

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

O INSETICIDA FIPRONIL ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS
MELÍFERAS AFRICANIZADAS

YAN SOUZA LIMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Julho, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

O INSETICIDA FIPRONIL ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS
MELÍFERAS AFRICANIZADAS

YAN SOUZA LIMA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Julho, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Lima, Yan Souza.

O inseticida fipronil altera a expressão gênica em abelhas
melíferas africanizadas / Yan Souza Lima. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Samir Moura Kadri

Capes: 50405004

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Expressão Gênica.
3. Xenobióticos. 4. Exposição a Produtos Químicos. 5.
Transcriptoma. 6. Abelha-africanizada.

Palavras-chave: Agrotóxicos; DEGs; Desintoxicação;
Exposição-aguda; Transcriptoma.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Yan Souza Lima, nascido em 8 de dezembro de 1993 na cidade de Petrolina (Pernambuco), é filho de Iva Souza e Walter Lima. Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Vale do São Francisco (2017), mestrado em Ecologia e Evolução pela Universidade Estadual de Feira de Santana (2020) e atualmente é doutorando em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita “Filho”, Campus de Botucatu (São Paulo).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram envolvidos na minha jornada acadêmica ao longo do meu doutorado em Zootecnia. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no meu crescimento como pesquisador, e é com profunda admiração que expresso minha sincera gratidão.

Agradeço aos meus pais, Iva e Walter, por todo amor, cuidado e incentivo durante o desenvolvimento do meu doutorado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Orsi, pela dedicação, ensinamentos, paciência e orientação constante durante o desenvolvimento do doutorado.

Agradeço ao Dr. Samir Kadri pela coorientação e auxílio durante as análises genéticas deste estudo, e ao MSc. Marcus Alvarez pela colaboração nas análises de bioinformática deste estudo.

Agradeço aos integrantes do Grupo NECTAR (Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional), incluindo todos os pós-graduandos, funcionários e estagiários, que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento deste estudo. Em especial, agradeço aos amigos Aline Astolfi, Daniel Mendes, Guilherme Souza, Suellen Matos, Isabella Lippi, Iloran Rosário, Jaine Scheffer e Juliana Lunardi.

Meus agradecimentos se estendem à FMVZ, seus funcionários e ao Departamento de Produção Animal (FMVZ – UNESP). Agradeço pelo suporte institucional, pela infraestrutura oferecida e pelo ambiente propício à pesquisa e ao aprendizado.

Agradeço a todos os professores com os quais tive o privilégio de aprender no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, bem como aos professores que tive aulas em programas externos à FMVZ - UNESP.

Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado concedida (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

Muito obrigado a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO GERAL

As abelhas *Apis mellifera* desempenham um papel significativo tanto na economia quanto para o ambiente, devido aos seus produtos apícolas e à sua eficiência na polinização de diversas culturas agrícolas e plantas silvestres. No entanto, durante o forrageamento, as abelhas podem ser expostas a fontes de alimento contaminadas com agrotóxicos, especialmente em áreas agrícolas e seu entorno. Os inseticidas neurotóxicos, em particular o fipronil, têm sido comprovadamente prejudiciais às abelhas, mesmo em doses muito baixas. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da contaminação por ingestão e via tópica com doses letais e subletais do inseticida fipronil, após dois períodos de exposição aguda, no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) em fase de campeiras. Para isso, abelhas foram coletadas e acondicionadas em placas com alimentadores contendo xarope de mel contaminado com fipronil ou não contaminado (controle). No teste de ingestão, foram utilizadas duas dosagens de fipronil no xarope de mel ($DL_{50} = 0,19 \mu\text{g/abelha}$; $D_{\text{Sub}} = 0,0019 \mu\text{g/abelha}$) e dois períodos de exposição (uma e quatro horas). No teste com exposição tópica, as abelhas foram contaminadas com 2 μL de água contaminada com fipronil na dosagem letal ($0,009 \mu\text{g/abelha}$), subletal ($0,0009 \mu\text{g/abelha}$) ou apenas água (grupo controle), aplicada na região do pronoto. Após a exposição aos tratamentos mencionados, o tecido cerebral das abelhas foi utilizado para análise do transcriptoma, a fim de verificar os Genes Diferencialmente Expressos (DEGs). Nas abelhas contaminadas por ingestão, o fipronil afetou diversas vias metabólicas, de transporte e de regulação celular, incluindo vias relacionadas aos ribossomos e canais iônicos (1 hora = 2.391 DEGs; 4 horas = 147 DEGs). DEGs envolvidos no desenvolvimento, adesão celular, metabolismo e transporte celular apresentaram redução na expressão, enquanto genes relacionados à desintoxicação e detecção de substâncias foram suprarregulados. A redução significativa na expressão de genes da família de proteínas de ligação odorante (OBP) também foi verificada, podendo causar comportamentos desorientados e diminuir a eficiência de forrageamento das abelhas. Por outro lado, nas abelhas contaminadas topicamente, o fipronil afetou genes relacionados à resposta imunológica, reparo de DNA, metabolismo de xenobióticos e desintoxicação (1 hora = 804 DEGs; 4 horas = 329 DEGs). Em conclusão, tanto a contaminação por ingestão quanto a exposição tópica resultaram em alteração na expressão de genes relacionados com vias metabólicas, de regulação celular e resposta imune das abelhas. Esses achados ressaltam a necessidade de estratégias de proteção e regulamentação mais rigorosas para preservar a saúde das colônias e a sustentabilidade do serviço de polinização prestado pelas abelhas.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Exposição-aguda; Transcriptoma; DEGs; Desintoxicação.

ABSTRACT

Honey bees (*Apis mellifera*) play a significant role in both the economy and the environment due to their apicultural products and their efficiency in pollinating various agricultural crops and wild plants. However, during foraging, bees can be exposed to food sources contaminated with pesticides, especially in agricultural areas and their surroundings. Neurotoxic insecticides, particularly fipronil, have been proven to be harmful to bees, even in very low doses. The objective of this study was to investigate the effect of contamination through ingestion and topical exposure to lethal and sublethal doses of fipronil, after two periods of acute exposure, on the gene expression profile of the brain tissue of Africanized honey bees (*A. mellifera*) in the foraging phase. To do this, bees were collected and placed in plates with feeders containing fipronil-contaminated honey syrup or uncontaminated (control) syrup. In the ingestion test, two fipronil dosages in honey syrup were used ($DL_{50} = 0.19 \mu\text{g}/\text{bee}$; $D_{\text{Sub}} = 0.0019 \mu\text{g}/\text{bee}$) and two exposure periods (one and four hours). In the topical exposure test, bees were contaminated with 2 μL of water contaminated with fipronil at lethal ($0.009 \mu\text{g}/\text{bee}$), sublethal ($0.0009 \mu\text{g}/\text{bee}$), or just water (control group) dosages, applied to the pronotum region. After exposure to these treatments, the brain tissue of the bees was used for transcriptome analysis in order to identify Differentially Expressed Genes (DEGs). In bees contaminated by ingestion, fipronil affected various metabolic, transport, and cellular regulation pathways, including pathways related to ribosomes and ion channels (1 hour = 2,391 DEGs; 4 hours = 147 DEGs). DEGs involved in development, cell adhesion, metabolism, and cell transport showed reduced expression, while genes related to detoxification and substance detection were upregulated. A significant reduction in the expression of odorant-binding protein (OBP) family genes was also observed, which could lead to disoriented behaviors and decreased foraging efficiency in bees. On the other hand, in bees contaminated topically, fipronil affected genes related to the immune response, DNA repair, xenobiotic metabolism, and detoxification (1 hour = 804 DEGs; 4 hours = 329 DEGs). In conclusion, both ingestion contamination and topical exposure resulted in alterations in the expression of genes related to metabolic pathways, cellular regulation, and the immune response of bees. These findings underscore the need for more stringent protection and regulation strategies to preserve colony health and the sustainability of the pollination service provided by bees.

Keywords: Pesticides; Acute exposure; Transcriptome; DEGs; Detoxification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Indivíduos de uma colônia de abelhas <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 2. Mecanismo de ação do inseticida fipronil em insetos.....	22

CAPÍTULO II

Figura 1. Diagrama de Venn indicando o número de DEGs entre os grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas via ingestão ao inseticida fipronil.	44
Figura 2. Histograma do número de DEGs infraregulados e suprarregulados entre os grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas ao fipronil via ingestão.....	45
Figura 3. Análise de ontologia gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após uma hora de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil.....	47
Figura 4. Análise de ontologia gênica da interseção dos grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após uma hora de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil.....	48
Figura 5. Análise de ontologia gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após quatro horas de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil.....	50
Figura 6. Análise de ontologia gênica da interseção dos grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após quatro horas de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil.....	51

CAPÍTULO III

Figura 1. Diagrama de Venn indicando o número de DEGs entre os grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas via tópica ao inseticida fipronil.	75
Figura 2. Histograma do número de DEGs infraregulados e suprarregulados entre os grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas ao fipronil via tópica.	76
Figura 3. Análise de ontologia gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após uma hora de exposição via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil.	78
Figura 4. Análise de ontologia gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após quatro horas de exposição via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil.	80
Figura 5. Análise de ontologia gênica da interseção dos grupos experimentais de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após quatro horas de exposição via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil.....	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Funções desenvolvidas por abelhas operárias (<i>Apis mellifera</i>) em função da idade.	15
Tabela 2. Levantamento dos efeitos do inseticida fipronil em abelhas eussociais.	24

CAPÍTULO II

Tabela 1. Consumo médio de xarope de mel contaminado ou não-contaminado com dose letal e subletal do inseticida fipronil pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas após uma e quatro horas de exposição.	43
Tabela 2. Principais genes diferencialmente expressos em abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil durante uma e quatro horas de exposição.	53

CAPÍTULO III

Tabela 1. Principais genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil durante uma e quatro horas de exposição.	83
---	----

LISTA DE APÊNDICES

CAPÍTULO II

Apêndice 1. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via ingestão após uma hora de exposição. 65

Apêndice 2. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via ingestão após quatro horas de exposição. 66

CAPÍTULO III

Apêndice 1. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via tópica após uma hora de exposição. 97

Apêndice 2. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via tópica após quatro horas de exposição. 98

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
OBJETIVOS GERAIS	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	65
CAPÍTULO III	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT	69
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	85
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	97
CAPÍTULO IV.....	99
IMPLICAÇÕES.....	100

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Surgimento das abelhas e origem de *Apis mellifera* Linnaeus (1758)

As abelhas são insetos que surgiram há cerca de 150 milhões de anos, durante o Período Cretáceo, evoluindo a partir de vespas predadoras que modificaram sua dieta de insetos e ácaros para o pólen e néctar, tornando-os sua principal fonte de nutrientes (FONSECA et al., 1993). Nesse período, a evolução e diversificação das abelhas ocorreram com o surgimento de plantas produtoras de sementes (fanerógamas) e a propagação das angiospermas (ROUBIK, 1989; RAVEN et al., 2001). Desse modo, esses insetos passaram por modificações morfofisiológicas, como o comprimento da língua e o olfato especializado, para se adaptarem ao novo hábito alimentar, dependente de recursos florais (FONSECA et al., 1993; SILVEIRA et al., 2002).

