

5.04.05 - Zootecnia / Produção Animal.

## **REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA GELEIA REAL EM ABELHAS *Apis mellifera* NUTRIZES EXPOSTAS AO INSETICIDA FIPRONIL, FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E SUAS ASSOCIAÇÕES.**

Rodrigo Zaluski<sup>1</sup>, José Cavalcante Souza Vieira<sup>2</sup>, Pedro de Magalhaes Padilha<sup>3</sup>, Matheus Portela Pinho<sup>4</sup>, Carlos Amancio Caldas<sup>4</sup>, Lívia Lopes Duarte<sup>4</sup>, Frederico Nakasone Ferreira<sup>5</sup>, Ricardo de Oliveira Orsi<sup>6\*</sup>

1. Professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS, Campo Grande – MS)
2. Pesquisador do Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (INQUI/UFMS, Campo Grande – MS)
3. Professor do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Campus de Botucatu), Departamento de Química e Bioquímica
4. Estudante da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ – UFMS)
5. Graduado em Ciências Biológicas. Técnico em Laboratório da da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ – UFMS)
6. Professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu), Departamento de Produção Animal/Orientador

### **Resumo**

A geleia real é sintetizada por glândulas localizadas na cabeça das abelhas nutrizas que podem ter seu desenvolvimento prejudicado em abelhas expostas a agrotóxicos. O objetivo do presente estudo foi analisar alterações na expressão de proteínas da geleia real em abelhas nutrizas expostas a doses ambientalmente relevantes do inseticida sistêmico fipronil (2,5 ppb) e fungicida piraclostrobina (850 ppb), isolados e em associação. Proteínas extraídas da cabeça de abelhas expostas aos agrotóxicos e não expostas (controle) foram separadas utilizando a técnica 2D-PAGE e identificadas em *spots* que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos. Quatro das principais proteínas da geleia real (MRJP1, MRJP2, MRJP4, MRJP5) foram identificadas em *spots* que apresentaram redução de expressão em abelhas expostas aos agrotóxicos. Alterações qualitativas na geleia real podem comprometer a nutrição das larvas, abelhas adultas e da rainha, afetando o desenvolvimento e a manutenção das colônias.

**Palavras-chave:** Apicultura, agrotóxicos; proteômica.

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 165696/2014-1).

### **Introdução**

As abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) vivem em sociedades altamente organizadas, caracterizadas pela presença castas (representadas pela rainha, zangões e operárias). As abelhas operárias com idade entre 06 e 12 dias, denominadas nutrizas, são responsáveis pela produção da geleia real, uma secreção proteica indispensável à criação das larvas, alimentação de abelhas adultas e da rainha (Crailsheim, 1992; Crailsheim, 1998).

A secreção da geleia real ocorre nas glândulas mandibulares e hipofaringeanas que se localizam na cabeça das abelhas, sendo a ingestão de pólen fundamental para o desenvolvimento e atividade dessas glândulas (Deseyn & Billen, 2005; Rortais et al., 2005). Em função do amplo uso de agrotóxicos nos ecossistemas, frequentemente o pólen levado para as colmeias apresenta resíduos de diversos agrotóxicos, incluindo inseticidas e fungicidas sistêmicos (Chauzat et al., 2011; Zaluski et al., 2017) que podem prejudicar o desenvolvimento de glândulas associadas a síntese de geleia real (Heylen et al., 2011; Hatjina et al., 2013; Zaluski et al., 2017).

Estudos na área da proteômica que utilizam a eletroforese bidimensional 2D-PAGE (2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) para separação de proteínas, análise da sua expressão e posterior identificação por espectrometria de massas, têm tido grande crescimento (Moraes et al., 2013). Esses estudos tem grande importância para determinar alterações na expressão de proteínas envolvidas em processos vitais para as abelhas, com destaque para proteínas presentes na geleia real que representam a base da nutrição e diferenciação de castas em *A. mellifera* (Buttstedt et al., 2013).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações na expressão de proteínas da geleia real em abelhas nutrizas expostas a doses ambientalmente relevantes do inseticida sistêmico fipronil (2,5 ppb) e fungicida piraclostrobina (850 ppb), isolados e em associação.

