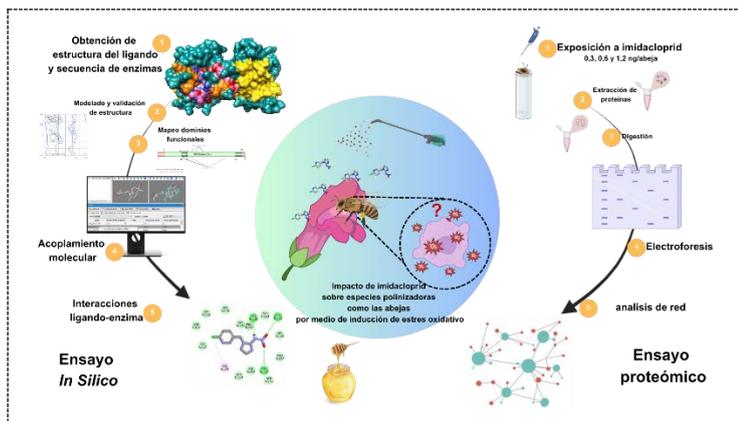


Cambios en las proteínas asociadas a estrés oxidativo de *Apis mellifera* expuestas al insecticida sistémico Imidacloprid

*Changes in proteins associated with oxidative stress in *Apis mellifera* exposed to the systemic insecticide Imidacloprid*

Graphical Abstract (GA)



GA Texto: Análisis proteómico y computacional de enzimas asociadas a estrés oxidativo de *Apis mellifera*.

Cambios en las proteínas asociadas a estrés oxidativo de *Apis mellifera* expuestas al insecticida sistémico Imidacloprid

Changes in proteins associated with oxidative stress in *Apis mellifera* exposed to the systemic insecticide Imidacloprid

*Fredy Gonzalo Galindo Morales**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Nelson Enrique Arenas Suarez Ph. D.

Resumen

El incremento de los cultivos agrícolas ha traído consigo el aumento del uso de insecticidas, sin embargo, su aplicación ha impactado colateralmente a insectos polinizadores. Los insecticidas inducen estrés oxidativo en abejas, mas, la razón por la cual se presenta, aún no se dilucida completamente, es por ello, que en este estudio se buscó describir las interacciones entre el insecticida imidacloprid con catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa mediante acoplamiento molecular, así como evaluar los cambios de expresión de las proteínas relacionadas con estrés oxidativo de extractos proteicos de *A. mellifera*. Se expusieron abejas a dosis de 0,3, 0,6 y 1,2 ng/abeja de imidacloprid, posteriormente se realizó la extracción de proteínas y un perfil electroforético. Se empleo Cytoscape para analizar la relación entre efectos subletales y vías metabólicas por una red de interacciones proteína-proteína. El insecticida muestra diferencias en la expresión de proteínas de cabeza y abdomen-tórax, afecta las interfases dimericas en la mayoría de las enzimas analizadas por acoplamiento molecular reduciendo su estabilidad estructural, así como se asocia con efectos subletales como la memoria o inmunidad, planteando que dichas enzimas tienen un rol importante en la producción de tales efectos.

Palabras clave: Abeja, imidacloprid, pesticidas, proteómica, acoplamiento molecular.

Abstract

The increase in agricultural crops has brought with it the increase in the use of insecticides, however, its application has collaterally impacted pollinating insects. Insecticides induce oxidative stress in bees, but the reason why it occurs has not yet been fully elucidated, which is why this study sought to describe the interactions between the insecticide imidacloprid with catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase using molecular docking, as well as evaluating the expression changes of proteins related to oxidative stress of protein extracts from *A. mellifera*. Bees were exposed to doses of 0.3, 0.6 and 1.2 ng/bee of imidacloprid, followed by protein extraction and an electrophoretic profile. Cytoscape was used to analyze the relationship between sublethal effects and metabolic pathways through a network of protein-protein interactions. The insecticide shows differences in the expression of head and abdomen-thorax proteins, affects the dimeric interfaces in most of the enzymes analyzed by molecular docking, reducing their structural stability, as well as being associated with sublethal effects such as memory or immunity, proposing that these enzymes play an important role in producing these effects.

Keywords: Bee, imidacloprid, pesticides, proteomics, molecular docking

Introducción

El crecimiento de la población en los últimos años ha generado un aumento en la demanda de alimentos a nivel mundial, esto ha conllevado a un crecimiento del uso de insecticidas para proteger los cultivos agrícolas. Dentro de los diferentes insecticidas, los neonicotinoides, abarcan la mayor parte del mercado, siendo el imidacloprid uno de los más representativos (Simon-Delso, et al., 2015). Las propiedades fisicoquímicas de los insecticidas sistémicos permiten su entrada en los tejidos vegetales y su traslocación a todas las partes de la planta alcanzando inclusive el néctar y el polen, afectando insectos que se alimenten de la misma. Imidacloprid (IMI) (1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenoamina) se emplea en forma de aspersión sobre las plantas o como agente de recubrimiento de semillas (Morrissey et al., 2015). A nivel molecular, ejerce su acción al inhibir los receptores nicotínicos de acetilcolina encargados de abrir los canales iónicos (Casida & Durkin, 2013). Se comporta como agonista de la acetilcolina, evitando ser degradado por la acetilcolinesterasa, induciendo una excitación continua de las membranas neuronales que conducen a parálisis y agotamiento energético celular (Buszewski et al., 2019).

Los alimentos son la base del desarrollo de la población generando un nexo entre la salud humana, la nutrición y la sostenibilidad ambiental (Wyckhuys et al., 2020). La producción de alimentos requiere de una combinación de factores, siendo la polinización uno de los más importantes. Las abejas tienen un papel fundamental como polinizadores, ya que participan en la polinización del 71 % de los cultivos destinados para la alimentación humana y animal. Los servicios de polinización prestados por las abejas están valorados a nivel mundial en USD 215 mil millones para la producción de alimentos (Dave et al., 2015). En EE.UU los servicios de polinización de abejas aporta USD 3.070 millones de los USD 57.000 millones que representa la polinización por insectos (Khalifa et al., 2021), reflejando la importancia de estos insectos en el abastecimiento alimentario del planeta.

Las abejas también son indirectamente responsables de la reproducción, el sostenimiento de las comunidades de plantas silvestres y la biodiversidad (Di Noi et al., 2021). Las plantas silvestres, inclusive, por procesos evolutivos, han generado modificaciones en su estructura reproductiva

permitiendo solo la polinización por abejas (G. Li et al., 2018). A nivel ecológico, *A. mellifera* puede influir en la aptitud y el comportamiento de los polinizadores competidores y mejorar o reducir la reproducción de las plantas por lo que los cambios en su distribución y abundancia pueden afectar la trayectoria evolutiva de las plantas polinizadas por animales concurrentes y otros polinizadores (Hung et al., 2018).

En las últimas décadas se han reportado descensos en el número de colonias de abejas a nivel mundial, principalmente en Europa y América del norte (Di Noi et al., 2021). Se han estimado pérdidas, en Europa central del 25 % de las colmenas y en Estados Unidos (EEUU) alrededor del 60% (Dave et al., 2015). Los factores por los cuales se ha producido el descenso de estos insectos se han relacionado con la exposición a estrés ambiental, siendo, los pesticidas el estrés abiótico más peligroso, debido a que contribuye a una mayor susceptibilidad a otros tipos de estrés ambiental (G. Li et al., 2018). Es por ello, que el impacto generado en la disminución de las poblaciones de abejas está teniendo un efecto negativo en la producción global de alimentos, la salud de la sociedad, la biodiversidad vegetal y la economía mundial (Martin-Culma & Arenas-Suárez, 2018)(Martin-Culma & Arenas-Suárez, 2018).

Según el sistema de información sobre biodiversidad de Colombia (SiB), en Colombia existen alrededor de 393 especies de abejas reportadas, dentro de las que se encuentra *A. mellifera* (Sib., 2022). La legislación en el país para el control en la comercialización de productos con el ingrediente activo imidacloprid es escasa, a pesar de que en Europa fue prohibido desde 2013 (Comisión Europea, 2015). A partir de datos expuestos acerca del envenenamiento de colmenas de abejas, 5.398 en 2016 y 10.385 en 2017 así como muerte de 192 colmenas de abejas en el mismo año, entre otros informes, en 2019 el Tribunal Administrativo de Cundinamarca mediante la sentencia del 12 de diciembre de 2019 reconoció el vínculo entre el uso de pesticidas (neonicotinoides y fipronil) con la muerte masiva de abejas y otros polinizadores, lo que dio pie a la generación de la resolución 922101 del 2 de marzo de 2021 que suspendió por 6 meses el registro de productos formulados con fipronil (Gómez Maldonado, 2021) y, posteriormente, mediante resolución 740 de 2023 prohibió de manera definitiva el uso de este

insecticida (Tribunal Administrativo de Cundinamarca & ICA, 2023), sin embargo, con respecto a imidacloprid, su uso aún es avalado por autoridades agrícolas y ambientales en el país (Perilla Melo, 2020).

Las abejas están expuestas normalmente a concentraciones subletales de imidacloprid en el ambiente. Una concentración subletal se define como aquella que no ocasiona mortalidad aparente en una población experimental, sin embargo, los efectos subletales fisiológicos y comportamentales producidos pueden conllevar con el tiempo a la muerte del insecto (Desneux et al., 2007). En abejas sometidas a dosis subletales de imidacloprid se han reportado efectos como: reducción en la alimentación que causa problemas reproductivos (Laycock et al., 2012), regulación a la baja de genes involucrados con la contracción muscular que afectan el movimiento (Wu et al., 2017), susceptibilidad extendida a diferentes patógenos (Paris et al., 2017), deficiencia en la búsqueda de néctar y polen (Schneider et al., 2012) y afectaciones en el metabolismo energético (Nicodemo et al., 2014).

