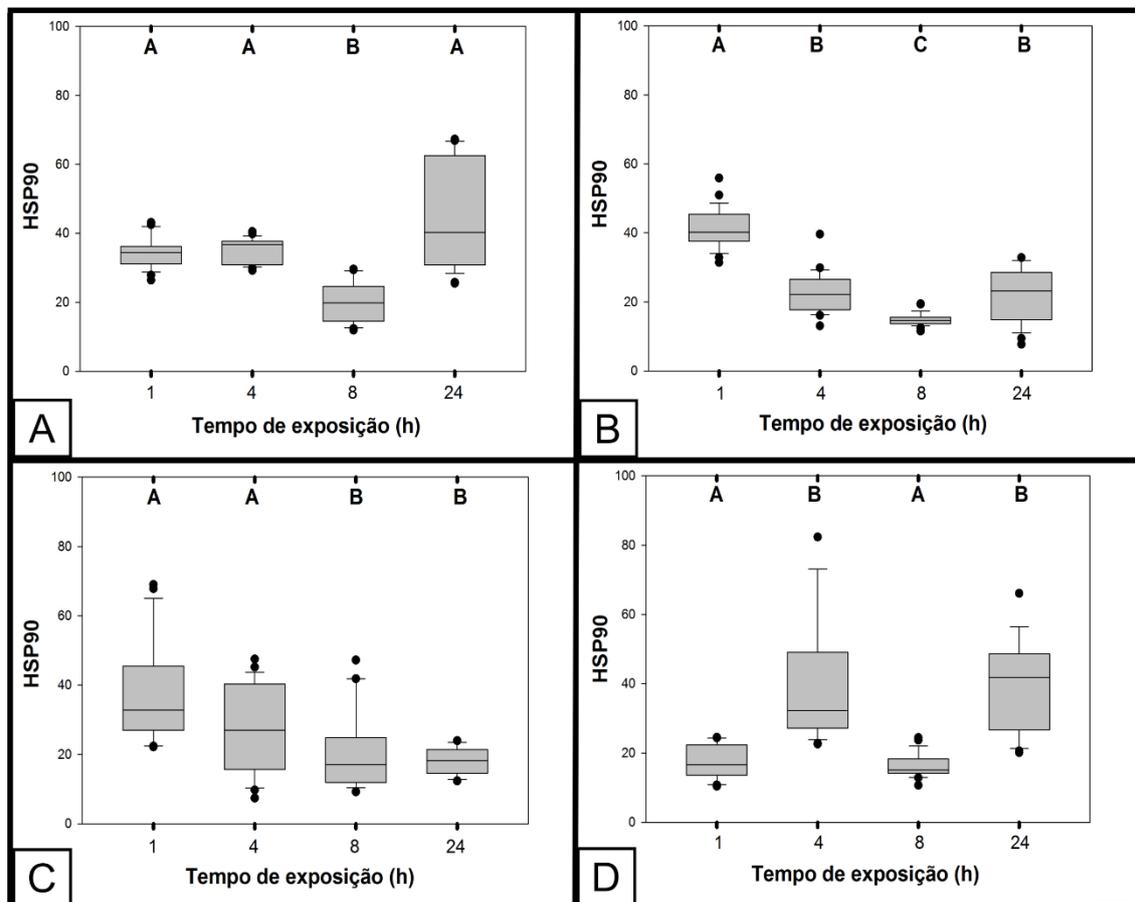


Gráfico 9: expressão de HSP90 ao longo do tempo, nos corpos pedunculados, de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. Controle (A); CL_{50/100} (B); CL_{50/10} (C) e CL₅₀ (D). As letras no topo dos gráficos correspondem aos resultados/diferenças estatísticas, sendo que letras diferentes indicam $p < 0,05$.



5. DISCUSSÃO

5.1 Alterações morfológicas

Os resultados do presente trabalho mostraram que concentrações subletais do inseticida tiametoxam causam alterações morfológicas nos diferentes órgãos estudados da abelha *M. scutellaris*. Para verificar se essas alterações são efetivamente resultado da exposição ao agrotóxico e possamos fazer comparações entre as concentrações através de uma análise semi-quantitativa, foram estabelecidos escores, que indicam o quanto severo é o dano e se é possível revertê-lo. Trabalhos realizados na área de patologia e toxicologia, com diferentes organismos, costumam atribuir escores para indicar o grau de comprometimento de um órgão, como Bernet et al., (1999), Marinho et al., (2014) e Gregorc A. et al., (2016).

Durante as observações constatamos projeções citoplasmáticas, que segundo Caetano et al., (1994) podem ser consideradas eliminação de secreção apócrina. Essas projeções podem conter organelas e granulações de vários tipos, com a função de secretar substâncias das células digestivas, quando ocorre a secreção apócrina, o processo envolve a perda de pelo menos, 10% do citoplasma apical (TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 2012).

