

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ENSAIO DE COMETA PARA ABELHAS *Tetragonisca angustula* E ANÁLISE DE DANOS AO DNA APÓS CONTAMINAÇÃO COM INSETICIDA NEONICOTINOIDE

Samara Calvi Baulli (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki (Orientadora), e-mail: mcrtakasusuki@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia,
Genética e Biologia Celular – DBC

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq/CAPES:
2.00.00.00-6 Ciências Biológicas; 2.02.00.00-5 Genética; 2.02.04.00-0 Genética Animal

Palavras-chave: DNA, Morfologia, Thiamethoxam

Resumo:

O presente estudo foi desenvolvido com os objetivos de estabelecer a metodologia de eletroforese em gel de célula única (SCGE) para abelhas *Tetragonisca angustula* e realizar experimentos *in vitro* por contaminação por ingestão oral com concentrações subletais do inseticida thiamethoxam (neonicotinoide), realizando posteriormente análise histológica para detectar possíveis alterações no intestino médio dessas abelhas sem ferrão. Essas análises contribuem com o entendimento de alterações em nível histológico e molecular que podem afetar a viabilidade e reprodução das abelhas sem ferrão, que são espécies extremamente importantes para a manutenção das Angiospermas. Os testes cometa não foram padronizados devido à impossibilidade de individualização das células do corpo goreduroso de abelhas adultas. Contudo, as análises histológicas após contaminação por ingestão oral com thiamethoxam por 24, 48 e 72 horas mostraram alterações na musculatura, epitélio e membrana peritrófica do intestino médio das abelhas analisadas. Assim, podemos concluir que mesmo não causando mortalidade, baixas concentrações ingeridas do neonicotinoide thiamethoxam causam alterações no intestino médio de *T. angustula* que provavelmente podem alterar sua capacidade de coleta.

Introdução

O Ensaio de Eletroforese em gel de célula única (SCGE) ou apenas Ensaio de Cometa, é uma técnica utilizada para detectar danos do DNA. Estudos mostram a utilização do Ensaio de Cometa em insetos, com o objetivo de compreensão da escala de danos causados pela genotoxicidade dos agrotóxicos. Essa metodologia tem sido empregada para estudar espécies

de insetos que são de importância fundamental para os seres humanos, como pragas e insetos benéficos (Augustyniak et al., 2015).

As abelhas sem ferrão estão entre os polinizadores mais comuns nos ambientes tropicais, visitando várias culturas. Entre elas destaca-se a espécie *Tetragonisca angustula* Latreille (1811), popularmente conhecida como abelhas “jataí”, que são amplamente distribuídas no Brasil. Estudos têm mostrado a suscetibilidade das *T. angustula* à contaminação com doses subletais de inseticidas.

Doses subletais de inseticida podem não interferir significativamente na mortalidade das abelhas. Porém, podem induzir mudanças do comportamento, fisiologia, além de alterações em órgãos dos insetos, como o intestino médio, que é caracterizado como um dos órgãos chave para análise da toxicidade (Cruz et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivos estabelecer a metodologia de teste de cometa para abelhas *T. angustula* e realizar experimentos *in vitro*, para verificar alterações na morfologia do intestino médio dessa espécie de abelha sem ferrão.

Materiais e métodos

Operárias forrageiras de *T. angustula* foram coletadas na entrada de ninho localizado no *campus* da Universidade Estadual de Maringá. Em seguida foram levadas ao laboratório de Genética Animal da UEM, anestesiadas sob refrigeração, sacrificadas e dissecadas em estereomicroscópio Zeiss. Testes para obtenção e dissociação do tecido de corpo gorduroso foram feitos com a solução de Tripsina 0,025% (1mL tripsina:4mL PBS) e Colagenase tipo II (5mg colagenase II:1mL PBS), ambas separadas e em conjunto, testando a quantidade e tempo de ação das mesmas.

O produto comercial Actara 250 WG-Singenta (neonicotinoide thiamethoxam) foi preparado de acordo com a bula para a cultura de *Citrus* (0,025g i.a./mL (gramas de ingrediente ativo/mL). Essa solução, posteriormente foi diluída para $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL para realização do bioensaio por ingestão. O desenvolvimento do bioensaio por ingestão realizado em laboratório consistiu no fornecimento de pasta cãndi (2g) contendo 10 μ L de inseticida ($7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL) e, apenas pasta cãndi para o controle. Foram colocadas 10 abelhas forrageiras em cada frasco de vidro (150mL), contendo o cãndi contaminado ou não (controle) e algodão umedecido com água. Os frascos foram mantidos em câmara B.O.D à 30°C, por períodos de 24, 48 e 72 horas.

Após a exposição ao thiamethoxam as sobreviventes (tratadas e controle) foram sacrificadas a frio, dissecadas em solução salina para insetos sob estereomicroscópio Zeiss, e o tubo digestório separado. As amostras foram fixadas em Bouin por 8 horas. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcoois (70% 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol, embebidas em parafina por três banhos e seccionadas a 6 μ m em micrótomo Leica RM 2250 e estendidas em lâminas de vidro. Posteriormente, foram reidratadas e coradas com hematoxilina e eosina (H/E) (Junqueira e

Junqueira 1983). As análises ocorreram em microscópio Omicron Medical – Axiocam MRc - ZEISS e feita a documentação fotográfica.

