

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

LETÍCIA CESCHI BERTOLI

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA
ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE DO MERCÚRIO EM ABELHAS DA
ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI)**

SOROCABA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

LETÍCIA CESCHI BERTOLI

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA
ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE DO MERCÚRIO EM ABELHAS DA
ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla.

SOROCABA

2020

CESCHI BERTOLI, LETÍCIA

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE DO MERCÚRIO EM ABELHAS DA ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI) / LETÍCIA CESCHI BERTOLI. -- 2020.

124 f. : 30 cm.

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

Orientador: FABIO CAMARGO ABDALLA

Banca examinadora: Silvia Pierre Irazusta, Fabio de Lima Leite, Fabio Camargo Abdalla

Bibliografia

I. Ensaio Cometa. 2. *Bombus atratus*. 3. Mercúrio. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

LETÍCIA CESCHI BERTOLI

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA ANÁLISE DE
GENOTOXICIDADE DO MERCÚRIO EM ABELHAS DA ESPÉCIE *Bombus atratus*
(HYMENOPTERA, BOMBINI)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 03 de março de 2020.

Orientador

Prof. Dr. Fabio Camargo Abdalla
UFSCar – *Campus* Sorocaba

Examinador (a)

Prof^a. Dr^a. Sílvia Pierre Irazusta
FATEC – *Campus* Sorocaba

Examinador (a)

Prof. Dr. Fabio de Lima Leite
UFSCar – *Campus* Sorocaba

*Dedico este trabalho a quem sempre se
dedicou a mim: Valéria, Maria e Mel.*

Per tutta mia vita.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, sou grata a Deus pela oportunidade, sabedoria e força concedida para concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica;

Agradeço à minha mãe Valéria, minha avó Maria (*in memorian*) pelo imenso amor que sempre me deram, o qual, com certeza, foi a mola propulsora para as minhas conquistas pessoais e profissionais. Sou eternamente grata por todo incentivo, apoio e esforço para me proporcionarem uma educação digna e de qualidade;

A Mel (*in memorian*), minha “cãopanheira”, por toda fidelidade e amor imensuráveis. Muito obrigada por ter sido o meu refúgio nos momentos de angústia e por ter me acalmado tantas vezes mesmo sem dizer nada. Você foi a responsável pelos meus sorrisos mais sinceros! Obrigada por ter sido o meu ponto de paz;

Ao Rubens Neto, pelo companheirismo e parceria de sempre, pelo apoio e ajuda infundável nas mais diversas situações. Muito obrigada por tudo;

Às minhas amigas, Carol, Maristela, Camila e Alícia, por toda força, conselhos e amizade genuína apesar da distância que nos separa. Vocês são muito especiais, obrigada por tudo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla, pelos ensinamentos e oportunidades que me permitiram crescer profissionalmente, além de todos os conselhos, auxílio e confiança que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) e todos os seus integrantes, que tão bem me acolheram durante estes dois anos. Em especial ao Guilherme Boeing, meu companheiro direto de trabalho, que sempre foi muito solícito e nunca deixou de me ajudar nos experimentos e momentos delicados, além de sempre provocar risos e alegria todos os dias. Obrigada pela parceria singular e por compartilhar este período comigo;

Agradeço ainda, a Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA) e todo o seu corpo docente,

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, a qual foi fundamental para a minha permanência no mestrado.

Todos, aqui citados, foram essenciais durante esta trajetória e marcaram a minha história. Muito obrigada por tudo!

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a
caminhar.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal traço não essencial, altamente tóxico aos seres vivos e um dos principais contaminantes dos corpos d'água. Apesar da importância genotóxica do Hg, não há estudos sobre sua genotoxicidade em abelhas nativas neotropicais, utilizando biomarcadores de efeito. Pelo exposto, realizou-se um estudo da genotoxicidade do Hg em abelhas da espécie *Bombus atratus* por meio do ensaio cometa. Este ensaio determina a extensão do dano ocorrido no DNA de núcleos celulares individualmente, através da migração diferencial de fragmentos do DNA em microeletroforese. Apesar da efetividade e sensibilidade da técnica, não há registros na literatura da aplicabilidade desse ensaio em abelhas neotropicais do gênero *Bombus*, o qual apresenta muitas espécies ameaçadas de extinção. Operárias de *B. atratus* foram coletadas no município de Sorocaba, SP, (23°34'53.1"S 47°31'29.5") durante os meses de fevereiro a março de 2019. Após a coleta, as operárias foram colocadas, individualmente, em caixas especiais para o ensaio toxicológico e mantidas em incubadora a 26 °C, 70% de umidade, no escuro, por 48 horas, conforme recomendações da OECD. Foram utilizadas 11 operárias para o grupo exposto ao Hg à concentração de 0,2 µg L⁻¹, concentração de Hg considerada segura pelo CONAMA (nº 357, 2005), e mesmo número para o grupo controle. Ambos os grupos foram mantidos com uma solução de sacarose a 70%, adicionalmente ao grupo exposto ofertou-se solução de 0,2 µg L⁻¹ de Hg e ao grupo controle, água não contaminada. Após 48h, os tecidos que compõe o Sistema Hepatonefrocítico (SHN), vaso dorsal, hemócitos, corpo gorduroso e células pericárdicas e os túbulos de Malpighi (TM) foram coletados e processados para a realização do Ensaio Cometa. Os resultados mostraram que o Hg promoveu genotoxicidade nestes animais. Com relação ao grupo controle, o SHN das operárias expostas ao Hg mostrou-se sensível à contaminação pela presença abundante de diferentes níveis de cometas, os quais indicam a fragmentação do material genético, enquanto os TM, por sua vez, foram menos responsivos ao metal traço, apresentando menor quantidade de núcleos danificados. A análise estatística comparada entre os parâmetros nível 0 e dano total mostrou maior genotoxicidade promovida pelo Hg no SHN do grupo exposto com relação ao grupo controle. Por outro lado, a genotoxicidade nos TM foi semelhante entre os grupos controle e exposto. Portanto, conclui-se que o SHN é mais responsivo à exposição ao Hg do que os TM. Também se concluiu que a concentração de Hg considerada segura pelo CONAMA comprometeu as células que compõe o SHN, prejudicando a fisiologia geral da espécie estudada, mesmo que os TM não tenham sido afetados.

Palavras-chave: Dano DNA; abelhas; metal; genotoxicidade.

ABSTRACT

The mercury (Hg) is a non-essential trace metal, that is highly toxic to living beings, is a major contaminant of water bodies. Despite the genotoxic importance of Hg, there are no studies on its genotoxicity in native neotropical bees, using effective biomarkers. Therefore, a study of the genotoxicity of Hg in *Bombus atratus* bees was carried out through the comet assay. This assay determines the extent of DNA damage to individual cell nuclei by differential migration of DNA fragments in microelectrophoresis. Despite the effectiveness and sensitivity of the technique, there are no records in the literature about the applicability of this assay to *Bombus* neotropical bees, which have many endangered species. *B. atratus* workers were collected from Sorocaba, SP, (23°34'53.1"S 47°31'29.5") during the months of February to March 2019. After capture, the workers were individually placed in special boxes for the toxicological test and kept in an incubator at 26 °C, 70% humidity, in the dark, for 48 hours, according to OECD recommendations. Eleven workers were used for the group exposed to Hg at a concentration of 0.2 µg L⁻¹, concentration considered safe by CONAMA (n° 357, 2005), and the same number for the control group. Both groups were maintained with a 70% sucrose solution. In addition to the exposed group, 0.2 µg L⁻¹ Hg solution was offered, and to the control group, uncontaminated water. After 48 hours, the tissues that compose the Hepato-Nephrocytic System (HNS), dorsal vessel, hemocytes, fat body/pericardial cells, and Malpighi tubules (MT), were collected and processed for the comet assay. The results showed that Hg promoted genotoxicity in these animals. Regarding the control group, the HNS of workers exposed to Hg was sensitive to contamination due to the abundant presence of different levels of comets, which indicate the fragmentation of genetic material. While MT, in turn, were less responsive to the trace metal, presenting fewer damaged nuclei. Statistical analysis compared between level 0 and total damage parameters showed higher genotoxicity promoted by Hg in HNS of the exposed group, compared to the control group. While genotoxicity in MT was similar between control and exposed groups. Therefore, it can be concluded that HNS is more responsive to Hg exposure than MT. It was concluded that the concentration of Hg considered safe by CONAMA compromised the cells that compose the HNS, impairing the general physiology of the studied species, even if the TM were not affected.

Keywords: DNA damage; bees; metal; genotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 ABELHAS: <i>Bombus atratus</i>	16
3.1.1 Sistema Hepatonefrocítico.....	20
3.1.2 Túbulos de Malpighi.....	24
3.2 METAIS-TRAÇO: MERCÚRIO.....	25
4 CAPÍTULO 1: ENSAIO COMETA EM INSETOS: APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	30
4.1 INTRODUÇÃO.....	33
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.3.1 Ensaio Cometa.....	34
4.3.2 Ensaio Cometa em insetos.....	41
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
4.5 REFERÊNCIAS.....	48
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1 COLETA DAS ABELHAS.....	55
5.2 PROCEDIMENTOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	55
5.3 ENSAIO COMETA.....	57
5.3.1 Preparo das lâminas histológicas.....	57
5.3.2 Tratamento com Solução de Lise.....	57
5.3.3 Eletroforese.....	57
5.3.4 Coloração das lâminas histológicas.....	58
5.3.5 Adequação do protocolo original do Ensaio Cometa.....	58
5.3.6 Análise das lâminas histológicas.....	59
5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	61
6 CAPÍTULO 2: COMET ASSAY PROTOCOL FOR <i>Bombus atratus</i> FAT BODY AND PERICARDIAL CELLS (HYMENOPTERA, BOMBINI) AT A SAFE CONCENTRATION OF Hg.....	62
6.1 INTRODUCTION.....	64

6.2 MATERIAL AND METHODS.....	65
6.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	67
6.4 CONCLUSION.....	70
6.5 REFERENCES.....	71
7 CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE DANOS NO DNA DE ABELHAS <i>Bombus atratus</i> EXPOSTAS A UMA CONCENTRAÇÃO SEGURA DE MERCÚRIO.....	74
7.1 INTRODUÇÃO.....	75
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
7.3.1 Genotoxicidade do mercúrio no Sistema Hepatonefrocítico.....	78
7.3.2 Genotoxicidade do mercúrio nos túbulos de Malpighi.....	87
7.3.3 Morfologia dos túbulos de Malpighi.....	95
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
9 REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pertencentes à ordem Hymenoptera e à família Apidae, as abelhas são consideradas animais essenciais ao serviço ecossistêmico de polinização, pois atuam como os principais polinizadores em ecossistemas terrestres (NEFF; SIMPSON, 1993; BUCHMANN; NABHAN, 1996; COSTANZA *et al.*, 1997; KLEIN *et al.*, 2007; MICHENER, 2007). São conhecidas aproximadamente 20.000 espécies de abelhas, estando presentes em praticamente todos os continentes, caracterizando uma grande biodiversidade e adaptabilidade (RAMOS *et al.*, 2015).

O serviço de polinização prestado por esses insetos é fundamental para a conservação da biodiversidade vegetal, uma vez que contribui para a manutenção das comunidades vegetais, influenciando na riqueza e abundância de espécies em um determinado ecossistema (BAWA *et al.*, 1985). Além disso, contribuem também com a melhoria da quantidade e da qualidade de sementes e frutos produzidos, os quais são a base da cadeia alimentar nos sistemas naturais (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; OLIVEIRA, 2015; FREITAS *et al.*, 2017).

As abelhas são extremamente relevantes na atividade de polinização, pois visitam frequentemente flores específicas, caracterizando um comportamento de fidelidade floral, o que possibilita uma maior probabilidade de as flores visitadas serem polinizadas (FREITAS; PAXTON, 1998) e, por estarem presentes em praticamente quase todos os *habitats* e serem sensíveis às alterações ambientais, também são consideradas eficientes bioindicadoras da qualidade ambiental (PERUGINI *et al.*, 2011). Entretanto, apesar da sua principal importância ter caráter ecológico, as abelhas também são consideradas relevantes à economia devido ao seu papel na polinização de sistemas agrícolas e por meio do fornecimento de seus produtos, tais como o mel, própolis, cera, geleia real e pólen (MICHENER, 2007; LAUTENBACH *et al.*, 2012; LIMA; ROCHA, 2012).

Contudo, mesmo sendo fundamentais para a manutenção da vida no planeta, populações de diferentes espécies de abelhas estão em declínio, tais como a espécie exótica *Apis mellifera* e espécies nativas, como as abelhas do gênero *Bombus* (van der VALK *et al.*, 2012). Esse gênero compreende aproximadamente 240 espécies, das quais, apenas seis são encontradas no Brasil, sendo que as espécies *Bombus morio* e *Bombus atratus* localizam-se abundantemente no sul e sudeste do país (MOURE; SAKAGAMI, 1962; SAKAGAMI, 1976; WILLIAMS, 1998; MICHENER, 2000).

As causas desse declínio são diversas. Dentre os fatores principais, encontram-se as mudanças climáticas, o desmatamento para avanço de agricultura intensiva (culminando em

destruição e perda de *habitats*), uso exacerbado de agrotóxicos e atividades industriais e de mineração (FITZPATRICK *et al.*, 2007; SANTOS, 2010). Dessa forma, o crescente desaparecimento de populações de abelhas está diretamente associado ao declínio na polinização, o que compromete tanto a qualidade ambiental quanto a produtividade agrícola, uma vez que estes polinizadores são utilizados em diversas monoculturas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

As atividades industriais e de mineração representam uma das principais fontes de emissão de mercúrio (Hg) no ambiente. A principal fonte antrópica de Hg advém da queima de combustíveis fósseis e da sua emissão por indústrias químicas e de eletroeletrônicos, enquanto, no Brasil destaca-se como a principal fonte emissora deste composto a mineração, a qual utiliza o Hg na amalgamação do ouro para extração (LACERDA; PFEIFFER, 1992; LACERDA *et al.*, 2007; TINÔCO *et al.*, 2010).

O Hg é um metal traço não essencial aos seres vivos e altamente tóxico, que se caracteriza por ser cumulativo, pouco degradável, difícil de ser metabolizado e altamente reativo às biomoléculas (ZAHIR *et al.*, 2005; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Dessa forma, é considerado uma substância com potencial genotóxico significativo, sendo relevante para estudos com abordagem ecotoxicológica, uma vez que este é o ramo da biologia que estuda, dentre outros parâmetros, os efeitos e impactos de agentes tóxicos em organismos vivos de determinado ecossistema (TRUHAUT, 1977; BUTLER, 1978; ZHOU *et al.*, 2007; NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Além disso, o nível de Hg encontrado nos produtos apícolas (mel, cera, pólen e própolis) têm preocupado os pesquisadores não só por ser deletério aos seres humanos, mas também às abelhas (TOPORCÁK *et al.*, 1992; FREITAS *et al.*, 2009; BATELKOVÁ *et al.*, 2012; PABLO *et al.*, 2012; MAGGID *et al.*, 2014).

Nessa perspectiva, é possível compreender os danos genéticos causados pela ação do Hg nas abelhas por meio do ensaio cometa, uma metodologia comumente utilizada em estudos genotoxicológicos que possibilita a avaliação e quantificação de danos no material genético do organismo em estudo. Trata-se de uma técnica altamente sensível que pode ser aplicada para determinar a extensão de danos no DNA de núcleos celulares individualizados, uma vez que o seu princípio consiste na migração diferencial dos fragmentos de DNA através de um processo de microeletroforese (ÖSTILING; JOHANSON, 1984). Esse ensaio é considerado um eficiente biomarcador de genotoxicidade e tem sido amplamente aplicado em estudos de biomonitoramento em organismos sujeitos à exposição de diversos contaminantes ambientais, pois permite a investigação do mecanismo de ação de compostos químicos genotóxicos e a

influência dos metais traço não essenciais no ambiente (MOLLER, 2005; AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016).

Nesse contexto, a análise do efeito genotóxico do Hg em operárias da espécie *Bombus atratus*, por meio da aplicação do ensaio cometa, é fundamental para a elucidação do impacto causado por essa substância nestes organismos, resultando em um estudo relevante para a promoção de ações futuras focadas na conservação destes animais, os quais são extremamente importantes, tanto ecológica quanto economicamente. Assim, o parâmetro utilizado nesta pesquisa visou verificar se a concentração de Hg considerada segura para todos os corpos d'água pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA nº 357, 17 de março de 2005) é, de fato, segura às abelhas da espécie *B. atratus*.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito genotóxico do mercúrio a uma concentração considerada segura pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005) sobre o sistema hepatonefrocítico e túbulos de Malpighi de operárias de *Bombus atratus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo do ensaio cometa para melhor visualização dos resultados em operárias de *Bombus atratus* expostas a uma concentração de mercúrio considerada segura ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$);
- Analisar, por meio dessa metodologia, o efeito genotóxico do mercúrio de mesma concentração no sistema hepatonefrocítico e nos túbulos de Malpighi destes animais,
- Realizar um estudo morfológico comparado dos túbulos de Malpighi entre operárias expostas a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio e grupo controle.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ABELHAS: *Bombus atratus*

As abelhas são vitais para a manutenção da estrutura e funcionamento de grande parte dos ecossistemas naturais, bem como para a agricultura, representando a maioria dos insetos polinizadores (KEARNS; INOUE, 1997; SCHÖNFELDER; BOGNER, 2017). Estes insetos pertencem a ordem Hymenoptera, com aproximadamente 20.000 espécies descritas e utilizam recursos florais como fonte de alimento e energia durante todo o seu ciclo de vida (MICHENER, 2000). A maioria apresenta hábitos solitários, enquanto aproximadamente 1.000 espécies são sociais com diferentes graus de sociabilidade (FREITAS *et al.*, 2009).

Dentre os insetos, as abelhas são consideradas eficientes indicadoras do estresse ambiental, principalmente devido à sua capacidade de percorrer longas distâncias e interagirem em diferentes *habitats*, sendo a principal espécie polinizadora que contribui para a manutenção de florestas e da diversidade floral, visto que mais de 90% das espécies de vegetação tropical com flores e cerca de 78% das espécies de zonas temperadas necessitam da polinização pelas abelhas (FERNANDEZ, 1994; SANNA *et al.*, 2000; BULDINI *et al.*, 2001; BOGDANOV *et al.*, 2003; DEVILLERS; PHAM-DELEGUE, 2003; FAO, 2004; FREDES; MONTENEGRO, 2006; KLEIN *et al.*, 2007).

Ao visitarem as flores para a coleta de pólen ou néctar, as abelhas não causam danos à flor ou à planta, o que, conseqüentemente, proporciona benefícios à manutenção da biodiversidade dos ecossistemas naturais (DEVILLERS, 2003). No entanto, as abelhas também são economicamente importantes, pois ao polinizarem sistemas agrícolas, os frutos apresentam maior tamanho e melhor qualidade (MCGREGOR, 1976; JARLAN *et al.*, 1997; LIMA; ROCHA, 2012).

A análise de órgãos internos das abelhas também é um aspecto de extrema importância e que deve ser considerado ao lhe atribuir o título de bioindicadora ambiental uma vez que, por possuírem respiração traqueal, são atingidas diretamente por qualquer tipo de contaminante, incluindo resíduos de poluentes e xenobióticos, os quais podem se acumular em seus órgãos e tecidos (BOGDANOV *et al.*, 2003; CRUZ-LANDIM, 2009; CRUZ *et al.*, 2010). O termo xenobiótico deriva da junção das palavras gregas *xeno* (estranho) e *bios* (vida), sendo literalmente atribuído às substâncias estranhas aos organismos, pois são capazes de alterar o equilíbrio orgânico e também promover toxicidade genética (NATIVIDADE; RODRIGUES; VIEIRA, 2011; IOVDIJOVÁ; BENCKO, 2010). São representados principalmente por

pesticidas agrícolas, inseticidas, plásticos, metais e fármacos (IAVICOLI, FONTANA; BERGAMASCHI, 2009; IOVDIJOVÁ; BENCKO, 2010). Todavia, além da exposição por contato, as abelhas também podem ser expostas aos xenobióticos por meio da ingestão de néctar e pólen de plantas contaminadas pelo ar, água e solo durante o seu cultivo (BOGDANOV, 2007).

As abelhas do gênero *Bombus*, popularmente conhecidas como mamangavas, são grandes e pilosas e apresentam coloração diferenciada no tórax e abdômen, variáveis de acordo com a espécie e subespécie. O gênero é composto por abelhas sociais primitivas que exploram uma alta variedade de *habitats*, possuindo uma distribuição geográfica ampla, sendo encontradas geralmente em regiões de clima moderadamente seco e temperado até florestas tropicais e subtropicais, e por isso, o Brasil constitui uma zona periférica de distribuição do gênero (MOURE; SAKAGAMI, 1962; WILLIAMS, 1994; CAMERON *et al.*, 2007).

Como são cosmopolitas, as abelhas do gênero *Bombus* apresentam-se distribuídas por todo o planeta, principalmente em quase todo o hemisfério norte e com ampla dispersão na América do Sul. Apesar dessa extensa distribuição geográfica pelo globo, as espécies de *Bombus* apresentam características morfológicas semelhantes, sugerindo que a capacidade de adaptação destes animais é fundamental para a colonização de diversos *habitats*, dentre eles as terras tropicais do Brasil (MOURE; SAKAGAMI, 1962; CAMERON *et al.*, 2007).

Por serem estruturalmente grandes, conseguem transportar uma maior carga de pólen para diferentes paisagens geobotânicas e o forrageamento é possibilitado mesmo em condições adversas. Além disso, possuem estruturas especializadas que lhes garante aperfeiçoar o processo de polinização, como a presença de uma glossa longa que alcança até mesmo flores com corolas tubulares longas. Essas abelhas apresentam comportamento de vibração do tórax, agitando as anteras e liberando o pólen; este comportamento é de extrema importância para aumentar a variabilidade ou mesmo para que ocorra a fecundação cruzada em determinadas espécies vegetais, como o tomate (AGUILAR-BENAVIDES, 2008).

A longevidade de *Bombus* varia conforme a região em que se encontra; duram de 13 a 34 dias em regiões de clima temperado e, em média, 41 dias em regiões de clima tropical (SILVA-MATOS; GARÓFALO, 2000). Durante todo o ciclo de vida sua alimentação é retirada, com maior frequência, de plantas das famílias Asteraceae, Leguminosae, Melastomaceae, Verbanaceae e Solanaceae (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2003), sendo que as abelhas adultas possuem uma dieta rica em néctar, pois este fornece energia para o voo, enquanto a alimentação das larvas é constituída de uma mistura de pólen e mel, os quais são

responsáveis por fornecerem nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento (WILLIAMS, 1994).

No Brasil são encontradas apenas seis espécies de *Bombus*, todas pertencentes ao subgênero *Fervidobombus*: *B. atratus* Franklin, 1913, *B. bellicosus* Smith, 1879, *B. brasiliensis* Lepeletier, 1836, *B. brevivillus* Franklin, 1913, *B. morio* (Swederus, 1787) e *B. transversalis* (Olivier, 1789) (MOURE; SAKAGAMI, 1962). As abelhas da espécies *B. atratus* ocorrem em 12 Estados brasileiros: BA, ES, GO, MG, MS, MT, PR, RJ, RO, RS, SC, SP; *B. morio* apresenta praticamente a mesma distribuição de *B. atratus*, não tendo sido encontrada no Estado de RO; *B. bellicosus* é a que apresenta menor distribuição, encontradas apenas em PR e RS; já *B. transversallis* tem sido encontrada em AC, AM, AP, MT, PA e RO, *B. brasiliensis* ocorre no ES, GO, MG, MS, PR, RJ, SC e SP enquanto *B. brevivillus* ocorre no AP, BA, CE, ES, GO, MT, PA, PB, PE, RJ e RN (MOURE; SAKAGAMI, 1962).

A *B. atratus* (Figura 1) é uma espécie neotropical encontrada em regiões da América do Sul, incluindo países como a Colômbia, o Equador, o Brasil e a Argentina. Essas abelhas possuem cor predominantemente preta e corpo praticamente todo recoberto por curtas cerdas. Vivem em colônias não perenes pequenas, constituídas por uma rainha fundadora e não mais do que uma centena de operárias, as quais são responsáveis pela coleta de alimento (GARÓFALO, 1976). As operárias possuem uma longa probóscide, a qual facilita a coleta de néctar em flores com uma morfologia mais tubular e profunda. Suas antenas são relativamente longas. Operárias possuem um comprimento de asa entre 4 e 10 mm e as rainhas costumam ser de duas a três vezes maiores que as operárias (SILVA-MATOS, 1986; 1993).

FIGURA 1 – Abelha operária da espécie *Bombus atratus*



Fonte: *Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, 2019.*

Relatos de desaparecimentos e diminuição das populações de muitas espécies do gênero *Bombus* nas Américas e no Leste da Europa vêm agravando a urgência em identificar as causas deste fenômeno. Nos anos entre 1950 a 2000 foram registrados o desaparecimento de populações de 13 espécies de *Bombus* na Europa Ocidental, sendo que quatro delas são consideradas extintas (KOSIOR *et al.* 2007). Na América do Norte, desde 1940, as espécies *B. borealis*, *B. terricola* e *B. variabilis* desaparecem do Estado de Illinois, EUA (GRIXTI *et al.*, 2009) e o mesmo vem ocorrendo com as espécies *B. affinis*, *B. fraternus*, *B. pensylvanicus* e *B. vagans* (GRIXTI *et al.*, 2009; CAMERON *et al.*, 2011). Além disso, populações da espécie *B. occidentalis*, muito utilizada para polinização em estufa nos EUA, estão decrescendo drasticamente (CARSWELL, 2015).

De acordo com o Serviço Americano de Pesca e Fauna Selvagem (USFWS, do inglês, *United States Fish and Wildlife Service*, 2017), a espécie *B. affinis* foi incluída pelas autoridades estadunidenses na lista de espécies em risco de extinção; sendo esta a primeira vez que uma espécie de abelha é objeto de tal medida no território de proporções continentais dos Estados

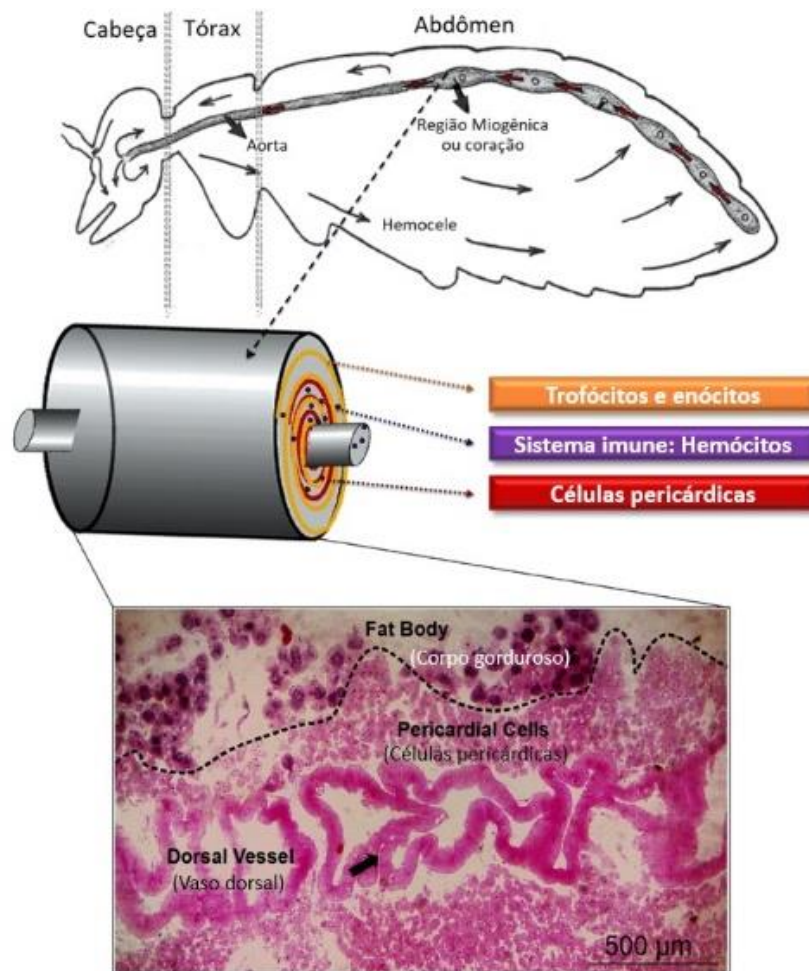
Unidos. Segundo a Associação Brasileira de Estudos das Abelhas (2017), a população destas abelhas diminuiu cerca de 88% desde o ano de 2000, coincidindo com a perda ou degradação de 87% de seu *habitat*, associada aos efeitos nocivos de pesticidas e patógenos. No Brasil, por sua vez, o caso da espécie *B. bellicosus* é o mais notável, onde o desaparecimento de populações destas abelhas nos estados do Paraná e Santa Catarina está relacionado ao aumento de áreas industrializadas e de zonas de agricultura intensiva (MARTINS; MELO, 2010).