O aumento da secreção apócrina, observado tanto no intestino quanto nos túbulos para os grupos expostos, quando comparados ao grupo controle, em todos os tempos analisados, pode indicar a excreção de substâncias que prejudicam seu funcionamento através do empacotamento e eliminação (CAETANO et al., 1994). A eliminação de secreção apócrina é uma alteração que pode cessar quando não houver mais substâncias que prejudiquem o funcionamento do organismo, devido a isso seu dano foi considerado mínimo e facilmente reversível, o que gerou a atribuição do escore 1.

Outra alteração encontrada foi a eliminação de células, tanto para o órgão de digestão quanto para o de excreção. As células mais afetadas pelo inseticida são as células digestivas, uma vez que elas possuem uma zona de contato maior com as substâncias e com o lúmen (CAETANO et al., 1994). A eliminação de células do epitélio para o lúmen ocorre quando a célula já não consegue mais realizar a sua função de forma adequada. No intestino, rapidamente novas células são produzidas por diferenciação celular nos ninhos regenerativos, e assumem o lugar das células que foram eliminadas, para que a função do órgão não seja prejudicada (JESUS, 2007; KAKAMAND et al., 2008). Para essa alteração foi atribuído o escore 1, pois uma célula, quando eliminada é rapidamente substituída por outra, adicionalmente esse evento ocorre naturalmente no organismo do indivíduo.

Outros trabalhos também constataram essa alteração, como Cruz et al., (2010) que observaram vacuolização citoplasmática, condensação cromatínica e eliminação de células no intestino de larvas de *A. mellifera* quando expostas ao fipronil e ácido bórico; e Soares (2012) que também observou eliminação de células para o lúmen quando expos *Scaptotrigona postica* a doses subletais do inseticida imidacloprido.

Os Esferocristais encontrados no intestino e nos túbulos de Malpighi tem uma importância fundamental no impedimento da intoxicação e na regulação osmótica do interior dos órgãos (CRUZ-LANDIM, 2009), dessa forma a intensificação da liberação dos esferocristais pode ser um mecanismo compensatório nos órgãos, pois impede a intoxicação das suas células (CAETANO et al., 1994). Devido a isso o escore estabelecido para esta alteração foi 1, pois a medida em que o contato com a substancia tóxica decai, o equilíbrio osmótico é reestabelecido e a excreção de esferocristais também decai.

Outra alteração observada foi a perda da borda em escova, a qual pode acarretar uma série de problemas, como danos nas células epiteliais, uma vez que sua função absorção e exocitose constitutiva de vesículas de secreção. Diante desse quadro o escore atribuído para a perda da borda em escova foi 2, uma vez que o dano é dificilmente reversível e pode causar alterações no funcionamento do organismo pela dificuldade de absorção dos nutrientes.

Além das alterações já citadas, observamos também, perda de material citoplasmático, que indica que o epitélio do intestino e dos túbulos de Malpighi estão sofrendo danos causados pelo inseticida, os quais dificilmente serão revertidos e podem causar alterações no funcionamento do órgão, devido a isso atribuímos a essa alteração o escore 2. Outros trabalhos, como o realizado por Oliveira et al., (2012) com *A. mellifera* também observaram perda de material citoplasmático desde o primeiro dia após a exposição ao inseticida tiametoxam e atribuíram isso aos danos imediatos causados pelo neonicotinoide.

Uma das alterações mais graves observáveis no intestino é a perda dos ninhos de células regenerativas, as quais, segundo Cruz-Landim; Silva-de-Moraes; Serrão (1996), tem a função de substituir as células digestivas que já não conseguem mais cumprir seu papel. Dessa forma, danos causados nesse complexo de células podem afetar o funcionamento do órgão e causar problemas irreversíveis na digestão e absorção dos nutrientes (CRUZ-LANDIM, 2009). A exposição ao tiametoxam também compromete a

função e o número de células regenerativas que são fundamentais na reestruturação epitélio, devido a isso o escore atribuído foi 3, pois é um dano irreversível. Outros estudos também constataram essa alteração, como Oliveira et al. (2013), que realizaram um experimento com uma dose de 0.428 ng/mL de tiametoxam onde os indivíduos foram analisados após 3, 5 e 8 dias do início da exposição, e observaram redução das células regenerativas e aumento de vacúolos citoplasmáticos.

A única alteração observada nos três órgãos foi a condensação cromatínica, evidenciada pelos núcleos fortemente corados. É um prelúdio de morte celular e é comum em tecido de insetos que estão sofrendo degeneração, depois de iniciado o processo de morte, ele torna-se irreversível (GREGORC e BOWEN, 1996; DAI e GILBERT, 1997 e SILVA-ZACARIM et al., 2008). Muitas vezes, quando essas células são eliminadas para o lúmen, ainda estão vivas e começam o processo de morte na luz do órgão (CRUZ-LANDIM, 2009). A condensação cromatínica também foi observada por Oliveira et al., (2008), em trabalho realizado com *A. mellifera* exposta a $CL_{50/10}$ após 1 dia de contato com o inseticida, o autor também atribuiu essa observação a uma possível morte celular. Doses subletais do tiametoxam causam danos os três órgãos analisadas, o que pode afetar, entre outras coisas, o comportamento alimentar das abelhas, o aprendizado e a memória, refletindo, posteriormente nas colônias (CRUZ-LANDIM, 2009). Devido ao seu grau de severidade e sua irreversibilidade, foi atribuído o escore 3 para essa alteração.