Estudos arqueológicos revelam que o fóssil de abelha mais antigo foi encontrado conservado em âmbar e contém a espécie primitiva *Melittosphex burmensis*, com idade estimada de 100 milhões de anos (POINAR-JR & DANFORTH, 2006). Em 1999, o fóssil da espécie *Cretotrigona prisca*, com idade estimada de 65 milhões de anos, foi descoberto na região centro-atlântica dos Estados Unidos (ENGEL, 2000). Pertencente à tribo Meliponini, essa espécie apresenta um comportamento eussocial, no qual as abelhas organizam-se em colônias com sobreposição de gerações, divisão do trabalho e cuidado cooperativo com a prole. A capacidade de formar colônias permitiu o controle da temperatura interna nos espaços de nidificação, possibilitando a sobrevivência das abelhas em locais com variações de temperatura e favorecendo sua dispersão em regiões de climas diversos (SILVEIRA et al., 2002).

Assim como vespas e formigas, as abelhas pertencem à ordem Hymenoptera. Cerca de 20.400 espécies de abelhas já foram descritas, distribuídas em pelo menos nove famílias (SILVEIRA et al., 2002; ENGEL et al., 2020). As abelhas melíferas pertencem à família Apidae e entre suas subfamílias destacam-se: Euglossini (abelhas-das-orquídeas), Bombinae (abelhões), Meliponinae (abelhas-sem-ferrão) e Apinae (abelhas melíferas); sendo o gênero *Apis* é o principal representante da subfamília Apinae (ORR et al., 2021).

O gênero *Apis* possui dez espécies (*A. andreniformis*, *A. binghami*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea*, *A. koschevnikovi*, *A. laboriosa*, *A. mellifera*, *A. nuluensis* e *A. nigrocincta*). Acredita-se que a origem geográfica desse gênero seja asiática, uma vez que nove das dez espécies são encontradas no continente (ARIAS & SHEPPARD, 2005; TIHELKA et al., 2020). Sugere-se que *A. mellifera* tenha evoluído a partir de sua espécie mais próxima, *A. cerana*, entre 6 e 25 milhões de anos atrás, expandindo-se para ocupar partes da Ásia, Europa e África (SHEPPARD & MEIXNER 2003; CRIDLAND et al., 2017). Posteriormente, com a

colonização de diferentes partes do mundo pelos europeus, várias linhagens de *A. mellifera* foram transportadas, resultando na naturalização de cruzamentos de múltiplas linhagens (SHEPPARD et al., 1999; CRIDLAND et al., 2017; ILYASOV et al., 2020).

Devido à sua capacidade de se adaptar a praticamente todos os biomas habitáveis e a diversas condições bioclimáticas, *A. mellifera* apresenta notável plasticidade morfológica e comportamental. Atualmente, foram descritas mais de 30 subespécies, e para distingui-las, é necessário recorrer a análises morfométricas e moleculares (TIHELKA et al., 2020).

Estudos genéticos e análises morfométricas sugerem a existência de pelo menos quatro linhagens evolutivas distintas em *A. mellifera* (WHITFIELD et al., 2006; CRIDLAND et al., 2017): a Linhagem A (subespécies nativas da África), Linhagem M (oeste e norte da Europa), Linhagem C (sul e leste da Europa) e Linhagem O (Cáucaso). Nos últimos anos, com base em dados moleculares, foram propostas duas novas linhagens: Linhagem Y (nordeste da África e Oriente Médio) (FRANCK et al., 2001), e uma possível sexta linhagem foi relatada na Síria e no Líbano (ALBURAKI et al., 2013).

A classificação das subespécies de *A. mellifera* tem implicações práticas significativas na apicultura, uma vez que essas subespécies (ou raças) diferem em vários aspectos comportamentais e genéticos, como defensividade, tendência à enxameação, produção de mel e resistência a doenças (TIHELKA et al., 2020).

Aspectos biológicos das abelhas melíferas

As colônias de *A. mellifera* podem conter de 30 a 100 mil indivíduos (WINSTON, 1991), apresentando uma organização social classificada como altamente eussocial; portanto, há divisão das funções entre os indivíduos da colônia, cuidados com a cria e sobreposição de gerações (COUTO & COUTO, 2006). A colônia é composta por duas castas morfológicamente distintas do sexo feminino (abelhas operárias e uma rainha) e pelos zangões, os indivíduos machos da colônia (Figura 1).

Assim como os demais insetos holometábolos, *A. mellifera* possui um ciclo de desenvolvimento que passa pelas fases de ovo (fecundado ou não), larva, pré-pupa, pupa e o inseto adulto. O período de desenvolvimento do ovo até a emergência do inseto adulto difere entre o sexo dos indivíduos e as castas femininas; são 24, 21 e 16 dias de desenvolvimento para os zangões, operárias e rainhas, respectivamente (WINSTON, 1987).

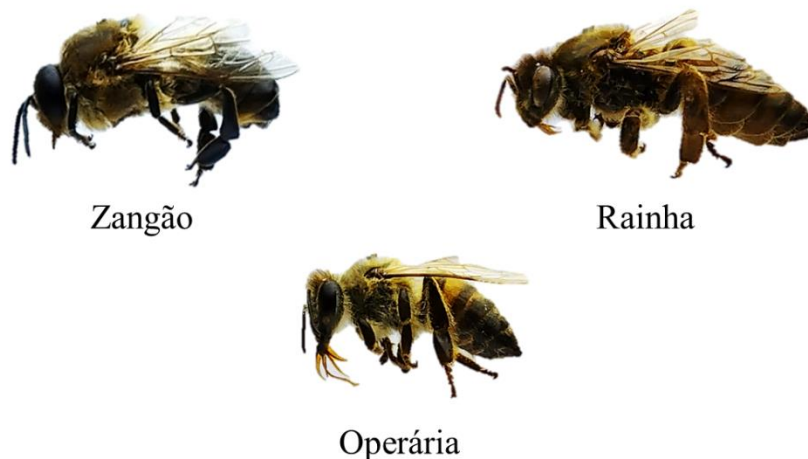


Figura 1. Indivíduos de uma colônia de abelhas *Apis mellifera*.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Os zangões se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados; portanto, são indivíduos haploides. A quantidade de machos na colmeia varia sazonalmente, dependendo da disponibilidade de alimento e da época de acasalamento (TAUTZ, 2010). Sua função é exclusivamente reprodutiva, acasalando com as rainhas virgens em um evento chamado de voo nupcial, morrendo logo após a fecundação da rainha (TAUTZ, 2010; COSTA & OLIVEIRA, 2018).

A abelha rainha nasce de um ovo fertilizado, desenvolvido em uma célula especial chamada célula real ou realeira. Durante toda a fase larval de desenvolvimento e vida adulta, a rainha recebe grandes quantidades de geleia real, uma secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das operárias denominadas nutrízes (DRAPEAU et al., 2006). A rainha tem a função de manter a ordem social liberando feromônios na colônia e realizando a postura dos ovos após o voo nupcial; durante o acasalamento, as rainhas podem copular com diversos zangões, sendo consideradas poliândricas (COUTO & COUTO, 2006).

Após o voo nupcial, a rainha retorna à colmeia com os espermatozoides armazenados em um órgão especializado chamado espermateca. Durante a oviposição, se a rainha fertilizar o óvulo com o espermatozoide, será gerada uma fêmea diploide. Caso o canal da espermateca seja fechado, o óvulo não é fertilizado, dando origem aos machos haploides. Nessa fase, a rainha pode colocar até dois mil ovos por dia e só sairá da colmeia novamente durante a divisão da colônia por enxameação, um processo em que as abelhas procuram um novo local para nidificação ou abandonam a colmeia (WINSTON, 1987).

As abelhas operárias, durante a fase de desenvolvimento larval, recebem uma secreção glandular semelhante à geleia real, porém menos rica em açúcares, chamada de geleia de operária. Posteriormente, recebem uma mistura dessa secreção com mel e pólen (HAYDAK, 1970). As operárias são facultativamente estéreis, mas na ausência da rainha, podem ativar seus ovários e realizar a oviposição de ovos não fertilizados, que originarão os machos (MALKA et al., 2007).

As operárias são os indivíduos mais numerosos na colônia e são responsáveis pelos trabalhos na colmeia, incluindo limpeza, alimentação da rainha e das larvas, construção dos favos, defesa da colmeia, coleta de recursos florais e água (COUTO & COUTO, 2006). As funções desempenhadas pelas operárias são atribuídas de acordo com a idade (Tabela 1), com tarefas de maior complexidade à medida que envelhecem, em um processo chamado de polietismo etário ou temporal (WINSTON, 1987; PAGE-JR & ROBINSON, 1991).

Tabela 1. Funções desenvolvidas por abelhas operárias (*Apis mellifera*) em função da idade.

Idade	Fase	Funções
1 a 5 dias	Faxineira	Limpeza do ninho e de abelhas recém-nascidas.
5 a 10 dias	Nutriz	Alimentam as larvas em desenvolvimento e a rainha, nesta fase já possuem glândulas hipofaríngeas e mandibulares bem desenvolvidas, produzindo grande quantidade de geleia real.
11 a 20 dias	Engenheira	Construção dos favos de cera, nesta fase apresentam glândulas cerígenas altamente desenvolvidas, também recebem e desidratam o néctar trazido pelas abelhas campeiras.
18 a 21 dias	Guarda	Defesa e controle da temperatura interna da colmeia.
Após 22 dias	Campeira	Coleta de néctar, pólen floral, resina e água.

Fonte: Adaptado de Couto & Couto (2006).

Após os 22 dias de idade, as operárias campeiras também podem ser denominadas forrageiras (COUTO & COUTO, 2006). As abelhas melíferas são consideradas generalistas, explorando uma grande diversidade de flores em busca dos recursos florais, o que é uma tarefa essencial para o desenvolvimento populacional das colônias (WINSTON, 1987; HUNG et al., 2018). No entanto, as operárias nesta fase estão suscetíveis a agentes contaminantes, podendo visitar flores e coletar recursos contaminados com agrotóxicos; dessa forma, as campeiras podem ser contaminadas com os resíduos ou armazenar o alimento contaminado na colmeia (IWASAKI & HOGENDOORN, 2021). Como consequência, o acúmulo e a exposição aos resíduos de agrotóxicos podem provocar diversos efeitos subletais nas colônias, que resultam na redução da produtividade das colmeias, acúmulo de substâncias tóxicas e morte das abelhas (BELZUNCES et al., 2012; TOSI et al., 2022).

Relevância econômica e ambiental das abelhas

O início da domesticação das abelhas melíferas é datado há milênios, muito antes da revolução agrícola. Produtos apícolas como o mel e a cera já eram utilizados pelos antigos egípcios por volta de 2.600 a.C. (ROFFET-SALQUE et al., 2015), evidenciado pela presença de iconografia de abelhas egípcias que datam do Império Antigo (CRANE, 1999); há ainda registros em arte rupestre que indicam pessoas da Idade da Pedra colhendo mel em um contexto pré-histórico do Holoceno (DAMS & DAMS, 1977).

