



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) POR EXPOSICIÓN A UNA DOSIS SUBLETAL DE FLUPIRADIFURONA**Variation in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) gene expression by exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone**María Camila GIRÓN LÓPEZ^{1a}, Ernestina VALADEZ-MOCTEZUMA^{2b}, Mateo VARGAS-HERNÁNDEZ^{3c}¹ Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México – Texcoco Chapingo, Texcoco, México² Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México – Texcoco Chapingo, Texcoco, México³ Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México – Texcoco Chapingo, Texcoco, México^a mcagironl@gmail.com^b evaladezm@chapingo.mx^c vargas_mateo@hotmail.com

* For correspondence: evaladezm@chapingo.mx

Recibido: 21st January 2021. Revisado: 13th July 2022. Aceptado: 25th January 2023.

Editor asociado: Allan Smith

Citation/ citar este artículo como: Girón, M. C., Valadez-Moctezuma, E., Vargas-Hernández, M. (2023). Variación en la expresión de genes de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) por exposición a una dosis subletal de flupiradifurona. *Acta Biol Colomb*, 28(3), 376-384. <https://doi.org/10.15446/abc.v28n3.92972>**RESUMEN**

La industria de los insecticidas ha desarrollado ingredientes activos más seguros para las abejas como la flupiradifurona. Sin embargo, investigaciones recientes proporcionan evidencia de los efectos negativos de esta y su posible influencia en el deterioro de la salud de los polinizadores. Durante el experimento, abejas obreras de edades mixtas de *A. mellifera* fueron expuestas a una dosis oral, única y subletal de flupiradifurona (645 ng/abeja) y se evaluaron solo durante el primer día tras la exposición a 0,5, 1, 3, 6 y 24 horas. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR, siglas en inglés), se cuantificó la alteración de la expresión génica relativa ocasionada tras la exposición a este insecticida. Un total de cinco genes fueron cuantificados: tres genes antioxidantes primarios (Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD1) y Tioredoxin dismutasa (Trxr1), un gen de detoxificación (Citocromo P450 9Q3 (CYP9Q3)) y un gen con actividad neuronal (Acetilcolinesterasa, AChE1). El gen endógeno proteína ribosómica S18 (RPS18) permitió estimar la expresión génica relativa como la respuesta a la exposición al insecticida. El gen AChE1 fue sobreexpresado hasta las seis horas tras la exposición; los restantes genes CYP9Q3, CAT, SOD1 y Trxr1 presentaron un comportamiento similar. En una dosis subletal y a intervalos de tiempo corto, la flupiradifurona causa alteración en la expresión relativa de cinco genes en individuos de abejas melíferas tras la exposición oral, lo cual podría causar a largo plazo un efecto adverso en la salud de las colmenas.

Palabras clave: agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina; efecto subletal; estrés oxidativo; flupiradifurona; disminución de polinizadores.**ABSTRACT**

The insecticide industry has developed more bee-safe active ingredients such as flupyradifurone. However, recent research provides evidence of the negative effects of this and its possible influence on the deterioration of the health of pollinators. During the experiment, mixed-age worker bees of *A. mellifera* were exposed to a single, sublethal oral dose of flupyradifurone (645 ng/bee) and were assessed only for the first day after exposure to 0.5, 1, 3, 6, and 24 hours. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR), the alteration in gene expression caused by exposure to this insecticide was quantified. A total of five

genes were quantified: three primary antioxidant genes (Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD1) and Thioredoxin dismutase (Trxr1), one detoxification gene (Cytochrome P450 9Q3 (CYP9Q3)) and one gene with neuronal activity (Acetylcholinesterase, AChE1). The endogenous ribosomal protein S18 (RPS18) gene allowed the estimation of relative gene expression as the response to insecticide exposure. The AChE1 gene was overexpressed up to six hours after exposure; the remaining CYP9Q3, CAT, SOD1, and Trxr1 genes presented a similar behavior. At a sublethal dose and at short time intervals, flupiradifurone causes alteration in the relative expression of five genes in individual honeybees after oral exposure, which could cause a long-term adverse effect on hive health.

Keywords: nicotinic acetylcholine receptor agonist; sublethal effect; oxidative stress; flupiradifurone; pollinators decline.

INTRODUCCIÓN

Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) es una especie polinizadora ecológica y económicamente importante en el mundo (Rand et al., 2015) que anualmente agrega \$ 15 mil millones en servicios de polinización a la agricultura tan solo en Norteamérica. No obstante, las continuas y altas tasas de mortalidad de las colonias (colapso de colonias, o Colony Collapse Disorder, CCD, por sus siglas en inglés) amenazan las poblaciones necesarias para polinizar frutas, nueces y otros cultivos (Calderone, 2012). En los últimos años se han propiciado múltiples estudios sobre los factores que influyen en la disminución de sus poblaciones como la intensificación de la agricultura y las enfermedades propias de éstas (Diaz Meraz, 2015; González-Varo et al., 2013). Aunque no se ha identificado una causa única para la pérdida de individuos, los insecticidas neurotóxicos, que son aquellos que alteran el desarrollo y funciones del sistema nervioso, sobresalen debido a su amplio uso en los sistemas agrícolas (Godfray et al., 2014; Macias et al., 2018).