### **Metodologia**

O experimento foi realizado no apiário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Abelhas *Apis mellifera* africanizadas recém-emergidas (<10 h) de cinco colônias doadoras foram marcadas no tórax com tinta atóxica e introduzidas em núcleos experimentais, onde receberam as dietas contaminadas. Para o preparo das dietas, inicialmente soluções estoque das formulações comerciais de piraclostrobina (Comet<sup>®</sup> 250 g i.a. L<sup>-1</sup>); e de fipronil (Regent 800WG<sup>®</sup> 800g i.a. kg<sup>-1</sup>) foram diluídas em água

destilada. Posteriormente, quantidades apropriadas das soluções de agrotóxicos foram adicionadas a xarope de mel (50%) e misturadas a pólen em proporção de 3:1 (pólen: xarope de mel), para obtenção das dietas contendo 850 ppb de piraclostrobina; 2,5 ppb de fipronil; e 850 ppb + 2,5 ppb de piraclostrobina + fipronil; as concentrações de agrotóxicos utilizadas foram selecionadas visando expor as abelhas a condições próximas a que ocorrem naturalmente em campo. O pólen e o xarope foram completamente homogeneizados para formar uma pasta que foi fracionada em porções de 100g e mantida em freezer a -20 °C até a utilização. As pastas de pólen fornecidas ao grupo controle (sem contaminação) foram preparadas da mesma maneira. Cada núcleo experimental recebeu 100 g de uma das pastas de pólen diariamente sobre os quadros de cria, durante seis dias para garantir que as abelhas marcadas introduzidas nos núcleos consumissem as dietas contaminadas *ad libitum* desde sua introdução até o 6º dia. No sétimo dia, abelhas marcadas de cada núcleo experimental foram coletadas, anestesiadas em gelo seco, decapitadas e armazenadas a -80 °C até a realização das análises proteômicas.

Para a extração das proteínas, foi utilizado um *pool* de 60 cabeças de abelhas nutrizas de cada tratamento; as amostras foram acondicionadas em microtubos com *beads* cerâmicas (2,8 mm) e 1 mL de água ultrapura gelada e homogeneizadas no equipamento Omni Bead Ruptor em velocidade máxima por 60 segundos. Após, as amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos e o processo de homogeneização foi repetido. O homogeneizado foi centrifugado a 7.000 rpm por 15 min (4 °C) com coleta do sobrenadante, seguido de duas etapas adicionais de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos (4 °C), a fim de limpar o extrato proteico. Finalmente, o sobrenadante foi filtrado em um filtro de seringa (0,46 µm) e precipitado com acetona gelada (80 %) em proporção 1:4 (amostra:acetona); as amostras foram mantidas em geladeira por 2 h. Após a precipitação, os extratos proteicos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi removido. O precipitado proteico (*pellet*) foi lavado mais duas vezes com acetona gelada. Uma parte dos *pellets* proteicos foi utilizada para quantificação total das proteínas e outra para as separações eletroforéticas. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o kit Quick Start Bradford Protein Assay, utilizando albumina sérica bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectrophotometer Evolution 60 Thermo Fisher Scientific, USA) em comprimento de onda de 595 nm.