A criação racional das abelhas do gênero *Apis* é denominada apicultura. Esta é uma das atividades agropecuárias com grande potencial para gerar impactos sociais, econômicos e ambientais. A apicultura é economicamente rentável, de fácil manutenção, ambientalmente sustentável e requer um investimento inicial reduzido, principalmente por não necessitar de grandes áreas. No Brasil, é uma atividade desenvolvida principalmente por pequenos produtores, geralmente inseridos em cooperativas e associações (KLOSOWSKI et al., 2020).

Há uma grande diversidade de produtos apícolas que podem ser explorados na apicultura, como o mel, pólen apícola, própolis, cera, geleia real e o veneno das abelhas (apitoxina). No entanto, o mel ainda é o produto apícola destaque para a agropecuária, com uma produção mundial estimada em 1.770.199 toneladas por ano (FAO, 2020).

Dentre os principais países produtores de mel, a China lidera com a produção de 458.100 toneladas em 2020, equivalente a quase 26% da produção mundial de mel. O país possui baixo custo de produção, sendo as cooperativas o seu principal modelo produtivo, existindo ainda grandes empresas encarregadas da compra de mel de apicultores individuais, fazendo o mel chinês um dos mais baratos do mundo (KLOSOWSKI et al., 2020). Seguindo o *ranking* de produção mundial de mel, a Turquia é o segundo maior produtor, com 104.077 toneladas em 2020; uma das principais características do país é o forte apoio dos órgãos públicos, que concedem créditos e subsídios aos apicultores (KLOSOWSKI et al., 2020). Após a China e a Turquia, o Irã (79.955 t), Argentina (74.403 t) e Ucrânia (68.028 t) seguem com as maiores produções mundiais (FAO, 2020).

O Brasil atualmente é o décimo maior produtor de mel, com uma produção anual estimada em mais de 55 mil toneladas no ano de 2021, e um valor estimado de R\$ 854.416.000, sendo a região Sul do país o principal produtor (IBGE, 2021). No entanto, o consumo brasileiro de mel ainda é muito baixo, sendo parte da produção brasileira exportada. Segundo dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Mel, em 2021, quase 85% da produção brasileira foi exportada (aproximadamente 47.190 t); os principais destinos de exportação foram os

Estados Unidos (71%), Alemanha (13%) e Canadá (6%); somente no primeiro trimestre de 2022, mais de 8 mil toneladas já foram exportadas (ABEMEL, 2022).

Além da produção de mel e dos demais produtos apícolas, as abelhas são essenciais para o serviço ecossistêmico de polinização (KLEIN et al., 2007). A polinização é o processo de transferência dos grãos de pólen (contendo os gametas masculinos) para as estruturas reprodutivas femininas das flores, sendo uma etapa indispensável para que a fecundação e reprodução eficiente das plantas ocorra. Agentes abióticos como o vento e a água podem realizar a polinização de diversas espécies; no entanto, cerca de 90% das plantas com flores são dependentes da polinização mediada pelos animais (OLLERTON et al., 2011).

As abelhas constituem o principal grupo de polinizadores bióticos. Esses insetos melhoram os resultados reprodutivos da maioria das angiospermas, auxiliam na manutenção da flora silvestre (OLLERTON, 2017; DAINESE et al., 2019), e contribuem para o rendimento da maioria das frutas, visto que a polinização realizada por abelhas proporciona uma maior quantidade e melhor qualidade dos frutos, aumenta a taxa de frutos melhores formados, maior vida útil e, conseqüentemente, maior valor comercial (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010; WINFREE et al., 2011; KLATT et al., 2014; BERNAUER et al., 2022).

Estima-se que as abelhas polinizem 75% de todas as plantações agrícolas; em função disso, 33% da alimentação humana depende do serviço de polinização realizado pelas abelhas (KLEIN et al., 2007; HUNG et al., 2018). Globalmente, os serviços de polinização fornecidos por polinizadores animais aos cultivos agrícolas são avaliados em mais de US\$ 200 bilhões por ano (PORTO et al., 2020; BERNAUER et al., 2022). No Brasil, os valores se aproximam a 12 bilhões de dólares, o que representa a renda total das culturas dependentes desses polinizadores (GIANNINI et al., 2015).

A abelha melífera (*A. mellifera*) é a espécie mais importante para a polinização de culturas agrícolas. Com ocorrência em uma grande diversidade de áreas geográficas, a espécie é reconhecidamente um polinizador de alto valor econômico (HUNG et al., 2018). Devido às suas características generalistas, elas fornecem os serviços de polinização para uma ampla diversidade de culturas agrícolas e geram valor por meio da comercialização dos produtos apícolas, uma vez que podem ser manejadas (KLEIN et al., 2007). Na apicultura migratória, por exemplo, as colmeias são transportadas para diferentes áreas visando atender à demanda de polinização de grandes cultivos agrícolas; como, por exemplo, nos EUA, onde as colmeias são transportadas em escala continental por vários estados para polinizar uma variedade de monoculturas, como mirtilos, cranberries, amêndoas e frutos cítricos (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2022).

No Brasil, as abelhas melíferas africanizadas exibem relevância na polinização de diversas culturas agrícolas, como o melão, maçã, pera, café, canola, caju, citros, girassol e algodão (KLEIN et al., 2020); e mesmo em cultivos que não necessitam da polinização biótica, as abelhas podem aumentar significativamente a produção da cultura, como ocorre com a soja (CHIARI et al., 2008; LEVERSON et al., 2022).

Apesar do papel fundamental que os polinizadores desempenham nos ecossistemas naturais e na produção de alimentos, atualmente esses insetos enfrentam crescentes estressores ambientais, incluindo a intensificação agrícola, alteração e fragmentação de habitat, pragas e doenças, estresse nutricional, mudanças climáticas, espécies invasoras e o uso indiscriminado de agrotóxicos (VANBERGEN et al., 2013; GOULSON et al., 2015; POTTS et al., 2016; PARREÑO et al., 2021).

Estudos recentes mostraram que os fatores de estresse não atuam isoladamente, mas sim sinergicamente (SIVITER et al., 2021), e que suas interações podem ser difíceis de prever; por exemplo, tanto a exposição aos agrotóxicos quanto o estresse alimentar causado pela baixa diversidade de recursos florais podem alterar a resposta imune, tornando as abelhas mais suscetíveis às doenças (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2022). Devido a esses estressores, os serviços de polinização prestados pelas abelhas vêm diminuindo ao longo do tempo; estudos recentes mostraram que a demanda por abelhas polinizadoras aumentou, enquanto a capacidade de oferta de serviços de polinização diminuiu em todo o mundo (PARREÑO et al., 2021; MASHILINGI et al., 2022).

***Apis mellifera* africanizada**

A introdução de *A. mellifera* no Brasil ocorreu em 1839, quando colônias de abelhas *A. mellifera* de raças europeias foram trazidas de Portugal para o Rio de Janeiro, pelo padre Antônio Carneiro Aureliano (COUTO & COUTO, 2006). Posteriormente, em 1845, imigrantes da Alemanha trouxeram a subespécie *A. mellifera mellifera*, dando início à produção apícola no Sul do Brasil. Sucessivamente, outras subespécies de origem europeia também foram introduzidas junto ao processo de imigração que ocorria no Brasil (WINSTON, 1992).

Em 1950, uma série de pragas e doenças causava perdas das colônias, além da baixa produtividade das colmeias. Diante desse cenário, o cientista Dr. Warwick Estevam Kerr trouxe abelhas de subespécies africanas (ex. *A. mellifera scutellata*) para o país, visando o melhoramento genético das abelhas de subespécies europeias, devido à linhagem africana ser considerada mais produtiva e resistente a doenças quando comparada às europeias (KERR, 1967; RAMOS & CARVALHO, 2007). Ao decorrer dos estudos genéticos, um acidente no

apiário experimental onde essas abelhas eram mantidas fez com que cerca de 26 enxames escapassem para áreas naturais; esse imprevisto experimental deu origem ao processo chamado de africanização (KERR, 1967; WINSTON, 1987).

Possivelmente a africanização de *A. mellifera* ocorreu devido aos zangões da subespécie africana acasalarem com as rainhas virgens de origem europeia presentes em áreas naturais (SPIVAK et al., 1991). Esse cruzamento entre subespécies africanas e europeias deu origem ao polihíbrido *A. mellifera* africanizada, expressando características predominantes das abelhas africanas, como rusticidade, maior tendência à enxameação e a característica de percorrer maiores distâncias quando comparadas com as subespécies europeias, o que permitiu rápida adaptação e expansão pelo continente americano (WINSTON, 1987; WINSTON, 1992; KIM & OGURO, 1999).

Ainda que as abelhas africanizadas fossem mais produtivas e resistentes às doenças, os apicultores brasileiros ainda não estavam adaptados a suas características, principalmente devido ao seu comportamento altamente defensivo (causando acidentes em humanos e criações de animais), tendência à pilhagem e dificuldade em manter as colônias. À medida que novas informações sobre a biologia e técnicas de manejo dessas abelhas foram ampliadas, a apicultura brasileira foi se expandindo (WINSTON, 1987; WINSTON, 1992).

Apesar das dificuldades de manejo iniciais com as abelhas africanizadas, a produção apícola brasileira obteve significativa melhoria, principalmente na produção de mel (WINSTON, 1987; WINSTON, 1992; MORAIS et al., 2012). Antes da introdução das abelhas africanas, a produção brasileira era de 8.000 toneladas por ano (1971) e após o processo de africanização, a produção de mel saltou para 35.000 t/ano (1992). Atualmente, o Brasil já ultrapassa 55 mil toneladas de mel produzidas por ano (2021) (IBGE, 2021).

Agrotóxicos: inseticidas e seus impactos em abelhas

Durante a última metade do século XIX, o crescimento da economia mundial levou ao aumento progressivo da geração e utilização de produtos químicos na agricultura (SHARMA et al., 2019). Devido às mudanças nas práticas agrícolas e à agricultura cada vez mais intensiva, o uso de agrotóxicos em todo o mundo tem aumentado nas últimas décadas. No entanto, essa prática tem gerado debates e preocupações globais, uma vez que o uso massivo e indiscriminado desses produtos traz impactos negativos para o ambiente e a saúde humana (SHARMA et al., 2019; GARCÍA et al., 2022).

De acordo com a Lei Federal brasileira nº 7.802/89, os agrotóxicos ou pesticidas são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao

uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989).

A Organização Mundial da Saúde agrupa os agrotóxicos de acordo com sua finalidade, sendo classificados principalmente em: acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, rodenticidas, moluscicidas e inseticidas (WHO, 2020). Projetados para atingir insetos pragas, os inseticidas também podem afetar organismos não intencionais, e entre esses, as abelhas são insetos com relevância agroambiental e econômica que podem ser criticamente prejudicados (BELZUNCES et al., 2012).

Em virtude do seu uso generalizado e incorreto, os agrotóxicos podem afetar cultivos próximos aos locais de aplicação (LINHART et al., 2019), contaminar áreas naturais ou de conservação (ZALLER et al., 2022), corpos d'água (STEHLER & SCHULZ, 2015), bem como plantas e animais não alvos, assim como vem ocorrendo com as abelhas (TANG et al., 2021; IWASAKI & HOGENDOORN, 2021; CECIL et al., 2023).