Os fatores para a diminuição e/ou desaparecimento de espécies do gênero *Bombus* são diversos; porém, pode-se citar que o aquecimento global, alteração dos ecossistemas e aumento de parasitas oportunistas, aumento das regiões de agricultura intensiva e maior uso de agrotóxicos, industrialização e, conseqüente, aumento da liberação de resíduos tóxicos industriais que contaminam o ambiente são os responsáveis para a ocorrência deste evento (EVANS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; DE JONG, 2009; PLISCHUK *et al.*, 2009, MARTINS; MELO, 2010; CAMERON *et al.*, 2011, HUNG *et al.*, 2018).

3.1.1 Sistema Hepatonefrocítico

Descrito por Abdalla e Domingues (2015), o sistema hepatonefrocítico é formado pela associação de uma camada externa constituída pelo corpo gorduroso a uma camada interna de células pericárdicas, a qual recobre todo o vaso dorsal e é mais desenvolvida na região do *sinus pericadium*, ou coração. Além desses tecidos, os hemócitos, células do sistema imunitário, também o compõe. Todos esses tecidos e células desempenham papéis no metabolismo intermediário, na filtragem e desintoxicação da hemolinfa, assim como na defesa imunitária, portanto, os autores o designaram como sistema hepatonefrocítico (SHN), em alusão às funções análogas desempenhadas pelo fígado e rins dos vertebrados. Como as abelhas não possuem nefrócitos, este sistema complementaria a atividade dos túbulos de Malpighi (Figura 2) (ABDALLA; DOMINGUES, 2015).

FIGURA 2 - Representação esquemática do Sistema hepato-nefrocítico



Fonte: Adaptado de Abdalla e Domingues, 2015.

O vaso dorsal é um órgão tubular que se estende dorsalmente por toda a região torácica até a região abdominal do corpo do inseto (Figura 3), sendo dividido em duas porções: a aorta, presente na região do tórax e caracterizada por ser um tubo de parede fina e não pulsátil, e o coração, localizado numa região denominada *sinus pericardium* e que possui células musculares estriadas com função contrátil, característica importante para a condução da hemolinfa do abdômen, ao tórax e cabeça, garantindo o transporte de hormônios e nutrientes para os tecidos (POIANI; CRUZ-LANDIM, 2007; CRUZ-LANDIM, 2009; CHAPMAN, 2013; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2013).

FIGURA 3 - Vaso dorsal. Legenda: **vd** – vaso dorsal.



Fonte: *Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, 2017.*

Já o corpo gorduroso, é um órgão que preenche toda a cavidade do corpo dos insetos, sendo distribuído em uma camada abaixo do tegumento (parietal) e outra camada ao redor dos órgãos internos, ou visceral (CRUZ-LANDIM, 2009). Nas abelhas, dois tipos celulares principais constituem esse órgão, os trofócitos e os enócitos. A principal função exercida pelos trofócitos consiste no fornecimento de energia necessária para as atividades metabólicas, como a síntese proteica da hemolinfa. Já os enócitos são responsáveis pela regulação da composição da hemolinfa, atuando diretamente na eliminação de produtos tóxicos ao organismo, desempenhando papel fundamental em processos de desintoxicação (KUTERBACH *et al.*, 1982; STEELE, 1985; FAN *et al.*, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2007; CRUZ-LANDIM, 2009).

As células pericárdicas, por sua vez, são encontradas ao longo de toda a extensão do vaso dorsal e estão organizadas em cordões com agrupamentos de até seis células enfileiradas.

Além disso, também são encontradas ao redor do esôfago, onde são chamadas de “Garland cells” (HOCHAPFEL *et al.*, 2018). Morfologicamente, caracterizam-se pela presença de um ou mais núcleos, vacúolos e grânulos citoplasmáticos (CRUZ-LANDIM, 2009). Elas desempenham função filtradora e excretora, pois são capazes de pinocitar e metabolizar substâncias tóxicas presentes na hemolinfa produzindo, assim, metabólitos de menor toxicidade que são liberados para serem excretados pelos túbulos de Malpighi ou permanecem nestas células por toda vida da abelha (MILLS; KING, 1965; CROSLLEY, 1972; POIANI; CRUZ-LANDIM, 2006; DAS *et al.*, 2008; CRUZ-LANDIM, 2009; HOCHAPFEL *et al.*, 2018).

A hemolinfa é um líquido constituído de substâncias inorgânicas e de células denominadas hemócitos, que se distribui por todo o corpo do inseto (CRUZ-LANDIM, 2009). Os hemócitos desempenham diversas funções importantes para as abelhas, tais como, defesa imunitária, transporte de nutrientes, coagulação da hemolinfa, secreção de enzimas hidrolíticas, entre outros (JONES, 1979; LAVINE; STRAND, 2002). No entanto, apesar do aumento de estudos sobre os hemócitos nas últimas décadas, a hematologia dos insetos não está totalmente definida, pois há divergências na literatura tanto em relação a sua classificação em diferentes tipos quanto em relação a sua origem, tendo em vista que há controvérsias se estas células possuem origem mesodérmica ou se originam-se de divisões de células pluripotentes de órgãos hematopoiéticos (JONES, 1962; GUPTA, 1969; STAURENGO-CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1971; STAURENGO-CUNHA; CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1976; CRUZ-LANDIM, 2009).

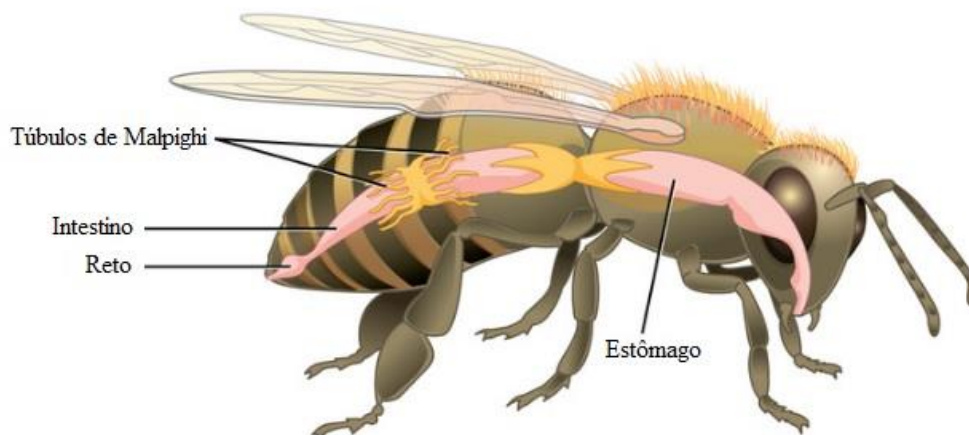
A combinação desses tecidos forma um sistema integrado, tendo em vista que a hemolinfa segue um caminho sequencial até chegar ao vaso dorsal. Inicialmente, a hemolinfa passa pelo corpo gorduroso e, posteriormente, pelas células pericárdicas, tecidos importantes na regulação de sua composição para, somente assim, ser internalizada no vaso dorsal através dos ostíolos localizados ao longo de sua parede (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). A hemolinfa é também distribuída no interior do corpo da abelha pela simples agitação mecânica de seu corpo (CRUZ-LANDIM, 2009).

Neste sentido, o SHN é um potencial biomarcador para estudos de toxicidade, pois devido às características dos tecidos que o constituem, atua diretamente no metabolismo secundário, na produção de vitelogenina, que além de ser um antioxidante, é o principal componente proteico dos óvulos, atua também em processos de desintoxicação possuindo grande capacidade de responder a produtos tóxicos sendo, portanto, extremamente relevante em estudos ecotoxicológicos e de monitoramento ambiental (ABDALLA; DOMINGUES, 2015).

3.1.2 Túbulos de Malpighi

O sistema excretor dos insetos é constituído por estruturas longas e finas que se encontram livres na cavidade do corpo, denominadas túbulos de Malpighi (TM) (Figura 4). Esse órgão é originado pela evaginação da extremidade anterior do intestino posterior e possui três regiões estruturalmente distintas: a região proximal, ligada ao tubo digestório na transição do intestino posterior e médio; a região intermediária e a região distal, que é livre e termina em um fundo cego na cavidade do corpo (CHAPMAN, 1998). Essas regiões são compostas por tipos celulares diferentes que desempenham funções distintas na filtração da hemolinfa (CRUZ-LANDIM, 1988; CRUZ-LANDIM, 2009).

FIGURA 4 - Representação esquemática dos túbulos de Malpighi em abelhas.



Fonte: *Adaptado de Biology – LibreTexts, 2005*

Apenas uma única camada de células (epitélio simples) forma a parede dos TM. Enquanto a região apical das células caracteriza-se pela presença de numerosas microvilosidades justapostas e organizadas, responsáveis por aumentarem a superfície de transporte de água e íons entre o citoplasma e o lúmen do túbulo, a região basal possui inúmeras invaginações que são responsáveis por aumentar a área de superfície da membrana plasmática, promovendo, assim, maior eficiência no transporte de água e íons presentes na hemolinfa para o interior das células (BRADLEY, 1985; MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1985).

A morfologia das células está diretamente relacionada às funções que esse órgão exerce. Os TM atuam por meio de transporte ativo, na remoção de substâncias tóxicas ou prejudiciais

presentes na hemolinfa, como metabólitos tóxicos e compostos nitrogenados, além de atuarem também na retenção e reabsorção de substâncias que são essenciais ao organismo, auxiliando na homeostase da hemolinfa (WIGGLESWORTH, 1965; HAZELTON *et al.*, 2001; NOCELLI *et al.*, 2016). Nesse sentido, sua principal função consiste na excreção de compostos que não foram metabolizados ou se encontram em excesso na hemolinfa, como produtos nitrogenados, e na reabsorção de elementos úteis ao metabolismo celular sendo, portanto, fundamental no processo de osmorregulação dos insetos (BERRIDGE; OSCHMANN, 1969; EICHELBERG; WESSING, 1975).

A quantidade de TM pode variar em cada organismo, sendo que, na ordem Diptera é relatado a presença de 4 túbulos; na ordem Lepdoptera a presença de 6, em Odonata este número pode variar de 50 a 60 túbulos e em Orthoptera de 2 a 200. Em Hymenoptera, por sua vez, este número varia de 12 a 150, sendo que indivíduos da espécie *B. atratus* apresentam 80 túbulos (GREEN, 1979; CRUZ-LANDIM, 2009).

Sendo assim, por estarem presentes em todas as espécies de insetos, os TM representam um dos órgãos-chave para estudos ecotoxicológicos destes animais, tornando-se altamente úteis como um potencial biomarcador de exposição à compostos tóxicos e poluição ambiental (BREITHOLTZ *et al.*, 2006).

3.2 METAIS-TRAÇO: MERCÚRIO

Também conhecidos como metais pesados, o grupo dos metais-traço abrange os elementos metálicos, semi-metálicos e não metálicos que possuem número atômico maior que 20 e densidade superior a 5 mg.cm^{-3} (MALAVOLTA, 2006; MARTINS *et al.*, 2011). Esses elementos são denominados “elementos potencialmente tóxicos”, uma vez que geralmente são encontrados no ambiente em baixas concentrações e possuem propriedades prejudiciais aos seres vivos, podendo constituir uma fonte potencial de poluição ambiental (SANTANA, 2010).

Nessa perspectiva, o termo “metal-traço” remete a elementos tóxicos e poluidores, englobando, por exemplo, o chumbo (Pb), o arsênio (As) e o mercúrio (Hg), considerados pela Agência para o Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, do inglês, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) como as três substâncias que possuem maior potencial tóxico e que, conseqüentemente, exigem uma prioridade no controle e monitoramento destes elementos (GUILHERME, 1999; ATSDR, 2005; MARTINS *et al.*, 2011). Entretanto, enquanto alguns compostos classificados como “metais-traço” não são essenciais aos seres vivos, outros

de mesma classificação, tais como o zinco (Zn), cobre (Cu) e o manganês (Mn) são biologicamente essenciais quando absorvidos em concentrações adequadas, mas que podem se tornar tóxicos se estas concentrações ultrapassarem o nível de tolerância do organismo (MARTINS *et al.*, 2011). No entanto, para o estabelecimento da real toxicidade da substância, outros parâmetros devem ser considerados, como os tipos de organismos expostos, as vias de exposição e a capacidade de assimilação de metais (PEIJNENBURG; JAGER, 2003).

O Hg, como já mencionado, é um metal-traço não essencial aos seres vivos e altamente tóxico, sendo reconhecido pela comunidade científica como um poluente global (D'ITRI, 1991). Possui, entre outras propriedades, alta volatilidade em temperaturas elevadas, o que lhe permite percorrer longas distâncias até ser condensado em locais de baixa temperatura e, como possui capacidade de biomagnificação, representa um perigo à integridade dos ecossistemas devido ao risco de contaminação, tendo em vista que este metal não apresenta uma fonte de degradação natural capaz de eliminá-lo e sua concentração aumenta à medida que percorre a cadeia alimentar, acumulando-se no nível trófico mais elevado e podendo permanecer no ambiente por um longo período de tempo (AZEVEDO, 2003; LAMBORG *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Este metal assume diversas formas químicas que podem ser divididas nas seguintes categorias: mercúrio elementar de vapor ou líquido (Hg^0), mercúrio inorgânico, principalmente na forma de sais mercúricos (HgCl_2 , HgS - ou cianábrio) e mercuriosos (Hg_2Cl_2) e mercúrio orgânico, ligado a radicais de carbono, como o metilmercúrio (metil-Hg) e o etilmercúrio (BERNHOF, 2011).

Com exceção do Hg^0 , as outras formas do Hg são altamente catiônicas, sendo capazes de interagir com cadeias de carbono e átomos de enxofre, átomos abundantes e importantes para a estrutura e a função das biomoléculas. O metil-Hg é considerado o composto mais tóxico quando comparado ao mercúrio inorgânico, pois é a forma que mais contribui para a bioacumulação do Hg e morte de animais, podendo ser produzido tanto de forma abiogênica quanto por processos de metilação realizada por bactérias presentes na água e nos solos (BISINOTI; JARDIM, 2004; SOUZA; SANTANA, 2013).

Já os sais de Hg, principalmente os cloretos, também são altamente prejudiciais, pois são lipossolúveis, característica que lhes permite atravessar as membranas celulares dos organismos expostos, ligando-se às macromoléculas biológicas, alterando, inativando ou destruindo os sistemas enzimáticos e interferindo na funcionalidade e integridade dos ácidos nucleicos, comprometendo severamente as funções celulares, pois além de provocarem distúrbios metabólicos gerais, são capazes de causar mutagênese, cito- e genotoxicidade, tendo

em vista que mutagênese pode ser definida como a indução de alterações permanentes e transmissíveis no número ou na estrutura do DNA, genotoxicidade refere-se à capacidade de compostos químicos induzirem alterações no material genético de organismos a eles expostos e citotoxicidade diz respeito a capacidade de uma substância induzir a morte da célula. (GOODMAN; GILMAR, 1995; GUILLOUSO, 1998; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; DURUIBE *et al.*, 2007; RUTTKAY-NEDECKY *et al.*, 2013).

As proteínas chamadas metalotioneínas (MTs) são macromoléculas responsáveis tanto pela regulação de metais essenciais quanto pelo processo de desintoxicação de metais tóxicos (INÁCIO, 2006). As MTs possuem o Zn^{2+} (metal essencial) como co-fator, porém este elemento pode ser facilmente substituído por outros íons metálicos não essenciais como o Hg, Cd^+ , Ag^+ e Cu^+ , sendo o Hg o metal de maior afinidade para ligação com estas proteínas. Assim, quando o mercúrio inorgânico liga-se às MTs pode provocar a inativação parcial ou total de suas funções (VIEIRA, 2017).

Nesse sentido, a exposição ao Hg é uma ameaça significativa a todos os seres vivos e aos ecossistemas do mundo todo, pois todas as formas em que é encontrado podem produzir toxicidade sistêmica (WHO, 1989; GRAEME; POLLACK, 1998), tendo em vista que é capaz de diminuir a capacidade neurológica e neurocomportamental (MERGLER *et al.*, 2007; BRIDGES *et al.*, 2016; LANDLER *et al.*, 2017); capaz de causar imunotoxicidade (LEWIS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; CROWE *et al.*, 2017) e nefrotoxicidade (TCHOUNWOU *et al.*, 2003), além de alterar o sistema endócrino (MEYER *et al.*, 2014) e a reprodução dos organismos expostos (KLAPER *et al.*, 2006; HOPKINS *et al.*, 2013). Por ser bioacumulativo, pode contaminar todas as espécies vegetais, inclusive o pólen, o néctar e as sementes, como também pode afetar sua germinação e crescimento (ZHOU *et al.*, 2007; MMA, 2013), colocando em risco a biodiversidade tanto da fauna, quanto da flora de diversos ecossistemas, o que tem causado, gradualmente, grande preocupação na comunidade científica (D'ITRI, 1991; AREFIEVA; KAMAEVA; KRASILSHCHIKOVA, 2015).

Nos insetos, por sua vez, esse metal pode alterar a taxa de crescimento, o sistema imunitário e de desintoxicação e aumentar sua taxa de mortalidade, sendo considerado um importante fator de genotoxicidade relevante em estudos ecotoxicológicos (ZHOU *et al.*, 2007; VANOOIK *et al.*, 2008; DUBOVSKIY *et al.*, 2011). Os níveis de Hg nos produtos apícolas (mel, cera, pólen e própolis) têm preocupado os pesquisadores não só por serem deletérios aos seres humanos, mas também às abelhas (TOPORCÁK *et al.*, 1992; FREITAS *et al.*, 2009; BATELKOVÁ *et al.*, 2012; PABLO *et al.*, 2012; MAGGID *et al.*, 2014).

Apesar dessa problemática, fontes antropogênicas de Hg são numerosas e difundidas por todo o planeta (TOTH *et al.*, 2016). Dentre elas, a que representa a maior emissão de mercúrio é a combustão do carvão e de outros combustíveis fósseis (AREFIEVA; KAMAEVA; KRASILSHCHIKOVA, 2015). O Hg já foi amplamente utilizado em amálgamas dentárias, fármacos e instrumentos de medição e calibração, entretanto, atualmente é mais utilizado em atividades industriais como catalisador na produção de soda cáustica, em baterias e lâmpadas domésticas, barômetros, pesticidas, pintura, produção de seda artificial, entre outros (CCOHS, 2000; TOTH *et al.*, 2016). Os processos de mineração do ouro também contribuem significativamente para a emissão de Hg no ambiente. No Brasil, essa atividade representa a maior fonte antropogênica dessa substância, pois após a remoção da fração pesada de sedimentos dos rios, solos ou rochas, o Hg é usado para promover a separação de partículas finas de ouro por meio de amálgama (LACERDA; PFEIFFER, 1992; SALOMONS, 1995; LACERDA *et al.*, 2007; TINÔCO *et al.*, 2010).

Durante o processo de mineração, o Hg pode escapar para a atmosfera em forma de vapor, podendo ser depositado nos solos e ecossistemas aquáticos ou ser reabsorvido pelo corpo humano através da respiração em uma proporção de 75~80%, ocasionando envenenamento crônico por Hg se este vapor for inalado por um longo período de tempo (SALOMONS, 1995; CASTILHOS, 2015). Na região da Amazônia, a biodiversidade encontra-se em risco pela contaminação com Hg, pois um estudo recente realizado pelo Fundo Mundial para a Vida Selvagem e Natureza (do inglês, *World Wide Fund for Nature Brazil* - WWF Brasil) em parceria com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) indica que diversas espécies de peixes estão altamente contaminadas devido ao uso indiscriminado de Hg na mineração do ouro (WWF, 2017). Costa Junior *et al.* (2018), demonstraram ainda que as comunidades ribeirinhas da região Amazônica também estão sofrendo contaminação por esta substância, principalmente pelo consumo de pescado com concentração elevada de Hg.

Crimes ambientais também são responsáveis por elevarem os níveis de Hg no ambiente. No ano de 2015, a barragem de rejeitos da empresa Samarco Mineração S.A, localizada na cidade de Mariana, Minas Gerais, Brasil, rompeu-se liberando aproximadamente 45 milhões de m³ de rejeitos e destruindo a Bacia do Rio Doce, e a análise de sedimentos revelou altos níveis de Hg e outros metais no ecossistema local, sendo que a concentração de Hg ultrapassou os limites estabelecidos pelas diretrizes de qualidade da água do país (HATJE *et al.*, 2017; FARIA, 2018). Em 2019, uma barragem de rejeitos também rompeu na cidade de Brumadinho, Minas Gerais, Brasil, contaminando aproximadamente 120 quilômetros do rio Paraopeba com metais pesados e, conseqüentemente, impactando as cidades ribeirinhas da região. De acordo com o

Instituto de Gerenciamento de Água de Minas Gerais (2019), os níveis de Hg que nunca haviam sido detectados anteriormente na Bacia do Rio Paraopeba, começaram a se acumular em valores altos logo após a ruptura da barragem.

Entretanto, vale ressaltar que, apesar das fontes antropogênicas de Hg serem significativas, há a existência de fontes naturais de emissão deste elemento como, por exemplo, em regiões de atividades tectônica e vulcanismo, com maior abundância em rochas magmáticas intrusivas (LAMBORG *et al.*, 2002).

Pelo exposto, a contaminação por Hg tornou-se, há décadas, motivo de preocupação devido aos seus diversos prejuízos para a saúde humana e toda a biota (CASTILHOS, 2015). Nesse sentido, a fim de estabelecer um limite seguro para exposição ao Hg, a legislação brasileira determinou, por meio do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a concentração máxima de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg permitida para águas salobras da Classe VII e águas doces da Classe II (Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005). Sendo assim, é neste contexto que o objetivo do presente trabalho se insere, visando constatar se esta concentração pode ser, de fato, considerada segura para a ecotoxicologia terrestre, tendo como modelo as abelhas.

4 CAPÍTULO 1: ENSAIO COMETA EM INSETOS: APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

Resumo

O ensaio cometa é uma metodologia rápida e relativamente simples que tem sido cada vez mais utilizada para determinar danos ocorridos no DNA de diversos organismos. Dentre estes animais, os insetos têm se tornado alvos de inúmeros estudos de genotoxicidade em ecotoxicologia, pois são considerados eficientes bioindicadores do estresse ambiental. Nesta perspectiva, o objetivo desta pesquisa foi realizar uma revisão bibliográfica a partir de um levantamento de trabalhos que aplicaram o ensaio cometa em insetos para estudos de genotoxicidade. Para isso, os bancos de dados PubMed e SCOPUS foram utilizados utilizando palavras-chave como “*comet assay*” e “*comet assay e insects*”, delimitado no período de 2002 a 2018. Após a seleção dos artigos, notou-se que a aplicação do ensaio cometa cresceu gradualmente no período analisado, de forma que os trabalhos com insetos se concentram principalmente na espécie *Drosophila melanogaster*, um organismo modelo amplamente empregado em estudos genéticos, mas outras espécies de diferentes ordens também já foram utilizadas. Além disso, observou-se que a abordagem principal com esses animais segue uma tendência predominante em biomonitoramento ambiental, analisando o potencial genotóxico de diferentes compostos, a fim de entender os efeitos em nível molecular causados nestes animais, para evidenciar o risco destes seres expostos a estas substâncias. Contudo, apesar da ascensão de trabalhos nessa área, ainda é necessário ampliar sua aplicação para uma maior biodiversidade, contemplando também organismos nativos para compreender melhor sua ecologia, realizar um biomonitoramento ambiental mais efetivo e a adotar estratégias de conservação destes animais no futuro.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Genotoxicidade. Bioindicador.

Abstract

The comet assay is a rapid and relatively simple methodology that has been increasingly used to determine DNA damage from various organisms. Among these animals, insects have become the targets of numerous genotoxicity studies in ecotoxicology, because they are considered efficient bioindicators of environmental stress. In this perspective, the objective of this research was to perform a bibliographical review based on a survey of works that applied the Comet Assay in insects for genotoxicity studies. For this, the PubMed and SCOPUS databases were exploited using keywords such as "comet assay" and "comet assay and insects" delimited in the period from 2002 to 2018. After the selection of the articles, it was noticed that the application of the comet assay increased gradually during the analyzed period, so that insect work is concentrated mainly on the species *Drosophila melanogaster* but other several species of different orders have also been used. In addition, it was possible to observe that the main approach with these animals is predominant in environmental biomonitoring, analyzing the genotoxic potential of different compounds in order to understand the effects at the molecular level caused in these animals, to show the risk of these beings exposed to these substances. However, despite the emergence of works using the comet assay on insects, it is still necessary to extend its application to a greater biodiversity, also contemplating native organisms to better understand its ecology, to perform a more effective environmental biomonitoring and to adopt conservation strategies of these animals in the future.

Keywords: Ecotoxicology. Genotoxicity. Bioindicator.

4.1 INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia foi originalmente definida como o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias naturais e artificiais sobre os organismos vivos (TRUHAUT, 1977; BUTLER, 1978). Ecotoxicologia, também designada como Toxicologia Ambiental ou Ecologia do Estresse, é o ramo da biologia que estuda e avalia o impacto de agentes tóxicos ou de alterações ambientais, naturais ou antrópicas, sobre os organismos vivos por meio de ensaios toxicológicos padronizados em condições controladas, com o intuito de entender e prever o efeito destas substâncias ou mudanças ambientais nos seres vivos de determinados ecossistemas e nichos tróficos (TRUHAUT, 1977; JUNIOR; CARVALHO, 2017; MAIA *et al.*, 2018).

Dentre os testes toxicológicos, o ensaio cometa é uma metodologia utilizada para a avaliação de danos no DNA, permitindo a investigação do potencial genotóxico de compostos químicos em diferentes organismos. Devido a esta abordagem, este ensaio foi adotado como ferramenta padrão em estudos de biomonitoramento, de forma que sua aplicação vem aumentando consideravelmente em um vasto número de modelos experimentais (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016; LAPUENTE *et al.*, 2015).

Os invertebrados são organismos interessantes para estudos ecotoxicológicos devido a sua importância nos ecossistemas. Os insetos, em particular, representam o maior grupo de invertebrados, podendo ser amplamente utilizados em estudos de toxicologia genética e avaliações de risco ambiental, pela aplicação do ensaio cometa como metodologia, uma vez que esta técnica tem sido cada vez mais utilizada, mostrando-se promissora para testes de genotoxicidade em estudos de biomonitoramento ambiental (MØLLER, 2005; AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016).

Os insetos são considerados ótimos bioindicadores, tendo em vista que um dado bioindicador é considerado eficiente quando a população, apesar de afetada, não é totalmente eliminada pelas alterações ambientais, mas apresentam respostas frente a elas por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, que indicam e refletem as alterações no ambiente onde elas vivem (WASHINGTON, 1984; BARTELL, 2006; BURGER, 2006; SKALDINA; SORVARI, 2017).

As abelhas são insetos de grande relevância para esses estudos, uma vez que desempenham um papel extremamente importante tanto econômica quanto ecologicamente; são considerados ótimos polinizadores de sistemas agrícolas, atuando também na conservação e manutenção da diversidade das florestas nativas, devido a sua capacidade de percorrer longas distâncias (MCGREGOR, 1976; BUDGE, *et al.*, 2015; SCHÖNFELDER; BOGNER, 2017).

Entretanto, as populações deste organismo encontram-se em declínio devido a inúmeros fatores, mas principalmente pelo aumento no uso de agrotóxicos e produtos tóxicos liberados por indústrias no ambiente (DE JONG, 2009; CAMERON *et al.*, 2011). Contudo, os estudos genotoxicológicos com abelhas se concentram principalmente na espécie africanizada *Apis mellifera* (THOMPSON, 2001), enquanto há poucos estudos registrados na literatura envolvendo as abelhas neotropicais e nativas que ocorrem no Brasil, como a espécie *Bombus atratus*. Nessa perspectiva, a finalidade deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a aplicação do ensaio cometa em insetos, bem como uma análise comparativa de trabalhos utilizando essas duas espécies de abelhas em estudos ecotoxicológicos.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho teve caráter exploratório, de forma que o levantamento bibliográfico foi realizado nos bancos de dados PubMed e SCOPUS, utilizando palavras-chave para a busca, tais como: “*comet assay*”; “*comet assay e insects*”; “*comet assay e honey bees*”; “*comet assay e Apis mellifera*” e “*comet assay e Bombus*”. Foram selecionados os artigos científicos pioneiros que descreveram e otimizaram o ensaio cometa para possibilitar a compreensão da realização e aprimoramento das aplicações da técnica; além disso, também foi realizada a revisão da literatura no período que compreende os anos de 2002 a 2018 sobre esta metodologia aplicada em insetos. Após a seleção dos artigos, realizou-se uma análise quantitativa e qualitativa dos trabalhos, uma vez que houve a construção de gráficos para análise numérica de publicações, bem como a discussão das principais abordagens de cada trabalho selecionado.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE, do inglês, *Single Cell Gel Electrophoresis*), foi descrito originalmente pelos pesquisadores suecos Östling e Johanson (1984) como uma metodologia sensível que avalia e quantifica danos no DNA de células individuais, a partir da eletroforese do DNA em micro-gel. Trata-se de uma técnica precisa para quantificar e identificar danos ao material genético, necessitando apenas de uma quantidade

pequena de células, possibilitando o estudo com diversos organismos, além de possuir custo relativamente baixo (BETTI *et al.*, 1994; BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998; COLLINS, 2014).