Os *pellets* proteicos de cada tratamento foram solubilizados em tampão apropriado (Braga et al., 2017) e 375 µg de proteínas solubilizadas foram aplicadas individualmente em fitas de 13 cm contendo anfólitos de pH 3–10. As fitas foram reidratadas por 14 h e posteriormente introduzidas no sistema de isoeletrofocalização para separação das proteínas de acordo com seu pI, perfazendo um total de 15.504 Vh. Posteriormente as fitas com as proteínas foram reduzidas e alquiladas (Braga et al., 2017) e aplicadas sobre um gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v). Um padrão de proteínas com massa molecular entre 14,4–97,0 kDa foi aplicado ao lado das fitas, e ambos foram selados com solução de agarose 0,5 % (m/v). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba SE 600 Ruby em duas etapas: 7,5 mA/gel por 30 min e 15 mA/gel por 2 h 10 min. Ao término da corrida, os géis foram fixados em ácido acético 10 % (v/v) e etanol 40 % (v/v) por uma hora; em seguida os géis foram corados com Coomassie coloidal por 72 h. O corante foi removido dos géis com sucessivas lavagens utilizando água ultrapura para revelação das proteínas. As corridas eletroforéticas foram realizadas em quadruplicata, totalizando 04 géis por tratamento.

Os géis foram escaneados utilizando o equipamento ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) e as imagens processadas no programa Image Master Platinum, versão 7.0 para obtenção do número de *spots*, porcentagem de correlação entre os géis (*matching*), pI, volume e Mm dos *spots*. A expressão dos *spots* proteicos das abelhas expostas aos agrotóxicos piraclostrobina, fipronil e piraclostrobina + fipronil foi comparada individualmente ao grupo controle, com análise de quatro géis para cada grupo experimental. O volume normalizado (%V) de cada *spot* proteico obtido nos géis do grupo controle foi utilizado para determinar diferenças significativas entre *spots* proteicos dos grupos expostos aos agrotóxicos por meio de análise de variância (ANOVA); o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Os *spots* proteicos foram excisados dos géis e processados para identificação das proteínas por ESI-MS/MS de acordo com Shevchenko et al. (2006). As soluções contendo os peptídeos foram analisadas utilizando sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QT-MS (Waters, Manchester, UK) com fonte de ionização por electrospray (ESI). O Servidor ProteinLynx Global (PLGS) versão 3.0 foi usado para processar e pesquisar os dados gerados pelo LC-MS<sup>E</sup> de acordo com Braga et al. (2017). A identificação das proteínas foi obtida por meio de busca no banco de dados de *Apis mellifera* (UniProtKB/Swiss-Prot) usando o algoritmo incorporado ao software.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 227, 215, 221 e 211 *spots* proteicos nos géis do grupo controle, piraclostrobina, fipronil e piraclostrobina + fipronil, respectivamente, em uma variação de Mm 9,66 – 136.100 kDa e variação de pI de 4,07 – 9,93. A correlação média (*match*) entre os quatro géis obtidos para cada tratamento foi de 98%, o que confirmou a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados.

Quatro das principais proteínas da geleia real, denominadas Major Royal Jelly Proteins (MRJPs): MRJP1, MRJP2, MRJP4 e MRJP5 foram identificadas em *spots* que apresentaram redução de expressão em abelhas nutrizas expostas aos agrotóxicos. Essas proteínas foram identificadas em 35 *spots* proteicos, cuja expressão foi reduzida em -1,0 a -2,57 em comparação ao grupo controle; em geral a redução da expressão das proteínas foi mais intensa em abelhas expostas à associação dos agrotóxicos. A redução da expressão de proteínas da geleia real de abelhas expostas ao fipronil e a piraclostrobina pode ser atribuída ao menor desenvolvimento das glândulas mandibulares e hipofaringeanas de abelhas nutrizas expostas a esses agrotóxicos, conforme observado anteriormente (Zaluski et al., 2017). Outros estudos também demonstraram

que a exposição de abelhas nutrizas a dietas contaminadas com agrotóxicos ocasiona alterações morfológicas em glândulas responsáveis pela síntese da geleia real (Heylen et al., 2011; Hatjina et al., 2013) sugerindo que essas alterações comprometem de forma quantitativa e qualitativa a secreção dessas proteínas. As análises proteômicas realizadas no presente estudo demonstram pela primeira vez que a exposição das abelhas nutrizas ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e as suas associações pode ocasionar alterações qualitativas em algumas das principais proteínas da geleia real. Essas alterações podem comprometer a nutrição das larvas, abelhas adultas e da rainha, afetando o desenvolvimento e a manutenção das colônias.