Outra alteração observada neste trabalho foi o espaçamento entre as células de Kenyon, que também foram constatadas por Soares (2012), quando expôs abelhas *Scaptotrigona postica* a doses subletais do inseticida imidacloprido. Estes espaçamentos indicam a perda do contato entre as células, o que sinalizaria uma desorganização do tecido. De acordo com Hacker, (2000) a morte celular por apoptose é marcada pela ausência do contato entre as células, pela reorganização e pela mudança da forma celular. Mediante a isso, o escore atribuído para o espaçamento entre as células de Kenyon foi 3, pois é um dano irreversível e que afeta outras funções dentro do organismo, como já citados a cima.

5.2 Via metabólica

No presente trabalho foi observado que subdoses do inseticida tiametoxam causaram alterações nos três órgãos estudados. O inseticida ingerido é absorvido pelo intestino, comumente na região conhecida como ventrículo, em seguida passa para a hemolinfa, a qual é levada pelo vaso dorsal do abdômen até o cérebro, quando não ocorre

a absorção, a hemolinfa é absorvida pelos túbulos de Malpighi, onde pode ser excretado (HABIB, 2003).

Foi possível observar que no tempo de 1 hora, os danos morfológicos do intestino tornam-se estatisticamente significantes apenas na CL₅₀, quando comparados as demais concentrações e ao controle. No entanto, as enzimas de desintoxicação presentes no tecido do intestino, que tem a função de biotransformar esses inseticidas (CRAILSHEIM et al., 1992; RORTAIS et al., 2005), podem não ter sido eficientes para promover a quebra dessas moléculas e desintoxicar o indivíduo. Devido a isso, o tiametoxam pode ter chegado a hemolinfa e sido filtrado pelos túbulos de Malpighi (HABIB, 2003), os quais também sofreram danos morfológicos na CL₅₀, indicando a citotoxicidade deste composto.

A expressão de HSP90 mostrou-se elevada no intestino das abelhas que foram expostas ao tiametoxam, assim como sua morfologia mostrou-se comprometida devido ao efeito do inseticida. Já para os túbulos de Malpighi e para o cérebro foi possível observar uma queda entre eles em relação ao intestino. Essa queda na expressão de HSP90 entre os órgãos pode indicar que quando o inseticida entra em contato com o intestino, a expressão de HSP90 aumenta, minimizando os danos proteotóxicos causados pelo mesmo e evitando a morte celular. Porém, para os demais órgãos, como ao longo da via metabólica uma parcela do que o indivíduo ingeriu vai sendo metabolizado e excretado, a expressão de HSP90 também sofre uma queda no órgão de excreção. Ao longo da via metabólica ocorrem adaptações fisiológicas que visam reestabelecer o equilíbrio homeostático, uma vez que o indivíduo entrou em contato com um agente estressor (WELCH, 2005).

Para o tempo de 1h não foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações do inseticida tiametixam nos corpos pedunculados, o que pode sugerir que a HSP90 está agindo como uma chaperona, evitando a morte celular nas células do intestino e dos túbulos de Malpighi (FEDER et al., 1996), fazendo com que o inseticida não chegue ao cérebro em quantidades suficientes para provocar alterações morfológicas ou de expressão de HSP90 neste primeiro momento.

Para o tempo de 4 horas, houve uma tendência em seguir os mesmos padrões para o tempo inicial, tanto para as alterações morfológicas, que apresentaram uma diferença estatística apenas na maior concentração, de CL₅₀, quando comparado as demais concentrações, CL_{50/10} e CL_{50/100}, e ao controle, para o intestino e para os túbulos de

Malpighi, quanto para a análise imunohistoquímica, nas quais também foi possível observar uma queda na expressão de HSP90 entre os órgãos, sendo mais alta para o intestino. Outro estudo que também observou alterações morfológicas no intestino apenas em concentração próxima a letal foi o desenvolvido por Rossi et al. (2013), que expos *A. mellifera* a doses subletais do inseticida imidacloprido.

Para as análises realizadas no cérebro, assim como no tempo de 1 hora, não houve diferença significativa para as alterações morfológicas entre as concentrações, o que pode ser interpretado como uma eficiência da expressão de HSP90 em impedir a morte celular para o tempo de 4 horas após o início da exposição ao alimento contaminado. Dessa forma podemos inferir que a HSP90 está cumprindo seu papel de chaperona, como já foi citado.

Comparando os resultados de 1 e 4 horas é possível observar que um intervalo de tempo de 3 horas não é responsável por uma diferença significativa entre os danos morfológicos e nem entre a expressão de HSP90 para os três órgãos. Já para a análise no tempo de 8 horas após o início de exposição é possível observar uma maior diferença quando comparado aos dois tempos iniciais.

Para o tempo de 8 horas as alterações morfológicas foram observadas a partir da concentração de $CL_{50/10}$ tanto para o intestino quanto para os túbulos de Malpighi, indicando que quanto mais tempo o indivíduo passa em contato com o inseticida, menor a concentração necessária para causar alterações que podem comprometer o funcionamento do seu organismo e conseqüentemente a sua saúde.