Em 1988, Singh e colaboradores modificaram o protocolo descrito anteriormente, atribuindo à técnica maior sensibilidade para a detecção de danos no DNA por meio do uso de solução alcalina, uma vez que este pH otimiza a desnaturação e migração de moléculas de DNA de fitas simples (SINGH *et al.*, 1988). Essa metodologia descrita por Singh *et al.* (1988) é considerada a publicação original do ensaio cometa (Tabela 1); contudo, desde sua publicação, novas variações e aplicações da técnica surgiram no decorrer dos anos (Quadro 1).

TABELA 1 – Parâmetros descritos no protocolo original do ensaio cometa.

Parâmetros	Protocolo original (Singh <i>et al.</i>, 1988)
Tratamento com solução de lise	60 minutos
Incubação das lâminas na solução de eletroforese	20 minutos
Parâmetros da cuba de eletroforese	300 mA e 25 V
Tempo de corrida eletroforética	20 minutos

Fonte: Elaborado pela autora.

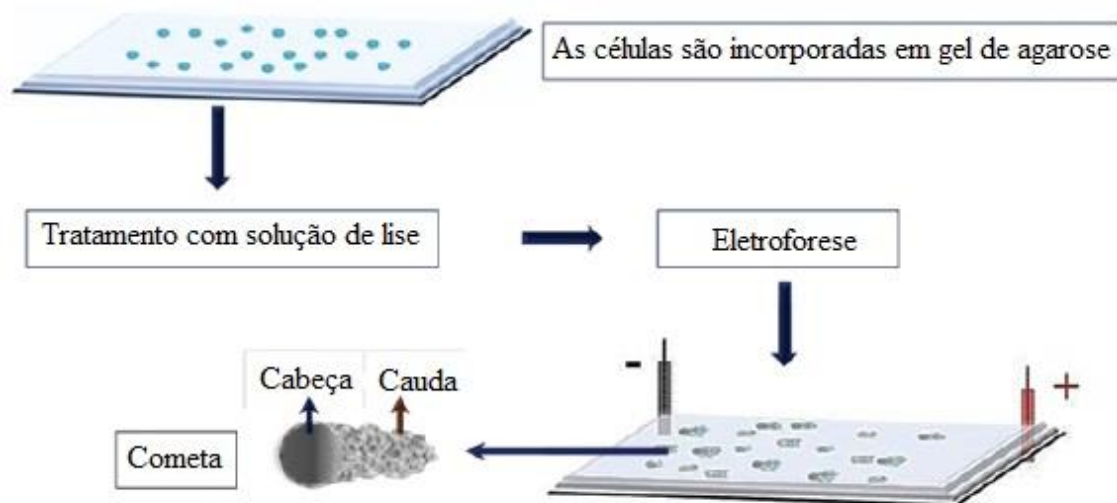
QUADRO 1 - Destaques das realizações do ensaio cometa e novas aplicações

ANO	EVENTOS
1978	Rydberg e Johanson introduziram um método para detecção de quebras de fita de DNA em células individuais embebidas em agarose sob condições alcalinas (pH 12). A quantidade de DNA simples em relação à fita dupla foi medida por coloração com Acridine Orange (AO) que emite frequência de fluorescência verde e vermelha, respectivamente.
1984	Östling e Johanson descreveram uma versão modificada de células embebidas em gel com eletroforese em pH 9,5. Nesse ensaio de microeletroforese, o DNA fragmentado migrou em direção ao ânodo, enquanto o DNA com pouca fragmentação permaneceu circular.
1988	Singh <i>et al.</i> introduziram a eletroforese com pH 13. É considerada a publicação original do ensaio cometa.
1989	Olive descreveu uma versão distinta do ensaio cometa, utilizando eletroforese em condições neutras. A partir desde momento, as imagens obtidas eram referidas como “cometas”.
1991	Gedik <i>et al.</i> descreveram uma nova versão do ensaio cometa, utilizando enzima para a detecção de danos. Estas enzimas digerem os nucleotídeos, ampliando as faixas de danos do DNA e conseqüentemente, possibilitando maior migração de fragmentos.
1996	Pfuler <i>et al.</i> detectaram <i>crosslinks</i> DNA-DNA pelo ensaio cometa.
1997	Santos <i>et al.</i> utilizaram hibridização de fluorescência <i>in situ</i> para marcação de regiões com quebras de genes específicos.
2000	Diretrizes internacionais foram publicadas para a aplicação do ensaio cometa em Tóxicologia Genética e em Biomonitoramento.
2001	Collins <i>et al.</i> mediram a atividade de reparo do DNA em extratos celulares.
2005	O número de publicações sobre o ensaio cometa é alto. (2.390 publicações utilizando “ <i>comet assay</i> ” como termo de pesquisa no banco de dados Medline em outubro de 2005).
2007	Burlison <i>et al.</i> (2007) revisaram o protocolo original a fim de otimizar a produção de protocolos padronizados com máxima aceitação pelas agências reguladoras internacionais, exigindo mais de uma concentração e mais de um tecido, além do fracionamento subcelular do núcleo das células.
2018	O número de publicações sobre o ensaio cometa aumentou consideravelmente nos últimos anos. (11.101 publicações utilizando “ <i>comet assay</i> ” como termo de pesquisa no banco de dados Medline ao final de 2018).

Fonte: Adaptado de Møller, 2005.

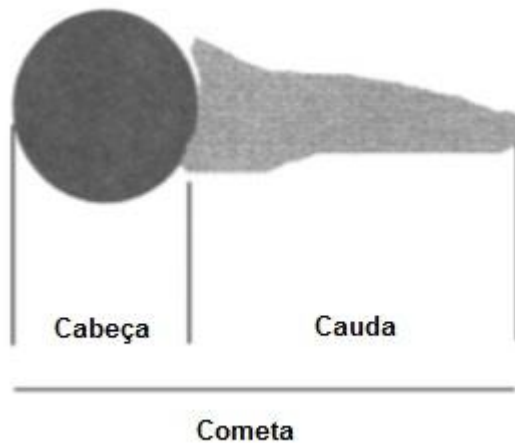
O princípio da técnica (Figura 1) consiste na incorporação de amostras celulares em gel de agarose, seguido de tratamento com solução de lise a fim de remover membranas plasmáticas e proteínas, mantendo apenas o nucleóide (cromatina nuclear sem o envoltório nuclear) incorporado ao gel. Com isso, as amostras de material genético são submetidas a um tratamento alcalino e à eletroforese, a qual possibilita a migração dos fragmentos de DNA, resultando em imagens nomeadas de “cometa” (Figura 2), uma vez que o material genético com pouca fragmentação permanece com sua cromatina condensada, enquanto o DNA fragmentado migra em direção ao ânodo formando uma cauda que varia de tamanho conforme a extensão do dano ocorrido (FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEILL, 1995; MØLLER, 2005).

FIGURA 1 - Princípio do ensaio cometa, evidenciando as principais etapas da técnica.



Fonte: Adaptado de Gunasekarana, Rad e Chand, 2015.

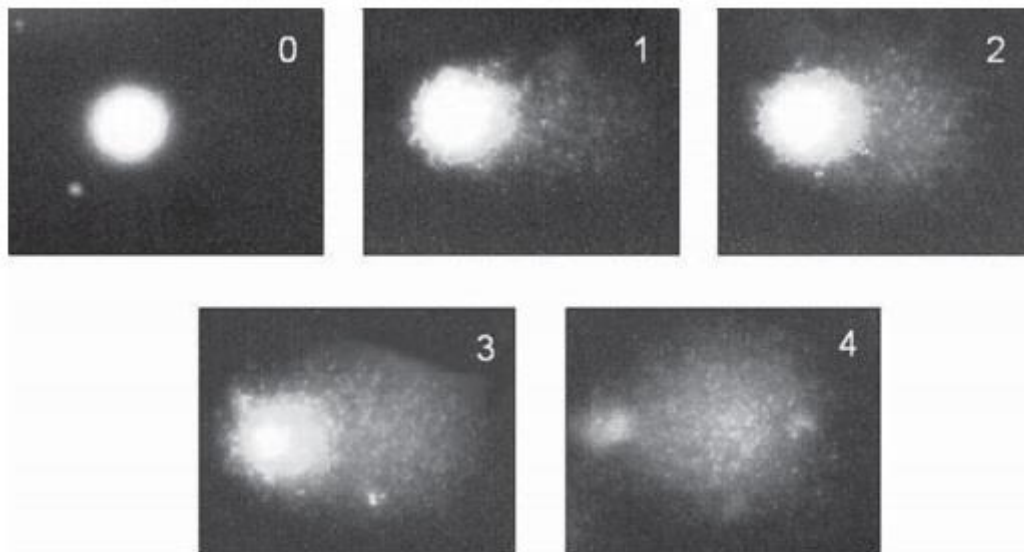
FIGURA 2 - Diagrama de um cometa típico, evidenciando a distribuição do DNA na cabeça (menos fragmentado) e na cauda (mais fragmentado).



Fonte: Adaptado de Lee; Steinert, 2003.

Conforme descrito por Collins (2004), de acordo com o tamanho da cauda formada é possível classificar visualmente os cometas em cinco categorias (Figura 3). A classe 0, corresponde a um cometa sem cauda (representa o DNA íntegro), enquanto as classes de 1 a 3 correspondem aos cometas com intensidades de cauda crescente e a classe 4 que contempla os cometas em que quase todo o DNA está presente na cauda (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

FIGURA 3 - Representação das classes 0 a 4 na classificação visual de cometas.



Fonte: Collins (2004, p. 255).

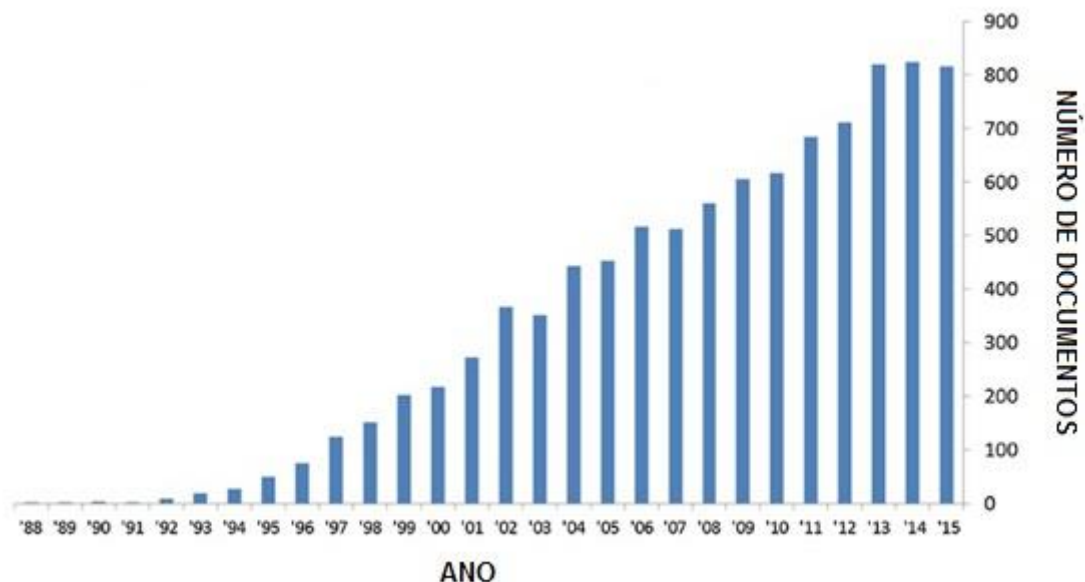
Devido à simplicidade e facilidade do ensaio cometa, a necessidade de uma pequena quantidade de amostra para realizá-lo, a possibilidade de utilizar diferentes tipos celulares e a sua alta precisão na avaliação de danos no DNA, esta metodologia pode ser aplicada em diversos estudos, principalmente em ensaios clínicos e de biomonitoramento genotoxicológico (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018). Contudo, devido à alta sensibilidade da técnica, a manipulação das amostras deve ser realizada cuidadosamente, a fim de não promover danos ao DNA durante o preparo das lâminas. Além dessa cautela especial, outra limitação encontrada na técnica é a variedade das propriedades biológicas dos diferentes tipos de amostras celulares que demandam ajustes específicos no protocolo (SZETO *et al.*, 2005; ROJAS *et al.*, 2014; AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018). Para isso, a padronização do protocolo para cada tipo de tecido e espécie do qual o tecido foi extraído deve ser realizada, alterando-se parâmetros como a concentração e tempo de exposição na solução de lise e o tempo de corrida eletroforética, por exemplo (ENCISO *et al.*, 2018).

O ensaio cometa foi aplicado originalmente em mamíferos (ÖSTLING; JOHANSON, 1984) porém, devido a sua versatilidade, esta metodologia foi adotada como ferramenta padrão de biomonitoramento, sendo utilizada na Ecotoxicologia para avaliação de genotoxicidade, de forma que sua aplicação vem aumentando consideravelmente em um vasto número de modelos experimentais tanto aquáticos quanto terrestres (LAPUENTE *et al.*, 2015), tais como peixes

(PANDRANGI *et al.*, 1995), anfíbios (RALPH *et al.*, 1996), moluscos (THOMAS *et al.*, 2007; ANGELETTI *et al.*, 2013), minhocas (VERSCHA EVE; GILLES, 1995), insetos (BILBAO *et al.*, 2002) e plantas (NAVARRETE *et al.*, 1997).

Provavelmente devido à ampliação de suas aplicações, o número de publicações sobre o ensaio cometa também aumentou consideravelmente com o passar do tempo. Segundo Singh (2016), utilizando-se o banco de dados PubMed, foi possível constatar que, desde o ano da descrição do ensaio em 1988 (SINGH *et al.*, 1988) até o fim do ano de 2015, os periódicos indexados neste banco de dados somavam mais de nove mil documentos, utilizando os termos de pesquisa “comet assay”, “microgel electrophoresis” ou “single cell gel electrophoresis” (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - Número de periódicos indexados por ano no banco de dados PubMed, utilizando os termos de pesquisa “comet assay”, “microgel electrophoresis” ou “single cell gel electrophoresis”.



Fonte: Adaptado de Singh, 2016.

4.3.2 Ensaio Cometa em insetos

Devido à sua importância nos ecossistemas de todo o mundo, os invertebrados são organismos importantes para pesquisas em ecotoxicologia, principalmente para biomonitoramento ambiental (SHETTY *et al.*, 2017). Tendo em vista a emergência da indústria química a partir do século XX, desencadeou-se a aparição de novos compostos químicos no ambiente, que possuem efeito biológico significativo e que submetem os organismos vivos a um alto grau de estresse por sua atividade tóxica, colocando-os em risco (LAPUENTE *et al.*, 2015). Estes compostos, também chamados de xenobióticos, são difíceis de decompor e apresentam toxicidade considerável, direta ou indiretamente, para os organismos expostos, causando danos ao seu material genético (LAPUENTE *et al.*, 2015).

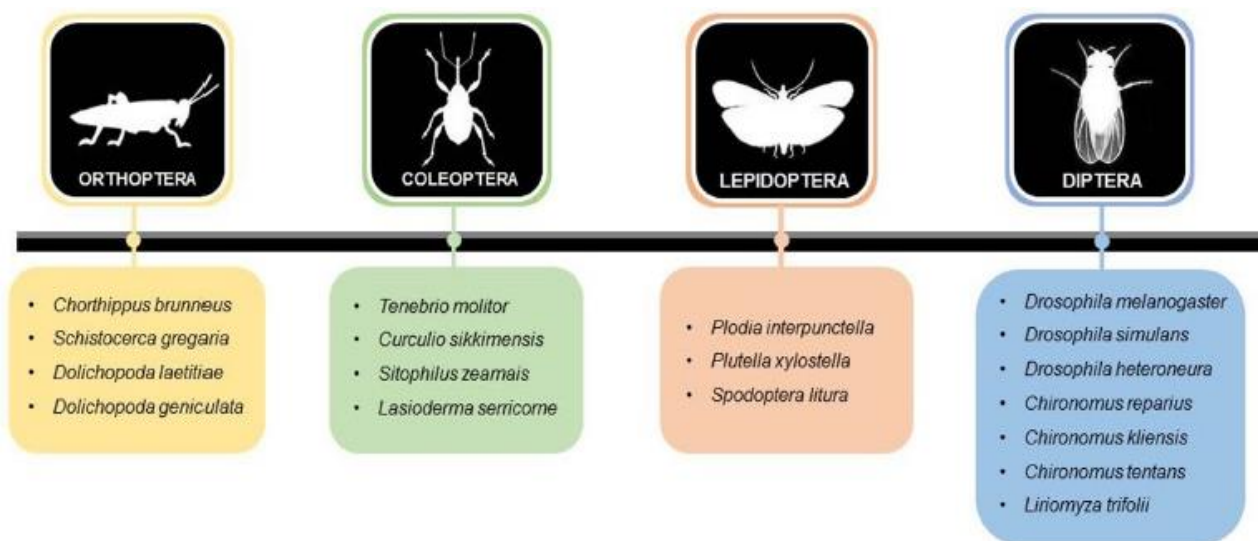
Sendo assim, o ensaio cometa tem se tornado cada vez mais popular como um biomarcador de genotoxicidade em estudos de biomonitoramento de exposições ambientais em que organismos, tanto animais quanto vegetais, estão sujeitos (MØLLER, 2005), tendo em vista que um dado biomarcador em ecotoxicologia pode ser definido como “*qualquer resposta biológica a um produto químico ambiental, medido dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pêlos, penas etc), indicando uma perturbação do seu estado normal, que não pode ser detectado a partir do organismo intacto*” (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996, p. 220).

Assim, a importância de se utilizar nesses estudos um biomarcador como o ensaio cometa consiste no fato de que o dano mais relevante em nível molecular é a indução de lesões no DNA, uma vez que tais danos podem possibilitar o aparecimento de aberrações cromossômicas, colocando em risco o sucesso reprodutivo dos organismos e, conseqüentemente, uma perda de biodiversidade, a qual é um dos parâmetros mais relevantes na Ecotoxicologia (JHA, 2008). Dessa forma, como os compostos tóxicos podem se acumular nos tecidos e órgãos dos insetos, estes organismos são de grande interesse em bioensaios ecotoxicológicos, podendo ser utilizados como bioindicadores da qualidade ambiental (HYNE; MAHER, 2003; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; ABDALLA; DOMINGUES, 2015; SKALDINA; SORVARI, 2017).

O ensaio cometa utilizando insetos iniciou-se no ano de 2002 com moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, um organismo modelo amplamente utilizado em estudos genéticos (BILBAO *et al.*, 2002). Porém, no decorrer dos anos, o ensaio cometa foi utilizado para mensurar danos no DNA em diferentes espécies de insetos (Figura 4), tornando-se uma ferramenta que permite o estudo da interação destes organismos com diferentes xenobióticos

presentes no ambiente (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016), possibilitando avaliar a capacidade de contaminantes em induzir danos ao DNA (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016; ZOCHE *et al.*, 2010). Assim, até o momento, espécies de várias ordens, incluindo insetos que são importantes para a economia humana, foram examinadas usando esta metodologia (SHETTY *et al.*, 2017).

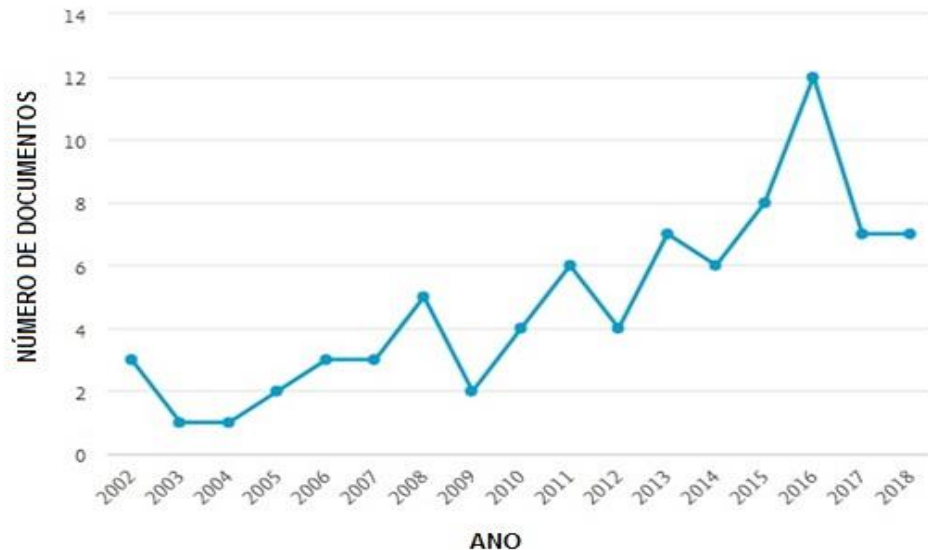
FIGURA 4 - Exemplo de diferentes espécies de insetos de quatro ordens distintas em que o ensaio cometa foi aplicado.



Fonte: Augustyniak, Gladysz e Dziewiecka (2016, p. 02)

Utilizando o banco de dados SCOPUS, foi possível observar que no período de 2002 a 2018 foram registrados nesta plataforma 81 documentos que contemplam simultaneamente os termos de pesquisa “comet assay” e “insects” (Gráfico 2). Em 2015 foram registrados 8 documentos, enquanto, no ano de 2016 houve um aumento considerável de trabalhos publicados totalizando 12 documentos. Contudo, essa tendência de crescimento não se manteve, uma vez que em 2017 houve um decréscimo de publicações para somente 7 documentos registrados, sendo que este número se repetiu no ano de 2018. Esses dados evidenciam a necessidade de fortalecer e impulsionar os estudos nessa área, tendo em vista que os insetos são ótimos bioindicadores e ainda há uma lacuna que precisa ser preenchida, aumentando o número de espécies a serem estudadas pelo ensaio cometa, o qual é um ótimo biomarcador de genotoxicidade.

GRÁFICO 2 - Número de documentos registrados, por ano, no banco de dados Scopus, utilizando os termos de pesquisa “*comet assay*” e “*insects*” simultaneamente.



Fonte: Adaptado do banco de dados SCOPUS, 2018.

Nesse contexto, foi realizada uma revisão de trabalhos utilizando insetos de diferentes ordens para observar e comparar as diferentes abordagens e aplicações do ensaio cometa nesses organismos nos últimos anos.

Díptera

Por serem animais que possuem características como tempo de vida curta, fácil manutenção e geração de alto número de descendentes em uma única linhagem, os insetos desta ordem estão sendo cada vez mais utilizados em estudos de biomonitoramento, genéticos, toxicológicos e do desenvolvimento de doenças (MISHRA *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, não só a *D. melanogaster*, como também outras espécies de dípteros, podem ser amplamente exploradas como organismos-modelo para estudos que vise avaliar a genotoxicidade (MISHRA *et al.*, 2017). Com isso, o ensaio cometa já foi aplicado em diferentes espécies, tais como *Chironomus riparius* (LEE *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-PAZ *et al.*, 2013; BERNABÓ *et al.*, 2017; AQUILINO; SANCHÉZ-ARGÜELLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2018); *Chironomus kiiensis* (AL-SHAMI *et al.*, 2011), *Chironomus ramosus* (DATKHILE *et al.*, 2015) e *Aedes aegypti* (SHETTY *et al.*, 2017).

Nos estudos com organismos da espécie *C. riparius*, o ensaio cometa foi utilizado em larvas aquáticas destes mosquitos, tanto para avaliar os efeitos genotóxicos do octacloroestireno (LEE *et al.*, 2008), do fungicida vinclozolina (AQUILINO; SANCHÉZ-ARGÜELLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2018) e do cobre (BERNABÓ *et al.*, 2017), quanto para analisar e quantificar os danos ocorridos no DNA causados por outros poluentes ambientais frequentemente encontrados no ambiente aquático (MARTÍNEZ-PAZ *et al.*, 2013).

Não distante, o trabalho utilizando *C. ramosus* aplicou o ensaio cometa em larvas desta espécie a fim de estudar o estado do DNA dos indivíduos após exposição a uma dose letal de radiação-gama, tendo em vista que essa espécie foi descrita recentemente como um inseto radio-tolerante (DATKHILE *et al.*, 2015). Por sua vez, o estudo utilizando larvas da espécie *C. kiiensis* aplicou o ensaio cometa para analisar o dano no material genético causado pelo cobre, cádmio e zinco nesses organismos, estabelecendo também uma comparação do potencial genotóxico destas substâncias (AL-SHAMI *et al.*, 2011).

Semelhante ao trabalho de Datkhile e colaboradores (2015), o estudo de Shetty *et al.*, (2017) empregou o ensaio cometa em dípteros adultos da espécie *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue em países tropicais e subtropicais, para avaliar danos no DNA induzidos por diferentes doses de radiação-gama, podendo ser utilizado como um biomarcador de risco ambiental.

Coleoptera

O ensaio cometa também já foi aplicado em insetos da ordem Coleoptera, como na espécie *Sitophilus zeamais*, um besouro popularmente conhecido como gorgulho-do-milho. A fim de avaliar os impactos causados pela radiação-gama em amostras celulares destes indivíduos, o ensaio cometa foi escolhido como metodologia nos estudos de Hasan *et al.* (2008, 2012).

Hasan *et al.* (2012) demonstraram, por meio do ensaio cometa, que o material genético presente nos núcleos celulares dos organismos irradiados foi altamente danificado, enquanto o DNA dos insetos utilizados como controle permaneceram intactos sugerindo, assim, que o ensaio cometa é uma ferramenta potencialmente útil, principalmente pela sua alta sensibilidade e precisão do mesmo para a detecção de baixos níveis de fragmentação cromatínica (HASAN *et al.*, 2008).

Lepdoptera

O bicho-da-seda, *Philosamia ricini*, foi utilizado no estudo de Kalita, Haloi e Devi (2017) com o objetivo de compreender e avaliar o potencial tóxico da cipermetrina nesses indivíduos. Trata-se de um inseticida de baixa toxicidade, de forma que, seu caráter genotóxico pôde ser determinado pelo ensaio cometa. O ensaio cometa também foi aplicado em insetos da espécie *Helicoverpa armigera* em diferentes fases do desenvolvimento com o objetivo de avaliar a extensão do dano ocorrido no DNA dos animais irradiados pela radiação-gama e determinar se estes danos poderiam comprometer o seu desenvolvimento (KIM *et al.*, 2015).

Por fim, estudos em estágio larval de *Spodoptera frugiperda* mostraram que o benzoato de emamectina, um inseticida amplamente utilizado no controle de pragas, induziu aumentos significativos nas quebras de DNA dos organismos expostos a esta substância (WU *et al.*, 2016).

Orthoptera

Seguindo a tendência de estudos utilizando o ensaio cometa como ferramenta para avaliar o potencial genotóxico de substâncias potencialmente tóxicas presentes no ambiente, Augustyniak *et al.* (2014) utilizaram em seu trabalho larvas de gafanhotos da espécie *Chorthippus brunneus* provenientes de indivíduos adultos coletados em ambientes com diferentes níveis de poluição com metais traço para analisarem os danos existentes no DNA dos animais originários dessas localidades. Além disso, foi discutida também a toxicidade do herbicida paraquat em organismos da mesma espécie, por meio do ensaio cometa, evidenciando os danos genotóxicos induzidos por ele (AUGUSTYNIAK *et al.*, 2015).

Em *Chorthippus biguttulus* utilizou-se o ensaio cometa para compreender as respostas biológicas frente à exposição crônica ao estresse ambiental causado por diferentes pesticidas utilizados na agricultura (KARPETA-KACZMAREK *et al.*, 2016). Enquanto, na mesma linha de abordagem, em *Aiolopus thalassinus* monitorou-se os efeitos genotóxicos de diferentes poluentes em animais coletados em região próxima a atividades industriais (ABDELFATTAH; AUGUSTNYAK; YOUSEF, 2017).

Hymenoptera

Em espécies da ordem Hymenoptera, o ensaio cometa já foi aplicado em algumas espécies, tais como *Apis mellifera* (GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2014), *Apis florea* (HAYAT *et al.*, 2018), *Apis dorsata* (HAYAT *et al.*, 2018) e *Polybia paulista* (HOSHINA *et al.*, 2013).

A espécie *A. mellifera* é amplamente estudada, de forma que os trabalhos com insetos desta ordem concentram-se nestes animais. Portanto, o ensaio cometa já foi aplicado nesses organismos para diversos fins. Divergindo da tendência observada, na qual o ensaio cometa estava sendo aplicado somente para biomonitoramento ambiental, os estudos com *A. mellifera*, incluem não somente esta abordagem, mas também ensaios clínicos. Nessa perspectiva, o potencial genotóxico do veneno dessas abelhas foi analisado, uma vez que, no geral, os venenos dos insetos desta ordem constituem uma fonte considerável de substâncias com potencial farmacológico (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2014). O veneno de *A. mellifera* foi alvo de estudo para a compreensão do seu potencial genotóxico no sangue dos seres humanos, tendo em vista que, apesar de suas propriedades medicinais serem bem conhecidas, ainda há lacunas acerca dos seus efeitos genotóxicos (GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2008). Ainda nesse aspecto, também foi analisado o veneno de vespas da espécie *Polybia paulista*, para determinar sua atividade genotóxica em diferentes concentrações (HOSHINA *et al.*, 2013).