Los mecanismos de acción de los insecticidas son muy variados, repercutiendo de manera directa o indirecta sobre los diferentes sistemas fisiológicos que mantienen la homeostasis. Se ha observado que imidacloprid induce estrés oxidativo en abejas mellíferas (Balieira et al., 2018), estimula la generación y almacenamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive oxygen species) y sobrecarga de Fe^{2+} (He et al., 2021); en cerebro, produce regulación a la baja de genes asociados a procesos de oxido-reducción encargados de la desintoxicación, conduciendo a la aparición de ROS aumentando el estrés oxidativo (Zhiguo Li et al., 2019) así como se ha reportado, producción de desbalances en la regulación oxidativa a nivel del sistema inmune (Paris et al., 2017), por lo cual, es probable que los efectos subletales observados en abejas expuestas a imidacloprid se relacionen, a nivel molecular con el estrés oxidativo inducido por este pesticida, sin embargo, aún no se tiene claro el mecanismo molecular con el que actúa.

El estrés oxidativo se produce cuando las defensas antioxidantes de un organismo son incapaces de contrarrestar las agresiones oxidantes (radicales libres) y, en consecuencia, pueden alterar varios constituyentes celulares (lípidos, ADN y proteínas), lo que conduce a trastornos del funcionamiento

de tejidos y órganos (Gauthier et al., 2018). En abejas expuestas a otro insecticida sistémico, fipronil, se observaron daños histopatológicos en el cerebro de la abeja que se relacionan con deficiencias en los procesos de desintoxicación y control de ROS (Farder-Gomes et al., 2021). En el sistema de regulación oxidativa participan enzimas encargadas de transformar las ROS en especies menos nocivas dentro de las que se encuentran superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) que actúan directamente sobre las ROS y se ha visto que su actividad se ve alterada en abejas que han sido expuestas a imidacloprid (Balieira et al., 2018).

El proteoma se puede definir como el contenido total de proteínas de una célula que se caracteriza con respecto a su localización, interacciones, modificaciones postraduccionales y recambio, en un momento determinado (Aslam et al., 2017). La producción de ROS de forma descontrolada, genera modificaciones reversibles y/o irreversibles en el proteoma, que pueden afectar la función o estructura de las proteínas, ocasionando alteraciones en las vías metabólicas reguladas por estas (Rocha et al., 2009). La proteómica como herramienta, permite, identificar las variaciones en la abundancia de las proteínas ante un estímulo o estado biológico y así analizar las implicaciones metabólicas que esto conlleve (Larance & Lamond, 2015); por lo que, un enfoque proteómico puede generar nuevos conocimientos sobre la respuesta de las abejas a ROS desde una perspectiva de sistemas y plasticidad del proteoma antioxidante (Tomanek et al., 2015), debido a que existen pocos estudios que usan este enfoque para evaluar el impacto de imidacloprid en *A. mellifera*.

Es por ello que se plantea que el insecticida imidacloprid (IMI) puede interactuar con enzimas del sistema antioxidante como lo son CAT, GPX1 y SOD afectando directamente el equilibrio oxidativo e indirectamente otras vías metabólicas reguladas por estas enzimas. Basados en la anterior hipótesis, el objetivo del presente estudio fue describir las interacciones de IMI con CAT, GPX1 y SOD mediante una aproximación computacional, así como evaluar la respuesta de las proteínas relacionadas con estrés oxidativo de extractos proteicos de *A. mellifera* expuestas al insecticida imidacloprid por medio de una aproximación proteómica, con el fin de aportar en la dilucidación de los mecanismos por los cuales IMI produce efectos subletales observados en abejas.

1. Materiales y métodos

A continuación, se presenta la metodología empleada para la extracción de proteínas, el análisis de datos obtenidos de la expresión de enzimas asociadas con estrés oxidativo, así como, el modelado y acoplamiento molecular entre el insecticida y CAT, GPX1 y SOD.

1.1 Obtención de abejas y diseño experimental

Se obtuvieron abejas obreras de edades mixtas del apiario ubicado en la Universidad Nacional de Colombia en la ciudad de Bogotá que representaban entre un 90 a 95 % del total de la colmena. La dosis subletal utilizada se tomó de un estudio previo (He et al., 2021), se definieron 3 tratamientos con dosis menores al 5 % a la LD50 seleccionada. Este principio ha sido empleado en estudios anteriores para imidacloprid (Boily et al., 2013). Considerando esto, la LD50 seleccionada fue de 132 ng/abeja y se definieron 3 tratamientos resumidos en la tabla 1. En total se usaron 30 individuos por tratamiento incluido el control. El experimento fue diseñado en 2 partes, la parte uno tuvo como objetivo analizar los efectos de imidacloprid sobre la expresión de proteínas de estrés oxidativo posterior a 24 horas de exposición vía oral de abejas a imidacloprid. La parte 2, se diseñó para describir, por métodos de acoplamiento molecular, las interacciones que se producen entre imidacloprid y las enzimas CAT, GPX1 y SOD para relacionar los efectos observados en la parte 1 con el sistema antioxidante de la abeja. Los métodos y procedimientos se describen a continuación.

Tabla 1. Dosis de insecticida utilizadas para el tratamiento de abejas.

Tratamiento	Dosis (ng/abeja)
1	0,3
2	0,6
3	1,2

1.2 Exposición a imidacloprid

Para la preparación de las dosis, se utilizó la presentación comercial de imidacloprid, usando

solución de sacarosa estéril al 30% m/v. La solución control estaba compuesta solo por sacarosa al 30% m/v. Posteriormente a su preparación, las soluciones se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las abejas se colectaron entre las 8 y 10 de la mañana en tubos cónicos de 115 x 30 mm, después se anestesiaron por frío, posicionándolas en un baño de hielo, luego de reducir su movimiento se acomodaron una por una en tubos de plástico asegurando que la proboscis quedara libre para la administración del insecticida, luego las antenas de las abejas fueron estimuladas con sacarosa para inducir la extensión de la proboscis y suministrar la dosis de imidacloprid o la dosis control.

Las abejas alimentadas con el insecticida y el control se liberaron en cajas de plástico de 13 x 10 x 9,5 cm, manteniendo como fuente de alimento sacarosa al 30% m/v, así como, temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $65\pm 5\%$ por 24 horas, transcurrido este tiempo, las abejas fueron sacrificadas por congelación empleando nitrógeno líquido, posteriormente, se almacenaron a -80°C .

1.3 Extracción de proteínas

Se seccionó la cabeza del tórax-abdomen de cada abeja usando una cuchilla estéril. Posteriormente, se depositaron en tubos de 1,5 mL uno para cada sección respectiva y se lavaron con solución salina (NaCl 0.9% m/v) por triplicado, después se añadió buffer fosfato (Na_2HPO_4 32.5 mM, NaH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 400 mM, pH 7,6.) en una relación de 10 μL / 1mg de muestra, se mezcló y homogenizó por 20 minutos en baño de hielo para luego sonicar durante 30 minutos en baño de hielo. Enseguida, las mezclas fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, luego se centrifugaron nuevamente a 15000 RFC por 10 minutos a 4 °C. Se retiraron los sobrenadantes y se traspasaron a tubos falcon de 1,5 mL para su uso posterior. Los precipitados por su parte se les agregó nuevamente buffer fosfato en relación 2 μL / 1 mg de muestra, se mezclaron y se centrifugaron nuevamente a 15000 RFC durante 10 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se adicionó a los tubos anteriormente separados. Los precipitados resultantes se trataron con buffer de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Nonidet P40 1% v/v, deoxicolato de sodio 0,5% p/v, SDS 0,1% p/v) en una relación de 10 μL / 1 mg de muestra inicial, se homogenizaron por 10 minutos y se sonicaron durante 30 minutos todo esto

en un baño de hielo, luego fueron centrifugadas a 15000 rpm por 10 min a 4 °C, por último, se tomaron los sobrenadantes y se traspasaron a los tubos con las proteínas solubles extraídas anteriormente mientras que los pellets se descartaron.

Las proteínas solubles se trataron con ácido tricloro acético (TCA) hasta alcanzar una concentración final de 10% m/v con el fin de precipitar las proteínas manteniéndolas en baño de hielo durante 10 minutos. Luego, fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 10 minutos a 4 °C consiguiendo un pellet con las proteínas precipitadas, luego el pellet fue lavado con 500 µL de acetona fría, resuspendiendo el pellet con ayuda de pipeta y vortex, después se centrifugaron a 15000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, este proceso se realizó 2 veces.

Para la reconstitución del pellet se usó el buffer de lisis empleado anteriormente en una relación de 4 µL de buffer/ 1 mg de muestra inicial, se adicionó y se homogenizo por 5 minutos en baño de hielo, se sonicó durante 2 minutos y se almacenó a -70°C.

Las proteínas obtenidas se redujeron utilizando el agente reductor ditroteitol (DDT) (5 mM), para ello, se adicionó y las muestras se incubaron durante una hora a 37 °C, luego, se alquilaron adicionando yodoacetamida (15 mM) e incubando las muestras por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, los extractos proteicos obtenidos se les adicionó tripsina (grado secuenciación de Promega) en una relación 1:50 (proteasa: extracto proteico), se dejó incubar durante una hora a 37 °C, se desalinizaron usando columnas C18 de centrifugación y se secaron usando el equipo speedvac de concentración al vacío. Las muestras fueron rotuladas y enviadas a la universidad de Rio de Janeiro, Brasil en donde se realizó el procesamiento de las mismas empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem - LC-MS/MS, estas muestras están pendientes de recepción por lo que no se incluirán en los resultados.