No que diz respeito à forma como as abelhas são contaminadas, as exposições podem ocorrer por ingestão ou via tópica (RORTAIS et al., 2017). A exposição via tópica geralmente é rápida e aguda, ocorrendo quando os agrotóxicos entram em contato com as abelhas (através do tegumento) devido à aplicação foliar, pulverização ou pela poeira das sementes tratadas com agrotóxicos em rotas de forrageamento ou áreas de nidificação das abelhas (FAIRBROTHER et al., 2014; IWASAKI & HOGENDOORN, 2021). Por outro lado, a exposição por ingestão pode ser contínua e prolongada, em razão de diversos agrotóxicos serem absorvidos pelas plantas, podendo atingir o néctar e o pólen por condução da seiva (GOULSON, 2013). Esses recursos florais contaminados podem ser coletados pelas abelhas e armazenados e consumidos pelos demais indivíduos da colônia (RORTAIS et al., 2017).

A depender da dosagem ingerida ou que entra em contato topicamente com as abelhas, os agrotóxicos podem gerar efeitos agudos (letais) ou crônicos (subletais) nesses insetos (RORTAIS et al., 2017). Um efeito letal é definido como aquele que causa a morte do indivíduo, sendo a dose estimada que causa a morte de mais de 50% de uma população testada em um determinado período de exposição denominada de Dose Letal - DL_{50} (TOSI et al., 2022); os agrotóxicos que apresentam DL_{50} inferior a 2 µg por abelha são classificados como extremamente tóxicos para *A. mellifera* (JOHANSEN & MAYER, 1990).

Já um efeito subletal é aquele que não causa a morte do indivíduo instantaneamente, mas sim efeitos que podem diminuir a sobrevivência e o crescimento das colônias a longo prazo, com consequências mais amplas e sutis em nível de colônia, podendo reduzir a eficiência de forrageamento das abelhas, desencadeando o declínio na produção de crias e enfraquecimento e morte da colônia (DESNEUX et al., 2007; BELZUNCES et al., 2012; TOSI et al., 2022).

Os inseticidas afetam diversos mecanismos de cognição, comportamento e funções fisiológicas das abelhas (EL-HASSANI et al., 2005; ROAT et al., 2014; ZALUSKI et al., 2015), como no processo de aprendizagem e memória, influenciando a forma como as abelhas respondem às exigências da colônia; o olfato e a gustação das abelhas podem ser afetados, sendo importantes na detecção e reconhecimento de aromas e sabores necessários para que a abelha associe flores à produção de néctar, reconheça indivíduos estranhos à colmeia e recrute campeiras; o forrageamento dos recursos alimentares também pode ser afetado, gerando deficiência nutricional tanto em nível individual quanto da colônia; e eventos fisiológicos como a termorregulação e contração muscular, afetando o controle da temperatura corporal e da colônia, assim como os mecanismos de comunicação, movimentação e digestão das abelhas (BELZUNCES et al., 2012; TOSI et al., 2022).

Os inseticidas sistêmicos neurotóxicos vêm ganhando maior atenção nos debates científicos relacionados à sua capacidade de ocasionar efeitos nocivos em abelhas. Esses inseticidas podem ser classificados em relação aos grupos químicos a que pertencem, sendo as principais famílias dos organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e fenilpirazóis (BELZUNCES et al., 2012). Os fenilpirazóis, dos quais o fipronil é o principal representante, pertencem ao grupo de inseticidas bloqueadores dos canais de cloro mediados pelo neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) (GUNASEKARA et al., 2007; SINGH et al., 2021).

O inseticida fipronil e seu efeito em abelhas

O fipronil [(RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfonilpirazol-3-carbonitrila] é um inseticida sistêmico de amplo espectro, sintetizado pela Rhône Poulenc Ag Company em 1987 e registrado pela primeira vez nos EUA (LI et al., 2020; SINGH et al., 2021). Este inseticida atua como bloqueador não competitivo do receptor de ácido gama-aminobutírico no sistema nervoso central dos insetos (Figura 2), afetando os canais de cloreto dependentes de glutamato, o que causa atividade descontrolada do sistema nervoso central, hiperexcitação, convulsões, paralisia e morte dos insetos (GUNASEKARA et al., 2007).

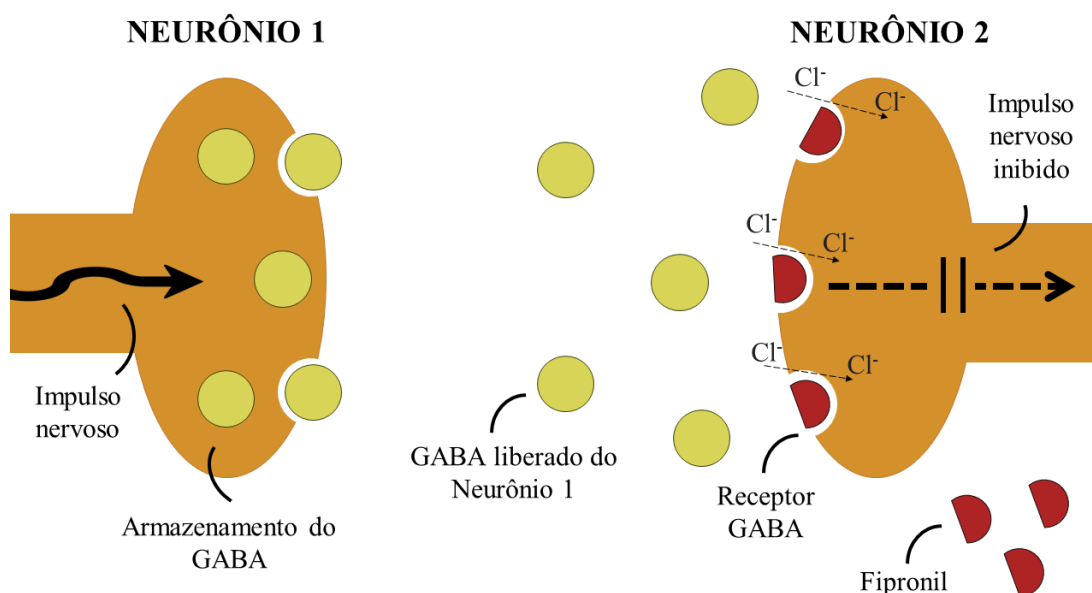


Figura 2. Mecanismo de ação do inseticida fipronil em insetos.

Fonte: Adaptado de Bloomquist (2015).

O fipronil é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo, devido à sua alta eficácia contra os insetos pragas (TINGLE et al., 2003; WRIGHT, 2013; LI et al., 2020; SINGH et al., 2021), sendo utilizado em diversas culturas agrícolas, como soja, milho, cana-de-açúcar, arroz, feijão, trigo, batata, algodão, girassol e pastagens (LI et al., 2020; ANVISA, 2022). No ambiente, o fipronil pode ser degradado através dos processos de hidrólise, fotólise e oxidação, podendo ser convertido nos metabólitos fipronil-sulfona, fipronil-sulfeto, fipronil-amida e fipronil-desulfenil (BOBÉ et al., 1998). Com sua meia-vida podendo variar entre 36 horas e sete meses, dependendo de fatores como umidade do solo, pH, teor de matéria orgânica, temperatura, intensidade da luz solar e população microbiana (SINGH et al., 2021).

No Brasil, o fipronil é classificado como altamente tóxico (classe II) segundo a Classificação Toxicológica da ANVISA e avaliado como muito perigoso ao ambiente (classe II) de acordo com a Classificação Ambiental do IBAMA (ANVISA, 2022). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos classifica o fipronil como possível carcinógeno humano (USEPA, 2018), e seu uso e venda já foram proibidos em 36 países, incluindo 27 países da União Europeia (GONÇALVES et al., 2022). Na China, as formulações de pesticidas contendo fipronil foram totalmente proibidas para cultivos agrícolas desde 2009, exceto para uso em higiene e tratamento de sementes (LI et al., 2020).

Esse inseticida é extremamente prejudicial para as abelhas, provocando diversas alterações comportamentais, fisiológicas e genéticas (Tabela 2). Baixas doses de fipronil podem

causar alterações no padrão de expressão de proteínas envolvidas na suscetibilidade a patógenos, estresse químico neuronal, problemas visuais, danos à formação de sinapses e degeneração cerebral, que podem resultar em comprometimento da memória e aprendizado (ROAT et al., 2014); também podendo inibir a bioenergética mitocondrial, resultando em depleção de ATP (NICODEMO et al., 2014).

O fipronil prejudica habilidades cognitivas, dificultando a percepção de odores, aprendizagem e memória das abelhas (EL-HASSANI et al., 2005; ALIOUANE et al., 2009), bem como a capacidade locomotora é diminuída (ZALUSKI et al., 2015; ROAT et al., 2017; BOVI et al., 2018). O sistema imunológico também pode ser afetado pelo fipronil, com aumento da suscetibilidade a patógenos, redução da área de cria e deficiência no desenvolvimento das larvas (ZALUSKI et al., 2015; BOVI et al., 2018); e quando associados a patógenos, como no caso de *Nosema ceranae*, o fipronil pode aumentar em 45% a taxa de mortalidade das abelhas contaminadas (AUFAUVRE et al., 2012).

Tabela 2. Levantamento dos efeitos do inseticida fipronil em abelhas eussociais.

Espécie	Casta/Fase	Intoxicação	Tempo de exposição	Dosagem	Efeitos	Fonte
<i>Apis mellifera</i>	Operárias/campeiras	Tópica	15 minutos	0,5 ng/abelha	Redução da aprendizagem e memória.	BERNADOU et al. (2009)
<i>Apis mellifera</i>	Operárias	Tópica	1 hora	1 ng	Redução da resposta de extensão da probóscide (PER).	EL-HASSANI et al. (2005)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Tópica	1 e 4 horas	0,000016 µg/abelha	Redução da capacidade motora.	BOVI et al. (2018)
<i>Apis mellifera</i>	Operárias	Tópica	3 horas	0,5 ng	Redução da aprendizagem e memória olfativa.	EL-HASSANI et al. (2005)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Tópica	4 horas	0,0000108 µg/abelha	Redução da capacidade motora.	LUNARDI et al. (2017)
<i>Melipona scutellaris</i>	Operárias	Tópica	24 horas	0,0040 ng ia/abelha	Redução da capacidade motora; letargia; hiperexcitação; paralisia; mudança no padrão de dispersão da heterocromatina.	MORAIS et al. (2018)
<i>Apis mellifera</i>	Operárias/engenheiras	Tópica	11 dias	0,01 ng/abelha	Incapacidade de diferenciação de odores.	ALIOUANE et al. (2009)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Tópica	11 dias	8 µg L ⁻¹	Redução na eclodibilidade dos ovos; redução da área de cria; letargia; redução do comportamento defensivo.	ZALUSKI et al. (2015)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	1 e 4 horas	0,0004 µg/abelha	Redução da capacidade motora.	BOVI et al. (2018)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	4 horas	0,0001056 µg/abelha	Redução da capacidade motora.	LUNARDI et al. (2017)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	4 horas	0,0004 µg/abelha	Redução da capacidade motora.	ZALUSKI et al. (2015)
<i>Partamona helleri</i>	Operárias	Ingestão	24 horas	0,28 ng ia/µL	Alterações morfológicas no intestino médio das abelhas; morte celular apoptótica; comprometimento da regeneração epitelial do intestino médio.	FARDER-GOMES et al. (2021)
<i>Partamona helleri</i>	Operárias	Ingestão	24 horas	0,28 ng ia/µL ⁻¹	Redução da capacidade motora; estresse oxidativo; alteração de enzimas de desintoxicação; morte celular apoptótica; comprometimento da função cerebral.	FARDER-GOMES et al. (2021)