Semelhante ao observado no presente estudo, Rossi et al. (2013) constatou que quanto mais alta a concentração de imidacloprido ao qual as abelhas estavam expostas, mais rápido e mais severos foram os danos morfológicos encontrados nos túbulos de Malpighi. Isso pode se agravar ainda mais quando analisamos o hábito desses insetos de coletar pólen e néctar e armazená-los, entrando em contato direto com agrotóxicos e dessa forma concentrando-os tanto em seu organismo quanto em suas colônias (JAMES E XU, 2012).

A partir do tempo de 8 horas a expressão de HSP90 apresenta diferenças estatísticas entre as concentrações, que podem estar relacionadas a concentração e aos danos causados na morfologia, os quais podem comprometer a função de digestão, absorção e excreção desses órgãos (CRUZ-LANDIM, 2009). Tanto para o intestino quanto para os túbulos, a concentração que tem a expressão de HSP90 mais elevada é a

CL_{50/100}, o que nos indica que no tempo de 8 horas a expressão da proteína de choque térmico é aumentada já na concentração mais baixa e depois sofre uma queda, exatamente nas concentrações de CL_{50/10} e CL₅₀, em que os danos morfológicos são maiores.

Isso pode estar indicando que enquanto a HSP90 estava conseguindo manter o equilíbrio homeostático do organismo do indivíduo, que se deu na concentração CL_{50/100}, não estava ocorrendo danos morfológicos significativos. Porém, a partir do momento em que essas alterações começaram a prejudicar o funcionamento do mesmo, apresentando danos morfológicos, que ocorreu nas concentrações mais altas de CL_{50/10} e CL₅₀, a expressão de HSP90 sofreu uma queda, indicando que talvez a expressão da proteína de choque térmico já não fosse mais o suficiente para impedir a morte celular. Alguns trabalhos que observaram alterações morfológicas constataram que estas estão ligadas à morte celular, como é o caso de Braeckman B, Raes H (1999) que relataram a eliminação de células quando infestou larvas de *A. mellifera* com *Bacillus* e Silva-Zacarin et al. (2008) que observou compactação cromatínica em glândula de seda das larvas de abelhas *A. mellifera*, indicando que as células estão com baixa atividade transcricional, evento que ocorre durante o processo de morte celular (WILLYE 1981).

Já para o cérebro, no tempo de 8 horas, a expressão de HSP90 foi menor para a concentração de CL_{50/100}, indicando que nessa concentração o agente estressor pode não ter chegado ao cérebro, diminuindo assim a necessidade de produzir níveis altos de HSP90 no mesmo, pois quando a expressão de HSP90 aumenta, a probabilidade de sobrevivência da célula é maior, pois ela evita a ativação da morte celular programada (BOWEN I. D. et al., 1993; GARRIDO et al., 2001), uma vez que a célula não corre riscos, e dessa forma ocorre proteotoxicidade, a expressão de HSP90 se mantém baixa.

Na análise dos resultados do maior tempo estudado, de 24 horas, as diferenças entre as concentrações nas quais ocorreram danos morfológicos e expressão de HSP90 foram diferentes entre os órgãos. No intestino a diferença estatística apareceu apenas na concentração mais alta de CL₅₀, indicando que os danos morfológicos causaram alterações significativas e que podem afetar a saúde do indivíduo, como por exemplo aumento da secreção apócrina, que pode estar relacionada ao processo de eliminação (CAETANO et al., 1994).

Quando essa desintoxicação não é possível a saúde do indivíduo como um todo pode ser afetada, como foi demonstrado no trabalho de Morandin e Winston (2003). Os

autores mostraram que no grupo controle e no exposto a 7 ppb de imidacloprido os indivíduos levaram em média 3 segundos para chegar a uma fonte de alimento. Já nos tratados com a concentração mais alta, de 30 ppb, a velocidade foi 27,7% mais lenta, ou seja, elas levaram 4,6 segundos para atingir o recurso. Dessa forma, abelhas expostas a concentrações acima de 30ppb, que é o caso deste estudo, onde a CL_{50} é igual a 36,859ppb (os cálculos foram realizados levando em consideração a densidade do xarope, que é de 1,229 g/mL), podem fazer viagens mais curtas ou carregar uma quantidade menor de pólen, o que pode afetar a saúde da colônia.

Mediante isso podemos interpretar que provavelmente as moléculas de HSP90 tenham conseguido controlar os danos causados no tempo de 8 horas na concentração de $CL_{50/100}$, no intestino, por isso a expressão de HSP90 na concentração de $CL_{50/100}$ em 24 horas é baixo, em relação a 8 horas. Isso explicaria o aumento na expressão de HSP90 para a concentração de $CL_{50/10}$ no tempo de 24 horas, pois foi nessa concentração que houve danos as células, e explicaria a ausência de diferença significativa entre a $CL_{50/10}$ e o controle nas alterações morfológicas (Bierkens, 2000). Já na concentração de CL_{50} a expressão de HSP90 sofreu uma queda, o que pode indicar que sua expressão já não é mais suficiente para evitar a morte celular e desequilíbrios.