En la investigación sobre el efecto de insecticidas en abejas, ha sido particularmente clave la comprensión del impacto de los productos a base de neonicotinoides, que actúan en el sistema nervioso central. Los insecticidas a base de butenóidos son las nuevas herramientas para el manejo de plagas y poseen el mismo modo de acción de los neonicotinoides, como agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) (Elbert et al., 2008). Los nAChR imitan al neurotransmisor de la acetilcolina, lo cual provoca que este no puede ser activado por la enzima en su forma natural, y causa excitación de la célula nerviosa, la persistencia de este efecto provoca una alteración en el sistema nervioso del insecto y, posteriormente, su colapso (Nauen et al., 2015). La exposición subletal a insecticidas de este tipo, puede provocar efectos en el comportamiento, la capacidad cognitiva y en general la salud de las abejas (Bryden et al., 2013; Williamson y Wright, 2013; Gregor et al., 2018; Hernandez et al., 2018). En consecuencia, se ha propiciado el desarrollo de nuevas moléculas (Parkinson et al., 2020) en la que compuestos como el butenóido flupiradifurona (FPF) se presentan como una alternativa más segura (Campbell et al., 2016). Pero dado que FPF tiene el mismo modo de acción que los neonicotinoides, se podrían proveer efectos nocivos similares a los reportados

para éstos. Investigaciones recientes de abejas expuestas a FPF proporcionaron evidencia empírica de que episodios de exposición a dosis subletales de este insecticida alteran la expresión de varios genes del sistema inmune y genes de desintoxicación, y en consecuencia conducen a la disminución generalizada de la salud de las abejas (Al Naggar y Baer, 2019; Chakrabarti et al., 2020).

Puesto que la incursión en el mercado de FPF en el 2015 es relativamente reciente, existe una necesidad inminente de evaluar los posibles efectos a nivel genético en los polinizadores. Los efectos de este insecticida no se pueden detectar mediante evaluaciones eco-toxicológicas estándar, sin embargo, puede ejercer un impacto negativo a nivel ecológico. Los estudios de FPF en abejas se han centrado principalmente en determinar la mortalidad y en evaluar los efectos sobre la capacidad cognitiva (Glaberman et al., 2014; Tan et al., 2017; Hesselbach y Scheiner, 2018; Tosi y Nieh, 2019), en analizar la alteración en genes de detoxificación y del sistema inmune (Al Naggar y Baer, 2019) o en determinar el estrés fisiológico tras exponerlas a periodos breve (horas) y prolongados (días) (Chakrabarti et al., 2020). El objetivo de este estudio fue cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR, siglas en inglés) la expresión relativa de tres genes antioxidantes (CAT, SOD1 y Trxr1), un gen neurotransmisor (AChE1) y un gen de desintoxicación (CYP9Q3) en poblaciones de abejas expuestas y no expuestas a flupiradifurona.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron 200 abejas obreras de edades mixtas de una colonia de *A. mellifera* en el municipio de Texcoco, México. La colonia estaba sana y sin signos de enfermedad. Las abejas fueron trasladadas al laboratorio de BiogenetixLab donde se mantuvieron bajo condiciones de cautiverio a 20° C durante todo el experimento. Para simular las condiciones de la colmena, las abejas permanecieron en completa oscuridad durante toda la prueba, excepto en las evaluaciones. Se siguió el protocolo establecido por la European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP (2010) para evaluar los efectos secundarios de los productos fitosanitarios en las abejas.

BIOENSAYO: PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN.

La población de abejas obreras con edades mixtas fue separada en dos grupos de 100 individuos cada uno. El grupo control fue alimentado con sacarosa al 50% y el grupo experimental con sacarosa 50% + FPF 645 ng/abeja. Cada abeja recibió una cantidad aproximada de 645 nanogramos (ng) de FPF, concentración recomendada en la hoja de seguridad del producto (Al Naggar y Baer, 2019). Previo al inicio del bioensayo, se realizaron pruebas de consumo de la solución de sacarosa y se determinó el consumo promedio por abeja en 20 μ L (Quiroga-Murcia et al. 2017). Tanto el grupo control como el experimental permanecieron en inanición durante dos horas (h) antes de suministrar las soluciones y posteriormente fueron expuestas a alimentación grupal con cajas de Petri que contenían la solución control y el tratamiento, en donde las abejas compartieron la solución entre ellas durante tres horas. Luego del tratamiento de alimentación se les proporcionó a ambos grupos solución fresca de sacarosa 50% *ad libitum*. Después de ser alimentadas con la solución se recolectaron al azar tres abejas en cinco tiempos distintos: 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h para cada grupo, el control y el tratamiento, con tres repeticiones para cada tiempo evaluado y se almacenaron en nitrógeno líquido para el análisis posterior.

DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN GÉNICA TRAS LA EXPOSICIÓN

Extracción de ARN total y síntesis de cADN. Para la extracción del ARN se utilizó el cuerpo completo de la abeja. Se analizaron tres replicas por cada tratamiento en cada tiempo evaluado para un total de 90 especímenes. Para realizar la cuantificación de la expresión génica, se aisló el ARN total usando el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, CA, EE. UU) siguiendo los protocolos del fabricante. La valoración de la cantidad y la pureza de ARN se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop™ (ND-1000, Thermo Scientific, EE. UU.). Los valores obtenidos estuvieron en un rango entre 178,6 y 436 ng μ L⁻¹ (concentración de ARN) y absorbancia (A260/280) igual a 2,1, valores entre 2,0-2,2 corresponden a ARN de alta pureza (Martínez-López et al., 2013).

La síntesis de la primera hebra de cDNA fue realizada usando 1 μ g del ARN extraído utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, EE. UU), el análisis de calidad con espectrofotometría mostró valores en un rango entre 303 y 1000 ng μ L⁻¹ (concentración de cDNA) y absorbancia (A260/280) igual a 1,8.

Se usó PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) de dos pasos para cuantificar la expresión de los cinco genes de interés. La información de los genes utilizados se indica en la Tabla 1. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ L que contenía 5 μ L SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 1 μ L (10pM) de cada

iniciador y 50 ng de cDNA usando dos repeticiones técnicas por muestra. Las condiciones de termociclaje (CFX96 Deep Well, BioRad, EE. UU.) fueron: un ciclo de 1,5 min a 95 °C, 39 ciclos (95 °C durante 15 s para desnaturalización; una etapa de alineamiento y extensión de 60 °C durante 30 s). Para cada gen, se realizó el análisis de Melt-Curve usando los incrementos y tiempos preestablecidos en el equipo. Los genes objetivo se normalizaron en todas las ejecuciones de RT-qPCR utilizando el gen de referencia de la proteína Ribosomal 18S (RPS18). Este gen endógeno codifica una proteína que es un componente de la subunidad menor del ribosoma (40S), dicha proteína pertenece a la familia S13P de proteínas ribosómicas. En estudios realizados con abejas los niveles de expresión de este gen son considerados estables en cualquier tejido y bajo cualquier manipulación experimental (Scharlaken et al., 2008).

ANÁLISIS DE DATOS

Durante el proceso de RT-qPCR, el material genético presente en las muestras se amplifica y se copia muchas veces. Esta amplificación es producida a través de una serie de ciclos en los cuales los genes duplican su cantidad (uno en dos, dos en cuatro y así sucesivamente) hasta que el espectrofotómetro puede detectar su presencia. El ciclo en el cual empieza la detección determina el valor Ct, siendo un valor inverso a la cantidad del gen presente en la muestra. A mayor número de ciclos para detectar el gen mayor será el valor Ct, lo cual significa que la cantidad del gen es pequeña porque debe copiarse muchas veces hasta que se pueda detectar. Si, por el contrario, la cantidad de ciclos es baja, significa que la cantidad del gen de interés es grande porque no es necesario generar muchas copias para detectarlo.

Los cálculos para la cuantificación relativa de la expresión génica están basados en la comparación de los valores Ct. Para garantizar que la variación de estos se debe a cambios biológicos reales se requiere una normalización de los datos. El método Livak ($\Delta\Delta$ Ct) compara los valores Ct de la muestra de interés con el valor Ct de un gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001), para este estudio, se utilizó el gen RPS18. El método, supone que las eficiencias de amplificación del gen de referencia y el gen de interés son casi del 100%

El método $\Delta\Delta$ Ct compara la variación de la expresión (Δ Ct) del gen de interés con la del gen de referencia, primero en condiciones experimentales y luego en controles:

Después, con este método se comparan las diferencias entre las muestras del experimento y las del control:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{grupo experimental}) - \Delta\text{Ct}(\text{control})$$

se utilizó la ecuación 1:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 2 - ((\text{CtGOI} - \text{CtRef}) \text{Exp} - (\text{CtGOI objetivo} - \text{CtRef}) \text{Ctl}) \quad (1)$$