1.4 Determinación de variaciones en la expresión de proteínas asociadas con estrés oxidativo

Se realizo un gel de electroforesis de poliacrilamida con el fin de evidenciar el éxito de la extracción de proteínas, así como, una evaluación cualitativa de las variaciones en la expresión de

proteínas.

Para la preparación del gel, inicialmente se prepararon las soluciones respectivas de acrilamida 30 % m/v (acrilamida, bis-acrilamida), tris (1,5 M pH 8,8), tris (1,0 M pH 8,8), SDS (10 % m/v), persulfato de amonio (10 % m/v), buffer de corrido (1X), solución comassie y buffer Leammly (pH 6,8), posteriormente de obtener la mezcla de acrilamida, se agregó el persulfato, se disolvió y se vertió en un molde de gel de poliacrilamida, evitando la formación de burbujas de aire; luego de polimerizado, se sembraron las muestras obtenidas de la extracción proteica, de acuerdo a la distribución mencionada en la Figura 1 y se empleó el marcador molecular Thermo Fisher #26637 de 8 pesos moleculares.

Los extractos proteicos obtenidos fueron cuantificados empleando el reactivo de Bradford con el fin de ajustar la concentración a 10 mg/mL para la siembra en el gel, debido al uso de TCA como precipitante, las muestras estaban ácidas, por lo que, fue necesario centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos y resuspender las muestras en buffer Leammy 1X, posteriormente se agregó beta-mercaptoetanol para alcanzar una concentración de 2,5 % v/v, se calentaron a 100 °C por 5 minutos y se sembraron 20 µL en cada pozo, adicionalmente se sembró albumina (10 mg/mL) como control de peso molecular en el carril 9.

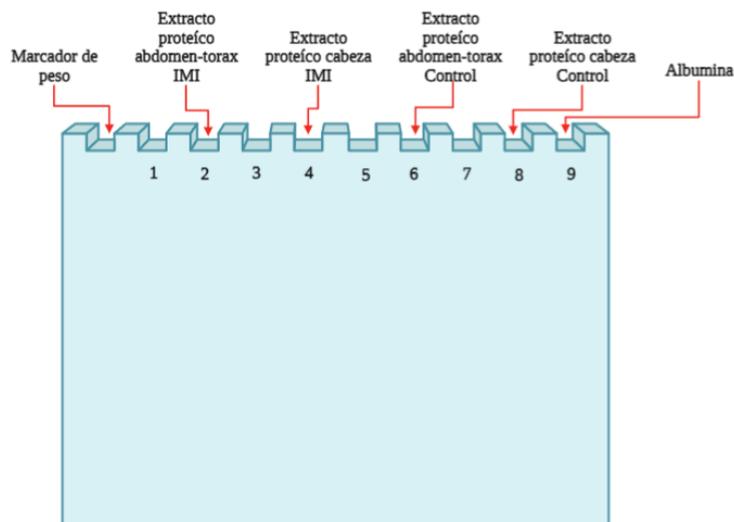


Figura 1. Distribución de siembra de muestras en gel de poliacrilamida

Para analizar las bandas obtenidas, se empleó el software *GelAnalyzer* (Istvan Lazar Jr) , allí se utilizó como input la imagen obtenida del gel, luego, se identificaron los picos de las bandas visibles de acuerdo a los perfiles observados, se inició con el carril del marcador de peso, el cual nos brindaría

la curva de calibración para el peso molecular de las proteínas para posteriormente continuar con los demás carriles hasta obtener el perfil electroforético de las 4 muestras sembradas.

1.5 Obtención de secuencias, modelado de estructura tridimensional de proteínas, validación de modelos y mapeo de dominios funcionales.

Las secuencias de las proteínas CAT (código de acceso: Q8I9W0), SOD (Q7YXM6 y Q7YXM5) y GPX1 (Q7YXM2) fueron extraídas de la base de datos UniProt en formato FASTA esto debido a que no existen estructuras de las mismas para abejas en el Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). La estructura de imidacloprid fue recuperada de PubChem con el siguiente código de acceso IMI: 86418, se descargó en formato SDF y se optimizó empleando la herramienta de optimización automática del software Avogadro (Hanwell et al., 2012), luego se guardaron en formato PDB para su posterior uso en el acoplamiento molecular.

Las proteínas fueron modeladas implementando el servidor de modelado de homología de proteínas SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse et al., 2018) para obtener sus estructuras tridimensionales. Se construyeron los modelos con base en las secuencias en formato FASTA obtenidas anteriormente, se descargaron en formato PDB, se removieron las moléculas de agua así como cofactores presentes empleando Chimera UCSF (Pettersen et al., 2004). La calidad de la estructura estereoquímica de los modelos obtenidos se inspeccionó mediante diagramas de Ramachandran que se obtuvieron por medio de la herramienta web Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu>) empleando las estructuras en formato PDB previamente modeladas (Williams et al., 2018). Se mapearon dominios y motivos funcionales utilizando InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) en donde se realizó la búsqueda de las enzimas utilizando el código UNIPROT para cada una de ellas (Blum et al., 2021), la información fue extraída y visualizada usando el programa DOG, se ingresó la cantidad de residuos con los que cuenta cada enzima y posteriormente se agregaron las proporciones de residuos pertenecientes a los dominios/motivos de las enzimas, se etiquetaron y las imágenes se descargaron en formato JPEG (Ren et al., 2009).

1.6 Acoplamiento molecular y evaluación de interacciones

El acoplamiento molecular se llevó a cabo usando el software PyRx que emplea AUTODOCK VINA como herramienta para el acoplamiento (Dallakyan & Olson, 2015). Se cargó el insecticida imidacloprid y las enzimas CAT, GPX1, SOD1 y SOD2 en formato PDB, el software preparó estas moléculas como ligando y macromoléculas respectivamente en formato PDBQT al ser elegidas manualmente, posteriormente se realizó el acoplamiento molecular ciego por lo que no se definió un tamaño de caja específico y se seleccionó la pose con menor energía de afinidad. El archivo PDBQT del acoplamiento resultante se procesó con la ayuda del software Pymol para eliminar las demás poses obtenidas, generando un archivo PDB con la pose seleccionada, este último archivo se cargó en la sección de interacciones receptor-ligando del software Discovery Studio, se seleccionó la opción de diagrama en 2D y se guardó la imagen en formato JGEP. Las demás visualizaciones se crearon con Chimera UCSF (Pettersen et al., 2004).

1.7 Diseño de red de interacciones

Se empleó el software Cytoscape (Shannon et al., 2003), dentro del cual se utilizó el plugin de String protein query, allí se realizó la búsqueda por nombre de las proteínas, catalase, superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2 y glutathione peroxidase 1 (se buscó en idioma inglés por preferencias del software), se definieron los parámetros de puntaje de confiabilidad (0,7), interactores adicionales máximos (30) y la especie *A. mellifera*, además de solicitar cargar datos enriquecidos con el fin de obtener las vías metabólicas relacionadas con estas enzimas del sistema antioxidante.

Luego de obtener los datos desde STRING, se procedió a editar la red generando un color de nodos de acuerdo al puntaje de interacción proteína-proteína obtenido y escogiendo el tipo de mapeo continuo que permitiera visualizar la distribución de colores, se cargaron los datos de enriquecimiento funcional de acuerdo al genoma, estos datos se filtraron, tomando solo datos de procesos biológicos GO y vías KEGG para su posterior análisis.

2. Resultados y discusión

A continuación, se presentan el perfil electroforético obtenido, así como, las interacciones generadas entre imidacloprid y las enzimas CAT, SOD y GPX1 obtenidos por acoplamiento molecular, y, por último, la relación entre las vías relacionadas con las enzimas CAT, SOD y GPX1 y los efectos subletales observados en abejas.

2.1 Variaciones en la expresión de proteínas en abdomen-tórax y cabeza de *A. mellifera*.

Se obtuvieron diferencias en la cantidad de bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida, evidenciándose una mayor cantidad de bandas en abdomen-tórax, con respecto al control a diferencia de los extractos de cabeza donde se observa una disminución en la expresión de proteínas (Figura 2 y tabla 2).

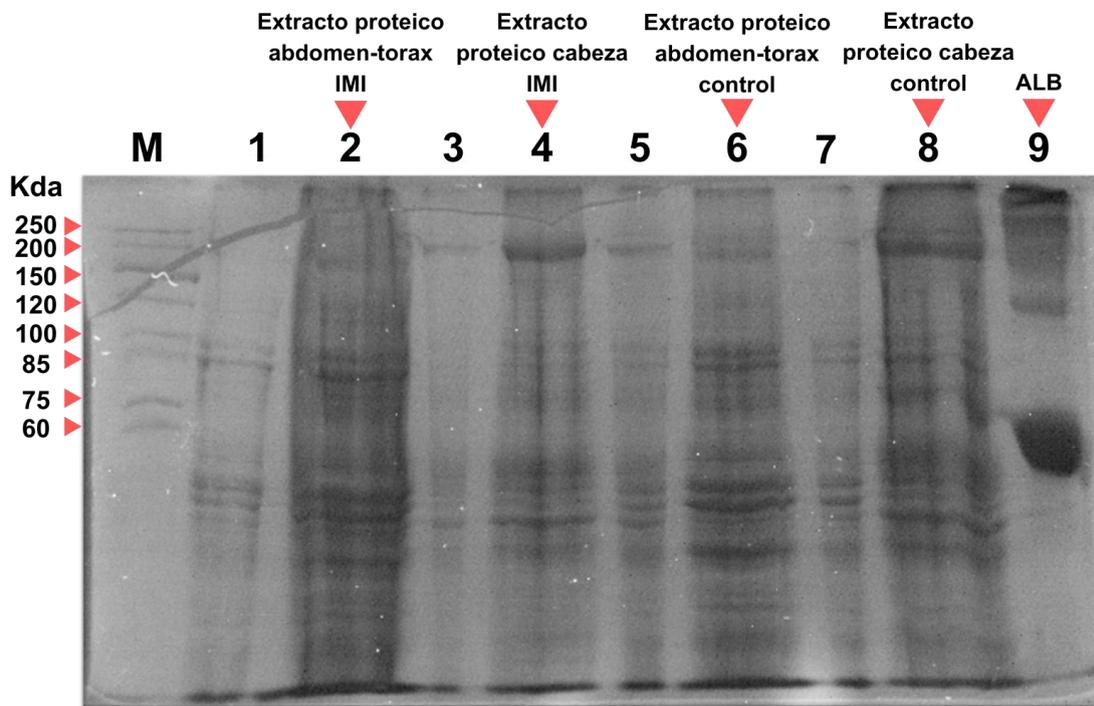


Figura 2. Expresión de proteínas en abdomen-tórax y cabeza de abejas expuestas a imidacloprid.