Já para os túbulos de Malpighi as moléculas de HSP90 não foram capazes de manter o equilíbrio homeostático e evitar os danos morfológicos, pois tanto para 8 quanto para 24 horas, as alterações significativas ocorreram para as concentrações de $CL_{50/10}$ e CL_{50} . Para este órgão essas diferenças estatísticas ocorreram pela resposta de aumento da expressão de HSP90, visando impedir os danos ao organismo, uma vez que a expressão aumentou tanto para as concentrações de $CL_{50/100}$ e $CL_{50/10}$ em relação ao controle e teve uma queda na concentração de CL_{50} . Essas observações são, possivelmente, devido a ineficiência da resposta diante de uma dose alta, como também observado pela técnica histológica e por outros trabalhos como Soares (2012), que constataram indícios de morte celular nas concentrações mais altas.

Dessa forma o inseticida passou pelo intestino e conseguiu causar alterações nos túbulos de Malpighi, o que pode ser indicativo de que quanto maior o tempo de exposição maior será o alcance do inseticida na via metabólica, pois foi apenas no tempo de 24 horas que as alterações morfológicas no cérebro mostraram diferença significativa entre si.

As células, como resposta ao estresse causado pela exposição ao agrotóxico, aumentaram a expressão de HSP90 na concentração de CL_{50} no cérebro, em relação as

demais concentrações, para o tempo de 24 horas. Diante disso, podemos concluir que foi apenas neste momento que o inseticida atingiu o sistema nervoso do indivíduo. Dessa forma as proteínas de choque térmico manteriam o equilíbrio homeostático e evitariam a morte celular, assim como observado por Petros et al., (2004) e Rossi et al., (2013).

Perante a isso podemos inferir que talvez a morte dos indivíduos ocorra devido aos danos causados no intestino e nos túbulos de Malpighi, comprometendo a digestão, absorção e excreção do organismo, (WYLLIE, 1981; HACKER, 2000 e SILVA-ZACARIM et al., 2008), pois foram nesses órgãos que observamos as maiores alterações morfológicas e uma queda na expressão de HSP90 para as concentrações e tempos maiores. Dessa forma estaria ocorrendo a morte celular, porém em etapas diferentes da que o teste de Tunel marca ou a fragmentação do DNA é mais tardia.

Outros experimentos, como Gregorc e Ellis (2011), também constataram que um nível elevado de estresse, como ocorreu com os indivíduos deste estudo, quando foram submetidos as concentrações mais altas, de CL₅₀, pelos maiores tempos, de 24 horas, pode induzir a apoptose. Eles analisaram os efeitos da exposição a 9 pesticidas, entre eles o imidacloprido e o glifosato, em larvas *A. mellifera* e constataram um elevado índice de apoptose das células do intestino médio desses insetos. Os resultados do trabalho sugerem que o processo de apoptose foi iniciado como um mecanismo de proteção do órgão, o que também estaria ocorrendo no presente trabalho, quando o nível de HSP90 cai, o organismo do indivíduo desencadeia a morte celular para tentar proteger o mesmo.

Dessa forma, podemos inferir que a morte celular tenha ocorrido, pois quando a célula do indivíduo identificou uma substância tóxica, o mesmo desencadeou o processo de morte celular para protegê-lo, o que explicaria a queda na expressão de HSP90 e as alterações morfológicas e, por fim, a morte de mais de 70% dos indivíduos na concentração de CL₅₀, no tempo de 24 horas, durante os experimentos.

Outros estudos, também realizaram as três técnicas, como Tavares et al., (2011) que analisou cérebro de larvas de *A. mellifera* expostas a subdoses de tiametoxam e constatou alterações morfológicas, como condensação cromatínica, porém não observou diferença estatística entre os grupos controle e os grupos expostos ao inseticida pela técnica de HSP90, o que justifica a marcação pela técnica de Tunel, uma vez que a proteína, da família HSP90, de choque térmico não estaria protegendo o organismo.

Comparar os níveis de HSP90 no organismo de insetos, como as abelhas, é fundamental para estabelecermos a relação entre estresse celular e morte celular, pois quando associamos as duas técnicas o esperado seria que quanto maior expressão de HSP90 menor a detecção de morte celular, pois está estaria sendo inibida, seja ela apoptose ou necrose. A exposição crônica a doses sub-letais de produtos químicos pode ativar a expressão de HSPs. O aumento da expressão de HSP pode ser induzido por uma série de fatores, devido a isso ela poderia ser considerada um bom biomarcador para avaliar os efeitos biológicos de diversos agentes tóxicos (Pomerai, 1996).

De maneira geral, foi possível observar que o tiametoxam causou danos mais acentuados nos órgãos e na estrutura estudada a partir da análise dos dados depois de oito horas da exposição contínua ao alimento contaminado, mostrando que a contaminação por esse inseticida via oral é capaz de causar danos aos insetos, podendo diminuir a eficiência funcional dos três órgãos analisados. Interessantemente, os resultados apontam que os maiores danos não são causados ao órgão alvo do inseticida, mas sim aos órgãos envolvidos com os processos de digestão, absorção, metabolização e excreção.