Espécie	Casta/Fase	Intoxicação	Tempo de exposição	Dosagem	Efeitos	Fonte
<i>Melipona scutellaris</i>	Operárias/campeiras	Ingestão	48 horas	0,005 ng ia/ μ L	Tremores e paralisia.	LOURENÇO et al. (2012)
<i>Melipona scutellaris</i>	Operárias/campeiras	Ingestão	48 horas	0,01 ng ia/ μ L	Tremores e paralisia.	LOURENÇO et al. (2012)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	3 dias	0,01 ng/abelha	Redução da atividade neural; alteração das células Kenyon presentes nos corpos de cogumelos.	ROAT et al. (2013)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	5 dias	10 pg/dia	Alteração de proteínas relacionadas à suscetibilidade aos patógenos; estresse químico neuronal; dobramento incorreto de proteínas neuronais; apoptose; deficiência visual; formação de sinapses danificadas; degeneração cerebral; redução da memória; deficiência no aprendizado.	ROAT et al. (2014)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/nutrizes	Ingestão	6 dias	2,5 ppb	Redução no desenvolvimento das glândulas mandibulares e hipofaríngeas.	ZALUSKI et al. (2017)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/nutrizes	Ingestão	6 dias	2,5 ppb	Redução na expressão das principais proteínas da geleia real; redução de proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos e síntese energética, sistema antioxidante, desintoxicação, biossíntese, metabolismo de aminoácidos, transcrição e tradução, dobramento e ligação de proteínas, olfato, aprendizado e memória.	ZALUSKI et al. (2020)
<i>Apis mellifera</i> africanizada	Operárias/campeiras	Ingestão	8 dias	0,01 ng ia/abelha	Alteração em enzimas reguladoras da transmissão neural e metabolismo de xenobióticos; estresse oxidativo.	ROAT et al. (2016)
<i>Apis mellifera</i>	Zangões	Ingestão	20 dias	0,1 μ g L ⁻¹	Redução da fertilidade dos zangões; diminuição na quantidade de espermatozoides produzidos; aumento da mortalidade de espermatozoides.	KAIRO et al. (2017)

Estudos de expressão gênica em abelhas

Embora os estudos que avaliem os efeitos comportamentais e fisiológicos das abelhas infectadas com agrotóxicos sejam de extrema relevância, as abordagens de genética molecular tornaram-se ferramentas importantes para detectar estressores prejudiciais que geralmente não são detectados em experimentos focados na fisiologia e comportamento das abelhas (COSTA et al., 2022).

As abelhas interagem com diversos fatores ambientais bióticos e abióticos, e essas interações podem influenciar em seus perfis genômicos, transcriptômicos e metagenômicos. As abordagens genômicas e os avanços nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS - *Next-Generation Sequencing*) fornecem ferramentas eficientes para entender minuciosamente o declínio das populações de abelhas (LOZIER & ZAYED, 2017; DOGANTZIS & ZAYED, 2019; GROZINGER & ZAYED, 2020).

Estudos transcriptômicos usando NGS têm sido fundamentais para caracterizar os mecanismos moleculares e fisiológicos pelos quais as abelhas respondem a diversos estressores, já que a exposição a um estressor desencadeia uma resposta transcricional específica na abelha (GROZINGER & ZAYED, 2020). Essas alterações transcricionais afetam vários genes-chave associados à neurotoxicidade, formação de memória, respostas ao estresse, metabolismo e expectativa de vida das abelhas (FENT et al., 2020; MIOTELO et al., 2022).

As mudanças nos padrões de expressão gênica têm sido utilizadas em diversos estudos, investigando os efeitos de parasitas nas abelhas (ZANNI et al., 2017), infecções virais (BRUTSCHER et al., 2017), estresse nutricional (CORBY-HARRIS et al., 2014), influência da dieta na resposta aos estressores ambientais (COSTA et al., 2022), efeito da suplementação mineral na expressão de genes (CAMILLI et al., 2022), o uso da genômica para reconstruir relações evolutivas entre ordens, famílias, gêneros e espécies de abelhas (BOSSERT et al., 2019), e estudos transcriptômicos avaliando o efeito de inseticidas neurotóxicos no perfil de expressão gênica do cérebro das abelhas (LI et al., 2019; GAO et al., 2022).

O cérebro ou gânglio cerebral das abelhas é formado por três principais massas ganglionares: o protocérebro, a maior e mais complexa região do órgão, está associado ao processamento de informações visuais e integração de informações dos lobos ópticos e antenais; o deutocérebro, que é formado pelos lobos antenais e os axônios motores e sensoriais das antenas, está associado ao processamento quimiossensorial; e o tritocérebro, a menor região do cérebro, responsável pelo controle das peças bucais e da percepção gustativa (AZEVEDO & NOCELLI, 2020; AZEVEDO et al., 2022).

Considerando que o cérebro das abelhas é o órgão alvo da ação dos inseticidas neurotóxicos, os sistemas cerebrais podem ser facilmente interrompidos por esses agrotóxicos (LI et al., 2019). Assim, ferramentas modernas, como análises de genética molecular, podem ser utilizadas para avaliar com maior precisão os danos causados por esses inseticidas às abelhas (AZEVEDO et al., 2022).

OBJETIVOS GERAIS

Diante das informações trazidas na seção anterior, o objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito da contaminação por ingestão e via tópica com doses letais e subletais do inseticida fipronil, após dois períodos de exposição aguda, no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de *A. mellifera* africanizadas em fase de campeiras.

De acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, o Capítulo II, intitulado “A ingestão do inseticida fipronil altera a expressão gênica em *Apis mellifera* africanizadas”, está apresentado de acordo com as normas de publicação do periódico *Apidologie* (ISSN: 0044-8435); o Capítulo III, intitulado “Respostas transcriptômicas em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) após exposição tópica ao inseticida fipronil”, está apresentado de acordo com as normas de publicação do periódico *Journal of Apicultural Research* (ISSN: 2078-6913).

REFERÊNCIAS

- ABEMEL - Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. **Dados Estatísticos do Mercado de Mel**. Rio Claro: ABEMEL, 2022.
- ALBURAKI, Mohamed et al. A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2013.
- ALIOUANE, Yassine et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **F43 – Fipronil**. Instrução Normativa IN nº 185, de 28/09/22. ANVISA, 2022.
- ARIAS, Maria C.; SHEPPARD, Walter S. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 1, p. 25-35, 2005.
- AUFAUVRE, Julie et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2012.
- AZEVEDO, Patricia et al. Optimization of in vitro culture of honeybee nervous tissue for pesticide risk assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 84, p. 105437, 2022.
- AZEVEDO, Patricia; NOCELLI, Roberta C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v. 20, n. 1, p. 10-20, 2020.
- BELZUNCES, Luc P.; TCHAMITCHIAN, Sylvie; BRUNET, Jean-Luc. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie**, v. 43, n. 3, p. 348-370, 2012.
- BERNAUER, Olivia M.; TIERNEY, Simon M.; COOK, James M. Efficiency and effectiveness of native bees and honey bees as pollinators of apples in New South Wales orchards. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 337, p. 108063, 2022.
- BLOOMQUIST, Jeffrey R. **Insecticides: chemistries and characteristics**. Flórida: [s.n.]. 2015. Disponível em <http://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>. Acesso em: 21 mai. 2022.
- BOBÉ, Alain et al. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834-2839, 1998.
- BOSSERT, Silas et al. Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 130, p. 121-131, 2019.
- BOVI, Thaís S.; ZALUSKI, Rodrigo; ORSI, Ricardo O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 239-245, 2018.

- BRASIL. **Lei 7.802, de 11 de julho de 1989**. Brasília, DF, 1989. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em: 15 mai. 2022.
- BRUTSCHER, Laura M.; DAUGHENBAUGH, Katie F.; FLENNIKEN, Michelle L. Virus and dsRNA-triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.
- CAMILLI, Marcelo P. et al. Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2022.
- CECH, Ramona et al. Pesticide drift mitigation measures appear to reduce contamination of non-agricultural areas, but hazards to humans and the environment remain. **Science of The Total Environment**, v. 854, p. 158814, 2023.
- CHIARI, Wainer C. et al. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Readytm cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, p. 267-271, 2008.
- CORBY-HARRIS, Vanessa et al. Transcriptional markers of sub-optimal nutrition in developing *Apis mellifera* nurse workers. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2014.
- COSTA, Claudineia P. et al. Pollen diet mediates how pesticide exposure impacts brain gene expression in nest-founding bumble bee queens. **Science of The Total Environment**, v. 833, p. 155216, 2022.
- COSTA, Paulo S. C.; OLIVEIRA, Juliana S. **Manual prático de criação de abelhas**. Viçosa – MG: Aprenda Fácil, 2018. 424 p.
- COUTO, Regina H. N.; COUTO, Leomam A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 192 p.
- CRANE, Eva. Recent research on the world history of beekeeping. **Bee World**, v. 80, n. 4, p. 174-186, 1999.
- CRIDLAND, Julie M.; TSUTSUI, Neil D.; RAMÍREZ, Santiago R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 457-472, 2017.
- DAINESE, Matteo et al. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. **Science Advances**, v. 5, n. 10, p. eaax0121, 2019.
- DAMS, M.; DAMS, L. Spanish rock art depicting honey gathering during the Mesolithic. **Nature**, v. 268, n. 5617, p. 228-230, 1977.
- DESNEUX, Nicolas et al. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n. 1, p. 81-106, 2007.
- DOGANTZIS, Kathleen A.; ZAYED, Amro. Recent advances in population and quantitative genomics of honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 31, p. 93-98, 2019.

- DRAPEAU, Mark D. et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Research**, v. 16, n. 11, p. 1385-1394, 2006.
- EL HASSANI, Abdessalam K. et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 30-39, 2005.
- ENGEL, Michael S. A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). **American Museum Novitates**, v. 2000, n. 3296, p. 1-11, 2000.
- ENGEL, Michael S.; RASMUSSEN, Claus; GONZALEZ, Victor H. Bees. **Encyclopedia of Social Insects**, p. 1–17, 2020.
- FAIRBROTHER, Anne et al. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT - Crops and livestock products**. FAO, 2020. Disponível em <https://www.fao.org/faostat/en>. Acesso em: 10 mai. 2022.
- FARDER-GOMES, Cliver F. et al. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.
- FENT, Karl; SCHMID, Michael; CHRISTEN, Verena. Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, v. 259, p. 113715, 2020.
- FONSECA, Vera L. I.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNI, A. Abelhas sociais e flores análise polínica como método de estudo. In: **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. p. 17-30.
- FRANCK, Pierre et al. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**, v. 86, n. 4, p. 420-430, 2001.
- GAO, Jing et al. Combined transcriptome and metabolite profiling analyses provide insights into the chronic toxicity of carbaryl and acetamiprid to *Apis mellifera* larvae. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2022.
- GARCÍA, Mariano G. et al. Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. **Science of The Total Environment**, p. 157291, 2022.
- GIANNINI, Tereza C. et al. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015.
- GONÇALVES, Sandrieli et al. Identifying global trends and gaps in research on pesticide fipronil: a scientometric review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-15, 2022.