Tabla 1. Descripción de los genes utilizados en el presente estudio

Serie	Gen	Función	Proteína	Iniciador (qPCR)	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
1	RPS18	Componente ribosomal 18S	Similar a la proteína ribosómica 18S	F: GATTCCCGATTGGTTTTTGA R: CCCAATAATGACGCAAACCT	152	(Moon et al., 2018)
2	AChE 1	Actividad neuronal de las sinapsis colinérgicas	Acetilcolinesterasa	F: GACGCGAAGACCATATCCGT R: TCTGTGTCTTGAAGTCCGC	150	(Alburaki et al., 2017)
3	CAT		Catalasa	F:TCCACTCATTCTGTGGTAAG R: GCCGGATCGAAGGCTATTT	87	(Gregorc et al., 2018)
4	SOD 1	Antioxidantes primarios	Superóxido dismutasa 1	F:CGTTCCGTGTAGTCGAGAAAT R: GGTACTCTCCGGTTGTCAAA	101	
5	Trxr1		Tioredoxin dismutasa	F: GCAAGTACTGTTGCCAGGA R:GTGTTTGTCTATCTTATCCACCCA	130	(Alburaki et al., 2019)
6	CYP9Q3	Metabolismo desintoxicación de toxinas (Li et al., 2007)	Citocromo P450	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC R: GGTCAAAATGGTGGTGAC	107	(Mao et al., 2011)

Donde 2 es la eficiencia que se fija en el 100 %, Ctl es el grupo control, Exp es el grupo de tratamiento experimental, GOI es el gen de interés (CAT, SOD1, Trxr1, AchE1 y CYP9Q3) y Ref es el gen de referencia (RPS18).

Como el método $\Delta\Delta Ct$ supone una eficiencia de expresión igual entre el gen de referencia y el gen de interés, cualquier resultado positivo se traducirá en la sobreexpresión del gen y cualquier resultado negativo en la subexpresión.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SAS 9.4 para Windows. Para ver los efectos de la exposición al insecticida FPF en la expresión génica, se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribuciones normales y prueba de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans) ($p = 0,05$).

RESULTADOS

Al comparar la expresión de los cinco genes entre abejas expuestas y no expuestas al insecticida flupiradifurona a través del tiempo, se encontró variación en la expresión génica, con diferencia significativa ($p = 0,05$) solo para el gen CYP9Q3. Este estudio se suma a las pocas investigaciones que evalúan los efectos de dosis subletales de FPF en abejas (Al Naggar y Baer, 2019; Hesselbach y Scheiner, 2019; Chakrabarti et al., 2020).

Al comparar las muestras tratadas respecto al control para el tiempo muestreado, se observaron diferencias en la expresión génica relativa de éstos. La expresión del gen neurotransmisor AchE1 (Fig. 1a) fue regulada positivamente durante los primeros cuatro tiempos de evaluación y regulada negativamente en el último, 0,5 h: 1,20; 1 h: 3,07; 3 h: 3,13; 6 h: 1,08 y 24 h: -7,36 veces.

El gen CYP9Q3 implicado en el metabolismo de detoxificación, fue regulado positivamente en los tiempos

de 0,5 h: 0,26; 1 h: 0,56; y 3 h: 7,79 veces; luego se reguló negativamente a las 6 h: -15,22 veces y finalmente 24 h después de la exposición fue sobre expresado 1,59 veces (Fig. 1e).

El gen CAT se reguló positivamente 1,42 veces al evaluarlo tras 0,5 h de exposición. Disminuyó su expresión -1,82 veces a 1 h, presentó una sobreexpresión en 1,39 veces a las 3 h y por último se reguló negativamente a las 6 h y 24 h en -3,23 y -9,84 veces respectivamente (Fig. 1b).

El gen SOD1 se reguló a la baja tras 0,5 h en -0.14 veces, se sobre expresó 0,98 veces tras 1 h y 2,22 a las 3 h, fue regulado negativamente al evaluar luego de 6 h de exposición en -54,46 veces y fue regulado al alta 0,67 veces luego de 24 h (Fig. 1c)

El gen Trxr1 (Fig. 1d) se sobreexpresó al evaluar en los tiempos de 0,5 h, 1 h y 3 h en 0,96; 0,70 y 3,09 respectivamente. Presentó una regulación negativa tras 6 h de exposición en -7,18 veces y fue regulado positivamente luego de 24 h en 4,86 veces.

DISCUSIÓN

Las abejas llevan a cabo servicios ecosistémicos vitales al polinizar plantas silvestres y cultivos de importancia económica, pero al hacerlo están expuestas a una amplia variedad de xenobióticos naturales y sintéticos, incluidos los plaguicidas (Manjon et al., 2018). Compuestos como la flupiradifurona, han sido desarrollados como alternativas más seguras (Campbell et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios en abejas melíferas han evidenciado que la exposición a concentraciones subletales causan efectos a nivel fisiológico, cognitivo y genético (Hesselbach y Scheiner, 2018, 2019; Al Naggar y Baer, 2019; Chakrabarti et al., 2020). Los agentes xenobióticos no solo alteran la