Desta forma, quando se trata de doses subletais, as alterações observadas e relatadas não são resultado dos efeitos relacionados ao seu mecanismo de ação, e sim relacionados à sua rota metabólica.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho concluímos que doses subletais do inseticida tiametoxam

- causam alterações morfológicas no intestino, túbulos de Malpighi e cérebro, principalmente na concentração mais alta, de CL₅₀;
- provocam aumento na expressão de HSP90, principalmente nas concentrações de CL_{50/10} e CL_{50/100}.

- a técnica de Tunel não foi capaz de identificar, por fragmentação de DNA, morte celular, apesar dos baixos níveis de HSP90 indicarem possível morte, na concentração de CL₅₀ no tempo de 24h.

- nanodoses do inseticida tiametoxam são prejudiciais às abelhas e comprometem sua morfofisiologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008b. Disponível em:<www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.

AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Agrotóxico Fitossanitários: Tiamethoxam, Brasília, 2003a. Disponível em:<

http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=248> Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A., CARVALHO, S. M., BRUNET, J. L., CARVALHO, G. A., BULETÉ, A., GIROUD, B., & BELZUNCES, L. P. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and environmental safety**, 82, 22-31. 2012.

BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE G.; VAN GESTEL CAM, MOMMAERTS V. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side effects and risk assessment. **Ecotoxicol** 21:973–992, 2012.

BRADLEY, T. J. The excretory system: structure and physiology. In: KERKUT, G. A; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. London: Pergamon.** p. 421-465. v.4. 1985.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., & WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, 22(1), 25-34. 1999

BIERKENS J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. **Toxicology** 153, 61-72. 2000

BRAECKMAN B, RAES H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). **Tissue Cell** 31, 223-232. 1999

BRITTAIN, C; POTTS, S. G; The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v.12, p.321 – 331, 2011.

BOWEN ID, MORGAN SM, MULLARKEY K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biol. Int.** 17, 13-33. 1993

BROSI, B. J., E BRIGGS, H.M. Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(32), 13044-13048. 2014.

CAETANO, F. H.; TORRES, JR. A. H.; CAMARGO-MATHIAS, A. M. I.; TOMAKE, E. M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Cytobios**, Cambridge, v. 80, p. 235-242, 1994.

CAMARGO, JOÃO MARIA FRANCO DE; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**, p. 272-578, 2007.

CAPELLA, INES C. SCHMIDT; HARTFELDER, KLAUS. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of insect physiology**, v. 44, n. 5, p. 385-391, 1998.

CATAE, A. F., ROAT, T. C., OLIVEIRA, R. A., FERREIRA NOCELLI, R. C., & MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy research and technique**, 77(4), 274-281. 2014.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5.ed. New York: Elsevier Publishing, 1998. 789p.

- CONAB: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_13_15_58_44_boletim_cana_portugues_-_2o_leve_-_15-16.pdf> Acesso em 23 de fevereiro de 2017.
- DA COSTA, L. M., GRELLA, T. C., BARBOSA, R. A., MALASPINA, O., & NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 62(4), 578-582. 2015
- CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L., HRASSNIGG, N., BUHLMANN, G., BROSCHE, U., GMEINBAUER, R., SCHOFFMANN, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38, 409–419. 1992.
- CRESSWELL, J. E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157. 2011.
- CRUZ-LANDIM, C; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v.1, p.29-40, 1996.
- CRUZ-LANDIM C. Specializations of the Malpighian tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata* anthidioides Lep. (Hymenoptera apidae). **Acta Microsc** 7:26–33. 1998.
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. **São Paulo: Ed. UNESP.** 416p. 2009.
- CRUZ, A. S; SILVA- ZACARIN, E. C. M; BUENO, O. C; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v.26, p. 165-179, 2010.
- DAI, J.D., GILBERT, L.I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal–adult metamorphosis. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 27, 69–78. 1997.
- DESNEUX, N; DECOURTYE, A; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.52, p.81-106, 2007.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Influência das cigarrinhas das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **Stab**, v.19, n.2, p.34-35, 2000.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; GIL, M.A. Estimativa do nível de dano econômico de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Bragantia**, v.66, n.1, p.81-88, 2007.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A., GÓIS, G. C., SILVA, C. M., SOUZA, D. L., SOUZA, D. N., SILVA, P. C. C., & RODRIGUES, M. L. Desenvolvimento produtivo de colmeias de abelhas *Melipona scutellaris*. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 59-64, 2008.
- FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v.51, p.209-232. 2006.
- FAIRBROTHER, A, PURDY, J., ANDERSON, T., E FELL, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 33(4), 719-731. 2014.