- GOULSON, Dave et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.
- GOULSON, Dave. Neonicotinoids and bees: What's all the buzz? **Significance**, v. 10, n. 3, p. 6-11, 2013.
- GROZINGER, Christina M.; ZAYED, Amro. Improving bee health through genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 5, p. 277-291, 2020.
- GUNASEKARA, Amrith S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, p. 0706180001-0706180001, 2007.
- HAYDAK, Mykola H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.
- HUNG, Keng-Lou J. et al. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 20172140, 2018.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agropecuária**. Produção de Mel de Abelha. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mel-de-abelha/br>. Acesso em: 10 jun. 2022.
- ILYASOV, Rustem A. et al. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3615-3621, 2020.
- IWASAKI, Jay M.; HOGENDOORN, Katja. Non-insecticide pesticide impacts on bees: A review of methods and reported outcomes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 314, p. 107423, 2021.
- JOHANSEN, Carl A.; MAYER, Daniel F. **Pollinator Protection**. A Bee and Pesticide Handbook. New Haven: Wicwas, 212 p. 1990.
- KERR, Warwick E. The history of the introduction of African bees in Brazil. **Apiculture in Western Australia**, v. 2, p. 53-55, 1967.
- KIM, Kenneth T.; OGURO, Jodi. Update on the status of Africanized honey bees in the western states. **Western Journal of Medicine**, v. 170, n. 4, p. 220, 1999.
- KLATT, Björn K. et al. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132440, 2014.
- KLEIN, Alexandra-Maria et al. **A polinização agrícola por insetos no Brasil: Um Guia para Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas**. 1. ed. Fortaleza, CE: UNIFR, 2020. 149 p.
- KLEIN, Alexandra-Maria et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

- KLOSOWSKI, Ana L. M.; KUASOSKI, Marli; BONETTI, Maria B. P. Apicultura brasileira: inovação e propriedade industrial. **Revista de Política Agrícola**, v. 29, n. 1, p. 41, 2020.
- LEVENSON, Hannah K.; SHARP, April E.; TARPY, David R. Evaluating the impact of increased pollinator habitat on bee visitation and yield metrics in soybean crops. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 331, p. 107901, 2022.
- LI, Zhiguo et al. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 156, p. 36-43, 2019.
- LI, Xianjiang et al. Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 185-195, 2020.
- LINHART, Caroline et al. Pesticide contamination and associated risk factors at public playgrounds near intensively managed apple and wine orchards. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 2019.
- LOZIER, Jeffrey D.; ZAYED, Amro. Bee conservation in the age of genomics. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 3, p. 713-729, 2017.
- MALKA, Osnat et al. Reversible royalty in worker honeybees (*Apis mellifera*) under the queen influence. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, n. 3, p. 465-473, 2007.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, Vicente; RUIZ, Carlos; DE-LA-RÚA, Pilar. Migratory beekeeping and its influence on the prevalence and dispersal of pathogens to managed and wild bees. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 18, p. 184-193, 2022.
- MASHILINGI, Shibonage K. et al. Honeybees are far too insufficient to supply optimum pollination services in agricultural systems worldwide. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 335, p. 108003, 2022.
- MIOTELO, Lucas et al. Transcriptomic analysis of Malpighian tubules from the stingless bee *Melipona scutellaris* reveals thiamethoxam-induced damages. **Science of The Total Environment**, v. 850, p. 158086, 2022.
- MORAIS, Michelle M. et al. Perspectivas e desafios para o uso das abelhas *Apis mellifera* como polinizadores no Brasil. In: **Polinizadores no Brasil**. São Paulo, SP: EdUSP, 2012. p. 203–236.
- NICODEMO, Daniel et al. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2070-2075, 2014.
- OLLERTON, Jeff. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 48, p. 353-376, 2017.
- OLLERTON, Jeff; WINFREE, Rachael; TARRANT, Sam. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

- ORR, Michael C. et al. Global patterns and drivers of bee distribution. **Current Biology**, v. 31, n. 3, p. 451-458, 2021.
- PAGE, Robert E.; ROBINSON, Gene E. The genetics of division of labour in honey bee colonies. In: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, 1991. p. 117-169.
- PARREÑO, M. A. et al. Critical links between biodiversity and health in wild bee conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 37, n. 4, p. 309-321, 2021.
- POINAR JR, George O.; DANFORTH, Bryan N. A fossil bee from Early Cretaceous Burmese amber. **Science**, v. 314, n. 5799, p. 614-614, 2006.
- PORTO, Rafaella G. et al. Pollination ecosystem services: A comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. **Food Security**, v. 12, n. 6, p. 1425-1442, 2020.
- POTTS, Simon G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- POTTS, Simon G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.
- RAMOS, Juliana M.; CARVALHO, Naiara C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, p. 1-21, 2007.
- RAVEN, Peter H., EVERT, Ray F., EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p. 2001.
- ROAT, Thaisa C. et al. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1659-1670, 2014.
- ROAT, Thaisa C. et al. Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.36, n. 6, p. 1652-1660, 2017.
- ROFFET-SALQUE, Mélanie et al. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 226-230, 2015.
- RORTAIS, Agnès et al. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. **Science of the Total Environment**, v. 587, p. 524-537, 2017.
- ROUBIK, David W. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge University Press, 504p. 1989.
- SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1-16, 2019.
- SHEPPARD, Walter S. et al. Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 73-75, 1999.

- SHEPPARD, Walter S.; MEIXNER, Marina D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 367-375, 2003.
- SILVEIRA, Fernando A.; MELO, Gabriel A. R.; ALMEIDA, Eduardo A. B. **Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação**. Belo Horizonte, F.A. Silveira, 253p. 2002.
- SINGH, Ngangbam S. et al. A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. **Environmental Research**, v. 199, p. 111316, 2021.
- SIVITER, Harry et al. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. **Nature**, v. 596, n. 7872, p. 389-392, 2021.
- SPIVAK, Marla; FLETCHER, David J. C.; BREED, Michael D. **The African honey bee**. CRC Press, 435p. 2019.
- STEHLE, Sebastian; SCHULZ, Ralf. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5750-5755, 2015.
- TANG, Fiona H. M. et al. Risk of pesticide pollution at the global scale. **Nature Geoscience**, v. 14, n. 4, p. 206-210, 2021.
- TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. Porto Alegre: Artmed, 288p. 2010.
- TIHELKA, Erik et al. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.
- TINGLE, Colin C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-66, 2003.
- TOSI, Simone et al. Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. **Science of The Total Environment**, p. 156857, 2022.
- USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. **Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food**. USEPA, 2018.
- VANBERGEN, Adam J.; The Insect Pollinators Initiative. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 11, n. 5, p. 251-259, 2013.
- WHITFIELD, Charles W. et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. **Science**, v. 314, n. 5799, p. 642-645, 2006.
- WHO - World Health Organization. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019**. World Health Organization, 2020. Disponível em <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240005662>. Acesso em: 25 mai. 2022.
- WINFREE, Rachael; GROSS, Brian J.; KREMEN, Claire. Valuing pollination services to agriculture. **Ecological Economics**, v. 71, p. 80-88, 2011.

- WINSTON, Mark L. The biology and management of Africanized honey bees. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 173-193, 1992.
- WINSTON, Mark L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 294p. 1987.
- WRIGHT, Ian. Fipronil: a microcosm of flea control? **UK Vet Companion Animal**, v. 18, n. 4, p. 139-141, 2013.
- ZALLER, Johann G. et al. Pesticides in ambient air, influenced by surrounding land use and weather, pose a potential threat to biodiversity and humans. **Science of The Total Environment**, p. 156012, 2022.
- ZALUSKI, Rodrigo et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1062-1069, 2015.
- ZANNI, Virginia et al. Transcriptional signatures of parasitization and markers of colony decline in Varroa-infested honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 87, p. 1-13, 2017.
- ZAYED, Amro et al. Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 591-615, 2012.

CAPÍTULO II

A INGESTÃO DO INSETICIDA FIPRONIL ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA EM *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

RESUMO

As abelhas são polinizadores eficientes de diversas plantas, no entanto, podem consumir recursos florais contaminados com agrotóxicos durante o forrageamento. O objetivo deste estudo foi verificar a influência da ingestão da dose letal e subletal do inseticida fipronil após dois períodos de exposição aguda no perfil da expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras. As abelhas receberam xarope de mel contaminado com o inseticida fipronil. Foram testadas duas dosagens ($DL_{50} = 0,19 \mu\text{g/abelha}$; $D_{\text{Sub}} = 0,0019 \mu\text{g/abelha}$) e dois períodos de exposição (uma e quatro horas). Após a exposição, o consumo de xarope por abelha foi mensurado, e o tecido cerebral das abelhas foi utilizado para análise do transcriptoma. Após uma hora de exposição, houve resposta genética intensa ao estresse, possivelmente devido à ativação rápida do sistema imunológico. Após quatro horas, alguns genes possivelmente retornaram aos níveis normais, resultando em redução na expressão diferencial. A análise genética mostrou que o fipronil afetou diversas vias metabólicas, de transporte e de regulação celular, incluindo vias dos ribossomos e canais iônicos. Genes relacionados ao desenvolvimento, adesão celular, metabolismo e transporte celular apresentaram redução na expressão, enquanto genes de desintoxicação e detecção de substâncias foram suprarregulados. A supressão significativa de genes da família OBP (*Olfactory Binding Protein*) pode levar as abelhas em fase de campeiras a comportamentos desorientados e redução na eficiência de forrageamento. Os achados deste estudo ressaltam os impactos dos inseticidas no nível genético das abelhas e enfatizam a necessidade de estratégias de proteção desses polinizadores.

Palavras-chave: abelhas campeiras; transcriptoma; DEGs; desintoxicação; OBP.

THE INGESTION OF THE INSECTICIDE FIPRONIL ALTERS GENE EXPRESSION IN *Apis mellifera* AFRICANIZED

ABSTRACT

Bees are efficient pollinators of various plants; however, they can consume floral resources contaminated with pesticides during foraging. The aim of this study was to investigate the influence of ingesting lethal and sublethal doses of the insecticide fipronil after two periods of acute exposure, on the gene expression profile of bees *Apis mellifera* Africanized in the foraging phase. The bees were fed with fipronil-contaminated honey syrup. Two doses ($LD_{50} = 0.19 \mu\text{g}/\text{bee}$; $SD = 0.0019 \mu\text{g}/\text{bee}$) and two exposure periods (one and four hours) were tested. After exposure, the syrup consumption per bee was measured, and the bees' brain tissue was used for transcriptome analysis. After one hour of exposure, there was an intense genetic response to stress, possibly due to rapid activation of the immune system. After four hours, some genes likely returned to normal levels, resulting in a reduction in differential expression. The genetic analysis revealed that fipronil affected various metabolic, transport, and cellular regulation pathways, including ribosome pathways and ion channel regulation. Genes related to development, cellular adhesion, metabolism, and transport showed reduced expression, while detoxification and substance detection genes were upregulated. The significant suppression of OBP (Olfactory Binding Protein) gene family can lead foraging bees to disoriented behavior and reduced foraging efficiency. These findings highlight the impacts of insecticides on the genetic level of bees and emphasize the need for protection strategies for these pollinators.