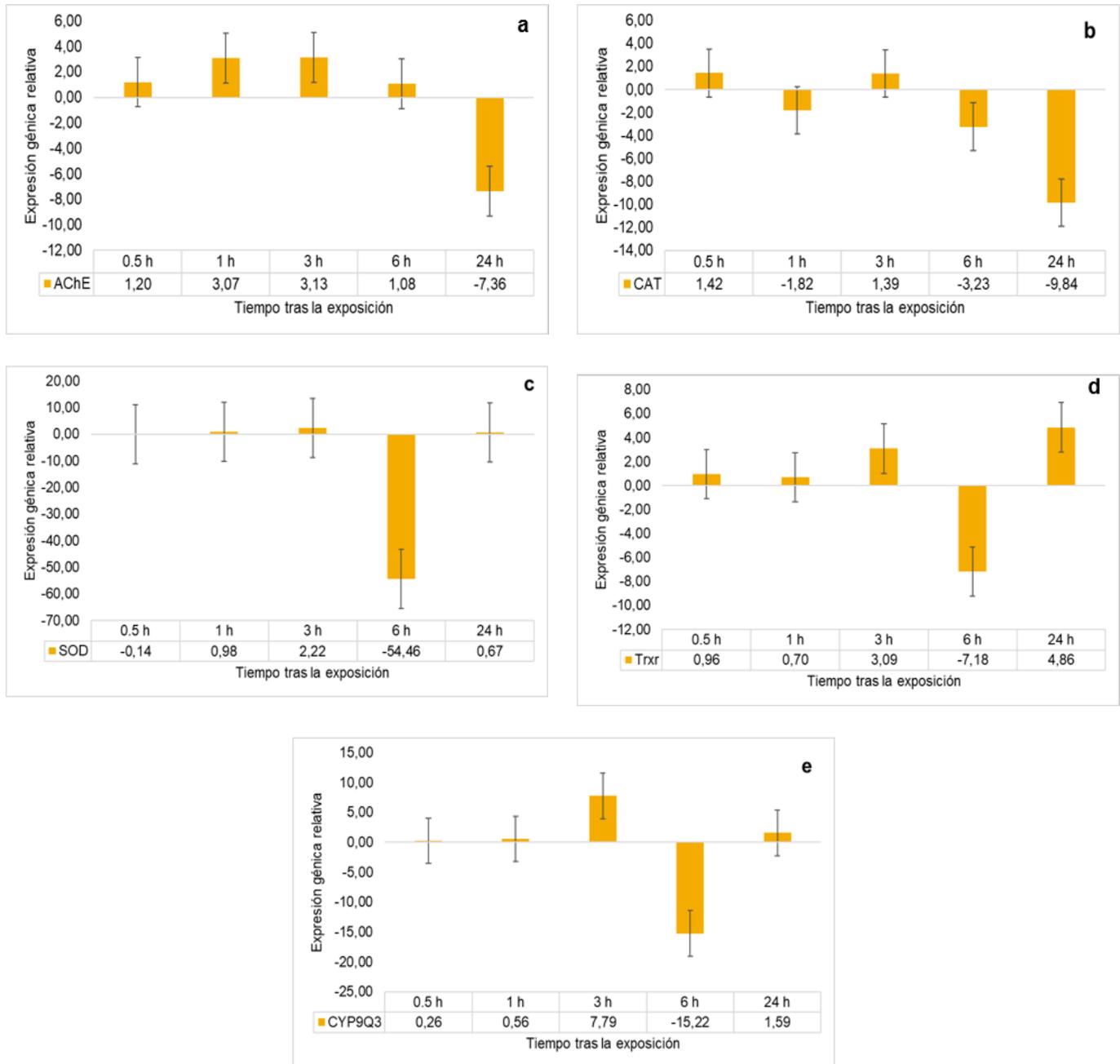


Figura 1. Análisis de la expresión génica relativa para los genes en estudio durante cada tiempo muestreado luego de la exposición a flupiradifurona. Tratamientos con * presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans) ($p = 0.05$). Los genes de interés durante los tiempos de evaluación tras la exposición: a: AChE; b: CAT; c: SOD; d: Trxr y e: CYP9Q3. Los datos fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para comparar las muestras tratadas contra las no tratadas en cada tiempo de muestreo utilizando el gen RPS18 como normalizador.

integridad del genoma, sino que también pueden afectar directa o indirectamente la expresión de los genes (Shugart y Theodorakis, 1994). Con base en los datos obtenidos por RT-qPCR se puede observar la modificación en la expresión génica relativa de algunos genes importantes en el metabolismo de las abejas. En este estudio se reporta por primera vez los efectos en la expresión de los genes AchE1,

CAT, CYP9Q3, SOD1 y Trxr1 tras la exposición en un tiempo corto a dosis subletal de FPF en abejas melíferas.

La acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza la acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas y por lo tanto juega un papel clave en el sistema nervioso central de los insectos (Toutant, 1989). Los butenólidos, grupo al cual pertenece FPF, a diferencia de los piretroides y organofosforados, no se catalogan como

inhibidores de la enzima AchE. Estudios demuestran que algunos insecticidas neonicotinoides, que al igual que FPF pertenecen al grupo cuatro Moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina en la clasificación del Comité de Acción de Resistencia de Insecticidas (IRAC, por sus siglas en inglés), sugieren la capacidad de los agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina para modular la actividad de la AchE (Palmer et al., 2013; Györi et al., 2017). La población de abejas melíferas aquí estudiada, muestra que la expresión relativa del gen AchE1 fue regulada positivamente sin diferencias estadísticas significativas ($p = 0,05$). Se ha reportado que abejas bajo condiciones controladas y expuestas a dosis subletales de insecticidas de tipo neonicotinoides (imidacloprid y clotianidina) elevan la actividad de la AchE (Boily et al., 2013). Los efectos indirectos de los neonicotinoides pueden contribuir al funcionamiento desequilibrado del sistema colinérgico y como consecuencia se pueden desencadenar algunos mecanismos compensatorios, incluida la modulación de la actividad AchE (Palmer et al., 2013; Györi et al., 2017). Debido a que los neonicotinoides ocupan el sitio de unión de la acetilcolina, este neurotransmisor se acumula en las sinapsis y estimula la enzima AchE (Györi et al., 2017), lo cual pudo haber ocurrido con la población de abejas en este estudio luego de ser expuestas a la FPF. La alteración e interrupción de la señalización colinérgica por insecticidas pueden modificar el funcionamiento neuromuscular y el comportamiento de las abejas, lo que perjudica el éxito de la búsqueda de alimentos que podría finalmente repercutir en la salud de la colonia (Christen et al., 2019).

Las monooxigenasas del citocromo P450 catalizan una amplia diversidad de reacciones que contribuyen a la desintoxicación de xenobióticos naturales y sintéticos en insectos (Feyereisen, 2012). El clado CYP9 al cual pertenece el gen CYP9Q3 implicado en la desintoxicación metabólica, fue afectado por la dosis a baja concentración (subletal) de FPF. La población en estudio mostró inducción en la expresión del gen en respuesta a la exposición desde el primer tiempo de evaluación (0,5 h) después de la ingesta del insecticida. Este resultado sugiere que la exposición a dosis subletales de un insecticida desencadena una respuesta genética inmediata. Las transcripciones diferenciales que inducen el CYP9 por algunos pesticidas es un atributo que las abejas comparten con otras especies de insectos (Mao et al., 2011). En un estudio con *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) se reportó que la deltametrina (piretroide) induce la transcripción de CYP9A12 y CYP9A17, dos miembros de la subfamilia CYP9A, aunque se desconoce las funciones que desempeñan estas dos citocromos P450s (Zhou et al., 2010). Dado que la transcripción genética de CYP9Q3 fue inducida selectivamente por flupiradifurona se plantea la posibilidad de que este gen pueda ser útil en el desarrollo de estrategias para el monitoreo de abejas

expuestas a insecticidas. Sin embargo, es necesario la realización de más estudios.

Los insectos poseen un conjunto de enzimas antioxidantes que pueden generar una respuesta frente a la presencia de oxidantes exógenos y a aquellos producidos de forma endógena (Felton y Summers, 1995). El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por Reactive Oxygen Species) potencialmente destructivas excede las propias defensas antioxidantes naturales del cuerpo, resultando en daños al organismo o incluso su muerte (Pham-Huy et al., 2008). Si no se regula adecuadamente el exceso de ROS se puede causar daños a las biomoléculas y de forma directa a sus funciones en el organismo. Es bien sabido que los pesticidas pueden inducir estrés oxidativo y generar ROS; sin embargo, las células tienen diferentes mecanismos para aliviar el estrés producido y para reparar macromoléculas dañadas (Verma et al., 2007). Durante este estudio, la exposición a FPF provocó la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y tioredoxin dismutasa (Trxr) durante algunos de los tiempos evaluados. Estas enzimas han demostrado ser significativamente afectadas por la exposición a plaguicidas (Verma et al., 2007). La regulación positiva de éstas denota: primero, que el FPF causa estrés oxidativo como respuesta específica a la toxina, resultado que está en concordancia con lo reportado por Chakrabarti et al. (2020). Y segundo, que el aumento en la expresión de éstas durante algunos tiempos evaluados es consistente con lo que ocurre a nivel celular, la expresión alterada puede indicar la activación de mecanismos de protección involucrados en los procesos de reparación celular, debido a que estas enzimas son la primera línea de defensa para la eliminación de radicales libres (Qi et al., 2018).

La expresión relativa de los cinco genes evaluados en este estudio mostró una tendencia hacia una subregulación (valores negativos) después de las seis horas de exposición a la FPF, excepto para la acetilcolinesterasa. Durante el experimento las abejas permanecieron en oscuridad para simular las condiciones dentro de la colmena, este tiempo de evaluación (6 h) fue durante la noche, marcado por el ritmo circadiano de los individuos lo que podría explicar el comportamiento en la expresión génica. Estudios demuestran que las abejas obreras recolectoras están activas durante el día y descansan durante la noche con un fuerte ritmo circadiano (Eban-Rothschild y Bloch, 2008) y que algunos insectos como las moscas al igual que los mamíferos reducen la tasa metabólica durante el sueño (Stahl et al. 2017), datos que concuerdan con los resultados de este estudio. Al reducir la tasa metabólica los genes en su mayoría van a ser subexpresados. Los datos aquí presentados muestran como la exposición de *A. mellifera* a una dosis subletal de FPF causa alteración en la expresión génica relativa subexpresando (valores negativos) o sobreexpresando (valores positivos) los genes en estudio.

