

## EFEITO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS NERVOSAS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Nathalia Rodrigues da Silva de Carvalho (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Andressa Santoro, José Ricardo Penteadó Falco (Coorientador), Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki (Orientadora)

e-mail da orientadora: mcrtakasusuki@uem.br

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

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas: 2.00.00.00-6;  
Genética: 2.02.00.00-5; Genética Animal: 2.02.04.00-0**

**Palavras-chave:** Neonicotinoide, Abelhas sem ferrão, cromatina.

### Resumo:

O imidacloprido é um neonicotinoide amplamente empregado em diversas culturas, possui elevada eficiência contra pragas agrícolas, porém afeta indiretamente os polinizadores, como é o caso das abelhas sem ferrão. Por ser um inseticida neurotóxico, o imidacloprido atinge o sistema nervoso central das abelhas e prejudica a expressão gênica desses insetos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos em nível de estrutura de cromatina das células nervosas do cérebro de operárias forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata*, expostas por contato a concentrações subletais do neonicotinoide imidacloprido. Os bioensaios foram realizados por um período de 24 horas, com cinco concentrações subletais do inseticida. As análises foram realizadas por meio da técnica citoquímica de CEC (Concentração Crítica de Eletrólitos), que possibilita identificar alterações na condensação da cromatina. Nas análises das células de cérebro das operárias tratadas com o imidacloprido foi possível verificar que o ponto de CEC foi maior que o valor verificado nas amostras controle. O aumento do ponto de CEC nas amostras tratadas permite inferir que houve condensação da cromatina e provavelmente diminuição na expressão gênica dessas células. Dessa maneira, em longo prazo podem ocorrer alterações comportamentais e o declínio desses polinizadores.

### Introdução

Desde a Revolução Verde os setores agrícolas passaram a se modernizar, e com isso o uso indiscriminado de agrotóxicos se tornou cada vez mais evidente no meio agrícola. Considerando os malefícios relacionados à utilização em larga escala de agrotóxicos é relevante citar a diminuição do número e biodiversidade de polinizadores.

Dentre os polinizadores mais comuns nos ambientes tropicais, estão as abelhas sem ferrão que possuem predominância em diversas regiões e favorecem a polinização de várias culturas agrícolas. Em alguns biomas brasileiros com Pampa, Mata Atlântica e Pantanal, a abelha sem ferrão

*Scaptotrigona bipunctata* está entre as espécies de abelhas mais utilizadas para a meliponicultura. Os neonicotinoides tornaram-se a classe de inseticidas mais amplamente utilizados para controle de pragas são inseticidas neurotóxicos que atuam nos receptores nicotínicos de acetilcolina do sistema nervoso central dos insetos. O processo de atuação dos neonicotinoides induz uma hiperexcitação neuronal, o que por vezes pode ocasionar a morte do inseto. Esses inseticidas são absorvidos pela planta e se tornam biodisponíveis no material coletado pelas abelhas em campo.

O consumo e o contato com esses agrotóxicos podem causar efeitos subletais como alterações morfológicas, fisiológicas e de expressão gênica. As alterações em nível de cromatina que agrotóxicos, como os neonicotinoides, podem causar nas abelhas pode ser analisada por meio da técnica de Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC). Essa metodologia permite avaliar alterações como, a condensação da cromatina, que pode estar relacionada com a morte celular do tipo apoptose, que por sua vez pode ser decorrente da exposição a agrotóxicos.

Assim, considerando a elevada importância das abelhas sem ferrão para o meio ambiente e a biodisponibilidade dos neonicotinoides para o polinizador, o presente trabalho objetivou identificar alterações na estrutura da cromatina das abelhas *S. bipunctata* expostas por contato ao neonicotinoide imidacloprido.

### **Materiais e métodos**

O imidacloprido comercial foi preparado em solução aquosa de acordo com a bula para a cultura de *Citrus* 0,033 g i.a./L, para controle do pulgão- preto (*Toxoptera citricida*). Essa solução foi diluída nas concentrações de 0,007 g i.a./L; 0,013g i.a./L; 0,020 g i.a./L; 0,026 g i.a./L e 0,033 g i.a./L para a realização dos bioensaios por contato. Cada bioensaio foi realizado com quatro repetições do tratamento mais o controle. Em cada frasco de tratamento foi adicionado ao fundo um papel filtro umedecido com 800 µL de inseticida diluído nas concentrações já citadas. No frasco de controle foi adicionado papel filtro umedecido com 800µL de água destilada. Para montagem do experimento as abelhas forrageiras *S. bipunctata* foram coletadas na entrada das colônias, mantidas em caixas comerciais, na Fazenda Experimental de Iguatemi- UEM, 15 indivíduos foram adicionados em frascos de vidro. Cada frasco continha além do papel filtro, 3g de alimento cãndi, e foram cobertos por tecido *voil* preso por elástico. Os vidros foram mantidos em câmara B.O.D à  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $70 \pm 2\%$ , por 24 horas. Após o período de exposição as abelhas mortas foram contabilizadas, as sobreviventes foram anestesiadas a frio e dissecadas sob lupa em solução salina para a retirada do cérebro e realização da análise da CEC. Após a extração, os cérebros foram estendidos em lâminas histológicas, fixados em ácido acético 45% e esmagados com o auxílio de lamínula. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido e a lamínula foi retirada. Em seguida, as lâminas foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1 - v/v) e lavadas em etanol 70%. Após o procedimento as lâminas foram coradas em azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4.0, contendo

MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0,0; 0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15, 0,20 e 0,30 Mol/L), foram armazenadas em porta lâminas para secagem e posterior montagem. Por fim, as lâminas foram desidratadas em xilol por 15 minutos, montadas com Entellan e analisadas sob microscópio óptico, para verificar as possíveis alterações da cromatina e determinar o ponto de CEC a partir da coloração dos núcleos.