Keywords: foraging bees; transcriptome; DEGs; detoxification; OBP.

INTRODUÇÃO

Devido às transformações nas práticas agrícolas e ao crescente aumento da intensificação da agricultura, o uso de agrotóxicos tem apresentado um aumento significativo em todo o mundo nas últimas décadas (Tudi et al. 2021). No entanto, essa prática tem suscitado debates e preocupações em nível global, visto que a utilização indiscriminada e em grande escala desses produtos gera impactos negativos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Bonmatin et al. 2015; Sharma et al. 2019; García et al. 2022). Devido ao uso generalizado e incorreto dos agrotóxicos, estes podem afetar áreas próximas aos locais de aplicação, resultando na contaminação de áreas naturais e de conservação (Zaller et al. 2022), corpos d'água (Stehle e Schulz 2015), bem como plantas e animais não alvos, como tem ocorrido com as abelhas (Cech et al. 2023).

No que diz respeito à forma como as abelhas são contaminadas, as exposições podem ocorrer por ingestão ou via tópica. Na exposição por ingestão, as abelhas são expostas ao agrotóxico pelo consumo do alimento contaminado (néctar, pólen ou água) (Rortais et al. 2017). Este tipo de exposição pode ser contínua e prolongada, devido a diversos agrotóxicos serem absorvidos pelas plantas, atingindo o néctar e o pólen por condução da seiva (Goulson 2013), assim, quando esses recursos florais são coletados pelas abelhas, podem ser armazenados e consumidos pelos demais indivíduos da colônia em doses subletais, acarretando em impactos negativos sobre as abelhas (Rortais et al. 2017).

Entre esses agrotóxicos, o fipronil [(RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile] é um inseticida sistêmico de amplo espectro responsável pela contaminação de recursos florais e diversos produtos apícolas (Bonmatin et al. 2015; Singh et al. 2021). Este inseticida atua como bloqueador não competitivo do receptor de ácido gama-aminobutírico no sistema nervoso central dos insetos, afetando os canais de cloreto dependentes de glutamato, causando atividade descontrolada do sistema nervoso central, hiperexcitação, convulsões, paralisia e morte dos insetos (Gunasekara et al. 2007; Gonçalves et al. 2022).

Diversas pesquisas evidenciam os efeitos prejudiciais causados pelo fipronil em abelhas *Apis mellifera*, resultando em alterações no comportamento, locomoção, habilidades cognitivas, aprendizagem e memória das abelhas (Pisa et al. 2015; Zaluski et al. 2015; Roat et al. 2017; Bovi et al. 2018). Embora estudos que avaliem efeitos comportamentais e fisiológicos em abelhas expostas aos agrotóxicos sejam de extrema relevância, as abordagens de genética molecular têm se mostrado uma ferramenta

importante para detectar estressores prejudiciais que geralmente não são identificados em experimentos focados na fisiologia e comportamento das abelhas (Costa et al. 2022).

A análise dos padrões de expressão gênica tem sido empregada em várias pesquisas, investigando os efeitos de parasitas nas abelhas (Zanni et al. 2017), estresse nutricional (Corby-Harris et al. 2014), efeito da suplementação mineral na expressão de genes (Camilli et al. 2022), bem como estudos transcriptômicos que avaliam o efeito de inseticidas no perfil de expressão gênica do cérebro de abelhas contaminadas (Li et al. 2019; Gao et al. 2022; Astolfi et al. 2022). Considerando que o cérebro das abelhas é o principal órgão afetado pelos inseticidas neurotóxicos, os sistemas cerebrais podem ser facilmente perturbados por esses agrotóxicos (Li et al. 2019). Portanto, técnicas avançadas, como análises de genética molecular, podem ser empregadas para avaliar com maior precisão os danos causados por esses inseticidas nas abelhas (Azevedo e Nocelli 2022).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da ingestão da dose letal e subletal do inseticida fipronil após dois períodos de exposição aguda no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de abelhas *A. mellifera* africanizadas na fase de campeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

Foram utilizadas colmeias de abelhas melíferas africanizadas (*A. mellifera*) mantidas no apiário experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ - UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil (22° 50' 28" S, 48° 25' 43" O, elevação de 726 m). A utilização das abelhas no estudo foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMVZ/UNESP), registrado sob o protocolo nº 0006/2021.

Obtenção das abelhas em fase de campeiras

Para a coleta das abelhas na fase de campeiras, foram utilizadas dez colônias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) mantidas em colmeias tipo Langstroth, padronizadas em relação ao número de quadros contendo favos de cria e alimento.

Inicialmente, foram retirados dois quadros contendo favos com cria operculada de cada colmeia. Esses quadros foram protegidos com bolsas confeccionadas com tecido filó e devolvidos às suas respectivas colmeias. Após um período de 24 horas, os quadros

protegidos foram novamente retirados das colmeias, e as abelhas recém-emergidas foram marcadas com uma caneta atóxica na região do pronoto.

Logo após a marcação das abelhas, as bolsas de filó foram retiradas, e os quadros contendo as abelhas marcadas foram devolvidos às suas respectivas colmeias. Após o período correspondente ao desenvolvimento das abelhas operárias até a fase de campeiras (21 dias), foram coletadas 180 abelhas previamente marcadas e acondicionadas em tubos tipo *Falcon* perfurados.

Os tubos contendo as abelhas marcadas foram levados ao freezer (-18°C) por aproximadamente dois minutos para anestesia, possibilitando a manipulação dos insetos. As abelhas na fase de campeiras foram distribuídas em placas de *Petri* perfuradas e mantidas em jejum total por três horas para esvaziar a vesícula melífera.

Exposição das abelhas ao alimento contaminado com Fipronil

Foi fornecido xarope de mel na proporção 1:1, tanto contaminado quanto não contaminado com o fipronil, para as abelhas acondicionadas em placas. Realizamos diluições com o ingrediente ativo fipronil (Sigma-Aldrich®; 98,8% de pureza) a fim de obter soluções de xarope de mel com a dose letal ($DL_{50} = 0,19 \mu\text{g/abelha}$) e subletal ($D_{\text{Sub}} = 0,0019 \mu\text{g/abelha}$) do inseticida (Zaluski et al. 2015, Lunardi et al. 2017, Bovi et al. 2018), considerando o consumo médio de 50 μL de xarope por abelha, correspondente ao volume médio da vesícula melífera (Thompson e Hunt, 1999).

Os alimentadores com xarope de mel permaneceram disponíveis para o consumo das abelhas durante dois períodos de exposição, uma e quatro horas. Em cada tratamento, foram utilizadas 30 abelhas, com um desenho experimental realizado em sextuplicata, contendo cinco abelhas por repetição (três dosagens: DL_{50} , D_{Sub} e Controle; dois períodos de exposição: 1 e 4 horas).

Os alimentadores com xarope foram pesados em uma balança analítica antes e após o período de exposição. O consumo do xarope pelas abelhas foi avaliado estatisticamente por ANOVA e para a comparação das médias, o teste de Tukey ($p < 0,05$) pelo programa Sisvar versão 5.6. Após a exposição, as abelhas foram coletadas e imediatamente congeladas, permanecendo armazenadas em um ultrafreezer (-80°C) até o momento da análise transcriptômica.

Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq

As abelhas foram decapitadas, com a remoção dos olhos compostos de cada cabeça, a fim de evitar possíveis contaminações causadas pela pigmentação ocular. Posteriormente, as cabeças foram maceradas para expor o material cerebral e, em seguida, seguiram para a extração do RNA total.

O RNA total foi extraído dos pools cerebrais de *A. mellifera* em fase de campeiras (três cérebros por *pool*) utilizando o protocolo de reagentes Trizol[®], de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) (Chomczynski 1993). As concentrações de RNA foram quantificadas em cada amostra usando um fluorômetro Qubit[™] 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). Para a preparação das bibliotecas, foram utilizados 4.000 ng de RNA total como amostra inicial para o sequenciamento de RNA Illumina (RNA-Seq) com a utilização do Kit SureSelect Strand Specific RNA Library Preparation (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

As bibliotecas foram quantificadas por qPCR no aparelho StepOne Plus (Life Technologies) com o uso do NEBNext[®] Library Quant Kit for Illumina[®] (New England BioLabs[®]Inc.). Posteriormente, as bibliotecas foram diluídas a 12 pM, carregadas em *flowcell* presente no NextSeq (Illumina, San Diego, EUA) e sequenciadas pelo método sequence by synthesis (SBS) por 50 ciclos no aparelho NextSeq, em fragmentos de 150 pb.

Processamento dos dados RNA-Seq e análise de diferenças de expressões gênicas

O programa FASTQC foi usado para verificar o conteúdo do adaptador e avaliar a qualidade das leituras brutas. O alinhamento dos dados foi realizado com o Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.12, utilizando o Amel_HAv3.1 do NCBI (RefSeq assembly accession: GCF_003254395.2) como referência. A matriz de contagem de recursos foi criada usando o HTSeq v0.11.2 e o arquivo de anotação GTF de Amel_HAv3.1.

A análise dos dados, visualização e plotagem foram realizadas usando o RStudio para a linguagem R, incluindo o pacote ggplot2 v3.3.2. A análise de expressão diferencial foi realizada usando o pacote edgeR v3.30.3, disponível no projeto de software Bioconductor para a linguagem R. Os genes de baixa expressão foram filtrados, mantendo aqueles que tiveram a contagem por milhão maior que um em pelo menos duas das amostras. As contagens foram normalizadas usando a normalização TMM. O modelo log-linear generalizado binomial negativo foi usado na análise de expressão diferencial, e o procedimento de Benjamini & Hochberg (FDR) foi utilizado para correções de testes

múltiplos. Os genes foram considerados significativamente regulados com valor de p ajustado $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$.

Análise de ontologia genética

A análise de ontologia gênica foi realizada para as listas de genes identificados com expressão diferencial usando o pacote gprofiler2, uma interface R para as ferramentas g: Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Os valores de p do teste exato de Fisher foram ajustados pelo procedimento de Benjamini & Hochberg (FDR) para correção de múltiplos testes, e a significância estatística foi considerada quando o valor de p ajustado foi $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$.

RESULTADOS

Consumo do alimento contaminado com fipronil

Em relação às dosagens do inseticida fornecidas no alimento, houve diferenças significativas apenas durante uma hora de exposição (GL = 2; F = 15,17; $p < 0,001$). O maior consumo entre os tratamentos ocorreu com as abelhas do tratamento controle, seguido pelas doses letal e subletal, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Consumo médio de xarope de mel ($\mu\text{L}/\text{abelha}$) contaminado ou não-contaminado com dose letal (0,19 $\mu\text{g}/\text{abelha}$) e subletal (0,0019 $\mu\text{g}/\text{abelha}$) do inseticida fipronil pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas após uma e quatro horas de exposição.