Tabla 2. Cantidades de bandas observadas en gel de poliacrilamida. los carriles 2 y 4 hacen referencia a muestras de abdomen-tórax y carriles 4 y 8 a muestras de cabeza

Carril	Numero de bandas	Intervalo MW
2	36	59-307
6	22	59-185
4	10	59-247

8	33	59-244
---	----	--------

Estos datos obtenidos están de acuerdo con lo reportado en otros estudios, en donde se han observado una disminución en la transcripción de genes del cerebro, los cuales están involucrados en procesos de respuesta inmunitaria, desintoxicación y antioxidante, siendo los procesos de oxidoreducción los más afectados (Zhiguo Li et al., 2019). En abdomen-tórax se ha evidenciado un aumento en la expresión génica en abejas *Apis cerana* expuestas a IMI, estas proteínas estaban relacionadas metabolismo de proteínas, vía de señalización FoxO y vía de señalización mTOR (Gao et al., 2020).

El contraste observado en los resultados arrojados en el perfil electroforético demuestra que la respuesta del organismo varía de acuerdo al tejido analizado y debido a que el intestino es el primer órgano que entra en contacto con el insecticida luego de consumido, se esperaría que la respuesta del organismo sea diferente al cerebro en donde las cantidades del insecticida que llegan son menores.

2.2 Análisis de los dominios funcionales en las enzimas del estrés oxidativo (CAT, SOD y GPX) de *A. mellifera*

En la Figura 3, se presentan los gráficos de Ramachandran, que permiten evidenciar la calidad de las estructuras de las enzimas obtenidas por modelación, los residuos resaltados en violeta en la Figura 1A se encuentran en regiones no permitidas de la estructura de la enzima catalasa, para las demás enzimas (Figura 3B, 3C y 3D), los gráficos de Ramachandran muestran que las estructuras de las enzimas modeladas exhibieron residuos en zonas permitidas con valores por encima del 98 %.

La Figura 4 representa los dominios funcionales de las enzimas, resaltando el dominio de enlace, sitio activo y residuos de unión al cofactor, lo cual se utilizará más adelante para analizar como las interacciones entre insecticida y cada una de las enzimas podrían influir sobre su actividad enzimática. Dentro de los dominios funcionales de CAT se reconocieron los residuos catalíticos His-74 y Asn-147, el residuo de Tyr-357 implicado en la unión del cofactor de hierro, así como el bolsillo de unión del grupo hemo (Figura 2A) y el dominio de enlace caracterizado por la formación de una estructura secundaria tipo alfa con presencia de residuos polares. GPX1 (Figura 2B) cuenta con 3

residuos catalíticos Cys-45, Gln-81, Tyr-134 y su correspondiente sitio activo caracterizado por presencia de residuos básicos y polares. La SOD1 contiene residuos implicados en la unión a átomos de cobre y zinc, así como 2 sitios de unión al ligando (Figura 2C) y la SOD2 que presenta los residuos His-46, His-94, Asp-178 y His-182 involucrados en la unión a manganeso.

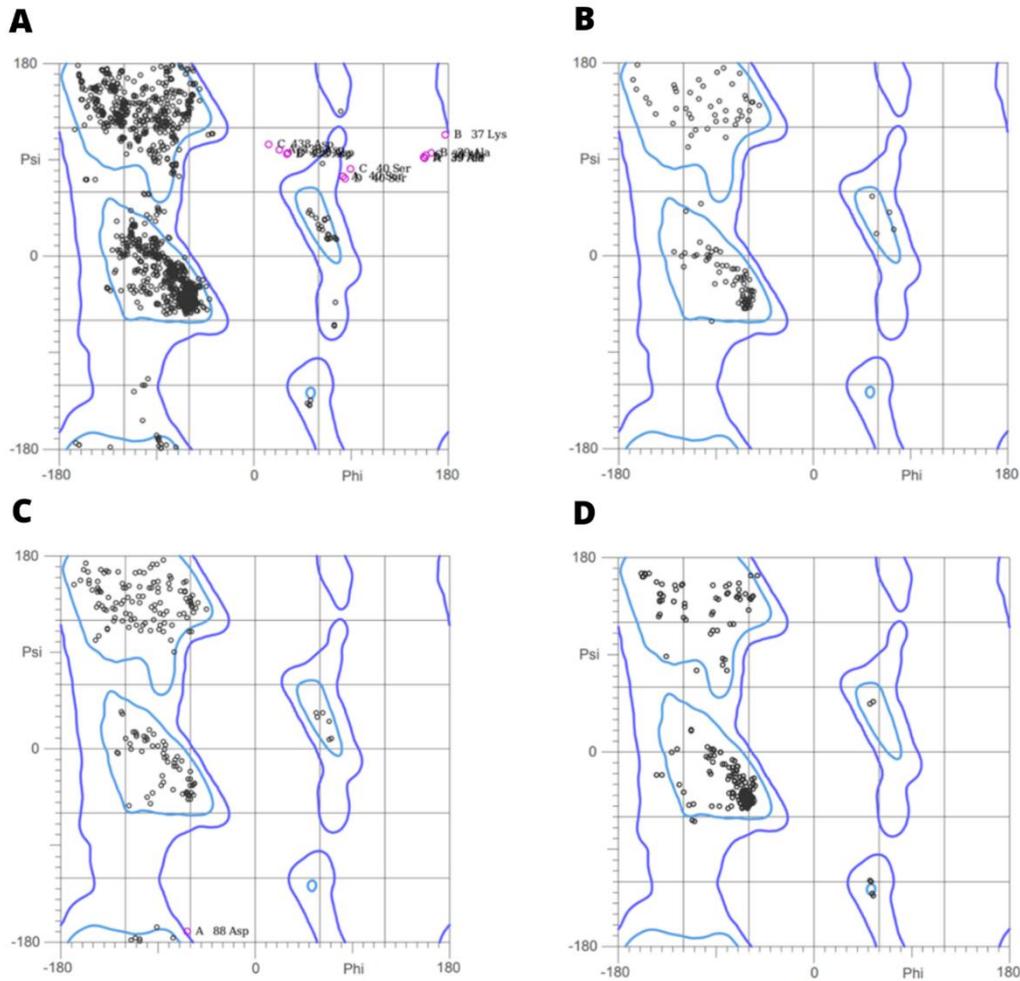


Figura 3. Gráficos de Ramachandran para las estructuras 3D de A. Catalasa (Con 98,7% de todos los residuos en regiones permitidas). B. Glutathión peroxidasa 1 (100%). C. Superóxido dismutasa 1 (99,7%). D. Superóxido dismutasa 2 (100%).

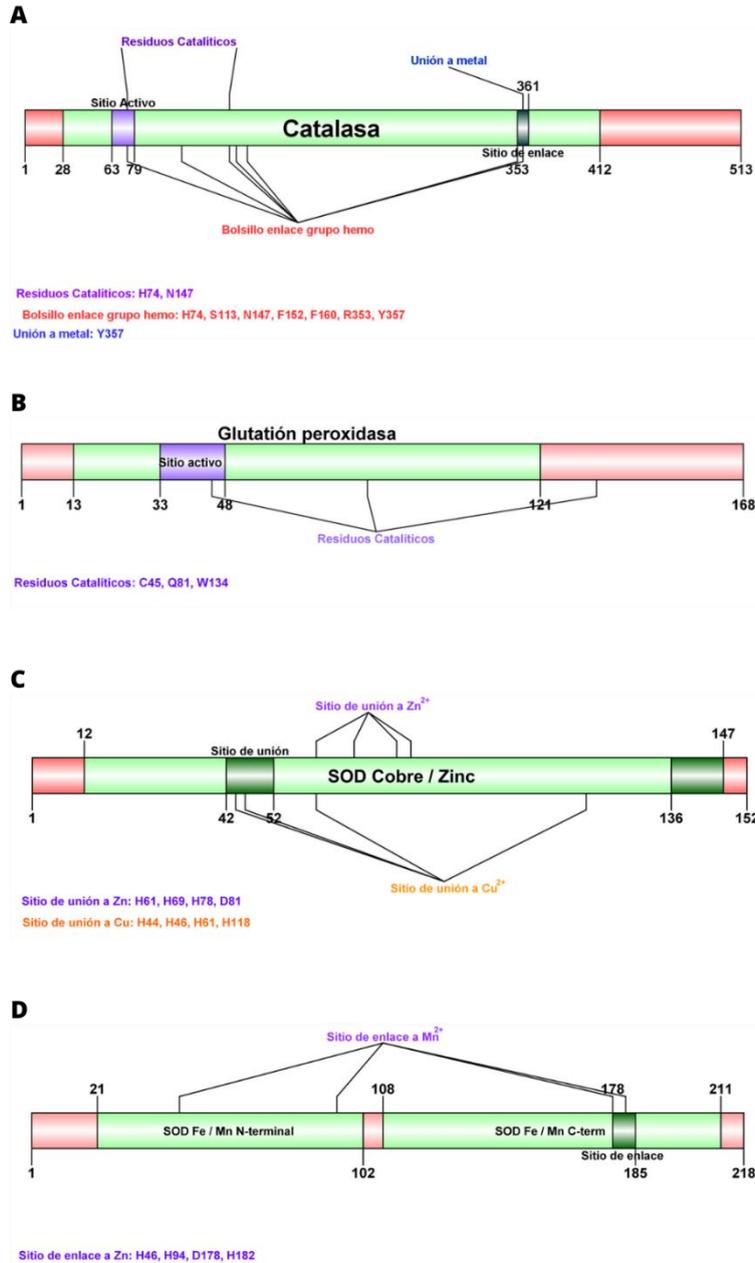


Figura 4. Dominios y regiones funcionales de las proteínas de estrés oxidativo de *A. mellifera*. A. Catalasa (CAT) B. glutatión peroxidasa 1 (GPX1) C. superóxido dismutasa 1 (SOD1) y D. superóxido dismutasa 2 (SOD2).