Em trabalhos utilizando as espécies *A. florea* e *A. dorsata* a abordagem de biomonitoramento ambiental é retomada, com um estudo que permite compreender como a exposição a inseticidas pode afetar abelhas em agroecossistemas, estabelecendo correlações quantitativas entre os danos observados no DNA de amostras de indivíduos expostos a estes compostos e amostras livres de inseticidas (HAYAT *et al.*, 2018).

Contudo, não há registros na literatura da aplicabilidade desta metodologia em abelhas neotropicais do gênero *Bombus*, o que evidencia a defasagem de estudos com abelhas nativas que são de grande relevância tanto ecológica quanto economicamente, uma vez que são polinizadores essenciais para a manutenção da diversidade floral em florestas e de sistemas agrícolas, respectivamente (LIMA; ROCHA, 2012; SCHÖNFELDER; BOGNER, 2017). Portanto, apesar do crescimento eminente de trabalhos utilizando o ensaio cometa em insetos, ainda é necessário ampliar sua aplicação para uma maior biodiversidade, contemplando organismos nativos, para melhor compreensão de sua ecologia e a realização de um biomonitoramento ambiental mais efetivo.

Os trabalhos relatados nesta revisão demonstraram que o ensaio cometa tem sido aplicado em muitos organismos invertebrados para estudos de biomonitoramento ambiental, mostrando-se uma metodologia sensível para a triagem de compostos tóxicos presentes no ambiente e para a investigação dos efeitos genotóxicos de diferentes substâncias, tais como inseticidas, metais e xenobióticos em geral (COTELLE; FÉRARD, 1999). Devido à eficiência, simplicidade e versatilidade do ensaio cometa, é notável o número crescente de espécies

estudadas por esta técnica a partir de adequações e padronização de protocolos existentes. As otimizações dos protocolos tornam o ensaio cometa uma metodologia adequada para praticamente qualquer tipo de tecido, possibilitando a sua aplicação em diferentes organismos para as mais variadas abordagens (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016).

Nesse sentido, a aplicação deste ensaio tem sido bem-sucedida em diferentes espécies de insetos, mostrando-se uma ferramenta eficaz para estudos de monitoramento da qualidade ambiental, uma vez que um grande número de produtos químicos é sintetizado a cada ano e estes tornam-se potenciais poluentes do ambiente, colocando em risco a entomofauna exposta a estas substâncias. Sendo assim, a partir dos trabalhos analisados nesta revisão, notou-se um interesse em expansão no uso de bioindicadores, como os insetos, para avaliação dos efeitos genotóxicos de contaminantes, refletindo diretamente no crescente aumento de publicações observadas ao longo das últimas décadas, utilizando o ensaio como metodologia e estes animais como bioindicadores.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio cometa é um excelente biomarcador genético e uma ferramenta ecotoxicológica consistente, que pode ser aplicado em diversos estudos de genotoxicidade. Sua aplicação no monitoramento ambiental permite relacionar as respostas biológicas causadas por contaminantes com potenciais consequências ecológicas. Os insetos são considerados ótimos bioindicadores e estão em ascensão nestes estudos que visam mensurar e quantificar efeitos biológicos precoces em resposta à exposição a um contaminante.

Entretanto, este ensaio é aplicado a um número limitado de espécies, se comparado a toda biodiversidade. Devido a isto, é necessário expandir a diversidade de organismos estudados por essa técnica, permitindo que as lacunas que existem na avaliação do risco ambiental sejam preenchidas, uma vez que os resultados indicam e refletem as alterações do ambiente em que estes seres vivem.

Desta forma, priorizar estudos acerca da identidade genética de um organismo, por meio da aplicação do ensaio cometa, possibilita monitorar os fatores que vêm causando o declínio populacional de diversas espécies, além de permitir que futuramente, seja possível estabelecer estratégias de conservação destes animais e do ambiente que habitam.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2017/06056-9).

4.5 REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: a novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 7, 21 jul. 2015

ABDELFATTAH, E. A.; AUGUSTYNIAK, M.; YOUSEF, H. A. Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet assay. **Chemosphere**, [s.l.], v. 182, p.762-770, set. 2017

AL-SHAMI, S.; RAWI, C. S.; AHMAD, A. H.; NOR, S. A. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. **Toxicology And Industrial Health**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.734-739, 24 out. 2011

ANGELETTI, D.; SEBBIO, C.; CARERE, C.; CIMMARUTA, R.; NASCETTI, G.; PEPE, G., et al. Terrestrial gastropods (*Helix* spp) as sentinels of primary DNA damage for biomonitoring purposes: a validation study. **Environ. Mol. Mutagen.** 54, 204–212, 2013

AQUILINO, M.; SÁNCHEZ-ARGÜELLO, P.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 232, p.563-570, jan. 2018

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, Elsevier BV. [s.l.], v. 767, p.67-76, jan. 2016

BARTELL, S. M. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk assessment – A brief review and evaluation. **Environmental Bioindicators**, v.1, p. 60-73, 2006

- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat Res.-Geneti Toxicol. Environ. Mutag.** v. 415, p.167-184. 1998
- BERNABÒ, P.; GAGLIO, M.; BELLAMOLI, F.; VIERO, G.; LENCIONI, V. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 173, p.235-244, abr. 2017
- BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESSE, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat Res.** v.307(1), n. 1. p.323-333. May, 1994
- BILBAO, C.; FERREIRO, J. A.; COMENDADOR, M. A.; SIERRA, L. M. Influence of mus201 and mus308 mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. **Mutat Res.** Elsevier BV. [s.l.], v. 503, n. 1-2, p.11-19, jun. 2002
- BUDGE, G. E. et al. Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12574, dez. 2015
- BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v.1, p. 22-39, 2006
- BUTLER, G. C. **Principles of ecotoxicology**, SCOPE 12, John Wiley and Sons, New York, 1978
- CAMERON, S. A.; LOZIER J. D.; STRANGE J. P.; KOCH J. B.; CORDES N.; SOLTER L. F. et al. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)**. 108, 662-667, 2011
- COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**. Elsevier BV [s.l.], v. 1840, n. 2, p.794-800, fev. 2014.
- COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biothechnology**. v. 26, p. 249-261, 2004.
- DATKHILE, K. D.; GAIKWAD, P. S.; GHASKADBI, S. S.; MUKHOPADHYAYA, R.; NATH, B. B. *Chironomus ramosus* larvae exhibit DNA damage control in response to gamma

radiation. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 91, n. 9, p.742-748, 15 jun. 2015

DE JONG, D. Desaparecimento de abelhas; pesticidas agrícolas afetam insetos, safras e saúde humana. **Scientific American** v. 84, p.48-49, 2009

ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**. Oxford University Press (OUP), [s.l.], v. 33, n. 1, p.25-30, jan. 2018

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L. and O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.** 339: 37-59, 1995

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Genotoxic potential of bee venom (*Apis Mellifera*) on human peripheral blood lymphocytes in vitro using single cell gel electrophoresis assay. **Journal Of Environmental Science And Health, Part A**, [s.l.], v. 43, n. 11, p.1279-1287, 18 jul. 2008

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, JCDR Research and Publications [s.l.], p.1-5, 2015

HASAN, M. D.; TODORIKI, S.; MIYANOSHITA, A.; IMAMURA, T. Detection of gamma radiation-induced DNA damage in maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) assessed using the comet assay. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 84, n. 10, p.815-820, jan. 2008

HASAN, M. D.; TODORIKI, S.; MIYANOSHITA, A.; IMAMURA, T. Age- and time interval-specific gamma radiation-induced DNA damage in adult maize weevils, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, assessed using comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 741, n. 1-2, p.95-100, jan. 2012

HAYAT, K.; AFZAL, M.; AQUEEL, M. A.; ALI, S.; SAEED, M. F.; KHAN, Q. M.; ASHFAG, M.; DAMALAS, C. A. Insecticide exposure affects DNA and antioxidant enzymes activity in honey bee species *Apis florea* and *A. dorsata*: Evidence from Punjab, Pakistan. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 635, p.1292-1301, set. 2018

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A.. Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of *Apis mellifera* venom. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 762, p.43-48, mar. 2014

HOSHINA, M. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**, [s.l.], v. 72, p.64-70, set. 2013

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.366-374, mar. 2003

JHA, A. N.. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. Oxford University Press (OUP). [s.l.], v. 23, n. 3, p.207-221, 17 fev. 2008

JUNIOR, N. G.; CARVALHO, M. B. A utilização de protozoários como organismos bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos e suas respostas à exposição a fármacos e outros compostos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 13, n. 4, 2017

KALITA, M. K.; HALOI, K.; DEVI, D. Cypermethrin Formulation (Ustad-10 EC) Induces Genotoxicity via Apoptosis, Affects Nutritional Physiology, and Modulates Immune Response in Silkworm *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.1010-1024, 25 mar. 2017

KARPETA-KACZMAREK, J.; KUBOK, M.; DZIEWIECKA, M.; SAWCZYN, T.; AUGUSTYNIAK, M. The level of DNA damage in adult grasshoppers *Chorthippus biguttulus* (Orthoptera, Acrididae) following dimethoate exposure is dependent on the insects' habitat. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 215, p.266-272, ago. 2016

KIM, J.; CHUNG, S. O.; JANG, M.; JANG, S. A.; PARK, C. G. Developmental inhibition and DNA damage of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) by gamma radiation. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 91, n. 10, p.827-832, 23 jul. 2015

LAPUENTE, J.; LOURENÇO, J.; MENDO, S. A.; BORRÁS, M.; MARTINS, M. G.; COSTA, P. M.; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers In Genetics**, Frontiers Media SA. [s.l.], v. 6, p.1-20, 4 jun. 2015

- LEE, R. F. & STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res.** v. 544, n.1, p.43-64. Sep, 2003
- LEE, S. W.; PARK, K.; HONG, J.; CHOI, J. Ecotoxicological evaluation of octachlorostyrene in fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1118-1120, 2008
- LIMA, C. M. ; ROCHA, A. Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil. 1st. Ed. Brasília: **IBAMA**, 86p., 2012
- MAIA, M.; BRITO, J.; MARTINS, I. M.; SILVESTRE, J. Toxicidade de agregados reciclados de betão: Ensaio de lixiviação. **ITeCons**, fev, 2018
- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological organs of bees. **Braz. J. morphol. Sci.** 23 (3-4), p. 303-309, 2006
- MARTÍNEZ-PAZ, P.; MORALES, M.; MARTÍNÉZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 758, n. 1-2, p.41-47, dez. 2013
- MCGREGOR, S. E. Insect pollination of cultivated crop plants. 1st. Ed. Washington: **USDA**, 411 p., 1976
- MISHRA, N.; SRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, U. R.; TEWARI, R. R. An insight into the genotoxicity assessment studies in dipterans. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, [s.l.], v. 773, p.220-229, jul. 2017
- MØLLER, P. The alkaline comet assay: Towards validation in Biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 98, n.4, p.336-345, apr, 2005
- NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; DE MIGUEL, M.; DE LA TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutat Res.**, Canto Blanco, Spain, v. 389, n. 2-3, p.271-277, mar. 1997
- ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 123:291-8, 1984

- PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S. and VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mutagen.** 26, 345–356, 1995
- RALPH, S.; PETRAS, M.; PANDRANGI, R. and VRZOC, M. Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. **Environ.Mol.Mutagen.** 28, 112–120, 1996
- ROJAS, E.; LORENZO, Y.; HAUG, K.; NICOLAISSEN, B.; VALVERDE, M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. **Front Genet.** v. 386, n. 5, nov. 2014
- SCHÖNFELDER M. L.; BOGNER, F. X. Individual perception of bees: Between perceived danger and willingness to protect. **Plos One, Public Library of Science (PLOS).** [s.l.], v. 12, n. 6, p.1-2, 29 jun. 2017
- SHETTY, V.; SHETTY, N. J.; ANANTHANARAYANA, S. R.; JHA, S. K.; CHAUBEY, R. C. Evaluation of gamma radiation-induced DNA damage in *Aedes aegypti* using the comet assay. **Toxicology And Industrial Health,** [s.l.], v. 33, n. 12, p.930-937, 9 out. 2017
- SINGH, N. P. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. **Mutation Research/reviews In Mutation Research,** Elsevier BV. [s.l.], v. 767, p.23-30, jan. 2016
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175:184–191, 1988
- SKALDINA, O; SORVARI, J. Biomarkers of Ecotoxicological Effects in Social Insects. **Perspectives In Environmental Toxicology,** Springer International Publishing. [s.l.], p.203-214, 2017
- SZETO, Y.T; BENZIE, I. F.; COLLINS, A. R.; CHOJ, S. W.; CHENG, C. Y.; YOW, C. M. TSE, M. M. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutat Res.** v. 578(1-2), n. 15, p.371-381, Hong Kong, oct. 2005
- THOMAS, R. E.; LINDEBERG, M.; HARRIS, P. M. and RICE, S. D. Induction of DNA strandbreaks in the mussel (*Mytilusrossulus*) and clam (*Protothacastaminea*) following

chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the ExxonValdezspill. **Mar.Pollut.Bull.** 54, 726–732, 2007

THOMPSON, H. M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, Sand Hutton, v. 32, n. 4, p. 305-321, 2001

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 1, p. 151-173, 1977

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p.217-225, ago. 1996.

VERSCHA EVE, L. and GILLES, J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 54, 112–119, 1995

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v. 18, p.653-694, 1984

WU, X.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZONG, M.; HUANG, Q.; TAO, L. Detection on emamectin benzoate-induced apoptosis and DNA damage in *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cell line. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 126, p.6-12, jan. 2016

ZOCHE, J. J., LEFFA, D. D., DAMIANINI, P. A., CARVALHO, F., MENDONÇA, A. R., SANTOS, C. E. I., ANDRADE, V. M. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. **Environmental Research**, 110(7), 684–691, 2010

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DAS ABELHAS

As operárias de *B. atratus* (Franklin, 1913) foram coletadas nos fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado, na área que compreende o *Campus* de Sorocaba (SP) da UFSCar (23°34'53.1"S 47°31'29.5"), nos meses de fevereiro (final) a março de 2019. A captura foi realizada com a utilização de uma rede entomológica associada a imediata transferência das abelhas para tubos Falcon de 50 mL (um indivíduo por tubo). Para evitar estresse nos espécimes, todos os tubos Falcon foram mantidos em uma caixa térmica abrigada da luz direta.

5.2 PROCEDIMENTOS ECOTOXICOLÓGICOS

Após coletadas, as abelhas foram mantidas, isoladamente, em caixas especiais para este fim, devidamente identificadas e com dimensões de 16 x 12 x 10 cm (Figura 5), em estufa B.O.D., à 26 °C, umidade relativa de 70%, no escuro. Os organismos coletados foram divididos em dois grupos, sendo eles, o grupo experimental e o grupo controle. O grupo experimental (n = 11) foi exposto ao mercúrio, pela oferta diária de exatos 2 mL de solução contendo cloreto de mercúrio (HgCl₂) a uma concentração de 0,2 µg L⁻¹ (concentração máxima de mercúrio considerada segura para águas salobras da Classe VII e águas da Classe II, CONAMA), além de alimento *ad libitum*, sendo este uma solução de 70% de sacarose (Figura 6). Para o grupo controle (n = 11) foram ofertados 2 mL de água filtrada e o mesmo alimento disponibilizado ao grupo exposto. As abelhas foram sacrificadas após 48 horas de bioensaio por meio de crio-narcotização a 4 °C e, em seguida, foram dissecadas para retirada dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso associado ao vaso dorsal, tendo em sequência o início dos experimentos com o preparo das lâminas destes tecidos. As diretrizes da OECD (2017) para testes de produtos químicos em *B. terrestris* foram seguidas.

FIGURA 5 – Caixas de manutenção das abelhas coletadas



Fonte: *Da autora.*

FIGURA 6 – Momento exato de alimentação da abelha coletada



Fonte: *Da autora.*

5.3 ENSAIO COMETA

5.3.1 Preparo das lâminas histológicas

As lâminas histológicas foram preparadas com um dia de antecedência. Diluiu-se a Agarose de Grau Técnico Genético (GTG) (Agarose GTG 0,3 g, Phosphate Buffered Saline 20 mL), fervendo-a de duas a três vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas no gel preparado, utilizando um porta lâminas tipo frasco. A parte de baixo foi limpa para secarem *overnight* em ambiente controlado, à temperatura ambiente. Os tecidos de interesse foram macerados manualmente em 100 μ L de PBS, com o auxílio de um pistão rotativo para microtubo, e, após esse processo, 35 μ L da amostra foram transferidos para um Eppendorf ao qual adicionou-se 80 μ L de Agarose Low Electroendosmosis (LE) (Agarose-LE 0,1 g, Phosphate Buffered Saline 20 mL). Assim, utilizando uma micropipeta, os 115 μ L, agora presentes no Eppendorf, foram acomodados na lâmina histológica previamente preparada. Colocou-se uma lamínula sobre a amostra imediatamente que a mesma (amostra) foi adicionada à lâmina. Ao final do processo, as lâminas foram resfriadas a 4 °C por dez minutos e, em seguida, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas.

5.3.2 Tratamento com Solução de Lise

As lâminas histológicas foram submersas na Solução de Lise Uso, durante uma hora e trinta minutos. Essa solução foi produzida a partir de 133,5 mL de uma Solução de Lise Estoque (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-Lauroyl-sarcosine 1%), 13,5 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO 9%) e 3 mL de Triton X-100 (2%), duas horas antes do uso para atingir 4 °C. Passado o tempo, as lâminas foram removidas da solução e submetidas a um banho com Solução de Neutralização (Tris 10 265 mM, pH 7,5) durante cinco minutos.

5.3.3 Eletroforese

As lâminas foram dispostas dentro da cuba eletroforética com a parte fosca (identificação) voltada para o polo positivo. A Solução de Eletroforese (EDTA 100 mM, NaOH 0,3 M) a 4 °C foi adicionada e as lâminas permaneceram trinta minutos em descanso nesta solução. Passado esse tempo, a fonte eletroforética foi ligada e ajustada para os parâmetros 25 volts (1V/cm), 300 mA, e tempo de corrida de 180 minutos. Após a corrida, as lâminas foram

retiradas da cuba e lavadas com Solução de Neutralização (Tris 10 mM, pH 7,5) por 5 minutos, repetindo o processo 3 vezes.

5.3.4 Coloração das lâminas histológicas

As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e deixadas para secar durante uma hora e trinta minutos à 37 °C em estufa B.O.D., ou *overnight* à temperatura ambiente. Depois de secas, aplicou-se a Solução Fixadora (HCl 4 278 M, Glicerol 1%, ZnSO₄ 7H₂O 0,2 M) nas lâminas, durante dez minutos e após este período, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada, sendo armazenadas, em seguida, em uma cubeta abrigada totalmente da luz. A Solução de Coloração (Na₂CO₃ 0,47 M, NH₄NO₃ 12,5 mM, AgNO₃ 6 mM, Ácido Tungstosilicico - H₄[W₁₂SiO₄₀] 0,86 mM, Formol 0,15%) foi despejada na cubeta, onde ficou em contato com as lâminas, no escuro, durante quarenta e cinco minutos. Ao final desse processo as lâminas foram removidas da cubeta e lavadas três vezes com água destilada, sendo submetidas, posteriormente, a um banho de Solução Parada (CH₃COOH 1%) durante cinco minutos e três lavagens com água destilada. Finalizado o processo, as lâminas foram deixadas para secar *overnight* à temperatura ambiente.

Para fins comparativos da eficácia de diferentes corantes, as lâminas foram coradas também com os corantes fluorescentes DAPI e Acridine Orange. Para a coloração com DAPI, foram diluídos 1µL do corante em 500 µL de PBS e, em seguida, adicionados 50 µL da solução em cada lâmina. Lamínulas plásticas foram dispostas em cima das lâminas de forma a homogeneizar o corante na amostra. Com essa etapa finalizada, as lâminas foram colocadas em banho-maria a 37°C por 20 minutos e, depois de retiradas, foram lavadas com PBS por três vezes. Já para a coloração com o Acridine Orange, que visa detectar o estado de compactação e fragmentação da cromatina nuclear, foram adicionados 50 µL do corante em cada lâmina, as quais foram cobertas com uma lamínula plástica, deixando reagir por 25 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS por três vezes.

5.3.5 Adequação do protocolo original do ensaio cometa

Como não havia metodologia descrita para a realização do ensaio cometa em abelhas da espécie *B. atratus*, inicialmente o protocolo original descrito por Singh e colaboradores (1988) foi aplicado integralmente. Entretanto, para promover uma melhor visualização de cometas nesses indivíduos, realizou-se a padronização da técnica, por meio de testes e

alterações de diversos parâmetros (Tabela 1). As alterações finais feitas no protocolo constam na metodologia descrita nos tópicos anteriores.

TABELA 1 – Alterações realizadas no protocolo original do ensaio cometa

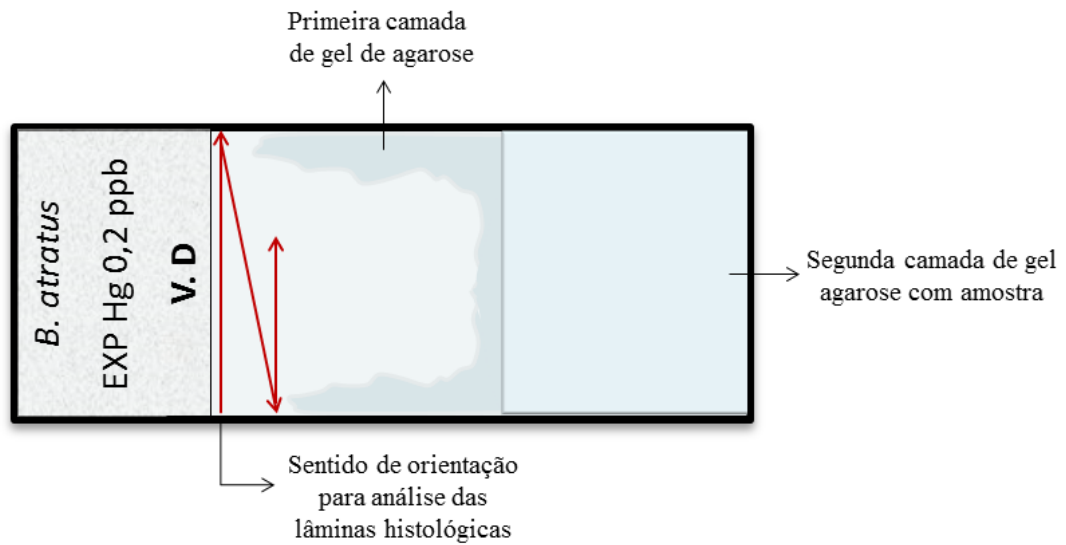
Parâmetros	Protocolo original (SINGH <i>et al.</i>, 1988)	Testes	Alterações finais
Concentração da Solução de Lise	Triton X-100 1%	Triton X-100 1% Triton X-100 2%	Triton X-100 2%
Tempo de tratamento com a Solução de Lise	60 minutos	30 minutos 60 minutos 90 minutos	90 minutos
Parâmetros da cuba de eletroforese	300 mA e 25 V	300 mA e 25 V 300 mA e 36 V	300 mA e 25 V
Tempo de corrida eletroforética	20 minutos	20 minutos 60 minutos 90 minutos 180 minutos	180 minutos

Fonte: *Elaborado pela autora.*

5.3.6 Análise das lâminas histológicas

As lâminas histológicas foram analisadas com a utilização de um fotomicroscópio (Leica® DM1000), estabelecendo padrões comparativos entre as lâminas dos indivíduos do grupo exposto e as lâminas dos indivíduos controle. Para excluir qualquer análise tendenciosa, a área total de todas as lâminas foi observada cuidadosamente realizando movimentos “zig-zague” (Figura 7). Vale ressaltar que a região preenchida pela primeira camada de gel de agarose é maior do que a região que contém a segunda camada de gel de agarose e amostra, possibilitando a migração de cometas para a região inicialmente isenta de amostra.

FIGURA 7 – Padrão de análise das lâminas histológicas



Fonte: *Elaborado pela autora.*

Foram realizados registros iconográficos das lâminas histológicas para a classificação visual dos cometas em níveis distintos, de acordo com a intensidade do dano ocorrido no DNA. Sendo assim, o nível 0 corresponde àquele em que o dano ao material genético é nulo (< 5%), o nível 1 onde o dano é baixo (5~20%), o nível 2 onde o dano é médio (20~40%), o nível 3 onde o dano é alto (40~95%) e, por fim, o nível 4 onde o dano ao DNA é total (>95%) e o cometa mais intenso. O *software* gratuito CASP (<http://casp.of.pl>) foi utilizado para a medição e padronização dos cometas em seus respectivos níveis de dano a fim de excluir subjetividade na classificação visual (KONCA, 2003).

Após as medições, o Índice de Danos (ID) foi calculado através da fórmula:

$$ID\ total = 0.(n^o\ nível\ 0) + 1.(n^o\ nível\ 1) + 2.(n^o\ nível\ 2) + 3.(n^o\ nível\ 3) + 4.(n^o\ nível\ 4)$$

Em seguida, a análise estatística foi realizada através do teste *Tukey's multiple comparisons test*, One Way ANOVA para dados não paramétricos, disponível no *software* GraphPad Prism.

5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para a análise morfológica, somente os túbulos de Malpighi foram selecionados. Inicialmente, o material biológico foi lavado com PBS e, em seguida, foi submetido ao processo de desidratação, passando por uma bateria de soluções alcoólicas de concentrações 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%, permanecendo por 10 minutos em cada solução. Em seguida, as amostras foram imersas em solução de xilol (1:1) por 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à metodologia de rotina para inclusão de material em resina plástica (historresina Leica) e foram cortadas em micrótomo Leica® modelo RM225 com 2 µm de espessura. Os cortes foram acomodados em lâminas histológicas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E). Por fim, foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Leica® modelo DM 1000.

6 CAPÍTULO 2: COMET ASSAY PROTOCOL FOR *Bombus atratus* FAT BODY AND PERICARDIAL CELLS (HYMENOPTERA, BOMBINI) AT A SAFE CONCENTRATION OF Hg

Abstract

The population decline of *Bombus* is closely related to the presence of pollutants in the environment. Among these pollutants, trace metals represent a major concern, including mercury (Hg), which is a known genotoxic substance. Genotoxicity induction may be demonstrated by the comet assay (single-cell gel electrophoresis), which is a simple, rapid and sensitive method to estimate DNA damage. The current work provided for the first time a protocol of the comet assay for *Bombus atratus* at a considered safe concentration. Bees were collected and divided into two groups (n = 11 each), the control group and the exposed group (subjected to 0.2 parts per billion mercury). The bioassay was performed for 48 h under controlled temperature and humidity conditions, according OECD guideline toxicological test method for *B. terrestris*. The samples were stained with different dyes (DAPI, acridine orange and silver nitrate) in order to observe the efficacy of each one. Variations in different parameters of the methodology, such as the concentration and the time of exposure in the lysis solution as well as the electrophoretic process, allowed the observation of comets at different levels. The fluorescent dyes (DAPI and acridine orange) presented unstable fluorescence due to photosensitivity decay, which represents a limiting factor for the analysis. On the other hand, conventional staining with silver nitrate was more effective, specifically regarding tinctorial stability and distinctness. Therefore, the comet assay is an effective method to evaluate genotoxic effects in bees. The present results may help establish a suitable protocol for future genotoxicity studies in neotropical bees, using different dose levels of xenobiotics.

Keywords: Standardization; Comet Assay; Genotoxicity; *Bombus atratus*; Ecotoxicology.

6.1 INTRODUCTION

There are few studies on the cytotoxic effects of xenobiotics and trace metals on bees of the genus *Bombus* [1, 2, 3, 4], despite numerous reports of the decline and disappearance of populations of species of this genus worldwide [5, 6, 7]. The main reason for this decline is exposure to pesticides and other contaminants. Among the contaminants, trace metals represent an important source of toxicity for the colonies. Indeed, high concentrations of various trace metals have already been found in the honey pots and pollen of eusocial bees [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Morphological and histochemical study demonstrated that cellular damage induced by mercury at considered safe concentration in *B. atratus* and *B. morio* fat body and pericardial cells is particularly harmful, impacting negatively the cell nuclei of such tissues [4]. However, its genotoxic effects have been poorly evaluated in bee tissues through specific technique like comet assay. The comet assay arises as a sensitive method employed to analyze damage to the genetic material in individual cell nuclei [15, 16, 17]. DNA electrophoresis in a micro-gel is relatively fast and simple, but involves several stages in order to prepare the samples for experimentation. This factor represents an obstacle for the protocolization of the comet assay using different species and tissues [18, 19, 20, 21]. Therefore, the present work proposes a protocol for the comet assay (single-cell gel electrophoresis) in *Bombus atratus* tissues.