- FARRIS, S. M. Evolution of insect mushroom bodies: old clues, new insights. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 34, n.3, p. 211-234, 2005.
- FAUSER-MISLIN, A. SADD, B. M., NEUMANN, P., E SANDROCK, C. Influence of combines pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. **Journal of Applied Ecology**. 2013.
- FEDER ME, CARTANO NV, MILOS L, KREBS RA, LINDQUIST SL. Effect of engineering Hsp 70 copy number on Hsp 70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol.** **199**, 1837-1844. 1996
- FELTHAM, H, PARK, K E GOULSON, D. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. **Ecotoxicology**, 1-7. 2014.
- FRYDMAN, Judith. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annual review of biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 603-647, 2001.
- GARIBALDI, L. A., STEFFAN-DEWENTER, I., WINFREE, R., AIZEN, M. A., BOMMARCO, R., CUNNINGHAM, S. A., e KLEIN, A. M. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, 339(6127), 1608-1611. 2013.
- GARRATT, M. P. D., BREEZE, T. D., JENNER, N., POLCE, C., BIESMEIJER, J. C., & POTTS, S. G. Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. **Agriculture, ecosystems & environment**, 184, 34-40. 2014.
- GARRIDO C, GURBUXANI S, RAVAGNAN L, KROEMER G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 286, 433-442. 2001
- GIANNINI, T. C., CORDEIRO, G. D., FREITAS, B. M., SARAIVA, A. M., & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, tov093. 2015.
- GONÇALVES, T.D.; MUTTON, M.A.; PERECIN, D.; CAMPANHÃO, J.M.; MUTTON, M.J.R. Qualidade da matéria-prima em função de diferentes níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. **Stab**, v.22, n.2, p.29-33, 2003.
- GOULSON, D. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, 50(4), 977-987. 2013.
- GREGORC, S., BOWEN, I.D. Programmed cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae midgut. **Cell Biol. Int.** 21, 151–158. 1996.
- GREGORC, A; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.99, p.200–207, 2011.
- 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
- HABIB, M. Fisiologia dos insetos. Campinas: **Apostila Unicamp**, 169 p. 2003.
- HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v.301, n.1, p. 5-17, 2000.

- HENRY, M., BEGUIN, M., REQUIER, F., ROLLIN, O., ODOUX, J. F., AUPINEL, P., ... E DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350. 2012.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ALVES DOS SANTOS, I. 2011. **Classificação das abelhas brasileiras**. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/beetaxon/>>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2017.
- IUPAC. **Global availability of information on agrochemicals**. 2015. Thiamethoxam. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/631.htm>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.
- JAMES, R. R.; XU, Junhuan. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of invertebrate pathology*, v. 109, n. 2, p. 175-182, 2012.
- JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 90, p. 69–72, 2013.
- JESUS, D. Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos de operárias recém-emergidas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae) tratadas com fipronil e ácido bórico. 2007. 101f. **Trabalho de conclusão do curso (Ciências Biológicas)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- JUNQUEIRA LCU, JUNQUEIRA LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. **São Paulo: Editora Santos**, 123 p. 1983.
- KAKAMAND, F. A. K. H; MAHMOUD, T. T; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Duhok University*, v. 11, n.1, p.144-151, 2008
- KEVAN, P.G. & VIANA, B.F. The global decline of pollination services. *Biodiversity Journal of Life on Earth.*, 494: 03-08. 2003.
- KLATT, B. K. *Bee Pollination of Strawberries on Different Spatial Scales-from Crop Varieties and Fields to Landscapes (Doctoral dissertation, Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen)*. 2013.
- KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; 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 of Lond – Biological Sciences*, London, v. 274, p. 303–313, 2007.
- KREGEL, K.C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, v. 92, p. 2177-2186, 2002.
- KREMEN, C., WILLIAMS, N. M., AIZEN, M. A., GEMMILL-HERREN, B., LEBUHN, G., MINCKLEY, R., ... E RICKETTS, T. H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: A conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology letter*, 10(4), 299-314. 2007.
- LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677. 1998
- LOCKSHIN, Richard A.; ZAKERI, Zahra F. Programmed cell death: new thoughts and relevance to aging. *Journal of gerontology*, v. 45, n. 5, p. B135-B140, 1990.
- LOURENÇO, C. T., CARVALHO, S. M., MALASPINA, O., & NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille,