As proteínas da geleia real possuem importante função na nutrição da colônia e podem influenciar a diferenciação de castas e a sanidade das abelhas (Buttstedt et al., 2013; Buttstedt et al., 2014; Vezeteu et al., 2017). Algumas proteínas da geleia real, especialmente a MRJP1, apresentam atividade antimicrobiana (Vezeteu et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017), portanto, a redução da expressão dessa proteína em colônias expostas a agrotóxicos pode aumentar sua susceptibilidade a patógenos, prejudicando a criação das larvas. Estudos prévios relataram comprometimento do crescimento de colônias e da produção de rainhas (Whitehorn et al., 2012), maiores taxas de substituição de rainhas (Sandrock et al., 2014), e comprometimento da imunidade e do desenvolvimento fisiológico de rainhas criadas em colônias expostas a agrotóxicos (DeGrandi-Hoffman et al., 2013). Os resultados do presente estudo sugerem que esses fatores podem estar associados a alterações na qualidade da geleia real produzida por abelhas nutrizas que consomem dietas contaminadas. Futuros estudos para avaliar a qualidade e quantidade de geleia real produzida em colônias expostas a agrotóxicos são importantes para confirmar os efeitos observados no presente estudo e para aumentar a compreensão dos impactos da exposição das abelhas a agrotóxicos.

### Conclusões

A exposição de abelhas nutrizas a dietas contaminadas com doses ambientalmente relevantes do inseticida sistêmico fipronil e fungicida piraclostrobina, isolados e em associação, reduz a expressão das proteínas MRJP1, MRJP2, MRJP4 e MRJP5 que integram a geleia real. Essas alterações demonstram que a qualidade da geleia real produzida por abelhas expostas a esses agrotóxicos pode ser prejudicada, afetando a manutenção e o desenvolvimento da colônia.

### Referências bibliográficas

- BRAGA, C. et al. Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 414-422, 2017.
- BUTTSTEDT, A., MORITZ, R. F. A. & ERLER S. More than royal food - major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. **Frontiers in Zoology**, v. 10, p. 1-10, 2013.
- BUTTSTEDT, A., MORITZ, R. F. A. & ERLER, S. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. **Biological Reviews**, v. 89, p. 255-269, 2014.
- CHAUZAT, M. P. et al. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 30, p. 103-111, 2011.
- CRAILSHEIM, K. et al. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, p. 409-419, 1992.
- CRAILSHEIM, K. et al. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 29, p. 97-112, 1998.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y. & SIMONDS, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v.4, p.71-89, 2013.
- DESEYN, J. & BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** v. 36, p. 49-57, 2005.
- HATJINA, F. et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie** v. 44, p. 467-480, 2013.
- HEYLEN, H., GOBIN, B., ARCKENS, L., HUYBRECHTS, R. & BILLEN, J. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee (*Apis mellifera*). **Apidologie** v. 42, p. 103-116 2011.
- MORAES, C. S. et al. Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: IOC, 84 p., 2013.
- RORTAIS, A., ARNOLD, G., HALM, M. P. & TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.
- SANDROCK, C. et al. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. **Plos One**, v. 9, p. e103592, 2014.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V. & MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric

characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2006.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D158-D169, 2017.

VEZETEU, T. V., BOBIȘ, O. MORITZ, R. F. A. & BUTTSTEDT, A. Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. **Microbiology Open**, v. 6, p. e00397, 2017.

WHITEHORN, P. R., O'CONNOR, S., WACKERS, F. L. & GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, p. 351-352, 2012.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A. JR.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.