2.2 El insecticida IMI puede perjudicar la estabilidad estructural de CAT y GPX1 de *A.*

mellifera

En la figura 5 se muestra las diferentes interacciones que se producen entre IMI y los residuos de CAT&GPX1 (Izquierda), Así como, la ubicación del insecticida en la estructura tridimensional de la enzima (Derecha). Lo observado en los acoplamiento molecular revelan que el insecticida produjo una afinidad de enlace (AE) de $-6,6 \text{ Kcal mol}^{-1}$, posicionándose en una zona próxima al sitio activo de CAT por medio de interacciones hidrofóbicas principalmente, sin embargo, se registran

puentes de hidrógeno con residuos de Ala-122 y Gly-120 (Figura 3A), este último relacionado con la interfase tetramérica de la subunidad A de CAT. La estabilidad estructural ofrecida por la tetramerización en CAT es esencial para su funcionamiento (Murugan & Hung, 2012), proporciona estabilidad térmica (Sepasi Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018), así como protección al sitio activo y el grupo hemo facilitando completar el ciclo de reacción e impidiendo la formación de radicales hidroxilos (Putnam et al., 2000).

Se observa un comportamiento similar en GPX1 (AE: $-5.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$) interactuando con residuos de interfase dimérica, principalmente de forma hidrofóbica y un puente de hidrógeno con el residuo de Ile-127 sin afectar directamente el sitio activo (figura 3B), sin embargo, puede producir modificaciones estructurales que producen alteraciones en la actividad enzimática como la limitación del acceso de complejos lipídicos al sitio activo de GPX1.

En extractos proteicos de intestino medio de abejas expuestas a dosis de 0,7 o 2,0 ng/mL de IMI, se ve aumentada la actividad catalítica de CAT (Balieira et al., 2018). En otro estudio, se reportó una reducción en la actividad de CAT en el intestino de abejas expuestas a 1,0 $\mu\text{g/L}$ de IMI, así como, un aumento en la actividad de GPX (Pal et al., 2022), contrario a lo reportado en abejas expuestas a 0,001 mg/mL de IMI donde se observó una reducción de los niveles de GPX en intestino medio y una alta actividad en hemolinfa. Estas diferencias pueden deberse a la metodología empleada o la cantidad de proteína que se expresa en cada tejido (Syama & Sreeranjit Kumar, 2022), sin embargo, las alteraciones en la actividad enzimática inducidas por IMI sobre CAT y GPX pueden asociarse con modificaciones estructurales que eviten el funcionamiento normal de la enzima haciendo que se evite el control de H_2O_2 y produciéndose efectos adversos en el organismo. Se ha informado de la inducción de sobre carga de hierro en abejas expuestas a IMI, lo cual se ve agravado con la presencia de H_2O_2 en el citoplasma al producirse la reacción fenton que genera radicales OH^\cdot con alto potencial oxidante que puede producir la muerte del insecto (He et al., 2021).

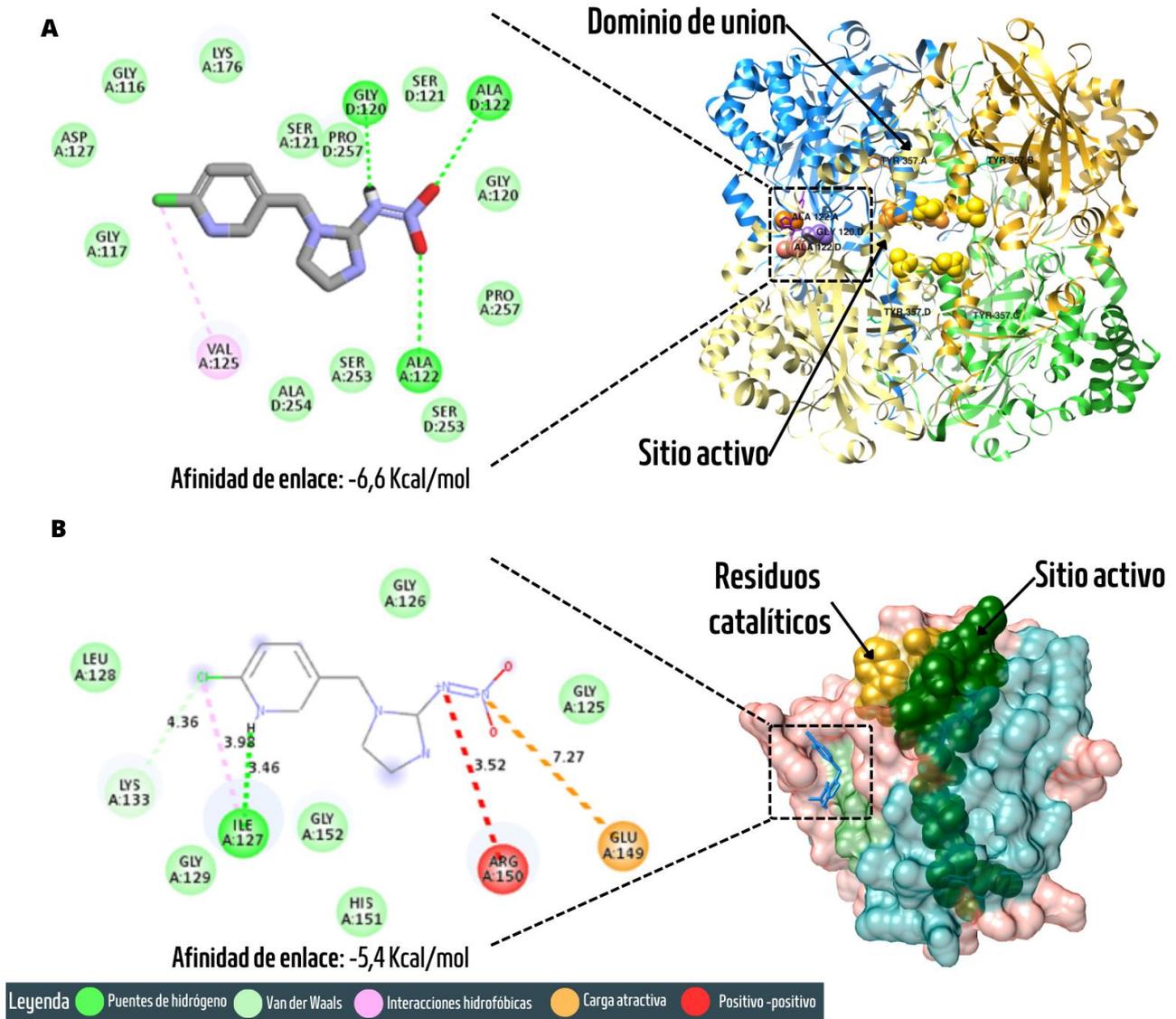


Figura 5. Interacciones CAT & GPXI – Imidacloprid. A. IMI-CAT. Ubicación de IMI en CAT y residuos de enlace por puentes de hidrógeno (esferas) a IMI (Morado). B. IMI – GPXI. Sitio activo (verde), residuos catalíticos (Dorado), los demás colores diferencian la estructura secundaria de la enzima.

2.3 La interfase dimérica de SOD1 y el sitio activo de SOD2 se pueden ver afectados por la exposición a imidacloprid.

El insecticida IMI tuvo una afinidad de enlace de $-6,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ que produjo interacciones hidrofóbicas con el residuo Ile-111, este es un residuo que integra la interfase dimérica de la enzima SOD1 (Figura 6A). Para que la actividad catalítica de la enzima se desencadene se requiere la formación del homodimero, siendo, la interfase dimérica clave para ello (Cerchia et al., 2022). Esta estructura se conserva en varias especies y se observa que en SOD con residuos mutantes, la actividad catalítica disminuye (Wintjens et al., 2008), así como, la alta termo tolerancia que esta presenta, llegando a ocasionar inactivación por calor (Castellano et al., 2009). Por otro lado, IMI se ubica próximo a los

residuos implicados en la unión del átomo de cobre (His-118). En otras especies, estos residuos participan en la protección del sitio activo actuando como segunda barrera (Castellano et al., 2009). Una situación similar ocurre entre IMI y SOD2, donde se generan puentes de hidrógeno con residuos de Asn-190 e Ile-137, así como, con Thr-53 e His-50 los cuales se ubican en una región próxima del átomo de manganeso (Figura 6B). Es por ello que, IMI podría producir los efectos mencionados anteriormente al modificar estructuralmente la enzima, afectando la estructura cuaternaria SOD1 y perjudicando el ingreso del ion superóxido al sitio activo de SOD2.