- 1811). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 89, n. 4, p. 921-924, 2012.
- MALAGODI-BRAGA, K.S.; KLEINERT, A.M.P. Os meliponíneos e a polinização do morangueiro em estufas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., Florianópolis, 2000. **Anais... Florianópolis: 2000.** (CD-ROM).
- MALASPINA, O; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v.23, n.3/4, p.303-309, 2006.
- MARIMOTO, R.I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOUS, C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.** 1994.
- MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; DE CASTRO MARCATO, A.C., PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.
- MARÇON, P.G. Modo de ação de inseticidas e acaricidas. **DuPont do Brasil S/A.** Paulínea. [V ENFRUTE, 2002. Disponível em: <www.irac-br.org.br/arquivos/mododeacao.doc>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2017.
- MEYRAN, J.-C. Comparative study of the segmental specializations in the Malpighian tubules of *Blattella germanica* (L.)(Diptera: Blattellidae) and *Tenebrio molitor* (L.)(Coleoptera: Tenebrionidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 11, n. 2, p. 79-98, 1982.
- MICHENER, C. D. The bees of the world. 2 ed. **Johns Hopkins: Baltimore**, 953p. 2007.
- MICHENER CD. The Meliponini. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D, editors. Pot honey— a legacy of stingless bees. **New York: Springer.** p 3–17. 2013.
- MORANDIN, Lora A.; WINSTON, Mark L. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. **Environmental Entomology**, v. 32, n. 3, p. 555-563, 2003.
- MOURE, J. S. Augochlorini. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*, 677-691. 2007.
- NOGUEIRA-COUTO, R.H.; PEREIRA, J.M.S.; COUTO, Estudo da polinização entomófila em *Cucurbita pepo* (abóbora italiana). **B. Industr.anim., N. Odessa**, v.62, n.1, p.79-90, 2005 L.A.Científica, v.18, n.1, p.21-27, 1990.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, 445 p. 1997.
- NOGUEIRA-COUTO, R.H. Uso de atrativos e repelentes na polinização dirigida. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3., Ribeirão Preto, 1998. **Anais... Ribeirão Preto.** p.21-27. 1998.
- NUNES LA, PINTO MFFC, CARNEIRO P, PEREIRA DG, WALDSCHMIDT AM. Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. **Biosci. J.** 23: 1-9. 2007.
- NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 140-151. 2010.

- OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. **Honeybees, Acute Oral Toxicity Test**, n.213, set. 8p. 1998b.
- OLIVEIRA R.A, ROAT T.C, CARVALHO S.M, MALASPINA O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environ Toxicol**. DOI 10.1002/tox.21842. 2013.
- PEIXOTO, M.F. *Danos e controle da cigarrinha da raiz Mahanarva fimbriolata (Stål., 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar*. 67f. **Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2004.
- PETROS AM, OLEJNICZAK ET, FESIK SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta** 1644:83–94. 2004
- POMERAI, D. I. Review: Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. **Human & experimental toxicology**, v. 15, n. 4, p. 279-285, 1996.
- PRONÍ, E.A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Cascavel, v. 3, n. 2, p. 145-150. 2000.
- RIBI, W.; SENDEN, T.J.; SAKELLARIOU, A.; LIMAYE, A.; ZHANG, S. Imaging honeybee brain anatomy with micro-x-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**, v.171, n.1, p.93-97, 2008.
- ROBERTA CF NOCELLI; PRISCILA CINTRA-SOCOLOWSKI; THAISA C ROAT; ELAINE CM SILVA-ZACARIN; OSMAR MALASPINA. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. Review. **Dove Press journal: Open Access Insect Physiology**. 13-23. 2016
- RORTAIS, A., ARNOLD, G., HALM, M.P., TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybee exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie** 36, 71–83. 2005.
- ROSSI, C.A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D.A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P; MALASPINA, O. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v.76, p.n/a-n/a, 2013.
- ROUBIK, D.W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, Versailles, v. 37, p. 124-143, 2006.
- SHEPERD, M.; BUCHMANN, S.L.; VAUGHAN, M. & BLACK, SH. **Pollinator Conservation Handbook**. The Xerces Society, Portland, Oregon. 145p. 2003.
- SILVA, A. C. Implicações na implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão em três comunidades indígenas no estado do Amazonas. 2006.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M; GREDORC, 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**, v.37, p.1-10, 2006.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M.; TABOGA, S. R.; DE MORAES, RLM Silva. Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Micron**, v. 39, n. 2, p. 117-127, 2008.
- SNODGRASS, R.E. Anatomy and Physiology of the Honeybees. **New York: Comstock Publishing Ass**. 327p. 1956.

SOARES, H. M. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI). 2013.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais.** 2009.38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) -Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

STÅL, C. Nya Hemiptera från Cafferlandet. *Öfv. Kongl. Vet.-Akad. Förh*, 10, 209-227. 1854.

TAVARES, D. A. **Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de abelhas africanizadas *Apis mellifera* após exposição à doses subletais do inseticida tiametoxam.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. 2011

TAVARES, D. A., ROAT, T. C., CARVALHO, S. M., SILVA-ZACARIN, E. C. M., e MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, 135, 370-378. 2015.

TERRA, WALTER R.; FERREIRA, CLÉLIA. 11–Biochemistry and molecular biology of digestion. **Insect molecular biology and biochemistry**, p. 365-418, 2012.

VIANA, B.F. Exemplos regionais de animais: *Melipona scutellaris*. **Projeto Qualibio**. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>>. Acesso em: 9 de fevereiro de 2017.

WEBBEE. **A abelha Uruçu.** Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/urucu/index.html>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2017.

WEBBEE. **Preferências florais da abelha Uruçu.** Disponível em: <http://www.webbee.org.br/urucu/preferencias_florais.htm>. Acesso em: 5 de fevereiro 2017.

A.H. WYLLIE, Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis, in: I.D. Bowen, L.A. Lockshin (Eds.), **Cell Death in Biology and Pathology**, Chapman and Hall, London, pp. 9–34. 1981

YOKOYAMA, N., HIRATA, M., OHTSUKA, K., NISHIYAMA, Y., FUJII, K., FUJITA, M., ... & TSURUMI, T. Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, 1493(1), 119-124. 2000