The work presented here do not intend focus on the toxicological bioassay, that, as stated in the Organization for Economic Development and Co-operation (OECD) test guideline 474, a chemical which shows no sign of toxicity up to the limit dose of 2 ppb need only be tested at that dose. The protocol proposed here is first to produce better visual results of the comets as possible, as standardized protocol [17] did not worked for *Bombus atratus*. After developed the protocol for best visualization of the comets, future studies of different dose limits can be done, as proposed by Burlinson et al. (2007).

6.2 MATERIAL AND METHODS

Collection and experimental design

B. atratus workers were collected from the remaining fragments of the semideciduous forest and Cerrado in the municipality of Sorocaba (São Paulo, Brazil) from January to March 2018. After collection, the workers were kept individually in $16 \times 12 \times 10$ cm wood boxes with two feeders attached to the bottom of the box (close to the wall), one for food and the other for either freshwater or the mercury-contaminated solution. The boxes were kept inside an incubator (26°C , relative humidity [RH] 70%, in the dark). They were fed *ad libitum* with a sugar solution (70% sucrose). Bioassays were conducted in replicates for both the control and experimental groups ($n = 11$ for each). The experimental group was offered 2 mL of the 0.2 parts per billion ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) mercury solution (mercury chloride; Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$ purity). After 48-h exposure, all bees were sacrificed, and the fat body and pericardial cells that shelter the dorsal vessels and Malpighian tubes were dissected. The OECD [22] guidelines for testing chemicals in *Bombus terrestris* were consulted.

Preparation of histological slides

The histological slides were prepared one day in advance of the experiment. with the dilution using Genetic technical grade (GTG) agarose (0.3 g in 20 mL phosphate buffered saline [PBS]) was boiled two to three times, and then slides were submerged into the gel in order to form a thin layer of agarose. Slides were dried overnight in a controlled environment at room temperature. The tissues underwent manual maceration; upon maceration, 35 μL of the sample was transferred to a new microtube (Eppendorf®) and filled with 80 μL low electroendosmosis (LE) agarose (0.1 g in 20 mL PBS). The sample (macerated tissue plus LE agarose) was settled on the previously prepared histological slide. A coverslip was inserted onto the slide immediately after the addition of the aforementioned sample. At the end of the procedure, the slides were cooled to 4°C for 10 min, and then the coverslips were carefully removed.

Treatment with lysis solution and electrophoresis

Histological slides were immersed in a lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]; 10 mM Tris; 1% N-lauroyl-sarcosine; 9% dimethyl sulphoxide and 2% Triton X-100) for 90 min. This solution was prepared 2 h prior to use or

until it reached 4°C. After lysis treatment, the slides were removed from the solution and bathed in neutralisation solution (10 mM Tris, pH 7.5) for 5 min.

The slides were then placed into the electrophoretic chamber; subsequently the electrophoresis solution (100 mM EDTA and 0.3 M NaOH, pH 12) at 4°C was added. The slides remained in alkaline treatment for 30 min. Next, the electrophoretic power supply was connected and adjusted to 25 V (1 V/cm) and 300 mA. Electrophoresis was run for 180 min. After completion, the slides were removed from the electrophoresis chamber and washed with neutralisation solution three times for 5 min each.

Histological slide staining

The slides were washed twice with distilled water and allowed to dry for 90 min at 37°C in a BOD oven, or overnight at room temperature in a controlled environment. After drying, the samples were exposed to the fixation solution (4M HCl, 1% glycerol, 0.2M ZnSO₄ · 7H₂O) for 10 min. Subsequently, the slides were washed three times with distilled water and stored overnight in a bucket totally sheltered from light. The slides were hydrated with distilled water for 5 min. Thereafter, an ordinary silver nitrate staining solution (0.47 M Na₂CO₃, 12.5 mM NH₄NO₃, 6 mM AgNO₃, 0.86 mM tungstic acid - H₄[W₁₂SiO₄₀] and 0.15% formol) was poured into the staining cuvette and stayed in contact with the slides in the dark for 40 min. The slides were then removed from the cuvette, washed three times with distilled water and subjected to a stop solution (1% CH₃COOH) bath for 5 min. Finally, the slides underwent three washes with distilled water. At the end of the process, the slides were dried overnight at room temperature in a controlled environment. For DAPI staining, 1 µl dye was diluted in 500 µl PBS; 50 µl of the solution was added to each slide. Plastic slides were placed on top of the histological slides in order to homogenize the dye in the sample. Thereafter, the slides were incubated in a 37°C water bath for 20 min and then washed with PBS three times for further fluorescence microscopy analysis. For acridine orange staining, which aims to detect the state of compaction and fragmentation of nuclear chromatin, 50 µl dye was added to each slide. The slide was covered with a plastic coverslip and allowed to react for 25 min. The slides were then washed with PBS three times for further fluorescence microscopy analysis.

6.3 RESULTS AND DISCUSSION

Testing different treatment times of the histological plates with lysis solution (30, 60 and 90 min) demonstrated that the longest exposure time (90 min) was more effective in disrupting cell membranes to expose the nuclei, so that when submitted to the electrophoresis process, the DNA fragments could migrate proportionally to the fragmentation pattern. Additionally, changing the electrophoretic running time to 180 min at 25 V and 300 mA was essential for obtaining good comet patterns of DNA damage in the *Bombus atratus* samples (Fig 1). Additionally, we obtained a clean background. This procedure enabled the establishment of the new comet assay protocol for these organisms (Fig. 2).

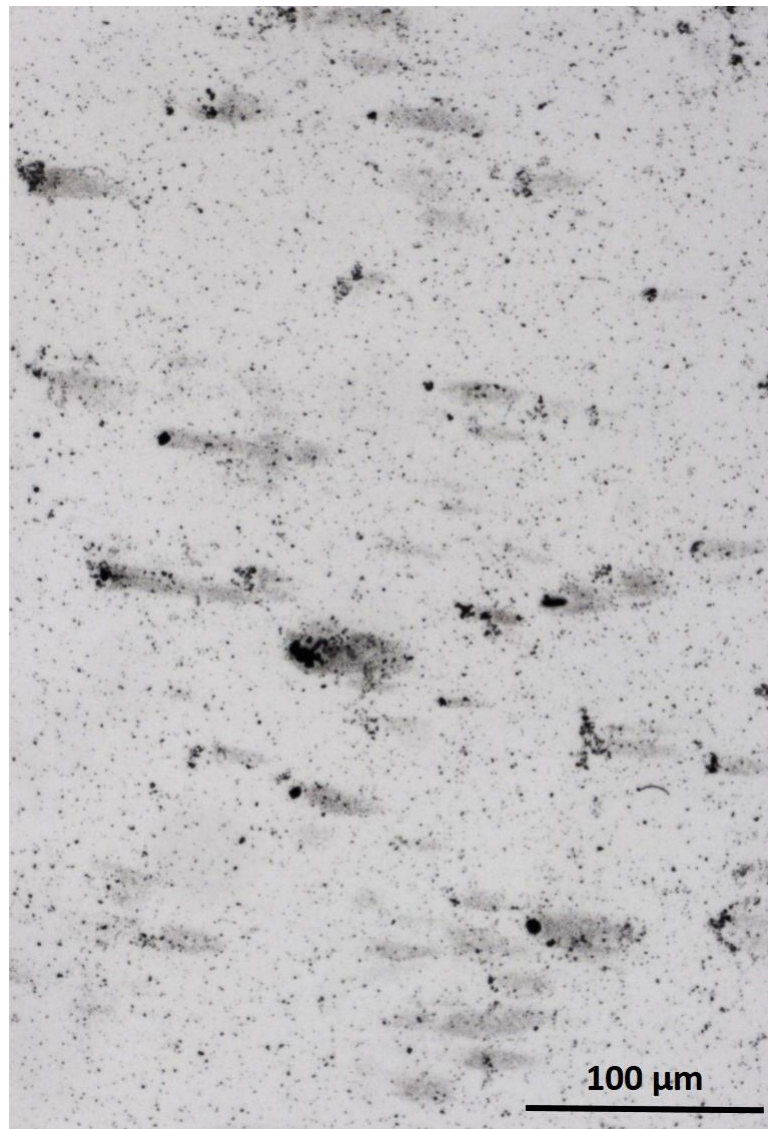


Fig 1. Comet assay in a sample of the dorsal vase of *Bombus atratus*.

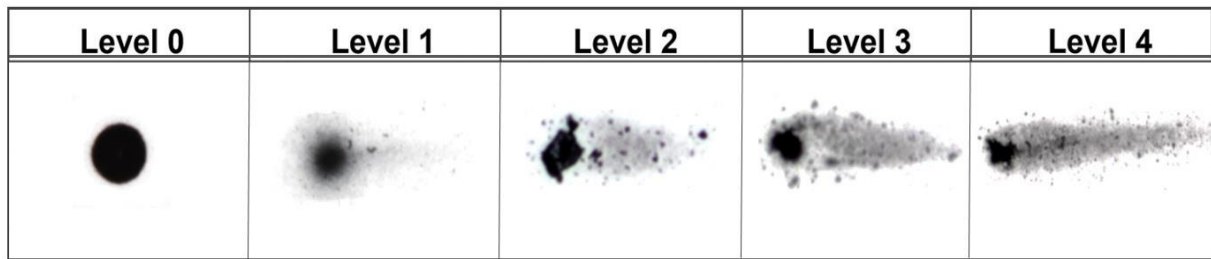


Fig 2. Visual classification of silver-nitrate-stained comets in five levels (0-4). Level 0: no damage (< 5%); level 1: low level of damage (5-20%); level 2: average damage (20-40%); level 3: high level of damage (40-95%); level 4: total damage (> 95%).

As proposed by Collins [23], comets were visually classified at one of five levels—from level 0 (without DNA damage) to level 4 (maximum damage)—with all the utilised dyes. For the samples stained with acridine orange (Fig. 3) or DAPI (Fig. 4), it was also possible to visually classify the five levels, data that evidence their effectiveness. Both are DNA-binding fluorescent dyes, and acridine orange, in particular, is a metachromatic dye that blends simple DNA strands into red and green double strands [24]. However, both dyes presented limitations regarding the amount of time available to analyze the sample, since the fluorescence decayed rapidly. The silver staining is more chemically stable, after histological plate staining it was possible to storage it for long time with no loss of sample quality and reliability.

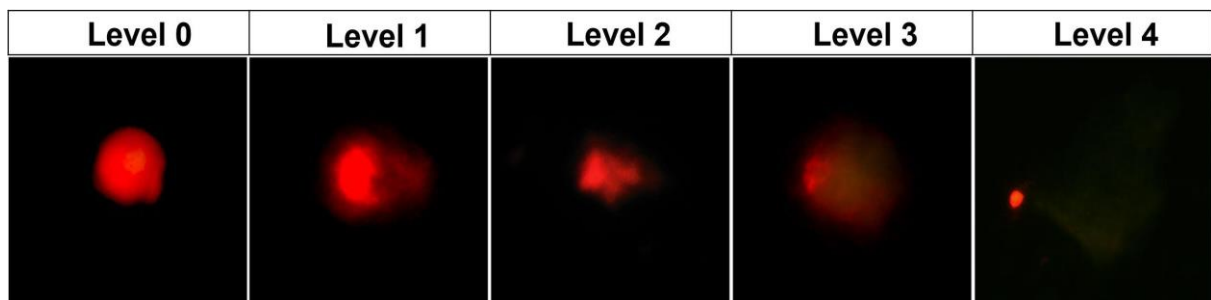


Fig 3. Visual classification of acridine-orange-stained comets in five levels (0-4). Level 0: no damage (< 5%); level 1: low level of damage (5-20%); level 2: average damage (20-40%); level 3: high level of damage (40-95%); level 4: total damage (> 95%)

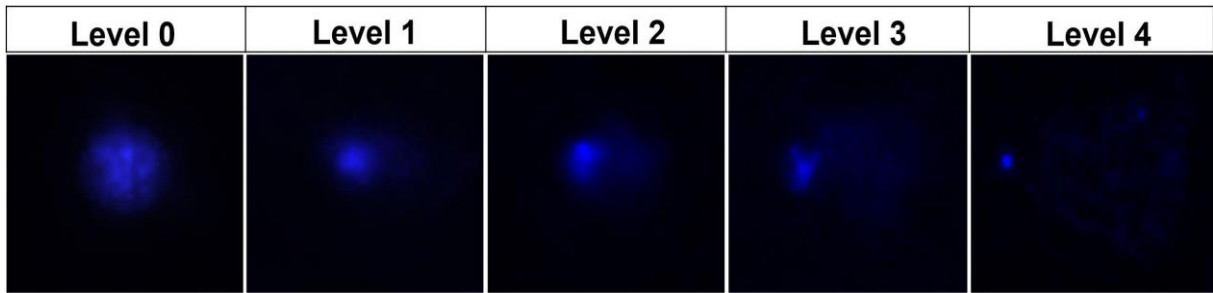


Fig 4. Visual classification of DAPI-stained comets in five levels (0-4). Level 0: no damage (< 5%); level 1: low level of damage (5-20%); level 2: average damage (20-40%); level 3: high level of damage (40-95%); level 4: total damage (> 95%).

Finally, CASP software, available free of charge at <http://www.casp.of.pl/>, was used as a complementary method to visually classify the comets. This image analysis programme allows one to measure the relative size of the comets and the proportion of DNA present in the head and tail. In level 0 comets, DNA is mostly in the head; comparatively, in level 4 comets most DNA is in the tail (Fig. 5). For this analysis, the images were adjusted in order to better delimit the DNA and to eliminate background noise. Specifically, the software limits the area of the comet by means of a frame, which is composed of a line that denotes the tail and a circle that indicates the head. The programme also provides graphs that estimate the percentage of DNA found in each part.

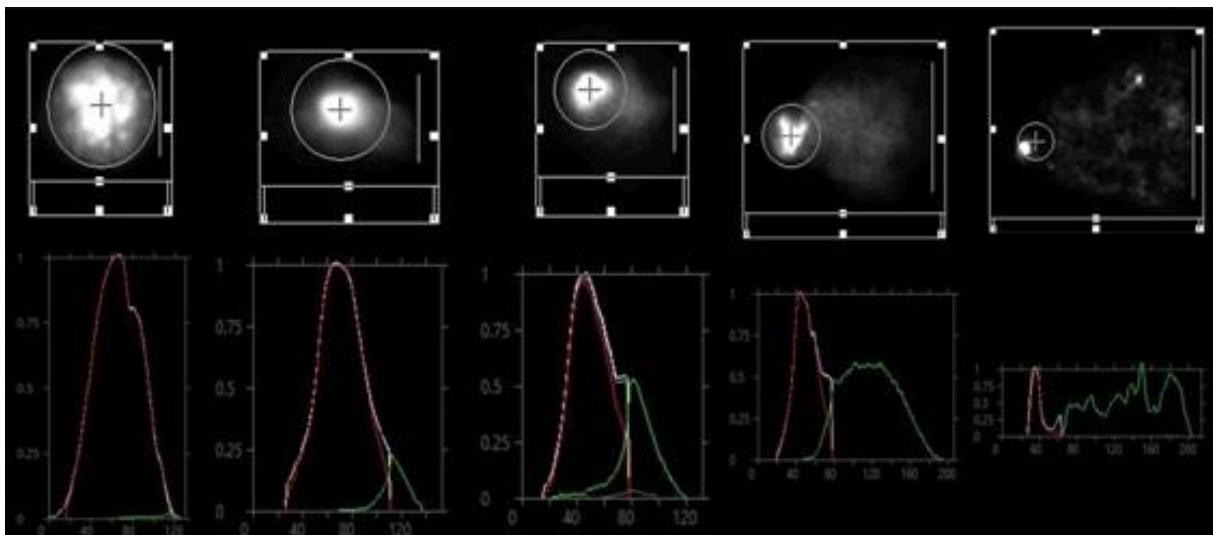


Fig 5. Use of CASP software as a complementary method to visually classify the comets. The programme generates a frame to limit the area of the comet and charts that provide information about the relative percentage of DNA in each area.

This programme was used as a verification method of visual classification in order to exclude the subjectivity of this classification. This design provided more solid and accurate results. However, as noted by Collins [23] the programme cannot be as accurate in delimiting the non-fragmented portion of the comet at level 4 (Fig. 5). For *B. atratus* conventional staining with silver nitrate was more effective, specifically regarding tinctorial stability and distinctness of the comet levels.

The importance of this work is to establish a best protocol for comet visualization in bees, since the ecotoxicological studies in laboratory conditions are methods that begin to investigate possible impacts on bees in regions near environmental disasters, since we don't have systematic studies monitoring bees, or the general entomofauna, in cases of dam collapses and other environmental disasters, like the illegal gold mining activity in Amazon Rain Forest. Additionally, study of terrestrial ecotoxicology in Brazil is still developing.

6.4 CONCLUSION

The comet assay is a demonstrated efficient biomarker in ecotoxicology. Regarding its applications in environmental monitoring sciences, this assay has been applied to a limited number of species when compared to the known biodiversity. Considering this limited application, and the lack of protocol methodology of the comet assay using bees of the *Bombus* genus, the current work provides for the first time a validated method for running the comet assay on these organisms. For *B. atratus* conventional staining with silver nitrate was more effective, specifically regarding tinctorial stability and distinctness of the comet levels.

Acknowledgements

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

6.5 REFERENCES

- [1] Abdalla, F. C., Domingues, C. E. C., 2015. Hepato-Nephrotoxic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. PLoS ONE, 10(7): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132349>.
- [2] Abdalla, F. C., Costa, M. J., Sampaio, G., Camargo, D. A., Pedrosa, M., Nogueira, F. L. A. 2016. Efeito do Cádmio e do Glifosato na Musculatura de Mamangavas. Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente (Online). 3: 66-72.
- [3] Abdalla, F.C., Pedrosa, M., Domingues, C.E.C., Balsamo, P.J., 2018. Effect of Cadmium on Worker Ovary Morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 13: 28-37. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2018.28.37>.
- [4] Nogueira, F. L. A., Balsamo, P. J., Costa, M. J., Abdalla, F. C., 2019. Exposure to Mercury at trace concentrations leads to collapse of the hepato-nephrotoxic system in two Neotropical species of Bumblebee. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 14: 1-10. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2019.1.10>.
- [5] Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C. D., Settele, J., Kunin, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. Science. 313: 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>.
- [6] Cameron, S. A., Lozier, J. D., Strange, J. P., Koch, J. B., Cordes, N., Solter, L. F. et al., 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.). 108: 662-667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014743108>.
- [7] Martins, A. C., Melo, G. A. R., 2010. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil?. Journal of Insect Conservation, 14(2): 207-210. <https://doi.org/10.1007/s10841-009-9237-y>.
- [8] Bogdanov, S. 2007. Contaminants of bees products. Apidologie. Switzerland, 37(1): 1-18. <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>.
- [9] Bratu, L., Georgescu, C., 2005. “Chemical contamination of bee honey – identifying sensor of the environment pollution”. Central European Agriculture. 6: 467-470.
- [10] Buldini, P. L., Cavalli, S., Mevoli, A., Sharma, J. L., 2001. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. Food Chem., 73: 487-495. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00132-7).
- [11] Carrero, P., Rondón, C., Saavedra, A. R., Vit-Olivier, P., 2013. A study of Hg and Pb content in pot-honey (Apidae: Meliponini). In: Vit P, Roubik DW, editors. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Mérida: Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. 1-5. Available: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>.

- [12] Mbiri, A.; Onditi, A.; Oyaro, N.; Murago, E., 2011. Determination of essential and heavy metals in Kenyan honey by atomic absorption and emission spectroscopy. *Journal of Agriculture, Science and Technology, Nairobi*, 13(1): 107-115.
- [13] Pablo, C., Rondón, C., Saavedra, A. R., Vitt, P., 2013. A study of Hg and Pb content in pot-honey (Apidae: Meliponini). In: *Stingless Bess Process Honey And Pollen In Cerumen Pots*, Vit, P. and D.W. Roubik, (Eds.), Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, pp: 1-5. ISBN: 978-980-111551-9.
- [14] Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofo, A., Gambacorta, E., 2012. Metal content of the southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology, Basilicata*. 47(9): 1909-1917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03050.x>.
- [15] Møller, P., 2005. The alkaline comet assay: Towards validation in Biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. v. 98, 4: 336-345. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x.
- [16] Östling, O., Johanson, K. J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 123: 291–8. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X).
- [17] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175: 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [18] Belpaeme, K.; Cooreman, K.; Kirsch-Volders, M., 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res.- Geneti Toxicol. Environ. Mutag*. 415: 167-184. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(98\)00062-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(98)00062-x).
- [19] Betti, C., Davini, T., Giannesi, L., Loprieno, N., Barale, R., 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res*. 307(1), 1: 323-333. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90306-9).
- [20] Collins, A. R., 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*. Elsevier BV [s.l.], v. 1840, 2: 794-800. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>.
- [21] Enciso, J. M., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Olsen, A. K., López de Cerain, A., Azqueta, A., 2018. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. *Mutagenesis*. Oxford University Press (OUP), [s.l.], 33, 1: .25-30. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex039>.
- [22] OECD., 2017. Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test, n.246

[23] Collins, A. R., 2002. The comet assay, principles, applications and limitations. In: Didenko VV (ed) *In situ Detection of DNA damage. Methods and protocols*. Humana Press Inc., Totowa, 203: 163-177. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163>.

[24] Collins, A. R., Dusinska, A., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayoitidis, M., Raslova, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation and applications. *Environ Mol Mutagen* 30: 139-146.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:2<139::AID-EM6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:2<139::AID-EM6>3.0.CO;2-I).

7 CAPÍTULO 3: ESTIMATIVA DE DANOS NO DNA PELO ENSAIO COMETA EM ABELHAS *Bombus atratus* EXPOSTAS A UMA CONCENTRAÇÃO SEGURA DE MERCÚRIO

7.1 INTRODUÇÃO

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única, é uma metodologia que permite a avaliação e quantificação de danos no DNA da cromatina do núcleo de uma única célula e se caracteriza por ser altamente sensível e preciso, relativamente rápido e de baixo custo, podendo ser aplicado em qualquer tipo de célula eucariótica, mesmo em pequenas quantidades de amostra (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Nessa metodologia, as células são incorporadas em gel de agarose, seguido de um tratamento com solução apropriada para o rompimento das membranas celulares e nucleares a fim de selecionar apenas o material genético, o qual é submetido à eletroforese em condições alcalinas. A partir disso, o DNA fragmentado migra em direção ao ânodo (eletrodo positivo para onde migram os íons negativos), produzindo uma cauda, que pode ser classificada em até cinco níveis, conforme seu comprimento (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; MØLLER, 2005). Esse ensaio tem se tornado cada vez mais promissor como um biomarcador de genotoxicidade, sendo amplamente utilizado em estudos de biomonitoramento ambiental, pois permite tanto a investigação do mecanismo de ação de compostos químicos genotóxicos em diferentes organismos, quanto a investigação da influência destes toxicantes no ambiente (MØLLER, 2005; AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016).

Um destes compostos é o mercúrio (Hg), uma substância de elevada toxicidade, mesmo se absorvido em pequenas doses ou baixas concentrações, reconhecido pela comunidade científica como um poluente global (D'ITRI, 1991). Além de ser cumulativo, pouco degradável e difícil de ser metabolizado pelo organismo, este metal-traço é altamente reativo às biomoléculas, sendo capaz de alterar, inativar ou destruir macromoléculas, sistemas enzimáticos e ácidos nucleicos, comprometendo severamente a funcionalidade celular. (GOODMAN; GILMAR, 1995; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; DURUIBE *et al.*, 2007; RUTTKAY-NEDECKY *et al.*, 2013).

Xenobióticos, como o Hg, são considerados um dos fatores que contribuem para o declínio de populações de diversas espécies de abelhas, sabidamente ameaçadas de extinção. As abelhas são consideradas ótimas bioindicadoras do estresse ambiental devido sua capacidade de percorrer longas distâncias e interagir com diversos *habitats*, além de serem os principais polinizadores responsáveis pela manutenção de paisagens geobotânicas variadas e diversos sistemas agrícolas, desempenhando papel extremamente importante tanto ecológico quanto econômico (MCGREGOR, 1976; FERNANDEZ, 1994; JARLAN *et al.*, 1997; SANNA *et al.*, 2000; BULDINI *et al.*, 2001; BOGDANOV *et al.*, 2003; DEVILLERS; PHAM-DELEGUE,

2003; FREDIS; MONTENEGRO, 2006; LIMA; ROCHA, 2012; SCHÖNFELDER; BOGNER, 2017).

Entretanto, os estudos que utilizam o ensaio cometa estão focados na espécie *Apis mellifera* (THOMPSON, 2001), enquanto trabalhos envolvendo abelhas nativas e neotropicais que ocorrem no Brasil, como a espécie *Bombus atratus*, são pouco explorados e não abordam os órgãos internos destas abelhas para avaliação de biomarcadores do efeito do estresse ambiental frente à ação de xenobióticos (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). O sistema hepatonefrocítico (SHN) e os túbulos de Malpighi (TM) são órgãos relevantes para essa análise, uma vez que ambos atuam em processos de desintoxicação e estão diretamente em contato com os contaminantes (BREITHOLTZ *et al.*, 2006; ABDALLA; DOMINGUES, 2015, NOGUEIRA *et al.*, 2019).

O SHN é formado por uma associação de tecidos localizados estrategicamente ao redor do vaso dorsal. Os tecidos apresentam um arranjo espacial definido, ou seja, mais externamente há uma camada de corpo gorduroso, o qual é constituído de trofócitos e enócitos e, envolvido por este, uma camada de células pericárdicas, que envolve o vaso dorsal. Entre esses tecidos, encontram-se hemócitos (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). Esse sistema desempenha funções importantes na regulação da homeostase da hemolinfa, assim como na remoção e/ou inativação de toxicantes e prevenção contra o estresse oxidativo, preservando os órgãos internos e o cérebro da contaminação por toxicantes. Dessa forma, as células do SHN são altamente responsivas a substâncias tóxicas, como os metais traço e outros xenobióticos, tornando-se um eficiente biomarcador para estudos de monitoramento ambiental (ABDALLA; DOMINGUES, 2015).

Nessa perspectiva, este estudo visou avaliar, por meio do ensaio cometa, o efeito genotóxico do Hg em concentração considerada segura pela legislação brasileira (CONAMA, 2005) nas células que compõem o SHN (trofócitos, enócitos, células pericárdicas, hemócitos e miofibrilas do vaso dorsal) e TM de abelhas da espécie *B. atratus*.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das abelhas e delineamento experimental

As abelhas da espécie *B. atratus* (Franklin, 1913) foram coletadas em fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado, na cidade de Sorocaba, São Paulo, Brasil, nos meses de fevereiro a março de 2019. Após coletadas, as abelhas foram mantidas, isoladamente, em caixas especiais para este fim, em estufa B.O.D., em condições de umidade e temperatura controladas. Os organismos coletados foram divididos em dois grupos. O grupo experimental (n = 11) foi exposto ao Hg, pela oferta diária de exatos 2 mL de solução contendo cloreto de mercúrio (HgCl₂) a uma concentração de 0,2 µg L⁻¹ (concentração máxima de mercúrio considerada segura para águas salobras da Classe VII e águas da Classe II, CONAMA), além de alimento *ad libitum*, sendo este uma solução de 70% de sacarose. Para o grupo controle (n = 11) foram ofertados 2 mL de água filtrada e o mesmo alimento disponibilizado ao grupo exposto. Após 48 horas de bioensaio, as abelhas foram sacrificadas através de crio-narcotização a 4 °C e, em seguida, foram dissecadas para retirada de amostras dos TM e do corpo gorduroso associado ao vaso dorsal. As diretrizes da OECD (2017) para testes de produtos químicos em *B. terrestris* foram seguidas.

Ensaio Cometa

Lâminas histológicas foram previamente preparadas com uma camada de gel de agarose. Em seguida, os tecidos foram macerados com o auxílio de um pistão rotativo para microtubo, e incorporados em agarose para comporem a segunda camada de gel nas lâminas anteriormente preparadas. Estas lâminas foram submetidas aos seguintes processos: (i) tratamento com solução de lise por 90 minutos; (ii) eletroforese 25 V, 300 mA por 180 minutos e (iii) coloração com nitrato de prata.

A classificação visual dos cometas em cinco categorias distintas foi realizada através de análise das lâminas em fotomicroscópio (Leica® DM1000), posteriormente, foi realizada a análise de variância utilizando o *Tukey's multiple comparisons test*, One Way ANOVA para dados não paramétricos.

Análises morfológicas

Os TM foram submetidos ao processo de desidratação, passando por uma bateria de soluções alcoólicas de concentrações 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%,

permanecendo por 10 minutos em cada solução. Após este processo, as amostras foram imersas em solução de xilol (1:1) por 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a metodologia de rotina para inclusão de material em resina plástica (historresina Leica) e foram cortadas em micrótomo Leica® modelo RM225 com 2 μ m de espessura. Os cortes foram acomodados em lâminas histológicas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E). Por fim, foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Leica® modelo DM 1000.