SOD controla la concentración de iones superóxido producidos por el metabolismo normal celular al convertirlos en H_2O_2 , transmitiendo información sobre el estado metabólico de la mitocondrias al resto de la célula (relación O_2/H_2O_2) (Palma et al., 2020). El H_2O_2 cumple funciones importantes como molécula señal. En concentraciones normales pueden modular el crecimiento, la actividad hormonal, los mecanismos de transducción sináptica, las actividades de los factores de transcripción, ingesta de alimentos y metabolismo energético (Damiano et al., 2020). Abejas reinas y obreras de la especie *A. mellifera* expuestas a dosis de IMI entre 0,1-1,0 $\mu g/L$, registraron un descenso en la actividad de SOD en hemolinfa (Paleolog et al., 2021). Se observó un comportamiento similar en intestino medio de abejas *A. mellifera* expuestas a 36,0 $ng/abeja$ de IMI donde la actividad de SOD disminuyó (Zhi Li et al., 2022). De acuerdo a esto la reducción reportada de la actividad catalítica de SOD puede estar relacionado con las interacciones descritas en este artículo entre IMI, SOD1 y SOD2 que puede hacer que la enzima tenga un comportamiento similar a lo informado en enzimas mutantes, posiblemente por alteraciones en las cargas de los residuos donde interactúa el insecticida con la enzima.

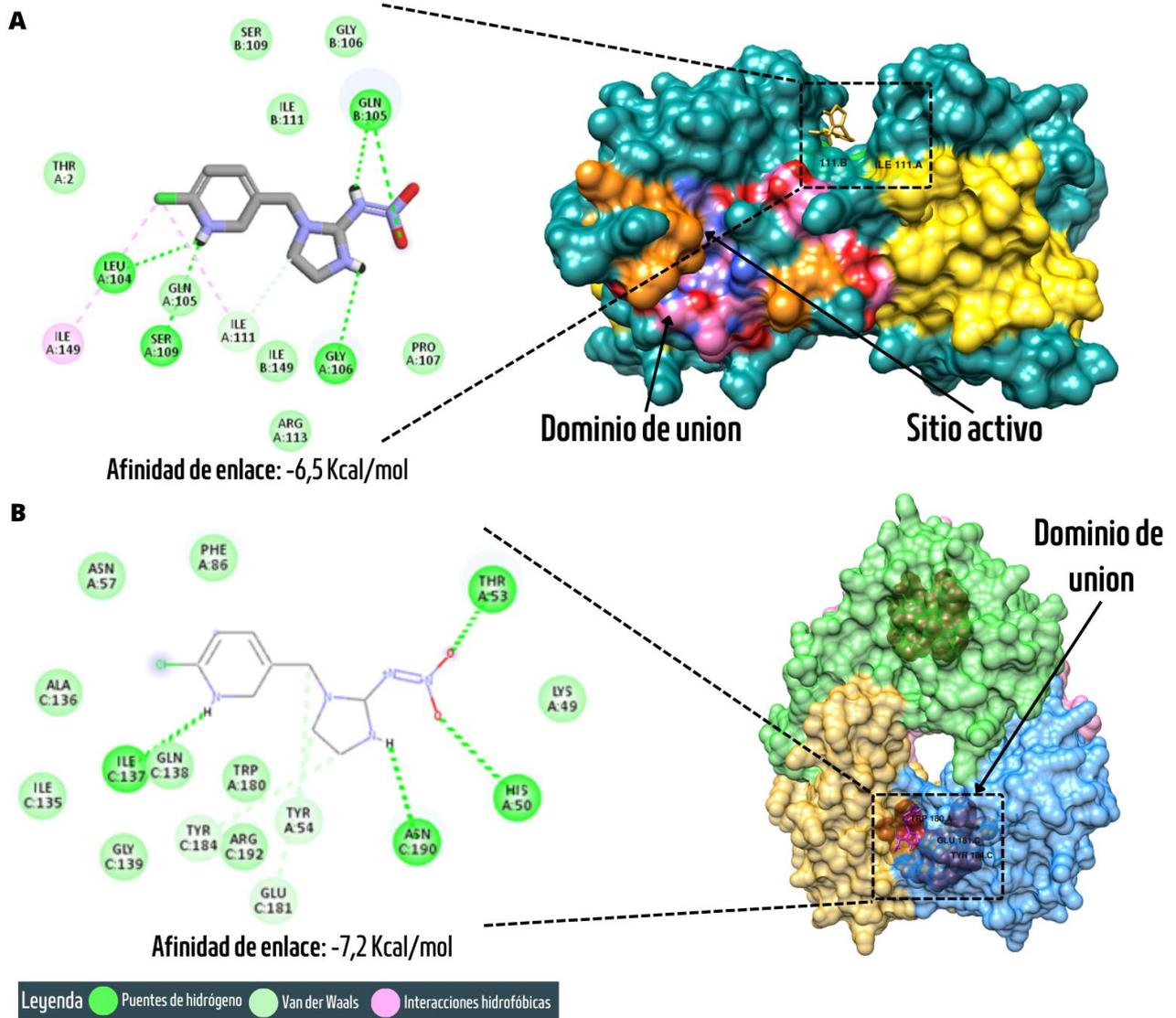


Figura 6. Interacciones SOD1 & SOD2 – Imidacloprid. A. SOD1 – IMI. Sitio de enlace (rosa), estructura secundaria (hojas beta – amarillo, hélices alfa - naranja). B. SOD2 – IMI. sitio de enlace (Verde) y sitio activo (Fucsia), los demás colores diferencian las 4 cadenas de la enzima.

2.4 Implicaciones de posible inhibición de las enzimas de estrés oxidativo de *A. mellifera*

Las afectaciones generadas por el insecticida IMI en el intestino medio, a nivel general conducen a un incremento en la actividad catalítica de CAT, y GPX, así como, reducción en la actividad catalítica de SOD. El exceso de ROS causa daños graves en varias especies de abejas, incluida *A. mellifera*, desencadena apoptosis en células intestinales, generan daños en la matriz y las crestas mitocondriales (Catae et al., 2017; Da Silva Cruz et al., 2009), produce un descenso en las reservas totales de energía (Mokkapatil et al., 2022) y afectación en los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones (Balieira et al., 2018). La disminución en la producción de ATP podría afectar el proceso de desintoxicación mediado por enzimas de respuesta a estrés oxidativo, que demandan una alta cantidad

de energía.

El mecanismo de eliminación de ROS implica la conversión, por SOD, del ion superóxido en peróxido de hidrógeno que migra fuera de la mitocondria donde actúa como mensajero y su exceso es eliminado por CAT y GPX1, al fallar esta sinergia, se producen los efectos mencionados anteriormente por exceso de O_2^- o de H_2O_2 . Uno de los procesos que se ha visto deteriorados en abejas expuestas a IMI es el aprendizaje y la memoria (Aguiar et al., 2023). Las bases moleculares de estos procesos dependen en gran parte de la concentración de Ca^{2+} intracelular, el cual, regula la transcripción y traducción de proteínas, como, la anisomicina asociada con la conformación de memoria a largo plazo, también, regula la actividad del proteasoma, importante en la degradación de proteínas y actuando como paso previo para la formación de memoria (Eisenhardt, 2014). La concentración de Ca^{2+} se ha visto que resulta aumentada por la presencia de H_2O_2 que activa la vía fosfolipasa C involucrada en la liberación de Ca^{2+} almacenado (Zhang et al., 2016) lo que se puede relacionar con la disminución en la memoria de abejas al fallar el sistema antioxidante de CAT, GPX y SOD, se produciría un aumento en la cantidad de H_2O_2 que activa la vía fosfolipasa C, produciendo el incremento en la concentración de Ca^{2+} .

3.1 Asociación de los efectos subletales observados en *A. mellifera* y las vías metabólicas relacionadas con enzimas antioxidantes.

Se obtuvo una red de interacción proteína-proteína compuesta por 33 nodos, 184 bordes y un puntaje de interacción que varió entre 0,80 y 2,85 (Figura 7), de acuerdo a los datos de enriquecimiento KEGG, las vías metabólicas relacionadas con las enzimas CAT, SOD1, SOD2 y GPX1 son la vía de regulación de longevidad (ame04213), metabolismo del glutatión (ame00480), vía de señalización FoxO (ame04068), metabolismo del carbono (ame01200), metabolismo de β -alanina (ame00410), metabolismo del propanoato (ame00640) y biosíntesis de ácidos grasos insaturados (ame01040) y dentro de los organelos involucrados se encuentran el ribosoma (ame03010) y el peroxisoma (ame04146) (Figura 8).

El análisis de proceso biológico GO arrojó entre otras los procesos relacionados con

metabolismo de péptidos (GO:0006518), biosíntesis de péptidos (GO:0043043), translación mitocondrial (GO:0032543) y respuesta a especies reactivas de oxígeno (GO:0000302) (Figura 9).

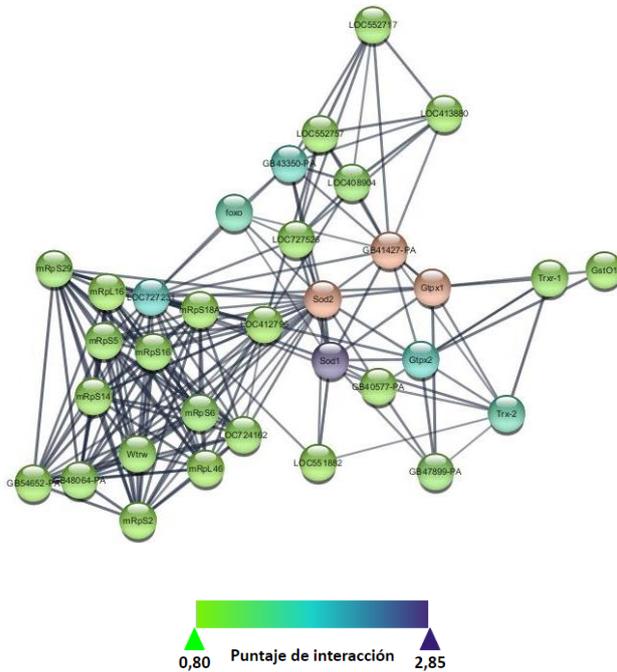


Figura 7. Red de interacción proteína-proteína obtenida para CAT, GPX1, SOD1 y SOD2.