Los resultados aquí expuestos dan un indicio de la cautela que se debe tener frente al uso de flupiradifurona en cultivos donde se utilice a *A. mellifera* como polinizador, o en áreas donde se practica la apicultura. Del mismo modo, el uso de técnicas moleculares para analizar la expresión de los genes, no solo de polinizadores sino también de objetivos no blanco como insectos benéficos u otros animales asociados a los sistemas agrícolas, cobran relevancia de cara a un mercado que debido al uso irracional de plaguicidas, la pérdida de sensibilidad de los objetivos plaga a estos, la ampliación de la frontera agrícola y la variabilidad climática actual, ofrece cada vez más productos que pueden tener efectos perjudiciales que no se pueden detectar a través de pruebas ecotoxicológicas convencionales.

CONCLUSIONES

La exposición durante un breve periodo de tiempo de *A. mellifera* a flupiradifurona causa alteración en la expresión génica relativa activando los genes *AchE1*, *CYP9Q3*, *CAT*, *SOD1* y *Trxr1* como mecanismo de defensa ante la presencia de un xenobiótico. Una dosis subletal de flupiradifurona tiene efectos negativos en las abejas melíferas, información que debe ser considerada para implementar de forma segura el uso de este insecticida. De igual forma, debido al impacto de los insecticidas en la salud de las abejas, es importante ampliar la comprensión sobre las alteraciones en la expresión génica y posibles efectos negativos de estos en las poblaciones de abejas melíferas.

PARTICIPACIÓN DE AUTORES

María Camila Girón: Planeación y diseño del proyecto, desarrollo de protocolos de laboratorio y escritura del manuscrito; Ernestina Valadez Moctezuma: negociación del financiamiento para la ejecución del proyecto, planeación y diseño del proyecto, supervisión del trabajo, revisión del manuscrito; Mateo Vargas Hernández: Supervisión y análisis estadístico de los datos.

AGRADECIMIENTOS

La autora principal agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, y con esto contribuir en la formación de posgraduados extranjeros, así como a la Universidad Autónoma Chapingo. A BioGenetix Lab S. de R.L. de C.V por todo el apoyo en el desarrollo de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Al Naggat, Y. y Baer, B. (2019). Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56224-1>
- Alburaki, M., Steckel, S. J., Chen, D., McDermott, E., Weiss, M., Skinner, J. A., Kelly, H., Lorenz, G., Tarry, D. R., Meikle, W. G., Adamczyk, J. y Stewart, S. D. (2017). Landscape and pesticide effects on honey bees: forager survival and expression of acetylcholinesterase and brain oxidative genes. *Apidologie*, 48(4), 556–571. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0497-3>
- Alburaki, M., Smith, K. D., Adamczyk, J. y Karim, S. (2019). Interplay between Selenium, selenoprotein genes, and oxidative stress in honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Insect Physiology*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103891>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P. y Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>
- Bryden, J., Gill, R. J., Mitton, R. A. A., Raine, N. E. y Jansen, V. A. A. (2013). Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecology Letters*, 16(12), 1463–1469. <https://doi.org/10.1111/ele.12188>
- Calderone, N. W. (2012). Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>
- Campbell, J. W., Cabrera, A. R., Stanley-Stahr, C. y Ellis, J. D. (2016). An Evaluation of the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Safety Profile of a New Systemic Insecticide, Flupyradifurone, Under Field Conditions in Florida. *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 1967–1972. <https://doi.org/10.1093/jee/tow186>
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P. y Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLOS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233033>
- Christen, V., Joho, Y., Vogel, M. y Fent, K. (2019). Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*, 244, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.030>