Resultados e Discussão

No presente estudo foram realizados testes com enzimas Tripsina 0,025% e Colagenase tipo II, com o objetivo de dissociação celular. Contudo, não foi possível individualizar as células do corpo gorduroso para realizar os ensaios cometa (Figura 1 A e C). A Figura 1B, mostra uma tentativa de teste cometa mesmo sem individualizar as células do corpo gorduroso. O colágeno presente em abelhas é do tipo I, assim, posteriormente serão realizados testes com a colagenase I, em novas tentativas para individualização celular (Cruz-Landim, 2009).

Os bioensaios para contaminação por ingestão de concentrações subletais de thiamethoxam foram desenvolvidos e análises da morfologia do intestino médio foram realizadas para suprir os ensaios de cometa. A figura 2A mostra o intestino médio do controle, sem alterações. Os resultados da contaminação por ingestão com thiamethoxam em 24, 48 e 72 horas mostram alterações no intestino médio como o afrouxamento/rompimento da musculatura longitudinal e circular (Figura 2 B, C e D), o descolamento da lâmina basal, o desaparecimento da membrana peritrófica que delimitava o lúmen e conseqüentemente a invasão das células que compõem o epitélio para o mesmo. As células epiteliais sofreram deformações em seu formato, passando de prismáticas para cúbicas e sem microvilosidades aparentes.

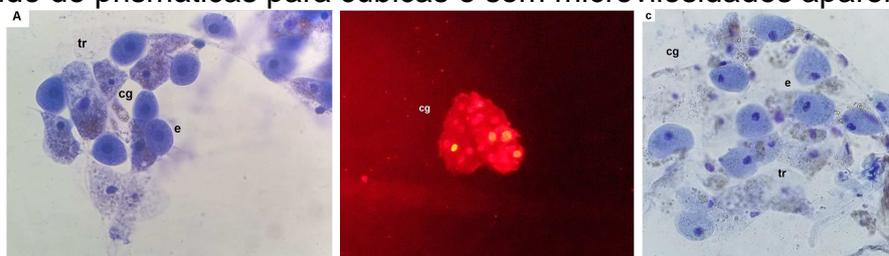


Figura 1. Montagem total do corpo gorduroso de *T. angustula*. A= Corpo gorduroso com tripsina 0,025%, coloração: Azul de metileno, 400x ; B= teste do cometa, corpo gorduroso, coloração: Brometo de etídio 0,002%,1000x; C= corpo gorduroso com colagenase tipo II, coloração: Azul de Metileno, 400x. cg = Corpo Gorduroso; tr = Trofócitos; e = Enócitos.

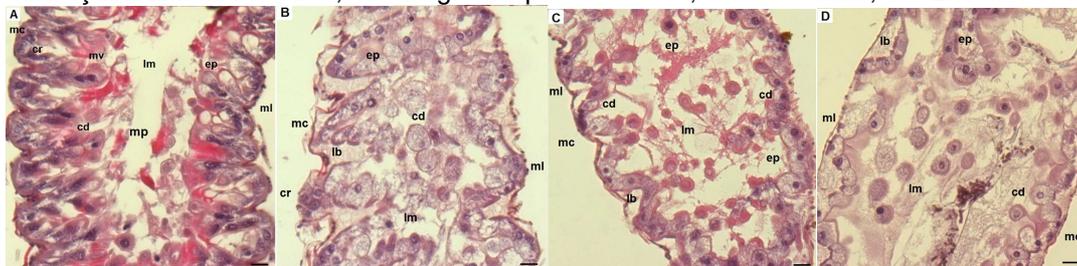


Figura 2. Fotomicrografia do intestino médio de operárias forrageiras de *T. angustula* após diferentes tempos de contaminação com thiamethoxam a $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL. A= Controle; B= 24 horas; C= 48 horas; D= 72 horas. Ep= Epitélio; mc= musculatura circular; ml= musculatura longitudinal; lb= lâmina basal; cd= células digestivas; cr= ninho células regenerativas; mp= membrana peritrófica; lm= lúmen do intestino médio; mv=

microvilosidades das células digestivas. Aumento de 200x. Hematoxilina-Eosina. Escala: 100µm.

Conclusões

O ensaio cometa é uma técnica rápida, simples, sensível e de baixo custo que permite analisar lesões no DNA causadas por agentes genotóxicos. A individualização celular do corpo gorduroso de abelhas adultas não foi possível impossibilitando a padronização da técnica de Ensaio de Cometa para as *T. angustula*. As análises morfológicas intestino médio das abelhas forrageiras de *T. angustula*, evidenciaram alterações após a contaminação por ingestão oral de thiamethoxam em concentrações subletais por 24, 48 e 72 horas, que provavelmente pode alterar a capacidade de coleta dessas abelhas.

Agradecimentos

As autoras agradecem ao Programa PIBIC-UEM, CNPq e Fundação Araucária pela bolsa concedida e ao incentivo para a realização da pesquisa.

Referências

AUGUSTYNIAK, M.; Gladysz, M.; Dziewiecka, M. **The Comet assay in insects-Status, prospects and benefits for Science**. Rev. Mutation Research. 2015. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.09.001>.

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

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. UNESP: São Paulo, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Basic techniques of cell biology**, Santos, São Paulo, 1983, 123p.