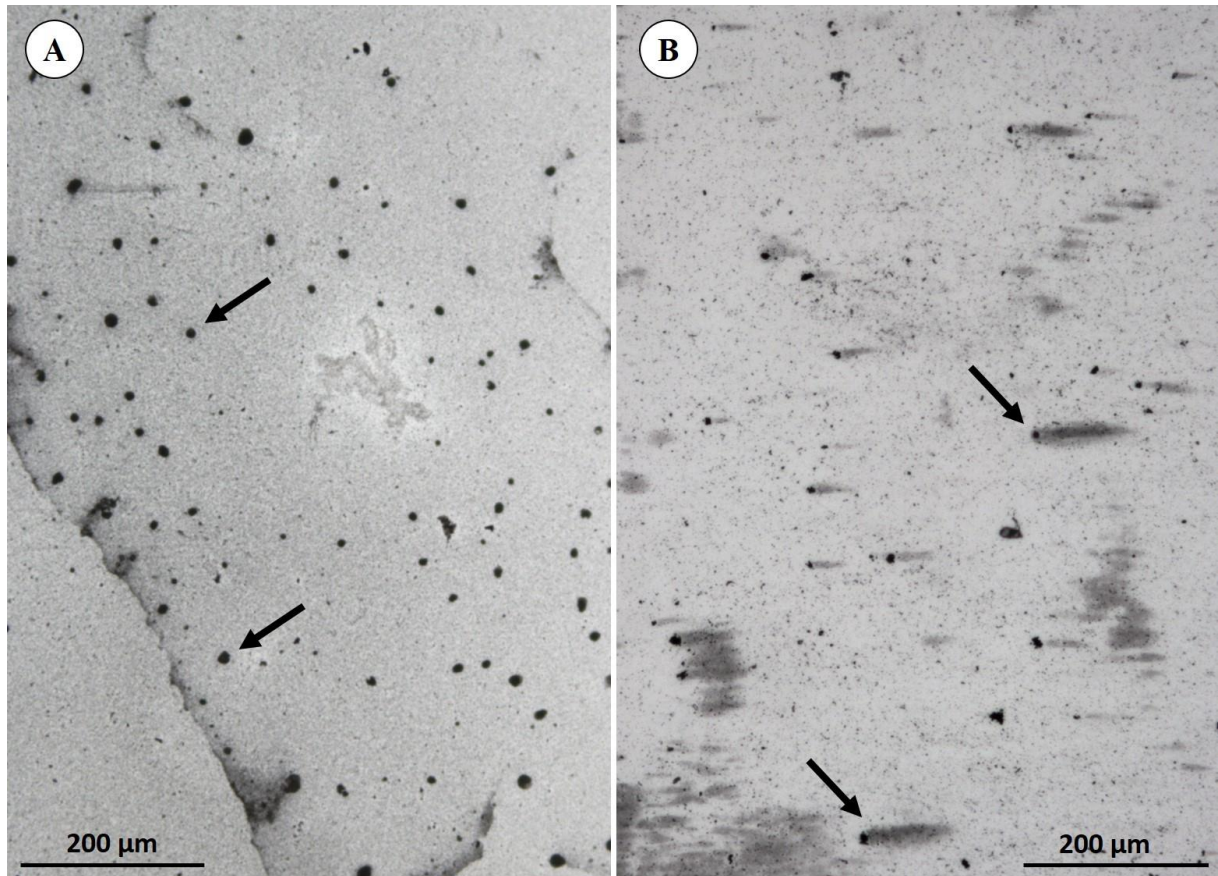
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Genotoxicidade do mercúrio no sistema hepatonefrocítico

Após a padronização do ensaio cometa para melhores resultados na visualização dos cometas para as abelhas da espécie *B. atratus* (Capítulo 2), foi possível analisar a genotoxicidade do Hg à concentração de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ nas células que compõe o SHN de operárias da mesma espécie; comparando os grupos controle e exposto.

Notou-se prevalência de nucleoides (cromatina nuclear intacta) no grupo controle (Figura 8A) e cometas de vários níveis nas células das abelhas expostas ao Hg (Figura 8B).

FIGURA 8 - Padrões observados nos grupos. Legenda: (A) Grupo controle apresentando majoritariamente nucleoide, ou nível 0 (setas) sem danos no DNA. (B) Grupo exposto com cometas majoritariamente em nível 3 e 4 (setas) com DNA altamente danificado.



Fonte: *Da autora.*

Toda a superfície de cada lâmina corada com nitrato de prata foi analisada e foram contados todos os níveis de cometa, ou seja, do nível 0 ao 4, por indivíduo, totalizando 3.300 medições em ambos os grupos. Os valores absolutos de dano genético por indivíduo de cada grupo estão elencados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 - Valores absolutos de dano genético por indivíduo do Grupo Controle (SHN).

	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	TOTAL	ÍNDICE DE DANO
Controle 1	254	24	14	7	1	300	77
Controle 2	279	16	2	3	0	300	29
Controle 3	267	17	6	7	3	300	62
Controle 4	232	18	21	22	7	300	154
Controle 5	212	65	12	7	4	300	126
Controle 6	179	112	3	6	0	300	136
Controle 7	126	73	87	11	3	300	292
Controle 8	238	9	15	11	27	300	180
Controle 9	277	14	6	3	0	300	35
Controle 10	270	21	4	4	1	300	45
Controle 11	259	32	4	5	0	300	55
SOMA	2593	401	174	86	46	3300	1.191

Fonte: *Elaborado pela autora.*

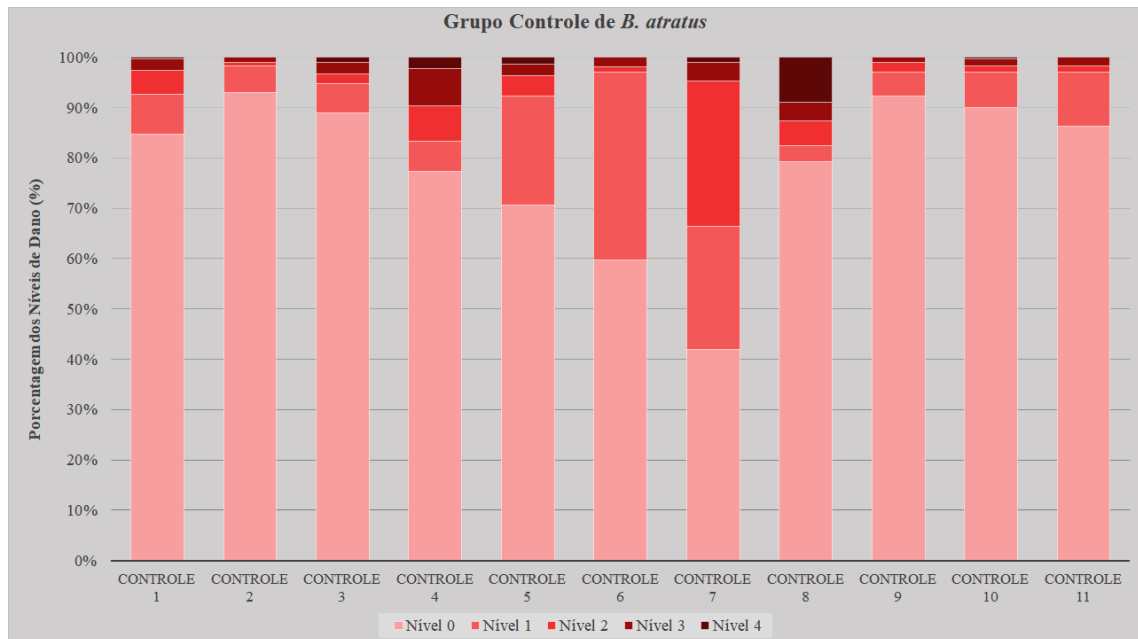
TABELA 3 - Valores absolutos de dano genético por indivíduo do Grupo Exposto (SHN).

	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	TOTAL	ÍNDICE DE DANO
Exposta 1	230	34	19	13	4	300	127
Exposta 2	208	27	23	33	9	300	208
Exposta 3	222	25	21	23	9	300	154
Exposta 4	100	109	24	27	40	300	398
Exposta 5	25	13	12	44	206	300	993
Exposta 6	33	18	11	8	230	300	984
Exposta 7	121	88	50	35	6	300	317
Exposta 8	97	139	15	13	36	300	352
Exposta 9	179	107	4	2	8	300	153
Exposta 10	161	82	23	21	13	300	243
Exposta 11	159	126	4	9	2	300	169
SOMA	1535	768	206	228	563	3300	4.116

Fonte: *Elaborado pela autora.*

Ao analisar a porcentagem de níveis de cometa em cada grupo, observou-se que o Hg tem efeito genotóxico para os tecidos analisados, uma vez que a maioria dos indivíduos expostos apresentaram número reduzido de nucleóide, ou nível 0, quando comparado com o grupo controle (Figuras 9 e 10). Além disso, cometas de nível 1 e 4 ocorreram em maior quantidade em indivíduos do grupo exposto (Figuras 9 e 10), o que demonstra a maior fragmentação do DNA desses indivíduos em relação ao grupo controle.

FIGURA 9 – Porcentagem dos níveis de danos no sistema hepatonefrocítico de abelhas do grupo controle.

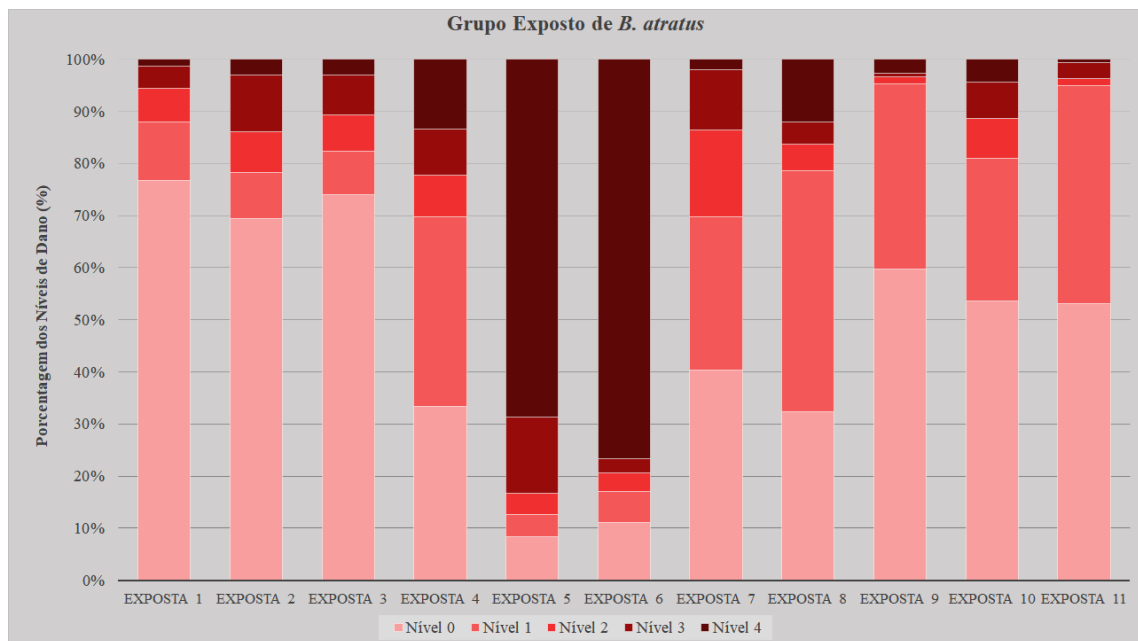


Fonte: *Elaborado pela autora.*

A análise da distribuição da porcentagem de níveis de cometa, ou índice de dano (Figura 11), evidenciou a diferença do grau de genotoxicidade entre os grupos por meio de uma análise comparada. Constatou-se que aproximadamente 78% dos nucleoides dos indivíduos do grupo controle estão concentrados em cometas de nível 0, isto é, com material genético íntegro (Figura 11). No grupo exposto, por sua vez, este nível somou, aproximadamente, 47% (Figura 11).

Nas categorias que representam as diferentes intensidades de dano ocorrido no DNA (níveis 1 a 4), o grupo controle totalizou 22% sendo que, deste número, o nível 1 predominou com 12%. Seguindo este parâmetro, pode-se sugerir que 53% dos nucleoides dos indivíduos do grupo exposto foram danificados e distribuídos nos níveis de 1 a 4 do grupo exposto, sendo que o nível 1 predominou com 32%, seguido do nível 4 com 18% (Figura 11).

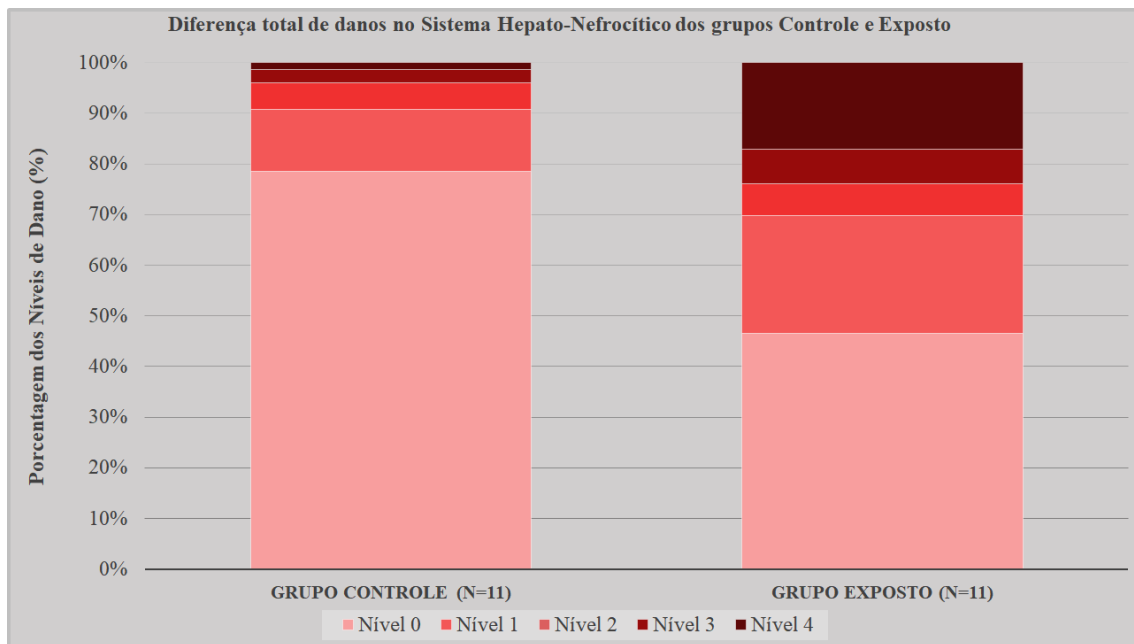
FIGURA 10 - Porcentagem dos níveis de danos no sistema hepatonefrocítico de abelhas do grupo exposto.



Fonte: *Elaborado pela autora.*

O nível 4 é a classe de cometa que apresenta a máxima fragmentação da cromatina, ou seja, com o DNA altamente fragmentado e em fita única. Quando essa categoria foi analisada individualmente entre os grupos, observou-se uma diferença considerável de 17%, uma vez que, o grupo exposto apresentou 18% de cometas de nível 4, enquanto o grupo controle apresentou 1% (Figura 11).

FIGURA 11 - Análise comparativa dos níveis de dano entre os grupos controle e exposto (%).



Fonte: *Elaborado pela autora.*

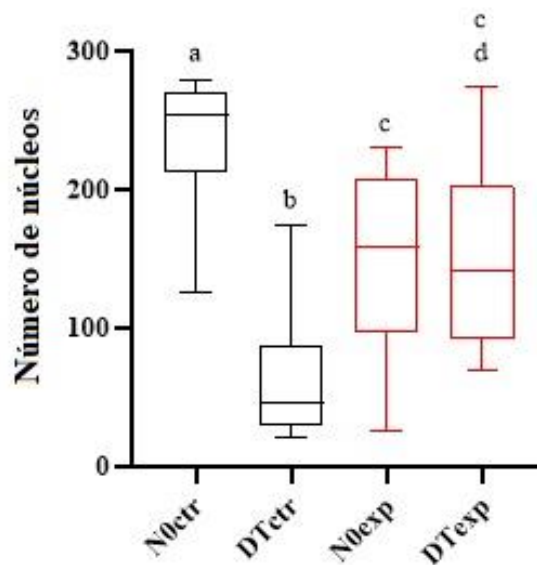
Após a análise visual, realizou-se análise de variância (*Tukey's multiple comparisons test*, One Way ANOVA para dados não paramétricos) para checar se havia diferenças estatísticas entre os grupos controle e exposto ($p > 0.0001$). O dano total do DNA de cada indivíduo é representado por cometas de nível 1 a 4, pois nestes níveis encontram-se os núcleos que sofreram fragmentação da cromatina. Dessa forma, os números correspondentes a esses níveis foram compilados para determinar o dano total, enquanto o nível 0, que corresponde ao DNA íntegro, ou nucleóide, tendo sido mantido isolado na análise a fim de estabelecer estatisticamente a quantidade de material genético intacto e a quantidade de material genético danificado (Figura 12).

Os resultados indicam que o nível 0 do grupo controle (N0ctr) predominou (**** = altamente significativo) em relação ao dano total deste mesmo grupo (DTctr), o que era esperado para animais não contaminados. Entretanto, o nível 0 do grupo exposto (N0exp) não difere estatisticamente do dano total (DTexp) encontrado nesse grupo. Isso demonstra que a quantidade de núcleos íntegros é similar à quantidade de núcleos danificados.

Porém, ao comparamos os dados separadamente entre os grupos, notou-se que o nível 0 do grupo exposto diminuiu em relação ao grupo controle ($p = 0,0031$), enquanto o dano total do grupo exposto aumentou com relação ao grupo controle ($p = 0,0031$). Sendo assim, o grau

de genotoxicidade do grupo exposto aumentou significativamente quando comparado com o grupo controle.

FIGURA 12 – Diferença estatística entre os grupos controle e exposto (Sistema hepatonefrocítico). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os demais ($p > 0.0001$). Teste de Tukey. Legenda: **N0ctr** – Nível 0 do grupo controle; **DTctr** – Dano total do grupo controle; **N0exp** – Nível 0 do grupo exposto; **DTexp** – Dano total do grupo exposto.



Fonte: Elaborado pela autora.

É sabido que o Hg possui toxicidade significativa, mesmo se absorvido em pequenas concentrações (ZAHIR *et al.*, 2005). O presente estudo indicou que as abelhas expostas a este contaminante apresentaram núcleos com DNA consideravelmente danificados, sendo observados pela migração diferencial dos fragmentos do material genético das células individualizadas em diferentes intensidades (Figura 13).

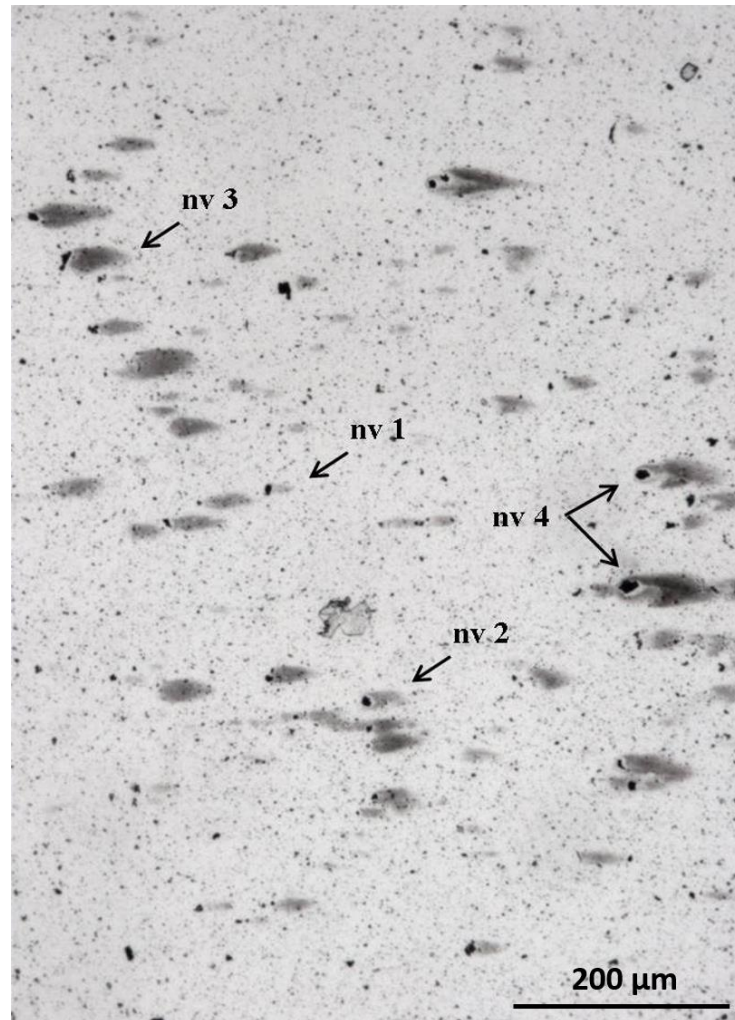
Esses resultados são corroborados pelo trabalho de Nogueira *et al.* (2019), que demonstraram por meio de análises morfológicas e histoquímicas, que as células do SHN de operárias de *B. atratus* expostas a concentrações traço de Hg sofreram colapso, enquanto em abelhas da espécie *B. morio* os trofócitos e enócitos perderam suas características, exibindo contorno irregular e núcleo em picnose. As análises morfológicas dos tecidos desses organismos indicaram que apesar de ter sido utilizada uma concentração de Hg considerada

segura ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$), todas as estruturas observadas no estudo (trofócitos, enócitos e células pericárdicas) foram altamente danificadas (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

No entanto, foi possível observar no presente trabalho que, dentre os tipos celulares que compõe o SHN, as células pericárdicas foram mais danificadas em relação aos trofócitos e enócitos. Isso pode estar relacionado à alta quantidade dessas células que envolvem o vaso dorsal, e, conseqüentemente, foram mais recorrentes na análise visual de classificação de cometas. Entretanto, seu alto nível de dano pode estar associado diretamente à função que exerce no organismo das abelhas. As células pericárdicas exibem capacidade pinocitária e estão envolvidas na captação e metabolização de produtos tóxicos da hemolinfa, viabilizando sua excreção pelos TM por meio de metabólitos intermediários menos tóxicos ou aprisionando os toxicantes dentro delas por toda a vida da abelha (MILLS; KING, 1965; CROSSLEY, 1972; POIANI; CRUZ-LANDIM, 2006; DAS *et al.*, 2008; CRUZ-LANDIM, 2009).

Devido a isso, as células pericárdicas são altamente responsivas à exposição de toxicantes, podendo ter suas funções superativadas ou desativadas. Em estado de superativação, essas células estão em intensa atividade de filtração da hemolinfa, enquanto, em estado de desativação esta filtração é impedida promovendo, assim, a ação prolongada dos agentes toxicantes no organismo (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). Segundo Nogueira *et al.* (2019), as células pericárdicas expostas a mesma concentração de Hg do presente estudo apresentavam-se todas em nível 4, ou seja, máximo grau de atividade pinocítica. Nessa perspectiva, assume-se que devido a esse maior tempo em contato com essas substâncias, as células pericárdicas são mais danificadas, comprometendo equilíbrio homeostático dos fluídos corporais das abelhas.

FIGURA 13 - Diferentes níveis de intensidade de danos das abelhas expostas ao Hg à concentração de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Legenda: **nv 1**. Danos mínimos no DNA; **nv 2**. Danos médios no DNA; **nv 3**. Danos intensos no DNA e **nv 4**. Danos máximos no DNA.

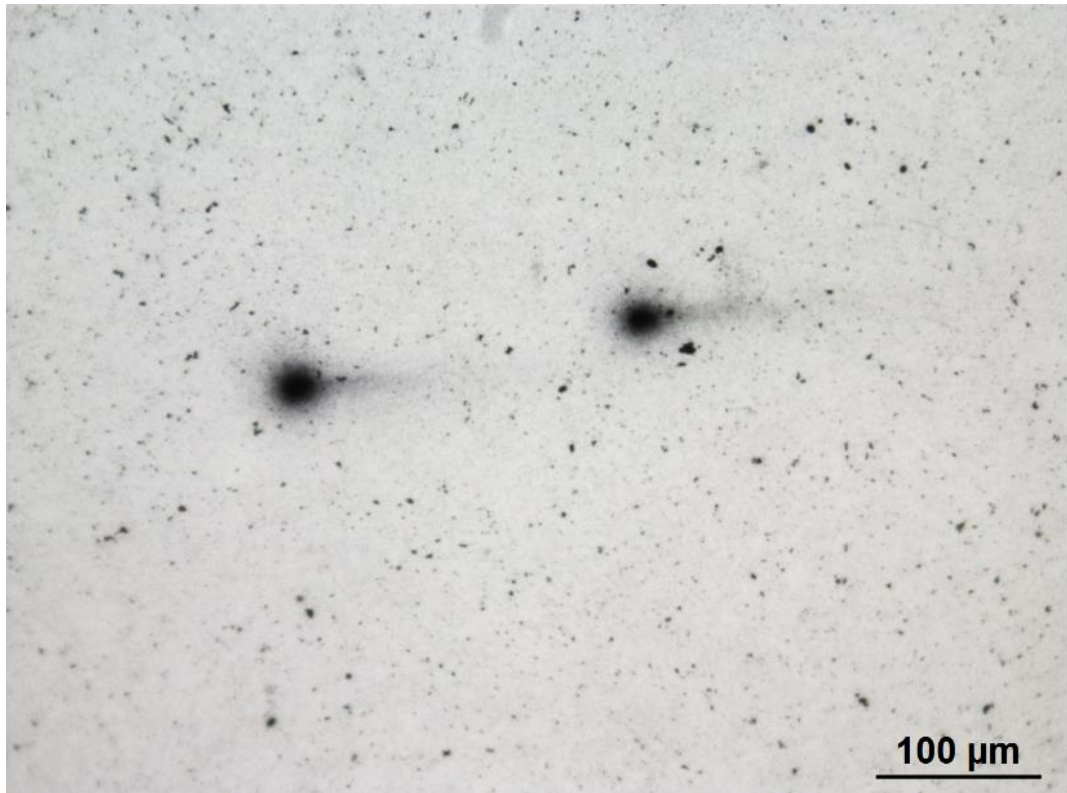


Fonte: *Da autora.*

7.3.2 Genotoxicidade do mercúrio nos túbulos de Malpighi

A análise da genotoxicidade do Hg a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ nos TM em análise visual das amostras indicou que este tecido é menos responsivo à exposição do Hg em relação ao SHN, uma vez que regiões com concentração exacerbada de cometas nível 1 a 4 não foram observadas. Esporadicamente, foram observados cometas de nível 1 em uma mesma região (Figura 14). Os valores absolutos de dano genético por indivíduo estão elencados nas tabelas 4 e 5.

FIGURA 14 – Cometas em nível 1, observados nos túbulos de Malpighi de abelhas expostas ao mercúrio ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$).



Fonte: *Da autora.*

TABELA 4 - Valores absolutos de dano genético por indivíduo do Grupo Controle (TM).

	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	TOTAL	ÍNDICE DE DANO
Controle 1	217	49	26	5	3	300	128
Controle 2	204	44	34	16	2	300	168
Controle 3	189	93	8	10	0	300	139
Controle 4	255	16	21	7	1	300	83
Controle 5	232	53	11	2	2	300	89
Controle 6	211	64	11	5	9	300	137
Controle 7	178	102	9	6	5	300	158
Controle 8	203	58	27	10	2	300	150
Controle 9	220	45	23	9	3	300	130
Controle 10	169	81	17	12	21	300	235
Controle 11	246	30	12	8	4	300	94
SOMA	2324	635	199	90	52	3300	1511

Fonte: *Elaborado pela autora.*

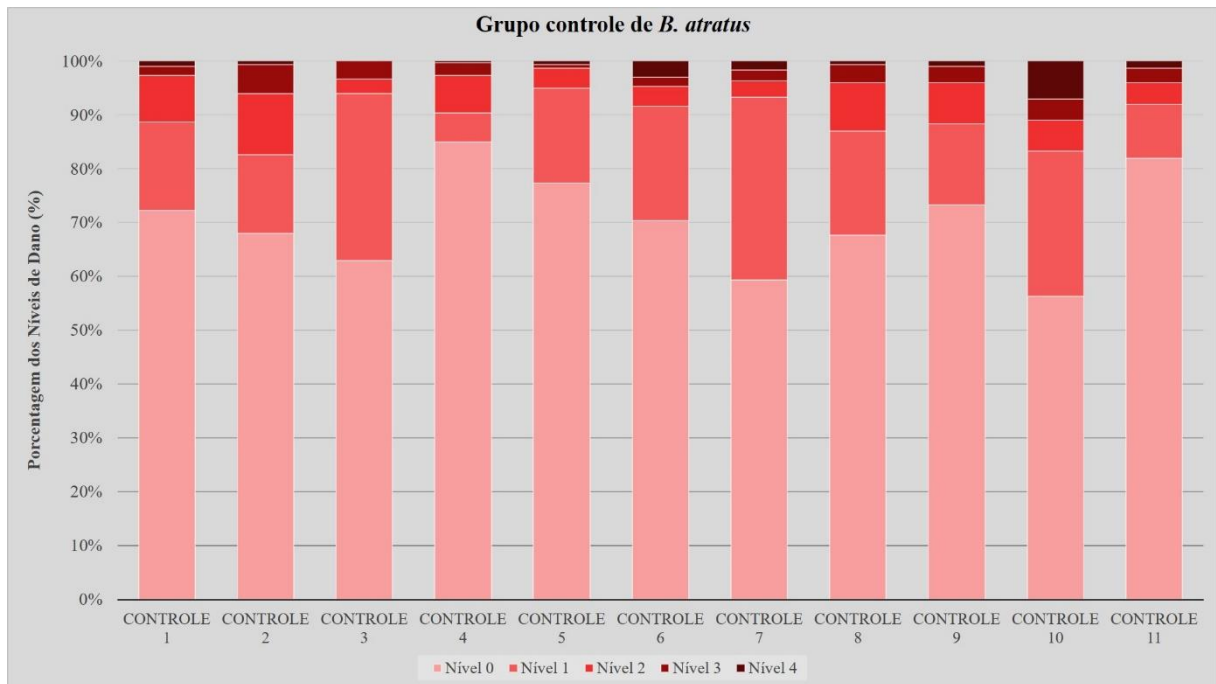
TABELA 5 - Valores absolutos de dano genético por indivíduo do Grupo Exposto (TM).