### Resultados e Discussão

Após a exposição à imidacloprido não foi possível estimar a concentração letal para 50% dos tratamentos, uma vez que o número de abelhas mortas não foi significativo. O estudo realizado por Gurgel (2015) em abelhas *Scaptotrigonas* demonstrou que as abelhas tratadas com dosagem tópica, apresentaram maior resistência ao inseticida Imidacloprido do que aquelas tratadas oralmente a partir da dieta contaminada. A menor toxicidade dos neonicotinoides oferecidos por via tópica pode estar relacionado com a dificuldade de penetração dos inseticidas através da cutícula dos insetos. Nas análises citoquímicas após 24 horas de exposição por contato, foi possível observar um valor de CEC de 0,30M (Tabela 1) em todas as concentrações testadas (0,007 g i.a./L; 0,013g i.a./L; 0,020 g i.a./L; 0,026 g i.a./L e 0,033 g i.a./L), maior que o ponto de CEC encontrado no controle, que apresentaram ponto de CEC 0,20M (Tabela 1). Portanto, o aumento do ponto de CEC dos tratamentos comparados com o controle demonstrou que houve condensação da cromatina das células do cérebro das operárias de *S. bipunctata* tratadas por contato com imidacloprido. Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira et al. (2018) em estudo realizado com operárias de *S. bipunctata* após exposição oral ao neonicotinoide thiamethoxam. Esses autores observaram que os valores de CEC para as diferentes concentrações testadas nos tratamentos realizados foram maiores ou iguais a 0,30M, valores superiores ao obtido nos controles (0,15M), demonstrando também maior condensação da cromatina. Contudo, no estudo realizado por Stuchi (2009) com abelhas do gênero *Tetragonisca* contaminadas tanto por via oral quanto por contato com o inseticida thiamethoxam, foi observado uma variação entre 0,20M e 0,30M do ponto de CEC, esses valores foram semelhantes aos controles que apresentaram pontos de CEC no intervalo de 0,20M<CEC<0,30M. Esses estudos indicam que a exposição aos neonicotinoides apresenta diferentes respostas em nível de condensação da cromatina dependendo da forma de exposição, por contato ou oral.

Os valores de CEC obtidos no presente estudo permitem inferir que houve uma diminuição na expressão gênica nessas células durante o tratamento com Imidacloprido. A redução da expressão gênica pode estar relacionada com a apoptose (morte celular) das células nervosas. Essas alterações possivelmente podem proporcionar em longo prazo, modificações morfofisiológicas nas células do cérebro, com conseqüente alterações comportamentais nas abelhas e finalmente, ocorrer o declínio das colônias dessas abelhas sem ferrão.

Tabela 1. Resposta de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *S. bipunctata* após exposição por contato ao Inseticida imidacloprido nas concentrações de 0,007 g i.a./L; 0,013g i.a./L; 0,020 g i.a./L; 0,026 g i.a./L e 0,033 g i.a./L por 24 horas. Coloração Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações.

Concentração corante	Controle	0,066 g i.a./L	0,013 g i.a./L	0,020 g i.a./L	0,026 g i.a./L	0,033 g i.a./L
AT controle	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,02 mol/L	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,05 mol/L	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,08 mol/L	Vi	Vi	Vi	Vi/Az	Vi/Az	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,10 mol/L	Vi	Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,12 mol/L	Vi	Az	Vi/Az	Vi/Az	Az	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,15 mol/L	Az	Az	Az	Az	Az	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,20 mol/L	Ve	Az	Az	Az	Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,30 mol/L	Az	Ve	Ve	Ve	Ve	Ve
<b>Valor de CEC (M)</b>	<b>0,20</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>

Az = azul, Vi = violeta; Ve = verde

## Conclusões

A exposição por contato, durante 24 horas, de operárias adultas de *S. bipunctata* a concentrações subletais do neonicotinoide Imidacloprido demonstrou que há condensação da cromatina das células nervosas do cérebro dessas abelhas, provavelmente alterando a expressão gênica nessas células.

## Agradecimentos

Agradeço ao programa PIBIC-UEM, CNPq e Fundação Araucária pelo incentivo e concessão da bolsa para a realização do projeto. Agradeço à minha orientadora Maria Claudia Ruvolo-Takasusuki pelo auxílio e paciência na orientação, agradeço ao professor José Ricardo Penteado pela oportunidade de realização do estudo.

## Referências

MOREIRA, D.R. et al. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepelletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Toxicology*, v. 33, p. 463-475, 2018.

STUCHI, A.L.P.B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009, 120p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

GURGEL, L. S. **Estabelecimento de parâmetros toxicológicos do Imidacloprido, para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona* sp. nov.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2015, 41p. Tese (Mestrado em Zootecnia).