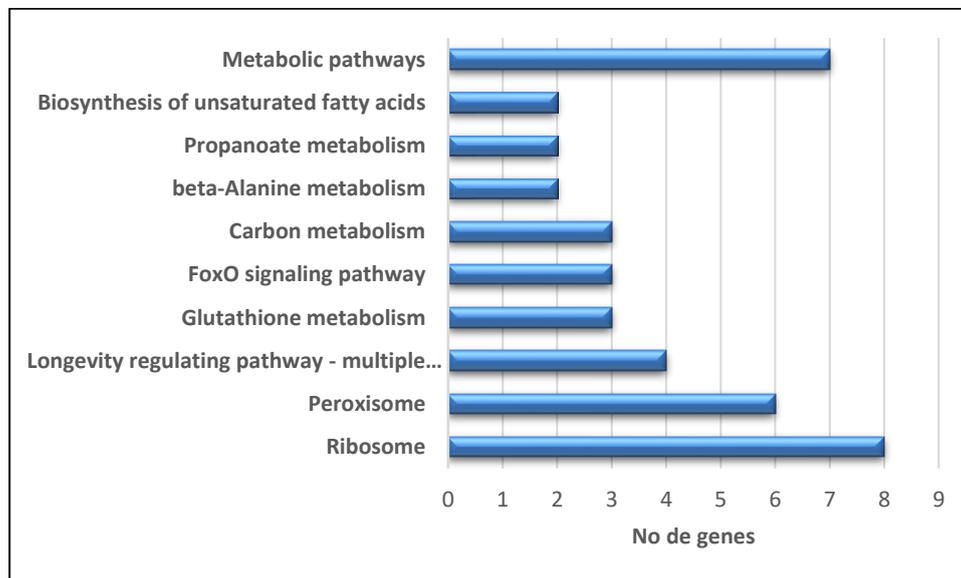


Figura 8. Clasificación de vías KEGG involucradas con las enzimas CAT, GPX1, SOD1 y SOD2

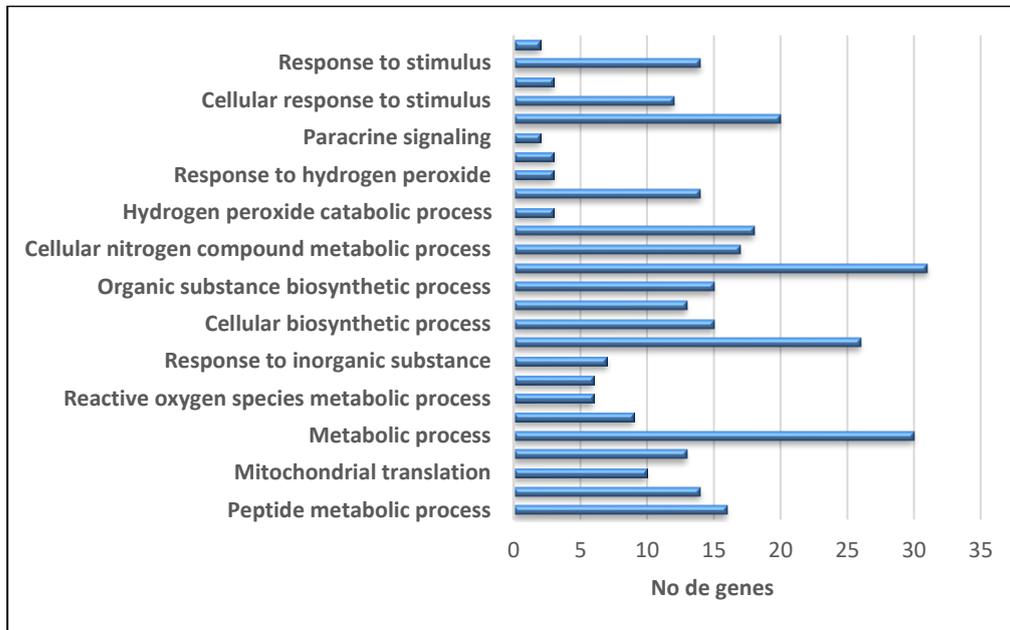


Figura 9. Clasificación procesos biológicos GO involucradas con las enzimas CAT, GPX1, SOD1 y SOD2

En diversos estudios se han observado efectos subletales en abejas expuestas a IMI, como deterioro en la memoria y aprendizaje (Aguiar et al., 2023), reducción en la actividad antimicrobiana de la hemolinfa y capacidad de supervivencia (Brandt et al., 2016), reducción en la puesta de huevos y producción de crías (Wu-Smart & Spivak, 2016), estos efectos fisiológicos tienen como base procesos metabólicos los cuales según lo observado en el análisis de enriquecimiento están relacionados con las enzimas CAT, GPX1, SOD1 y SOD2.

Los procesos de memoria y aprendizaje están relacionados con la concentración de calcio influenciada por la concentración de H_2O_2 , además los procesos de sinapsis neuronal requieren bastante energía (Zhang et al., 2016) y se necesita de la síntesis de lípidos que proporciona los elementos de la membrana plasmática de las neuronas. La respuesta de la actividad antimicrobiana se relaciona con la vía Toll e Imd la cual según lo depositado bajo el código GB41427-PA en KEGG esta involucrada en este proceso, influyendo en la producción de péptidos con capacidad antimicrobiana, lo cual se asocia con lo obtenido en el análisis GO. La vía FoxO está involucrada en procesos de apoptosis, control de ciclo celular, metabolismo celular y resistencia a estrés oxidativo, de acuerdo con lo depositado en KEGG, en este estudio se evidencio que CAT y SOD1 son las enzimas que más podrían influenciar en la activación de esta vía lo que se puede relacionar con la disminución en la supervivencia de abejas a largo plazo y por último, los procesos de reproducción que se ven reducidos en abejas expuestas a IMI

podrían relacionarse con fallas en el metabolismo energético en donde se han reportado reducción en las reservas de energía por daños en las crestas y complejos mitocondriales relacionados con la actividad antioxidante alterada de las enzimas descritas en este estudio (Nicodemo et al., 2014).

3. Conclusiones

El presente estudio permitió describir como el insecticida imidacloprid afecta las enzimas del sistema antioxidante, así como, las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. Se identifico que el insecticida puede afectar de forma diferenciada la expresión de proteínas de acuerdo al tejido evaluado

IMI generó una mayor afinidad de enlace con la enzima superóxido dismutasa 2. En todas las enzimas puede actuar de forma indirecta, debido a que, puede modificar la estabilidad estructural de estas al ubicarse en regiones de unión de dímeros en CAT y SOD, así como en regiones cercanas al sitio activo en SOD2 o GPX1 donde puede limitar el acceso de complejos lipídicos al sitio activo de la enzima, esto puede relacionarse con las variaciones reportadas en la actividad catalítica de estas enzimas en abejas expuestas a IMI.

Se evidencio la relación que puede tener la actividad de CAT, GPX1, SOD1 y SOD2 con los efectos subletales reportados en abejas expuestas a IMI al estar involucradas en vías metabólicas como la biosíntesis de lípidos, la vía toll e Imd o la vía foxO, por lo que se puede concluir que ellas juegan un papel fundamental en dichos efectos.

Agradecimientos

Agradezco inicialmente a mi familia quienes han sido parte fundamental en mi proceso de formación, acompañándome en cada momento de la carrera, a mis amigos y compañeros que siempre me dieron su apoyo en momentos que lo necesite, muchas veces me dieron la fuerza para no desistir a pesar de las adversidades y eso es algo que valoro mucho. A mi novia que fue un gran apoyo en el último tramo de mi carrera, brindándome sus consejos y voz de aliento, también a mis profesores, en especial a mi director de grado que me guio y me dio consejos no solo a nivel académico sino también a nivel personal y en general a todas las personas que hicieron parte de este proceso, de cada una aprendí cosas que he aplicado en el transcurso de la vida y de seguro me llevaran a ser un mejor profesional y

una mejor persona.

Referencias

- Aguiar, J. M. R. B. V., Nocelli, R. C. F., Giurfa, M., & Nascimento, F. S. (2023). Neonicotinoid effects on tropical bees: Imidacloprid impairs innate appetitive responsiveness, learning and memory in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Science of The Total Environment*, 877, 162859. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.162859>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/BMW167>
- Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. de J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, 49(5), 562–572. <https://doi.org/10.1007/S13592-018-0583-1/TABLES/3>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA977>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(8), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/S11356-013-1568-2>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.01.001>
- Buszewski, B., Bukowska, M., Ligor, M., & Staneczko-Baranowska, I. (2019). A holistic study of

neonicotinoids neuroactive insecticides—properties, applications, occurrence, and analysis.

Environmental Science and Pollution Research, 26(34), 34723–34740.

<https://doi.org/10.1007/S11356-019-06114-W/TABLES/3>

Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>

Castellano, I., Cecere, F., De Vendittis, A., Cotugno, R., Chambery, A., Di Maro, A., Michniewicz, A., Parlato, G., Masullo, M., Avvedimento, E. V., De Vendittis, E., & Ruocco, M. R. (2009). Rat mitochondrial manganese superoxide dismutase: Amino acid positions involved in covalent modifications, activity, and heat stability. *Biopolymers*, 91(12), 1215–1226.