	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	TOTAL	ÍNDICE DE DANO
Exposta 1	111	137	31	16	5	300	267
Exposta 2	167	102	19	10	2	300	178
Exposta 3	233	38	9	11	9	300	125
Exposta 4	155	88	31	19	7	300	235
Exposta 5	123	101	42	18	16	300	303
Exposta 6	138	122	25	9	6	300	223
Exposta 7	197	58	24	13	8	300	177
Exposta 8	206	51	18	11	14	300	176
Exposta 9	173	97	15	8	7	300	179
Exposta 10	211	27	22	28	12	300	203
Exposta 11	92	136	27	31	14	300	339
SOMA	1806	957	263	174	100	3300	2405

Fonte: *Elaborado pela autora.*

Ao analisar a porcentagem de níveis de cometa em cada grupo, observou-se que o efeito genotóxico do Hg neste tecido não foi significativo, uma vez que a maioria dos indivíduos expostos apresentaram número reduzido de cometas de níveis 1 a 4, similar ao que ocorreu no grupo controle (Figuras 15 e 16). Além disso, os cometas de nível 0 apareceram em maior abundância em ambos os grupos (Figuras 15 e 16).

FIGURA 15 - Porcentagem dos níveis de danos nos túbulos de Malpighi de abelhas do grupo controle.

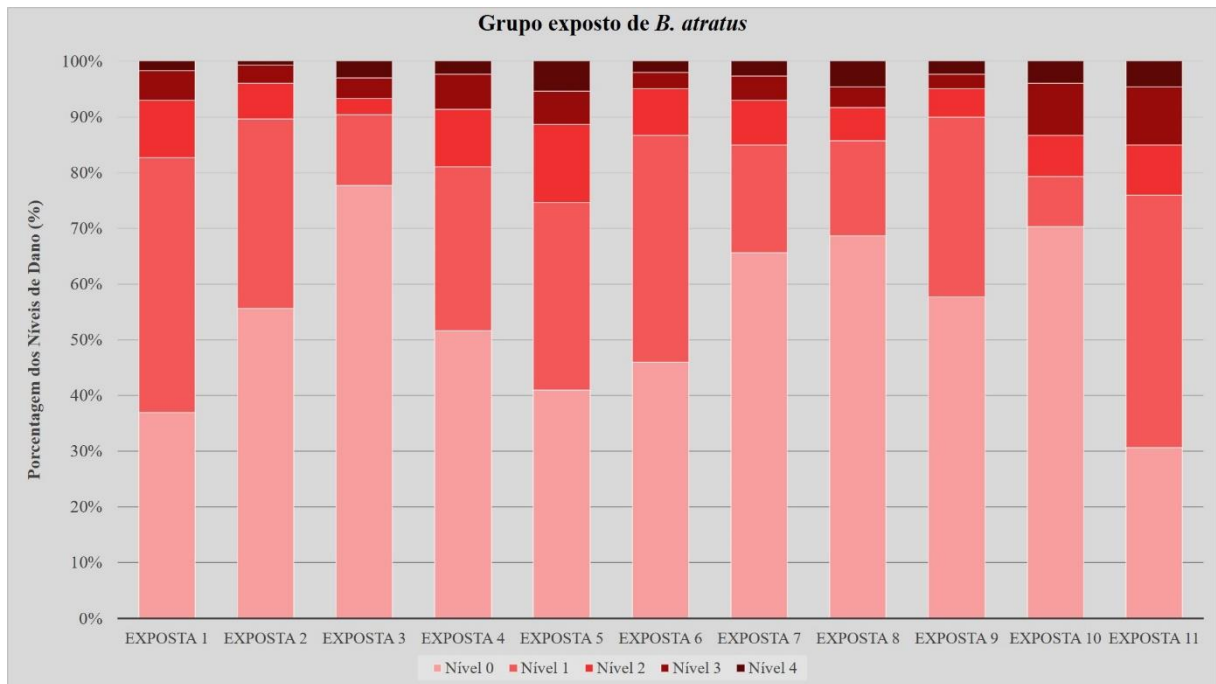


Fonte: *Elaborado pela autora.*

A análise da distribuição da porcentagem de níveis de cometa, ou índice de dano (Figura 17), evidenciou um grau de genotoxicidade semelhante entre os grupos por meio de uma análise comparada. Constatou-se que aproximadamente 71% dos nucleoides dos indivíduos do grupo controle estão concentrados em cometas de nível 0, isto é, com material genético íntegro (Figura 17). No grupo exposto, por sua vez, houve um decaimento sutil de cometas desta mesma categoria, somando, aproximadamente, 55% (Figura 17).

Nas categorias que representam as diferentes intensidades de dano ocorrido no DNA (níveis 1 a 4), o grupo controle totalizou 29%, sendo que deste número, o nível 1 foi predominante com 18%. Seguindo este parâmetro, 45% dos nucleoides dos indivíduos do grupo exposto foram danificados e distribuídos nos níveis de 1 a 4, entretanto o nível 1 predominou com 28%, seguido do nível 4 com 18% (Figura 17).

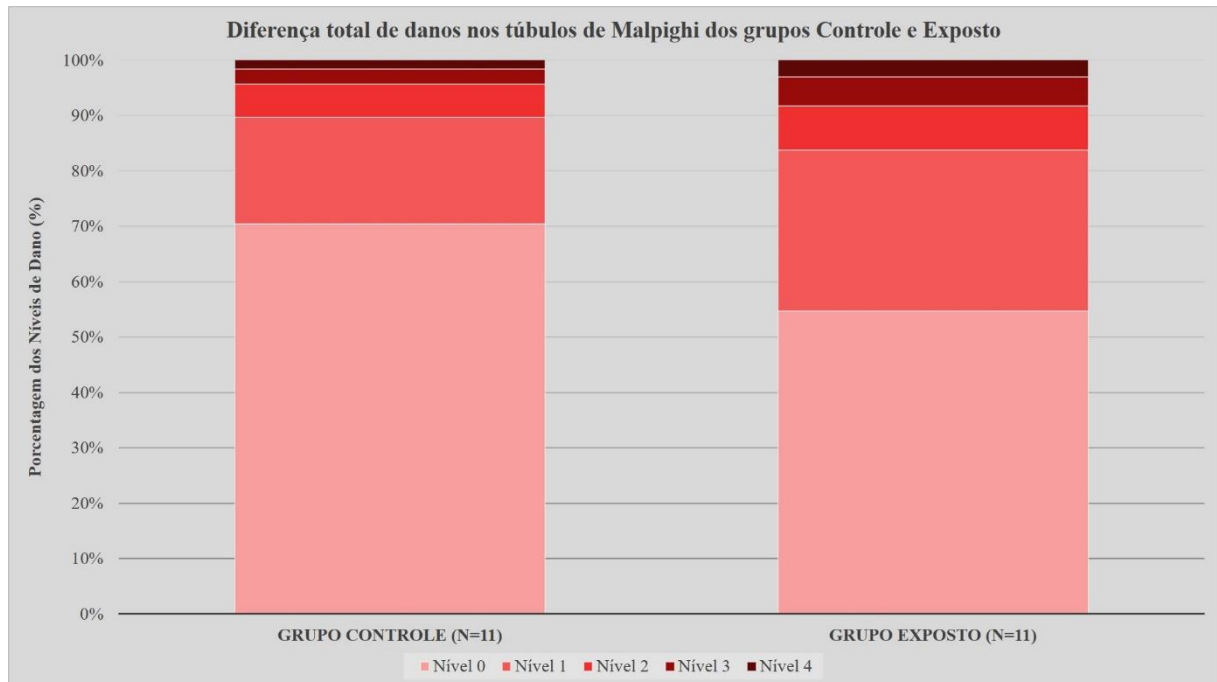
FIGURA 16 - Porcentagem dos níveis de danos nos túbulos de Malpighi de abelhas do grupo exposto.



Fonte: *Elaborado pela autora.*

Analisando somente o nível 4, o qual corresponde ao dano máximo da cromatina, ambos os grupos apresentaram quantidade ínfima, visto que, o grupo controle somou aproximadamente 1%, enquanto o grupo exposto apresentou 3% de cometas neste nível.

FIGURA 17 - Análise comparativa dos níveis de dano entre os grupos controle e exposto (%).



Fonte: *Elaborado pela autora.*

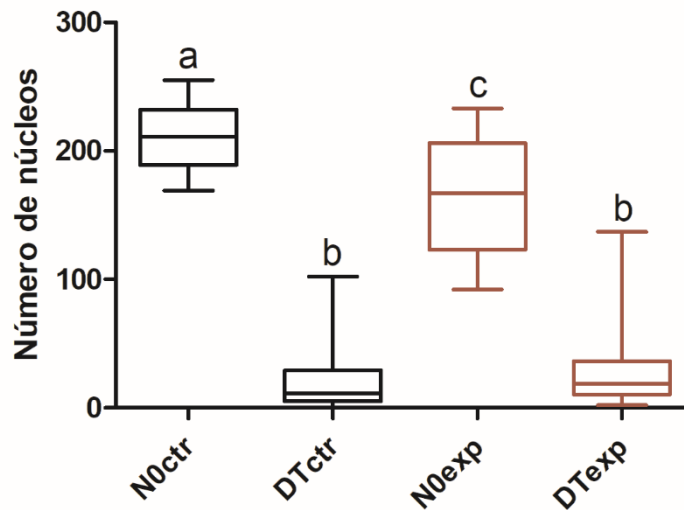
Após a análise visual, realizou-se análise de variância (*Tukey's multiple comparisons test*, One Way ANOVA para dados não paramétricos) para checar se havia diferenças estatísticas entre os grupos controle e exposto ($p > 0.0001$). Assim como realizado para o sistema hepatocítico, os números que representam cometas de nível 1 a 4 foram compilados a fim de evidenciar o dano total ocorrido, enquanto o nível 0, que corresponde ao DNA íntegro, foi mantido isolado na análise (Figura 18).

Os resultados indicaram que o nível 0 do grupo controle (N0ctr) predominou (****) em relação ao dano total deste mesmo grupo (DTctr), o que era esperado para animais não contaminados. Entretanto, o mesmo ocorre para o grupo exposto: o nível 0 do grupo exposto (N0exp) também predominou em relação ao dano total (DTexp) encontrado neste grupo, diferindo estatisticamente. Isto demonstra que a quantidade de núcleos íntegros é maior do que quantidade de núcleos danificados.

O dano total do grupo exposto é estatisticamente similar ao dano total do grupo controle, ambos com baixa quantidade de núcleos danificados. Sendo assim, o grau de genotoxicidade do Hg foi baixo neste tecido, não representando prejuízos significativos à concentração utilizada nesta pesquisa e no tempo exposto.

FIGURA 18 - Diferença estatística entre os grupos controle e exposto (Túbulos de Malpighi).

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os demais ($p > 0.0001$). Teste de Tukey. Legenda: **N0ctr** – Nível 0 do grupo controle; **DTctr** – Dano total do grupo controle; **N0exp** – Nível 0 do grupo exposto; **DTexp** – Dano total do grupo exposto.



Fonte: *Elaborado pela autora.*

Frente a esses resultados, pode-se aventar que o Hg foi neutralizado pelos tecidos do SHN antes de penetrar os túbulos de Malpighi ou estes órgãos apresentam adaptações celulares e moleculares para metabolizar o Hg, resistindo aos seus efeitos deletérios. As células pericárdicas parecem assumir função importante na retirada de material tóxico da hemolinfa que não possa ser excretada pelos TM, para neutralizá-lo, aprisionando-o dentro da célula por toda a vida da abelha ou devolvendo-o à hemolinfa como metabólitos em condições de serem excretados (MILLS; KING, 1965; FIFE *et al.*, 1987; POIANI; CRUZ-LANDIM, 2007; DAS *et al.*, 2008; CRUZ-LANDIM, 2009).

7.3.3 Morfologia dos túbulos de Malpighi

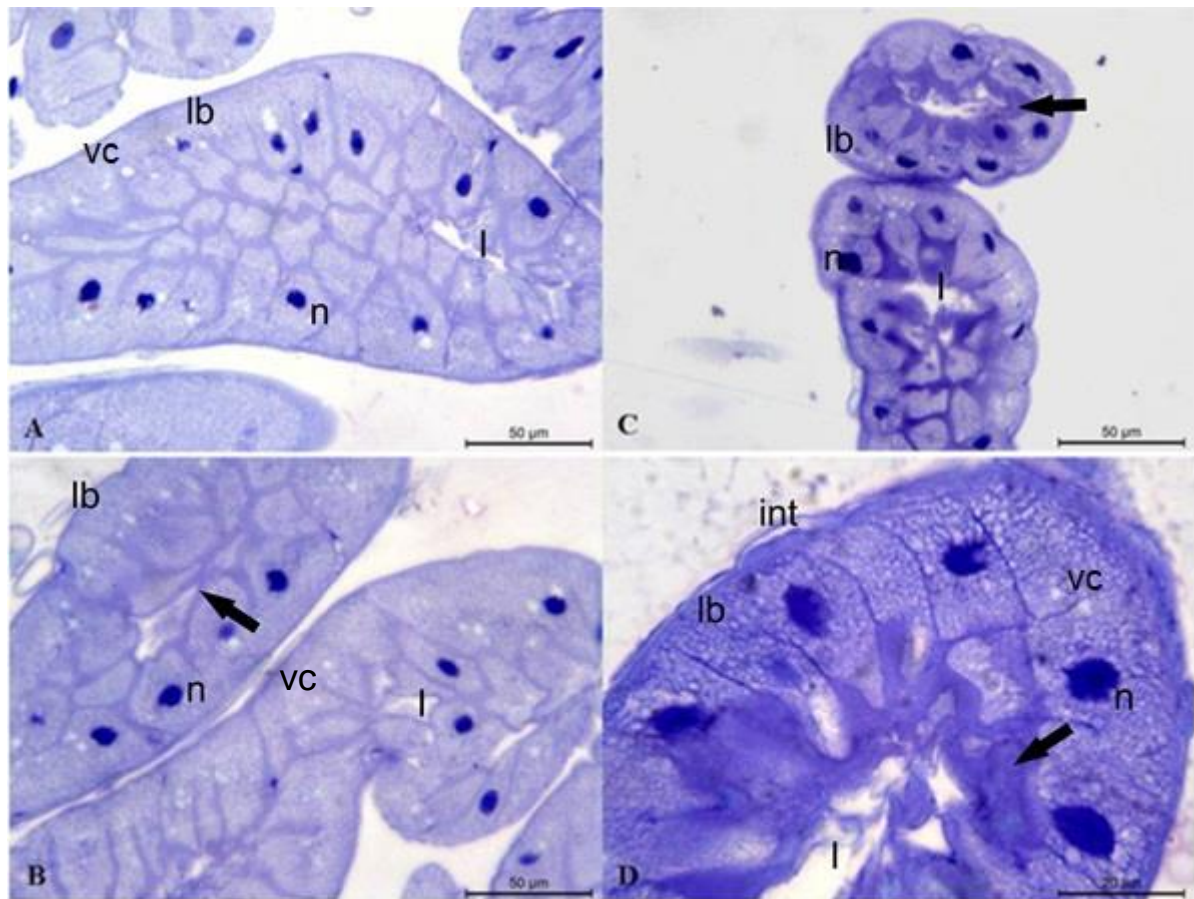
As análises morfológicas comparadas das células dos TM corroboram este achado. Diferentemente do corpo gorduroso e células pericárdicas; os núcleos das células dos TM que apresentaram fragmentação cromatínica não foram muito frequentes (Figura 19).

Nas abelhas, em geral, esses órgãos tendem a serem longos, finos e numerosos nos adultos. Em abelhas operárias adultas da espécie *B. atratus* o número total de túbulos é 80. O epitélio dos TM varia ao longo da sua extensão, sendo mais delgado na região mediana e mais alto na região proximal e distal. Entre essas últimas, as invaginações e microvilosidades das células epiteliais são mais desenvolvidas na região proximal, assim como o lúmen é mais aberto (BERRIDGE; OSCHMAN, 1969; CRUZ-LANDIM, 2009).

Observou-se a porção proximal (próxima a sua ligação com o intestino) dos TM, por ser a porção mais próxima da sua abertura com o intestino e, provavelmente, as primeiras a serem afetadas com a ingestão do Hg.

No grupo controle (Figuras 19A e 19B) o lúmen apresentou-se vazio e estreito, com epitélio formado de células colunares abauladas na porção apical. Essas células apresentam microvilosidades (bordo em escova) bem desenvolvidas (Figuras 19A e 19B). A porção basal das células dessa região parece diferenciada, com um contorno mais claro ao redor de todo o perímetro do túbulo, o que, segundo a literatura, pode representar o labirinto basal formado por longas invaginações da membrana plasmática da região basal. As análises morfológicas indicam características morfológicas normais dos TM analisados (CRUZ-LANDIM, 2009).

FIGURA 19 - Corte proximal dos túbulos de Malpighi das operárias de *B. atratus* evidenciando as alterações morfológicas entre grupo controle e exposto a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg. (A) e (B) Grupo Controle. (C) e (D) Grupo Exposto. Legenda: **int** = íntima, **lb** = labirinto basal, **l** = lúmen, **n** = núcleo, **vc** = vacuolização, **seta** = microvilosidades.



Fonte: *Elaborado pela autora.*

Em comparação com o grupo controle, algumas diferenças morfológicas dos TM das abelhas expostas ao Hg foram encontradas (Figuras 19C e 19D). As células do TM apresentaram-se vacuolizadas, o que indica aumento das invaginações do labirinto basal e consequente atividade de filtração de hemolinfa. Além disto, em comparação com o grupo controle, as células do TM das abelhas expostas apresentaram maior desenvolvimento das microvilosidades, o que indica maior atividade de excreção de substâncias ao lúmen. Conclui-se que as células dos TM das abelhas expostas estavam em processo mais intenso de atividade,

provavelmente estimuladas pela presença de Hg na hemolinfa. Porém, em ambos os grupos, não se notou dano tecidual ou celular.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, o ensaio cometa foi padronizado para abelhas da espécie *B. atratus* pelo ajuste de parâmetros específicos da técnica, sendo extremamente relevante e essencial para uma melhor visualização de cometas e, conseqüentemente, para a obtenção de resultados mais precisos e fidedignos na avaliação de genotoxicidade.

Após a padronização, foram avaliados os efeitos genotóxicos do Hg em concentração considerada segura pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), nas abelhas em questão. A partir das análises de biomarcadores, como o sistema hepatonefrocítico e os túbulos de Malpighi pela aplicação do ensaio cometa, foi possível constatar que o Hg a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ promoveu respostas celulares consideráveis nestes animais.

O sistema hepatonefrocítico exibiu resposta distinta dos túbulos de Malpighi frente à exposição ao metal-traço, mostrando-se mais sensível à contaminação pela presença abundante de diferentes níveis de cometas, os quais indicam a fragmentação do material genético. Aproximadamente metade dos núcleos analisados estavam comprometidos e distribuídos em cometas de níveis 1 a 4, enquanto a outra metade manteve-se em nível 0, isto é, com o DNA íntegro. Essa proporção é extremamente significativa, uma vez que, pode indicar o comprometimento das funções celulares e distúrbios metabólicos em geral. Os túbulos de Malpighi, por sua vez, foram menos responsivos ao Hg, apresentando menor quantidade de núcleos danificados (cometas de nível 1 a 4) pois, provavelmente, os efeitos desse metal-traço foram minimizados pelo sistema hepatonefrocítico anteriormente.

Com base nesses resultados, infere-se que, apesar da concentração de Hg considerada segura pelo CONAMA não promover a morte imediata das abelhas, pode causar alterações ou inativar os sistemas metabólicos das abelhas estudadas, podendo ser um fator que contribui para o desaparecimento das populações do gênero *Bombus*. O declínio populacional dessas abelhas poderá desencadear uma cascata de eventos correlacionados, pois pode comprometer a qualidade ambiental pela ausência do seu serviço de polinização e também a produtividade agrícola, com a produção de frutos de baixa qualidade.

9 REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C., COSTA, M. J., SAMPAIO, G., CAMARGO, D. A., PEDROSA, M., NOGUEIRA, F. L. A. Efeito do Cádmio e do Glifosato na Musculatura de Mamangavas. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente (Online)**. 3: 66-72, 2016.

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

ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: a novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 7, 21 jul. 2015

ABDELFATTAH, E. A.; AUGUSTYNIAK, M.; YOUSEF, H. A. Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet assay. **Chemosphere**, [s.l.], v. 182, p.762-770, set. 2017

A.B.E.L.H.A. Associação Brasileira de Estudos das Abelhas. EUA incluem abelha em lista de espécies ameaçadas. 15 jan 2017. Disponível em: <https://abelha.org.br/eua-incluem-abelha-em-lista-de-especies-ameacadas/>

AGUILAR-BENAVIDES, M. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bombus morio* (swederus) e *Bombus atratus* Franklin (hymenoptera, apidae). Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em entomologia – Universidade Federal de Viçosa. p. 12-13, 2008

AL-SHAMI, S.; RAWI, C. S.; AHMAD, A. H.; NOR, S. A. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. **Toxicology And Industrial Health**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.734-739, 24 out. 2011

ANGELETTI, D.; SEBBIO, C.; CARERE, C.; CIMMARUTA, R.; NASCETTI, G.; PEPE, G., et al. Terrestrial gastropods (*Helix* spp) as sentinels of primary DNA damage for biomonitoring purposes: a validation study. **Environ. Mol. Mutagen**. 54, 204–212, 2013

AQUILINO, M.; SÁNCHEZ-ARGÜELLO, P.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 232, p.563-570, jan. 2018

AREFIEVA, A. S.; KAMAEVA, A. G.; KRASILSHCHIKOVA, M. S. Low doses of mercuric chloride cause the main features of antinuclear autoimmune process in female outbred CFW mice. **Toxicology and Industrial Health**, Moscow, v. 32, n. 9, p. 1-12, Mar. 2015.

ATDSR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for cobalt. Atlanta. 2005.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects— Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, Elsevier BV. [s.l.], v. 767, p.67-76, jan. 2016

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. 1. Ed. São Carlos: **RiMa**, 292p. 2003

BARTELL, S. M. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk assessment – A brief review and evaluation. **Environmental Bioindicators**, v.1, p. 60-73, 2006

BATELKOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I.; CELECHOVSKÁ, O.; VORLOVÁ, L.

BARTÁKOVÁ, K. Polycyclic hydrocarbons and risk elements in honey from the South Moravian region (Czech Republic). **Acta Vet. BRNO**, v. 81, p. 169-174, 2012

BAWA, K. S. et al. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees.II. Pollination systems. **American Journal Of Botany**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.346-356, mar. 1985. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1537-2197.1985.tb05358.x>.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat Res.-Geneti Toxicol. Environ. Mutag**. v. 415, p.167-184. 1998

BERNABÒ, P.; GAGLIO, M.; BELLAMOLI, F.; VIERO, G.; LENCIONI, V. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 173, p.235-244, abr. 2017

BERNHOF, R. A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. **Journal of Environmental and Public Health**. p. 1-10, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/460508>

BERRIDGE, M.J.; OSCHMANN, J.L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue; Cell**, v.1 (2), p. 247-272, 1969.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat Res.** v.307(1), n. 1. p.323-333. May, 1994

BIESMEIJER, J. C., ROBERTS, S. P. M., REEMER, M., OHLEMULLER, R., EDWARDS, M., PEETERS, T., SCHAFFERS, A. P., POTTS, S. G., KLEUKERS, R., THOMAS, C. D., SETTELE, J., KUNIN, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science.** 313: 351–354, 2006.
<https://doi.org/10.1126/science.1127863>.

BILBAO, C.; FERREIRO, J. A.; COMENDADOR, M. A.; SIERRA, L. M. Influence of mus201 and mus308 mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. **Mutat Res.** Elsevier BV. [s.l.], v. 503, n. 1-2, p.11-19, jun. 2002

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quím. Nova.** São Paulo, v. 27, n. 4, p. 593-600, Aug. 2004.

BOGDANOV, S. Contaminants of bees products. **Apidologie.** Switzerland, v. 37, n. 1, p. 1-18, feb. 2007

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

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

BRATU, L., GEORGESCU, C. Chemical contamination of bee honey – identifying sensor of the environment pollution. **Central European Agriculture.** 6: 467-470, 2005

BREITHOLTZ M, RUDÉN C, HANSSON SO, BENGSSON BE. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 63(2): 324–335, 2006.

BRIDGES, K.N.; SOULEN, B.K.; OVERTURF, C.L.; DREVNICK, P.E.; ROBERTS, A.P. Embryotoxicity of maternally transferred methylmercury to fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. n. 35, p. 1436–1441, 2016.

BUCHMANN, S. L.; G.P. NABHAN. The forgotten pollinators. Washington, D.C., **Island Press**, 292p, 1996.

BUDGE, G. E. et al. Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12574, dez. 2015

BULDINI, P.L.; CAVALLI, S.; MEVOLI, A. & SHARMA, J. L. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. **Food Chem.**, 73: 487-495, 2001

BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v.1, p. 22-39, 2006

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 627, n. 1, p.31-35, fev. 2007.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>.

BUTLER, G. C. **Principles of ecotoxicology**, SCOPE 12, John Wiley and Sons, New York, 1978

CAMERON, S. A.; HINES, H. M.; WILLIAMS, P. H. A Comprehensive Phylogeny of the Bumble Bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 91, n. 1. p. 161-188, Apr. 2007.

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

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

CARSWELL, C. Bumblebees being crushed by climate change. **Science, American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. [s.l.], p.1-2, 9 jul. 2015.

CASTILHOS, Z. et al. Human exposure and risk assessment associated with mercury contamination in artisanal gold mining areas in the Brazilian Amazon. **Environmental Science And Pollution Research**, Springer Science and Business Media LLC. [s.l.], v. 22, n. 15, p.11255-11264, 24 mar. 2015.

CCOHS. Canadian Center for Occupation Health and Safely. 2000. Disponível em: <<https://www.ccohs.ca>> Acesso em: 15 de agosto de 2019.

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

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. Fourth Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**. Elsevier BV [s.l.], v. 1840, n. 2, p.794-800, fev. 2014.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biothecnology**. v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. R., DUSINSKA, A., FRANKLIN, M., SOMOROVSKA, M., PETROVSKA, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANAYOITIDIS, M., RASLOVA, K., VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation and applications. **Environ Mol Mutagen** 30: 139-146, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:2<139::AID-EM6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:2<139::AID-EM6>3.0.CO;2-I).

COLLINS, A. R. The comet assay, principles, applications and limitations. In: Didenko VV (ed) In situ Detection of DNA damage. Methods and protocols. **Humana Press Inc.**, Totowa, 203: 163-177, 2002. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163>.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 34:246 –255, 1999.

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

COSTA JUNIOR, J. M. F.; SILVA, C. I. M. da.; LIMA, A. A. da S.; RODRIGUES JÚNIOR, D.; SILVEIRA, L. C. de L.; SOUZA, G. da S.; PINHEIRO, M. da C. N. Teores de mercúrio em cabelo e consumo de pescado de comunidades ribeirinhas na Amazônia brasileira, região do Tapajós. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23(3), P. 805–812, 2017. doi:10.1590/1413-81232018233.09492016

COSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, London, v. 387, p. 253-260, 1997.

CROSSLEY, A. C. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 4, n. 3, p. 529-560, 1972.

CROWE, W.; ALLSOPP, P.J.; WATSON, G.E.; MAGEE, P.J.; STRAIN, J.J.; ARMSTRONG, D.J.; McSORLEY, E.M. Mercury as an environmental stimulus in the development of autoimmunity—a systematic review. **Autoimmunity Reviews** v. 16, p. 72–80, 2017.