- Diaz Meraz, R. A. (2015). Efecto de seis plaguicidas sobre mortalidad en dos especies de abejas: *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana. Repositorio Escuela Agrícola Panamericana. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/3917104b-5b57-404d-90f4-94d100864acf/content>
- Eban-Rothschild, A. D. y Bloch, G. (2008). Differences in the sleep architecture of forager and young honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, 211(15), 2408–2416. <https://doi.org/10.1242/jeb.016915>
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W. y Nauen R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci*,64(11):1099-105. <https://doi.org/10.1002/ps.1616>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP. (2010). Efficacy evaluation of plant protection products: Side-effects on honeybees. *EPPO Bulletin*, 40(3), 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02418.x>
- Felton, G. W. y Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- Feyereisen, R. (2012). 8-Insect CYP Genes and P450 Enzymes. In L. I. Gilbert (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (pp. 236–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10008-X>
- Glberman, S., White, K., Steeger, T., Carleton, J. y Winfield, S. (June 25, 2014). *Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960)*. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2013-0226-0047>
- Godfray, H. C. J., Blacquière, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., Raine, N. E., Vanbergen, A. J. y McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*.281(1786).<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0558>
- González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., Steffan-Dewenter, I., Szentgyörgyi, H., Woyciechowski, M. y Vilà, M. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. In *Trends in Ecology and Evolution* 28(9), (pp. 524–530). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008>
- Gregorc, A., Alburaki, M., Rinderer, N., Sampson, B., Knight, P. R., Karim, S. y Adamczyk, J. (2018). Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33348-4>
- Györi, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M. y Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biológica Hungarica*, 68(4), 345–357. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.4.1>
- Hernandez, J., Volland, A., Leysnon, B. J., Juda, M., Ridlon, J. M., Johnson, R. W. y Steelman, A. J. (2018). Effect of imidacloprid ingestion on immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Scientific Reports*, 8(11615). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30093-6>
- Hesselbach, H. y Scheiner, R. (2018). Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23200-0>
- Hesselbach, H. y Scheiner, R. (2019). The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, 28(3), 354–366. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02028-y>
- Li, X., Schuler, M. A. y Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review Entomology*, 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Macias, J. O., Tapia Gonzalez, J. M., Contreras Escareno, F., Guzman Novoa, E., Medina Flores, C. A. y De la Mora Peña, A. (2018). *El efecto de los agroquímicos sobre las abejas melíferas (Apis mellifera) y su relación con el síndrome del colapso de las colonias*. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Universidad de Zacatecas <http://ricaxcan.uaz.edu.mx/jspui/handle/20.500.11845/974>
- Manjon, C., Troczka, B. J., Zaworra, M., Beadle, K., Randall, E., Hertlein, G., Singh, K. S., Zimmer, C. T., Homem, R. A., Lueke, B., Reid, R., Kor, L., Kohler, M., Benting, J., Williamson, M. S., Davies, T. G. E., Field, L. M., Bass, C. y Nauen, R. (2018). Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. *Current Biology*, 28(7), 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.045>
- Mao, W., Schuler, M. A. y Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12657–12662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109535108>
- Martínez-López, A., Leshner, J. y Jiménez-García, M. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de hojas de cacao. *Biotecnología Vegetal*, 13(2). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100>

- Moon, K., Lee, S. H. y Kim, Y. H. (2018). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate seasonal and labor-specific expression profiles of the honey bee abdomen. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4), 1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.10.014>
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., & Raupach, G. (2015). Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6), 850–862. <https://doi.org/10.1002/ps.3932>
- Palmer, M. J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G. A. y Connolly, C. N. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms2648>
- Parkinson, R. H., Zhang, S. y Gray, J. R. (2020). Neonicotinoid and sulfoximine pesticides differentially impair insect escape behavior and motion detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(10), 5510–5515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916432117>
- Pham-Huy, L. A., He, H. y Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. In *International Journal of Biomedical Science* 4(2), pp. 89–96. Master Publishing Group. www.ijbs.org
- Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X. y Wu, L. (2018). Effects of a novel neonicotinoid insecticide cycloxaprid on earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 14138–14147. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1624-z>
- Quiroga-Murcia, D. E., Zotti, M. J., Zenner de Polanía, I. y Pech-Pech, E. E. (2017). Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). *Agronomia Colombiana*, 35(3), 340–349. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.65447>
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W. y Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, 5(11779). <https://doi.org/10.1038/srep11779>
- Scharlaken, B., de Graaf, D. C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J. y Jacobs, F. J. (2008). Reference Gene Selection for Insect Expression Studies Using Quantitative Real-Time PCR: The Head of the Honeybee, *Apis mellifera*, After a Bacterial Challenge. *Journal of Insect Science*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.008.3301>
- Shugart, L. y Theodorakis, C. (1994). Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 102(Suppl. 12), 13–17. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1213>
- Stahl, B. A., Slocumb, M. E., Chaitin, H., DiAngelo, J. R. y Keene, A. C. (2017). Sleep-Dependent Modulation of Metabolic Rate in *Drosophila*. *Sleep*, 40(8). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx084>
- Tan, K., Wang, C., Dong, S., Li, X. y Nieh, J. C. (2017). The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18060-z>
- Tosi, S. y Nieh, J. C. (2019). Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1900). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433>
- Toutant, J. P. (1989). Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology*, 32(5), 423–446. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90031-2)
- Verma, R. S., Mehta, A. y Srivastava, N. (2007). *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.11.002>
- Williamson, S. M. y Wright, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1799–1807. <https://doi.org/10.1242/jeb.083931>
- Zhou, X., Ma, C., Li, M., Sheng, C., Liu, H. y Qiu, X. (2010). CYP9A12 and CYP9A17 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: Sequence similarity, expression profile and xenobiotic response. *Pest Management Science*, 66(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/ps.1832>