<https://doi.org/10.1002/BIP.21208>

Catae, A. F., Roat, T. C., Pratavieira, M., Silva Menegasso, A. R. da, Palma, M. S., & Malaspina, O. (2017). Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology* 2017 27:2, 27(2), 109–121. <https://doi.org/10.1007/S10646-017-1874-4>

Cerchia, C., Roscetto, E., Nasso, R., Catania, M. R., De Vendittis, E., Lavecchia, A., Masullo, M., & Rullo, R. (2022). In Silico Identification of Novel Inhibitors Targeting the Homodimeric Interface of Superoxide Dismutase from the Dental Pathogen *Streptococcus mutans*. *Antioxidants*, 11(4), 785. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11040785/S1>

Comisión Europea. (2015). Reglamento de ejecución (UE) No 485/2013 de la comisión. *EFSA Journal*, 13(8), 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013>.

Da Silva Cruz, A., Da Silva-Zacarin, E. C. M., Bueno, O. C., & Malaspina, O. (2009). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biology and Toxicology* 2009 26:2, 26(2), 165–176.

<https://doi.org/10.1007/S10565-009-9126-X>

Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx.

Methods in Molecular Biology, 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19

- Damiano, S., Sozio, C., La Rosa, G., Guida, B., Faraonio, R., Santillo, M., & Mondola, P. (2020). Metabolism Regulation and Redox State: Insight into the Role of Superoxide Dismutase 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/IJMS21186606>
- Dave, G., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1–16.
<https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 52, pp. 81–106).
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Di Noi, A., Casini, S., Campani, T., Cai, G., & Caliani, I. (2021). Review on Sublethal Effects of Environmental Contaminants in Honey Bees (*Apis mellifera*), Knowledge Gaps and Future Perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol. 18, Page 1863, 18(4), 1863. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18041863>
- Eisenhardt, D. (2014). Molecular mechanisms underlying formation of long-term reward memories and extinction memories in the honeybee (*Apis mellifera*). *Learning & Memory*, 21(10), 534–542. <https://doi.org/10.1101/LM.033118.113>
- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Oliveira, L. L. de, Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021). Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). *Science of The Total Environment*, 794, 148678. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148678>
- Gao, J., Jin, S. S., He, Y., Luo, J. H., Xu, C. Q., Wu, Y. Y., Hou, C. S., Wang, Q., & Diao, Q. Y. (2020). Physiological Analysis and Transcriptome Analysis of Asian Honey Bee (*Apis cerana cerana*) in Response to Sublethal Neonicotinoid Imidacloprid. *Insects* 2020, Vol. 11, Page 753, 11(11), 753. <https://doi.org/10.3390/INSECTS11110753>

- Gauthier, M., Aras, P., Paquin, J., & Boily, M. (2018). Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34625-y>
- GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc
- Gómez Maldonado, L. D. (2021). Abejas y otros insectos polinizadores frente al uso indiscriminado de neonicotinoides y fipronil en Colombia. Comentarios a la sentencia del 12 de diciembre de 2019 del Tribunal Administrativo de Cundinamarca. *DA Derecho Animal : Forum of Animal Law Studies*, 12(2), 0208–0216. <https://doi.org/10.5565/REV/DA.575>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>
- He, B., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Qing, Q., Duan, J., Xu, J., Dang, X., Zhou, Z., & Li, Z. (2021). Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 112709.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112709>
- Hung, K. L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., & Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2017.2140>
- Khalifa, S. A. M., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., Alajmi, M. F., Zhao, C., Masry, S. H. D., Abdel-Daim, M. M., Halabi, M. F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M. A. M., & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8).
<https://doi.org/10.3390/INSECTS12080688>
- Larance, M., & Lamond, A. I. (2015). Multidimensional proteomics for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2015 16:5, 16(5), 269–280. <https://doi.org/10.1038/nrm3970>

- Laycock, I., Lenthall, K. M., Barratt, A. T., & Cresswell, J. E. (2012). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology*, *21*(7), 1937–1945. <https://doi.org/10.1007/S10646-012-0927-Y/METRICS>
- Li, G., Zhao, H., Liu, Z., Wang, H., Xu, B., & Guo, X. (2018). The wisdom of honeybee defenses against environmental stresses. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00722>
- Li, Zhi, Duan, J., Chen, L., Wang, Y., Qin, Q., Dang, X., & Zhou, Z. (2022). Melatonin enhances the antioxidant capacity to rescue the honey bee *Apis mellifera* from the ecotoxicological effects caused by environmental imidacloprid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *239*, 113622. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.113622>
- Li, Zhiguo, Yu, T., Chen, Y., Heerman, M., He, J., Huang, J., Nie, H., & Su, S. (2019). Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *156*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.02.001>
- Martin-Culma, N. Y., & Arenas-Suárez, N. E. A.-S. E. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Entramado*, *14*(1), 232–240. <https://doi.org/10.18041/entramado.2018v14n1.27113>
- Mokkapati, J. S., Bednarska, A. J., & Laskowski, R. (2022). Physiological and biochemical response of the solitary bee *Osmia bicornis* exposed to three insecticide-based agrochemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *230*, 113095. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.113095>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, *74*, 291–303. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.10.024>
- Murugan, S., & Hung, H. C. (2012). Biophysical Characterization of the Dimer and Tetramer

Interface Interactions of the Human Cytosolic Malic Enzyme. *PLoS ONE*, 7(12).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050143>

Nicodemo, D., Maioli, M. A., Medeiros, H. C. D., Guelfi, M., Balieira, K. V. B., Jong, D. De, & Mingatto, F. E. (2014). Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity.

Environmental Toxicology and Chemistry, 33(9), 2070–2075. <https://doi.org/10.1002/ETC.2655>

Pal, E., Almasri, H., Paris, L., Diogon, M., Pioz, M., Cousin, M., Sené, D., Tchamitchian, S., Tavares, D. A., Delbac, F., Blot, N., Brunet, J. L., & Belzunces, L. P. (2022). Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenoconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. *Toxics*, 10(3).

<https://doi.org/10.3390/TOXICS10030104>

Paleolog, J., Wilde, J., Miszczak, A., Gancarz, M., & Strachecka, A. (2021). Antioxidation Defenses of *Apis mellifera* Queens and Workers Respond to Imidacloprid in Different Age-Dependent Ways: Old Queens Are Resistant, Foragers Are Not. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(5), 1246. <https://doi.org/10.3390/ANI11051246>

Palma, F. R., He, C., Danes, J. M., Paviani, V., Coelho, D. R., Gantner, B. N., & Bonini, M. G. (2020). Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(10), 701–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7962>

Paris, L., Roussel, M., Pereira, B., Delbac, F., & Diogon, M. (2017). Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1702–1717.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12772>

Perilla Melo, J. E. (2020). *Afectación de colonias apícolas por la utilización del imidacloprid para el control de insectos plaga en zonas de producción agrícola*. [UNAD].

<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/37250>

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., &

Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.

<https://doi.org/10.1002/JCC.20084>

Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295–309. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1999.3458>

Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., & Yao, X. (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Research 2009 19:2*, 19(2), 271–273. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.6>

Rocha, M., Esplugues, J., Hernandez-Mijares, A., & Victor, V. (2009). Mitochondrial-Targeted Antioxidants and Oxidative Stress: A Proteomic Prospective Study. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3052–3062. <https://doi.org/10.2174/138161209789058138>

Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B., & Fuchs, S. (2012). RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera*. *PLOS ONE*, 7(1), e30023. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030023>

Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/GR.1239303>

SiB Colombia (2022) Biodiversidad en Cifras, Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia. Recuperado de: <https://biodiversidad.co/cifras>

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., D Mitchell, E. A., Morrissey, C. A., ... Girolami Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali, V. (2015). Worldwide

integrated assessment of the impact of systemic pesticides on biodiversity and ecosystems

systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites.

Environ Sci Pollut Res, 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

Syama, P. S., & Sreeranjit Kumar, C. V. (2022). Sociobiology. *Sociobiology*, 69(3), e7763–e7763.

<https://doi.org/10.13102/SOCIOBIOLOGY.V69I3.7763>

Tomanek, L., Podrabsky, J. E., Stillman, J. H., & Tomanek, L. (2015). Proteomic responses to

environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1867–1879.

<https://doi.org/10.1242/JEB.116475>

Tribunal Administrativo de Cundinamarca, & ICA. (2023). (31/01/2023). *ICA*, 00000740(00000740),

1–7.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De

Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL:

homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1),

W296–W303. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>

Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V.,

Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J.,

Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More

and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science : A*

Publication of the Protein Society, 27(1), 293. <https://doi.org/10.1002/PRO.3330>

Wintjens, R., Gilis, D., & Rooman, M. (2008). Mn/Fe superoxide dismutase interaction fingerprints

and prediction of oligomerization and metal cofactor from sequence. *Proteins: Structure,*

Function, and Bioinformatics, 70(4), 1564–1577. <https://doi.org/10.1002/PROT.21650>

Wu-Smart, J., & Spivak, M. (2016). Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure

on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/srep32108>

Wu, Y. Y., Luo, Q. H., Hou, C. S., Wang, Q., Dai, P. L., Gao, J., Liu, Y. J., & Diao, Q. Y. (2017).

Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee *Apis mellifera* L. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16245-0>

Wyckhuys, K. A. G., Aebi, A., Bijleveld van Lexmond, M. F. I. J., Bojaca, C. R., Bonmatin, J. M., Furlan, L., Guerrero, J. A., Mai, T. V., Pham, H. V., Sanchez-Bayo, F., & Ikenaka, Y. (2020). Resolving the twin human and environmental health hazards of a plant-based diet. *Environment International*, 144, 106081. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106081>

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/4350965>