CRUZ, A.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology** 26:165–176, 2010

CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas*. 1a ed. São Paulo: Fundação, Editora da UNESP, p.416, 2009

CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Micros**. Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.

D'ITRI, F. M. Mercury contamination - what we learned since Minamata. **Environmental Monitoring and Assessment**, East Lansing, v. 19, 3, p. 165-182. Oct. 1991.

DAS, D. et al. Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 331, n. 2, p. 565-570, 2008.

DATKHILE, K. D.; GAIKWAD, P. S.; GHASKADBI, S. S.; MUKHOPADHYAYA, R.; NATH, B. B. *Chironomus ramosus* larvae exhibit DNA damage control in response to gamma radiation. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 91, n. 9, p.742-748, 15 jun. 2015

DE JONG, D. Desaparecimento de abelhas; pesticidas agrícolas afetam insetos, safras e saúde humana. **Scientific American** v. 84, p.48-49, 2009

DEPARTAMENTO DE PESCA E VIDA SELVAGEM (U.S. Fish & Wildlife Service). In a race against extinction, rusty patched bumble bee is listed as endangered. 2017. Disponível em: <<https://www.fws.gov/midwest/news/861.html>>

DEVILLERS, J. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology, 2003

DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M. Honey Bees: Estimating the environmental impact of chemicals. 1 st. New York: Taylor & Francis e-Library, 7p., 2003

DUBOVSKIY, L. M.; GRIZANOVA, E. V.; ERSHOVA, N. S.; RANTALA, M. J.; GLIPOV, V. V. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth. **Chemosphere**, Siberian, v. 85, n. 1, p. 92-96, Sep. 2011.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal Physical Sciences**, Owerri, v. 2, n. 5, p. 112-118, May. 2007.

EICHELBERG, D., WESSING, A. Morphology of the Malpighian tubules of insects. **Fortschr. Zool.**, v.23, p 124-47. 1975.

ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**. Oxford University Press (OUP), [s.l.], v. 33, n. 1, p.25-30, jan. 2018

EVANS, E.; THORP, R.; JEPSEN, S. & BLACK, S. H. Status Review of Three Formerly Common Species of Bumble Bee in the Subgenus *Bombus*: *Bombus affinis* (the rusty patched bumble bee), *B. terricola* (the yellowbanded bumble bee), and *B. occidentalis* (the western bumble bee). Portland, Oregon (U.S.A.): **The Xerces Society**, 2008

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L. and O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.** 339: 37-59, 1995

FAN, Y.; ZUREK, L.; DYKSTRA, M. J.; SCHAL, C. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German cockroach *Blattella germanica*. **Naturwissenschaften**, North Carolina, v. 90, n. 3, p. 121- 126, Mar. 2003.

FARIA, M. P. Mariana e Brumadinho: a repercussão dos desastres do setor de mineração na saúde ambiental. **17º Congresso da Associação Nacional de Medicina do Trabalho**, [s.l.], p.16-17, 2019. <http://dx.doi.org/10.5327/z16794435201917s1006>.

FERNANDEZ, M. C.; SUBRA, E. & ORTIZ, A. Honey, environmental indicator. Environmental practices for quality agriculture. **Proceeding of the Congress of the Spanish Society of Organic Agriculture**, (SSOA'94) Toledo, Spain, pp: 37-44, 1994

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

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

FREITAS, B. M.; BOMFIM, I. G. A. A necessidade de uma convivência harmônica da agricultura com os polinizadores. In: Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), Brasília, 124p., 2017

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; PEIXOTO, A. M.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA, -EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, Fortaleza, v. 40, n. 3. p. 332-346, Jan. 2009

- FREITAS, B. M.; PAXTON, R. J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal Of Applied Ecology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.109-121, fev. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2664.1998.00278.x>.
- FREITAS, P. V. D. X.; RIBEIRO, F. M.; ALMEIDA, E. M.; ZANATA, R. A.; ALVES, J. J. L.; OLIVEIRA, V. F.; FAQUINELLO, P. Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **PUBVET**, v. 11, p. 1-102, 2017.
- GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Genotoxic potential of bee venom (*Apis Mellifera*) on human peripheral blood lymphocytes in vitro using single cell gel electrophoresis assay. **Journal Of Environmental Science And Health**, Part A, [s.l.], v. 43, n. 11, p.1279-1287, 18 jul. 2008
- GARÓFALO, C.A. Evolução do comportamento social visualizada através da ecologia de *Bombus morio* (Hymenoptera, Bombinae). Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, Brasil, 1976.
- GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Arch Toxicol**, 90:2315–2336, 2016.
- GOODMAN, L.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 12th. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, v. 2, 1995
- GRAEME, A. K.; POLLACK, C. V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **The Journal of Emergency Medicine**, Phoenix, v. 16, n. 1, p. 45-56, Feb. 1998.
- GREEN, L. F. B. Regional specialization in the Malpighian tubules of the new zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). The structure and function of type I and II cells. **Tissue & Cell**, v. 11, n. 4, p. 673-702, 1979.
- GRIXTI, J. C.; WONG L. T.; CAMERON S. A. & FAVRET C. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. **Biological Conservation** 142, 75-84, 2009
- GUILHERME, L.R. Poluição do solo e qualidade ambiental. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO**, 26º, Brasília: SBCS, 1999. CD-ROM. 1999.
- GUILLOUSO, A. Liver cell models in vitro toxicology. *Environmental Health Perspectives*, North Carolina, 106, 511-532, 1998.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, JCDR Research and Publications [s.l.], p.1-5, 2015

GUPTA, A. P. Studies of the blood of Meloidae (Coleoptera):I. The haemocytes of *Epicauta cinerea* (Forster), and a synonymy of haemocyte terminologies. **Cytologia**, Tokyo, v. 34, n. 2, p. 300-344, 1969.

GUTIERREZ, E. WIGGINS, D.; FIELDING, B.; GOULD, A. P. Specialized hepatocyte like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. **Nature**, Mill Hill, v. 445, n. 7125, p. 275-280. Jan. 2007.

HASAN, M. D.; TODORIKI, S.; MIYANOSHITA, A.; IMAMURA, T. Detection of gamma radiation-induced DNA damage in maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) assessed using the comet assay. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 84, n. 10, p.815-820, jan. 2008

HASAN, M. D.; TODORIKI, S.; MIYANOSHITA, A.; IMAMURA, T. Age- and time interval-specific gamma radiation-induced DNA damage in adult maize weevils, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, assessed using comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 741, n. 1-2, p.95-100, jan. 2012

HATJE, V. et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**. 2017;7:10706.

HAYAT, K.; AFZAL, M.; AQUEEL, M. A.; ALI, S.; SAEED, M. F.; KHAN, Q. M.; ASHFAG, M.; DAMALAS, C. A. Insecticide exposure affects DNA and antioxidant enzymes activity in honey bee species *Apis florea* and *A. dorsata*: Evidence from Punjab, Pakistan. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 635, p.1292-1301, set. 2018

HAZELTON SR, FELGENHAUER BE, SPRING JH. 2001. Ultrastructural changes in the Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*, at the onset of diuresis: a time study. **J. Morphol**. 247: 80–92.

HOCHAPFEL, F., DENK, L., MAABEN, C., ZAYTSEVA, Y., RACHEL, R., WITZGALL, R.; KRAHN, M. P. Electron microscopy of *Drosophila* garland cell nephrocytes: Optimal

preparation, immunostaining and STEM tomography. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2018. doi:10.1002/jcb.26702

HOPKINS, B.C.; WILSON, J.D.; HOPKINS, W.A. Mercury exposure is associated with negative effects on turtle reproduction. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 2416–2422, 2013.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A.. Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of *Apis mellifera* venom. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 762, p.43-48, mar. 2014

HOSHINA, M. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**, [s.l.], v. 72, p.64-70, set. 2013

HUNG, K-L. I.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proc. R. Soc. B**, 2018

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.366-374, mar. 2003

IAVICOLI, I.; FONTANA, L.; BERGAMASCHI, A. The Effects of Metals as Endocrine Disruptors. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.206-223, 29 maio 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/10937400902902062>.

IGAM. Instituto Mineiro de Gestão de Águas. Resumo da qualidade das águas nos locais monitorados ao longo do Rio Paraopeba, após o desastre na barragem 1 no complexo da Mina Córrego Feijão da Mineradora Vale/SA, município de Brumadinho - Minas Gerais, Brazil. 2019.

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

INÁCIO, A. Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* - Acará, 2006. 54 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública – **FIOCRUZ**, 2006.

IOVDIJOVÁ, A.; BENCKO, V. Potential risk of exposure to selected xenobiotic residues and their fate in the food chain – Part I: Classification of Xenobiotics. **Ann Agric Environ Med** 17, 183–192, 2010.

JARLAN, A.; OLIVEIRA, D.; GINGRAS, J. Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouse by the syrphid fly *Eristalis tenax* L. **Acta Horticulturae** (ISHS), British Columbia, v. 437, n. 441, p. 335-340, 1997

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. Oxford University Press (OUP). [s.l.], v. 23, n. 3, p.207-221, 17 fev. 2008

JONES, J. C. Current concepts concerning insect hemocytes. **American Zoologist**, Utica, v. 2, n. 2, p. 209-246, 1962.

JONES, J. C. Pathways and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes. In: GUPTA, A. P. (Ed.). *Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques*. 1. ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 279-300, 1979.

JUNIOR, N. G.; CARVALHO, M. B. A utilização de protozoários como organismos bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos e suas respostas à exposição a fármacos e outros compostos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 13, n. 4, 2017

KALITA, M. K.; HALOI, K.; DEVI, D. Cypermethrin Formulation (Ustad-10 EC) Induces Genotoxicity via Apoptosis, Affects Nutritional Physiology, and Modulates Immune Response in Silkworm *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.1010-1024, 25 mar. 2017

KARPETA-KACZMAREK, J.; KUBOK, M.; DZIEWIECKA, M.; SAWCZYN, T.; AUGUSTYNIAK, M. The level of DNA damage in adult grasshoppers *Chorthippus biguttulus* (Orthoptera, Acrididae) following dimethoate exposure is dependent on the insects' habitat. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 215, p.266-272, ago. 2016

KEARNS; C. A.; INOUYE, D. W. Pollinators, flowering plants and conservation biology. **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 5, p. 297-307, 1997.

KIM, J.; CHUNG, S. O.; JANG, M.; JANG, S. A.; PARK, C. G. Developmental inhibition and DNA damage of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) by gamma

radiation. **International Journal Of Radiation Biology**, [s.l.], v. 91, n. 10, p.827-832, 23 jul. 2015

KLAPER, R.; REES, C.B.; DREVNICK, P.; WEBER, D.; SANDHEINRICH, M.; CARVAN, M.J. Gene expression changes related to endocrine function and decline in reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*) after dietary methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1337–1343, 2006.

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

KONCA, K., LANKOFF, A., et al. A cross-plataform public domain PC image analysis program for the comet assay, *Mutat. Res.* 534,15-20, 2003

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

KUTERBACH, D. A.; WALCOTT, B.; REEDER, R. J.; FRANKEL, R. B. Iron containing cells in the honey bee (*Apis mellifera*). **Science**, Stony Brook, v. 218, n. 4572, p. 695-697, Nov. 1982.

LACERDA, L. D; PFEIFFER, W. C. Mercury from gold mining in the Amazon environment – An overview. **Quim. Nova.** 15 (2), 155-160, 1992

LACERDA, L. D; SANTOS, A. F.; MARINS, R. V. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. **Quim. Nova.** [s.l.], v. 30, n. 2, p.366-369, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200024>.

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

LANDLER, L.; PAINTER, M.S.; COE, B.H.; YOUMANS, P.W.; HOPKINS, W.A.; PHILLIPS, J.B. High levels of maternally transferred mercury disrupt magnetic responses of

snapping turtle hatchlings (*Chelydra serpentina*). **Environmental Pollution**, v. 11, p. 19–25, 2017

LAPUENTE, J.; LOURENÇO, J.; MENDO, S. A.; BORRÁS, M.; MARTINS, M. G.; COSTA, P. M.; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers In Genetics**, Frontiers Media SA. [s.l.], v. 6, p.1-20, 4 jun. 2015

LAUTENBACH, S.; SEPPELT, R.; LIEBSCHER, J.; DORMANN, C. F. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. **Plos One**, Leipzig, v. 7, n. 3, Apr. 2012.

LAVINE, M. D.; STRAN, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LEE, R. F. & STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res.** v. 544, n.1, p.43-64. Sep, 2003

LEE, S. W.; PARK, K.; HONG, J.; CHOI, J. Ecotoxicological evaluation of octachlorostyrene in fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1118-1120, 2008

LEWIS, C.A.; CRISTOL, D.A.; SWADDLE, J.P.; VARIAN-RAMOS, C.W; ZWOLLO, P. Decreased immune response in zebra finches exposed to sublethal doses of mercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 327–336, 2013.

LIMA, C. M. ; ROCHA, A. Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil. 1st. Ed. Brasília: **IBAMA**, 86p., 2012

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, Ciudad Del Mexico, v. 674, n. 2, p. 137-147, Mar. 2009.

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

MAIA, M.; BRITO, J.; MARTINS, I. M.; SILVESTRE, J. Toxicidade de agregados reciclados de betão: Ensaio de lixiviação. **ITeCons**, fev, 2018

- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological organs of bees. **Braz. J. morphol. Sci.** 23 (3-4), p. 303-309, 2006
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, **Editora Agronômica Ceres**, p. 638, 2006
- MARTÍNEZ-PAZ, P.; MORALES, M.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 758, n. 1-2, p.41-47, dez. 2013
- MARTINS, A. C.; MELO, G. A. R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **J Insect Conserv.** 14:207–210, 2010
- MARTINS, C. A. S.; NOGUEIRA, N. O.; RIBEIRO, P. H.; RIGO, M. M.; CANDIDO, A. O. A dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3/4, p. 383-391, 2011.
- MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory Organs. In: KING, R.C., AKAI, H. Insect Ultrastructure. New York: **Plenum Press**, p. 199-268, 1985.
- MBIRI, A.; ONDITI, A.; OYARO, N.; MURAGO, E. Determination of essential and heavy metals in Kenyan honey by atomic absorption and emission spectroscopy. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, Nairobi, 13(1): 107-115, 2011.
- MCGREGOR, S. E. Insect pollination of cultivated crop plants. 1st. Ed. Washington: **USDA**, 411 p., 1976
- MERGLER, D.; ANDERSON, H.A.; CHAN, L.H.; MAHAFFEY, K.R., MURRAY, M.; SAKAMOTO, M. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. **Ambio** v. 36, 2007.
- MEYER, E.; EAGLES-SMITH, C.A.; SPARLING, D.; BLUMENSHINE, S. Mercury exposure associated with altered plasma thyroid hormones in the declining western pond turtle (*Emys marmorata*) from California mountain streams. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 2989–2996, 2014.

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

MILLS, R. P.; KING, R. C. The pericardial cells of *Drosophila melanogaster*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, New Havenv. 106, n. 3, p. 261-268. Sep. 1965.

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

MISHRA, N.; SRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, U. R.; TEWARI, R. R. An insight into the genotoxicity assessment studies in dipterans. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, [s.l.], v. 773, p.220-229, jul. 2017

MØLLER, P. The alkaline comet assay: Towards validation in Biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 98, n.4, p.336-345, apr, 2005

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

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M.. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.199-216, 28 jul. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>.

NATIVIDADE, D. P.; RODRIGUES, D. C. G. A.; VIEIRA, V. S. XENOBIÓTICOS: frequência da inserção na dieta alimentar dos adoçantes artificiais com destaque para o Aspartame, Ciclamato de Sódio e Sacarina Sódica - possíveis efeitos adversos. **Revista Práxis**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.71-76, 28 mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.25119/praxis-3-5-982>.

NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; DE MIGUEL, M.; DE LA TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutat Res.**, Canto Blanco, Spain, v. 389, n. 2-3, p.271-277, mar. 1997

NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B. Bees, pollination systems and plant diversity. 143-168 in LaSalle J, Gauld ID, eds. Hymenoptera and biodiversity. Oxon (UK): C.A.B. International, 1993

NOCELLI, R.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; ROAT, T.; SILVA-ZACARIN, E., MALASPINA, O. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Insect Physiol.**: 12–23, 2016.

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

OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Bumblebee, **Acute Contact Toxicity Test**, n.246, 2017.

OLIVEIRA, M. O. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 01-06, 2015.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 123:291–8, 1984

PABLO, C.; RONDÓN, C.; SAAVEDRA, A.R.; VIT, P. A Study of Hg and Pb content in pot-honey (Apidae: Meliponini). pp. 1-5. In Vit P & Roubik DW, eds. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes; Mérida, Venezuela, 2012.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mutagen**. 26, 345–356, 1995

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, p. 63-77, 2003.

PERNA, A., SIMONETTI, A., INTAGLIETTA, I., SOFO, A., GAMBACORTA, E. Metal content of the southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. **International Journal of Food Science & Technology**, Basilicata. 47(9): 1909-1917, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03050.x>.

PERUGINI, M.; MANERA, M.; GROTTA, L.; ABETE, M. C.; TARASCO, R.; AMORENA, M. Heavy Metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) Contamination in Urban Areas and Wildlife Reserves: Honeybees as Bioindicators. **Biological Trace Element Research**, Teramo, v. 140, n. 2, p. 170-176, 2011.

PLISCHUK, S.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; PRIETO, L.; LUCÍA, M.; BOTÍAS, C.; MEANA, A.; ABRAHAMOVICH, A. H.; LANGE, C. & HIGES, M. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), na emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports** 1(2), 131–135, 2009

POIANI, S. B.; CRUZ-LANDIM C. Histology and ultrastructure of pericardial cells of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae) in workers and queens of different ages. *Micron: the international research and review journal for microscopy*, Oxford, v. 38, n. 7, p. 766-770, 2007.

RALPH, S.; PETRAS, M.; PANDRANGI, R. and VRZOC, M. Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. **Environ.Mol.Mutagen.** 28, 112–120, 1996

RAMOS, K. S.; KAWADA, R.; BRANDÃO, C. R. Type specimens of bees (Hymenoptera, Apidae) deposited in the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 55(24), 2015

ROJAS, E.; LORENZO, Y.; HAUG, K.; NICOLAISSEN, B.; VALVERDE, M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. **Front Genet.** v. 386, n. 5, nov. 2014

RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Science**, Technicka, v. 14, n. 3, p. 6044-6066. Mar. 2013.

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

SALOMONS, W. Environmental impact of metals derived from mining activities: Processes, predictions, prevention. **Journal of Geochemical Exploration**, 1995.

SANNA, G.; PILO, M.; PIU, P.; TAPPARO, A. & SEEBER, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. **Analytica Chimica Acta** 415: 165-173, 2000

SANTANA, G.P. Elemento-traço ou metal pesado. Disponível em: http://www.cq.ufam.edu.br/Artigos/Elemento_metal_pesado/Elemento_metal_pesado.html. Acesso em: 04 jun. 2010.

SANTOS, A. M.; SERRANO, J. C; COUTO, R.M.; ROCHA, L. S. G.; MELLO-PATIU, C.A. & GARÓFALO, C.A. Conopid flies (Diptera: Conopidae) parasitizing *Centris* (*Heterocentris*) *analis* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Neotropical Entomology** 37(5): 606-608, 2008

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

SCHÖNFELDER M. L.; BOGNER, F. X. Individual perception of bees: Between perceived danger and willingness to protect. **Plos One, Public Library of Science (PLoS)**. [s.l.], v. 12, n. 6, p.1-2, 29 jun. 2017

SHETTY, V.; SHETTY, N. J.; ANANTHANARAYANA, S. R.; JHA, S. K.; CHAUBEY, R. C. Evaluation of gamma radiation-induced DNA damage in *Aedes aegypti* using the comet assay. **Toxicology And Industrial Health**, [s.l.], v. 33, n. 12, p.930-937, 9 out. 2017

SILVA-MATOS, E. V. Análise comparativa do desenvolvimento de colônias órfãs e com rainhas de *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP, Rio Claro, Brasil, 1993.

SILVA-MATOS, E. V. Estudos sobre a variabilidade de tamanho entre operárias de *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1986.

SILVA-MATOS, E. V.; GARÓFALO, C. A. Worker life tables, survivorship, and longevity in colonies of *Bombus* (*Fervidobombus*) *atratus* (Hymenoptera: Apidae) **Rev. Bio. Trop.**, 48(2/3): 657-664, 2000

SINGH, N. P. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, Elsevier BV. [s.l.], v. 767, p.23-30, jan. 2016

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175:184–191, 1988

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

SOUZA, W. B.; SANTANA, G. P. O caso do mercúrio: Toxicidade dos organomercuriais. **Scientia Amazonia**, v. 2, n.2, 20-28, 2013.

STAURENGO-CUNHA, M. A.; CUNHA, R. A.; CRUZ-LANDIM, C. Hemócitos presentes na hemolinfa de *Polystes versicolor* (Hym., Vespidae). **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 19, n. 1, p. 39-42, 1976.

STEELE, J. E. Control of metabolic processes. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. 1st. ed. Michigan: Pergamon Press, 1985. cap. 8. p. 99-145.

SZETO, Y.T; BENZIE, I. F.; COLLINS, A. R.; CHOJ, S. W.; CHENG, C. Y.; YOW, C. M. TSE, M. M. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutat Res.** v. 578(1-2), n. 15, p.371-381, Hong Kong, oct. 2005

TCHOUNWOU, P.B.; AYENSU, W.K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 149–175, 2003.

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

THOMAS, R. E.; LINDEBERG, M.; HARRIS, P. M. and RICE, S. D. Induction of DNA strandbreaks in the mussel (*Mytilusrossulus*) and clam (*Protothacastaminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the ExxonValdezspill. **Mar.Pollut.Bull.** 54, 726–732, 2007

THOMPSON, H. M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, Sand Hutton, v. 32, n. 4, p. 305-321, 2001

TINÔCO, A. A. P., et al. Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto, MG. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.305-314, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522010000400003>.

TOPORČÁK, J.; LEGÁTH, J.; KULKOVÁ, J. Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination. **Vet Med-Czech**, Kosice, v. 37, n. 7, p. 405-412, Jul. 1992.

TOTH, T.; KOPERNICKA, M.; RASTISLAV, S.; KOPERNICKA, T. The Evaluation of Mercury in Honey Bees and their Products from Eastern Slovakia. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, 49 (1), 2016.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. Estudo dos Insetos: tradução da 7ª edição de Borror and DeLong's introduction to the study of insects. 13. ed. São Paulo: Cengage Learning, 809 p, 2013.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 1, p. 151-173, 1977

van der VALK, H. et al. Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents. **Julius-Kühn-Archiv**, Berlin, v. 437, p. 142-158, 2012.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p.217-225, ago. 1996.

VANOOIK, T.; PAUSIO, S.; RANTALA, M. J. Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrata autumnata*. **Chemosphere**, Turku, v. 71, n. 10, p. 1840-1844, 2008

VERSCHAEVE, L. and GILLES, J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 54, 112–119, 1995

VIEIRA, J. C. S. Investigação de Metalotioneínas em peixes da Região de Jirau – Bacia do Rio Madeira – Rondonia. Tese (Doutorado Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e

Aplicada), Área de concentração Biomoléculas – Estrutura e Função. Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. 2017.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v. 18, p.653-694, 1984

WIGGLESWORTH, V. B. The principles of insect physiology. 6 th, Ed. Methuen and Co Ltd., London, 1965.

WILLIAMS, P. H. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of The Natural History Museum (Entomology)**, London, v. 67, n. 1, p. 79-152, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mercury: environmental aspects / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. **Environmental Health Criteria**, Geneva: World Health Organization, 115p, 1989.

WU, X.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZONG, M.; HUANG, Q.; TAO, L. Detection on emamectin benzoate-induced apoptosis and DNA damage in *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cell line. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 126, p.6-12, jan. 2016

WWF. World Wide Fund for Nature Brazil. Biodiversidade Amazônica sob ameaça pela contaminação de mercúrio. Brazil, 2017.

ZAHIR, F.; RIZWI, S. J.; SOGHRA, K. H.; RIZWAN, H. K. Lowdosemercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Aligarh, v. 20, n. 2, p. 351-360, Sep. 2005.

ZHANG, Q.F.; LI, Y.W.; LIU, Z.H.; Chen, Q.L. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 181, p. 76–85, 2016.

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

ZOCHE, J. J., LEFFA, D. D., DAMIANINI, P. A., CARVALHO, F., MENDONÇA, A. R., SANTOS, C. E. I., ANDRADE, V. M. Heavy metals and DNA damage in blood cells of

insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. **Environmental Research**, 110(7), 684–691, 2010

ANEXO

Teste de Tukey: Sistema hepatonefrocítico

Number of families	1							
<i>Number of comparisons per family</i>	6							
<i>Alpha</i>	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
<i>N0ctr vs. DTctr</i>	171,5	102.5 to 240.4	Yes	****	<0.0001	B-G		
<i>N0ctr vs. N0exp</i>	96,18	27.27 to 165.1	Yes	**	0,0031	B-H		
<i>N0ctr vs. DTexp</i>	75,27	6.366 to 144.2	Yes	*	0,0276	B-M		
<i>DTctr vs. N0exp</i>	-75,27	-144.2 to -6.366	Yes	*	0,0276	G-H		
<i>DTctr vs. DTexp</i>	-96,18	-165.1 to -27.27	Yes	**	0,0031	G-M		
<i>N0exp vs. DTexp</i>	-20,91	-89.82 to 48.00	No	Ns	0,8478	H-M		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
<i>N0ctr vs. DTctr</i>	235,7	64,27	171,5	25,71	11	11	9,432	40
<i>N0ctr vs. N0exp</i>	235,7	139,5	96,18	25,71	11	11	5,291	40
<i>N0ctr vs. DTexp</i>	235,7	160,5	75,27	25,71	11	11	4,141	40
<i>DTctr vs. N0exp</i>	64,27	139,5	-75,27	25,71	11	11	4,141	40
<i>DTctr vs. DTexp</i>	64,27	160,5	-96,18	25,71	11	11	5,291	40
<i>N0exp vs. DTexp</i>	139,5	160,5	-20,91	25,71	11	11	1,15	40

ANEXO

Teste de Tukey: Sistema Hepatonefrocítico

<i>Table Analyzed</i>	<i>Data 1</i>				
<i>Data sets analyzed</i>	B-M				
<i>ANOVA summary</i>					
<i>F</i>	15,05				
<i>P value</i>	<0.0001				
<i>P value summary</i>	****				
<i>Significant diff. among means (P < 0.05)?</i>	Yes				
<i>R square</i>	0,5302				
<i>Brown-Forsythe test</i>					
<i>F (DFn, DFd)</i>	1.231 (3, 40)				
<i>P value</i>	0,311				
<i>P value summary</i>	Ns				
<i>Are SDs significantly different (P < 0.05)?</i>	No				
<i>Bartlett's test</i>					
<i>Bartlett's statistic (corrected)</i>	3,038				
<i>P value</i>	0,3859				
<i>P value summary</i>	Ns				
<i>Are SDs significantly different (P < 0.05)?</i>	No				
<i>ANOVA table</i>	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
<i>Treatment (between columns)</i>	164086	3	54695	F (3, 40) = 15.05	P<0.0001
<i>Residual (within columns)</i>	145394	40	3635		
<i>Total</i>	309480	43			
<i>Data summary</i>					
<i>Number of treatments (columns)</i>	4				
<i>Number of values (total)</i>	44				

ANEXO

Teste de Tukey: Túbulos de Malpighi

Table Analyzed	Data 1				
<i>One-way analysis of variance</i>					
<i>P value</i>	< 0,0001				
<i>P value summary</i>	***				
<i>Are means signif. different? (P < 0.05)</i>	Yes				
<i>Number of groups</i>	4				
<i>F</i>	143,9				
<i>R square</i>	0,8028				
<i>Bartlett's test for equal variances</i>					
<i>Bartlett's statistic (corrected)</i>	9,246				
<i>P value</i>	0,0262				
<i>P value summary</i>	*				
<i>Do the variances differ signif. (P < 0.05)</i>	Yes				
<i>ANOVA Table</i>	SS	df	MS		
<i>Treatment (between columns)</i>	463888	3	154629		
<i>Residual (within columns)</i>	113942	106	1075		
<i>Total</i>	577830	109			
<i>Tukey's Multiple Comparison Test</i>	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
<i>N0ctr vs DTctr</i>	189,1	24,2	Yes	***	160,2 to 218,0
<i>N0ctr vs N0exp</i>	47,09	4,764	Yes	**	10,54 to 83,64
<i>N0ctr vs DTexp</i>	177,3	22,69	Yes	***	148,4 to 206,2
<i>DTctr vs N0exp</i>	-142	18,17	Yes	***	-170,9 to -113,1
<i>DTctr vs DTexp</i>	-11,77	2,382	No	ns	-30,05 to 6,501
<i>N0exp vs DTexp</i>	130,2	16,66	Yes	***	101,3 to 159,1