Tempo de exposição	Controle	Dose Letal	Dose Subletal
1 hora	38,49 $\pm$ 3,24a	29,77 $\pm$ 5,89b	21,41 $\pm$ 6,43c
4 horas	39,29 $\pm$ 6,07	53,31 $\pm$ 9,21	44,37 $\pm$ 13,10

*Letras distintas na linha apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos pelo inseticida fipronil em abelhas melíferas africanizadas

Após a ingestão do xarope contaminado com o inseticida fipronil durante uma hora de exposição, houve alteração na expressão de um total de 2.391 genes ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$). Desses, 2.026 genes foram diferencialmente expressos (DEGs) na dosagem letal e 1.829 na dosagem subletal. Um total de 1.464 genes apresentaram alteração na sua expressão em comum para as duas dosagens testadas. Também foram identificados genes

alterados exclusivamente em cada dosagem, com 562 DEGs para a dose letal e 365 DEGs para a dose subletal (Figura 1A).

À medida que as abelhas foram expostas por um período mais longo ao inseticida, houve uma redução no número de genes diferencialmente expressos. As abelhas contaminadas após quatro horas de exposição apresentaram um número total de 147 genes alterados ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$). No tratamento com a dose letal, 96 DEGs foram registrados, enquanto 102 DEGs foram observados para a dose subletal. Em ambos os tratamentos, houve a alteração de 51 genes em comum (Figura 1B). Além disso, um total de 45 DEGs foram observados exclusivamente no tratamento com a dose letal, e 51 nas abelhas tratadas com a dose subletal.

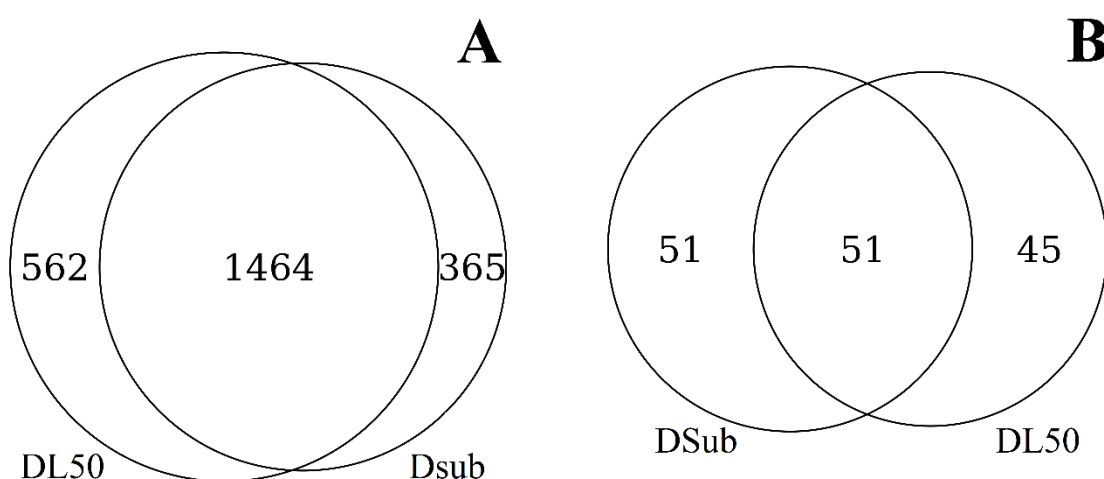


Figura 1. Diagrama de Venn indicando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas via ingestão ao inseticida fipronil após o período de uma (A) e quatro horas (B) nas dosagens letal (DL₅₀) e subletal (Dsub) em comparação aos grupos controles.

Ao analisar os DEGs em abelhas contaminadas com o inseticida, é possível distinguir um padrão na expressão dos genes em relação aos períodos de exposição e às dosagens do fipronil utilizadas. Após uma hora de exposição, a maioria dos DEGs estava infrarregulado (*downregulated*), independentemente da dosagem utilizada (DL₅₀ = 1118 DEGs; DSub = 1010 DEGs). No entanto, um número significativo de genes estava suprarregulado (*upregulated*), 908 e 819, nas dosagens letal e subletal, respectivamente (Figura 2A).

À medida que as abelhas foram expostas ao fipronil por um período mais longo (4 horas), ocorreu o oposto no padrão de expressão dos genes em comparação com a exposição de uma hora, havendo um maior número de genes suprarregulados, em ambas

as dosagens testadas (DL50 = 55 DEGs; Dsub = 57 DEGs). No entanto, dezenas de genes tiveram sua regulação reduzida após a exposição de quatro horas, com 41 e 45 DEGs infrarregulados nas dosagens letal e subletal, respectivamente (Figura 2B).

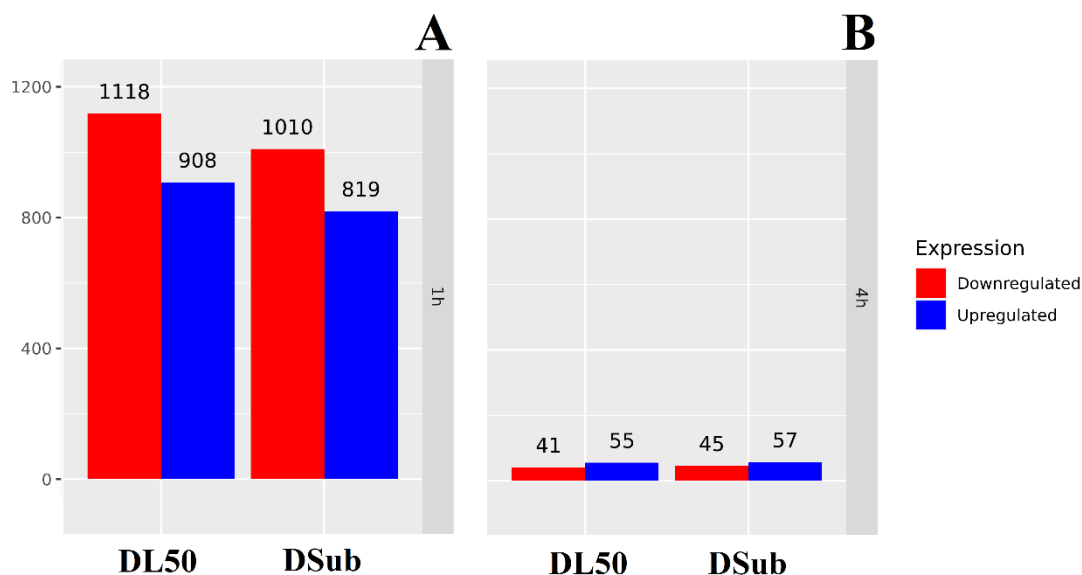


Figura 2. Histograma do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) infrarregulados (*downregulated*) e suprarregulados (*upregulated*) entre os grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas ao fipronil via ingestão após o período de uma (A) e quatro horas (B) com a dose letal (DL₅₀) e subletal (Dsub) em comparação aos grupos controles.

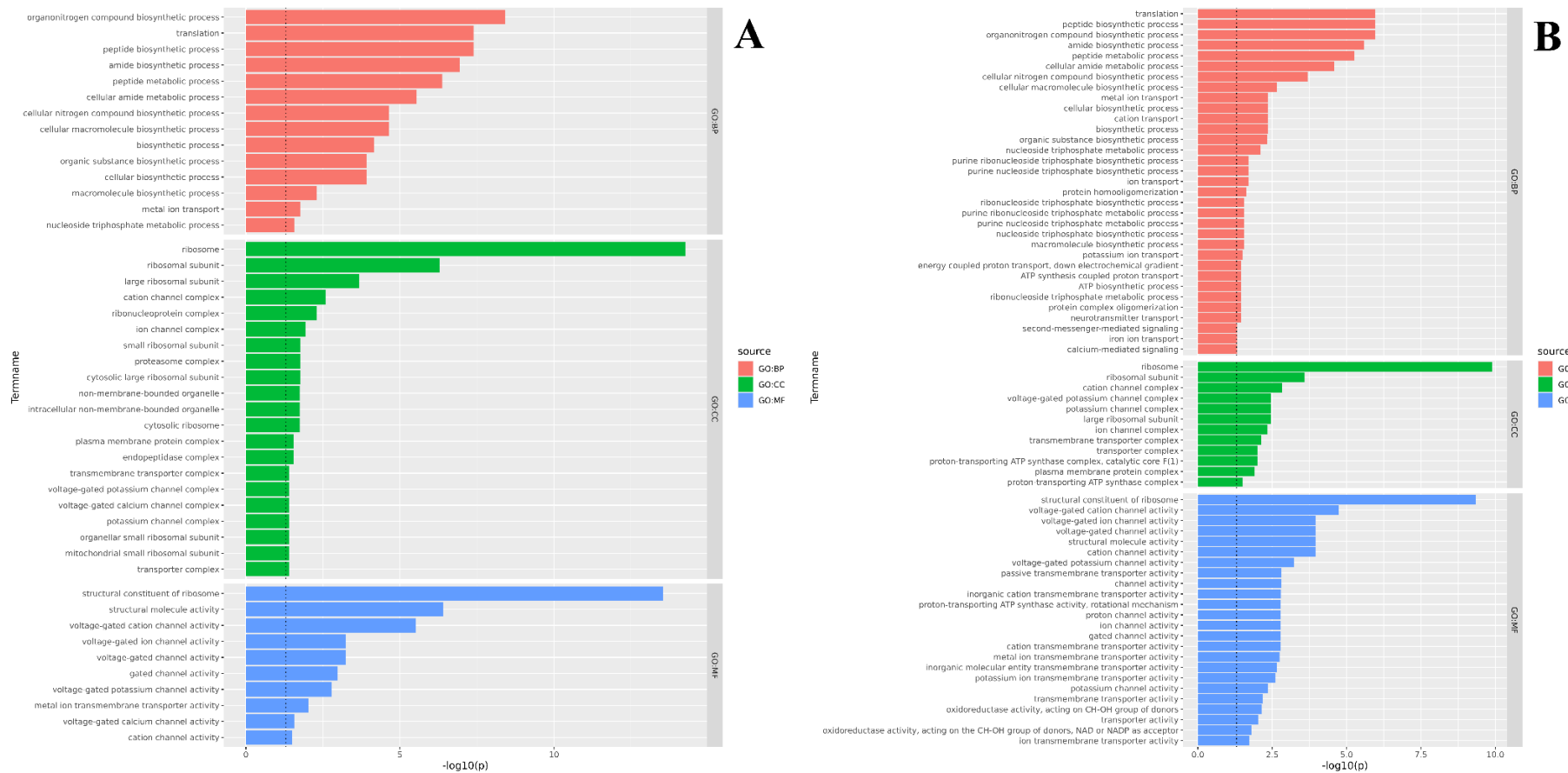
Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) e agrupados em relação as suas categorias funcionais, sendo classificadas em processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC).

Após uma hora de exposição ao inseticida, os DEGs de abelhas que ingeriram a dose letal do fipronil apresentaram maior enriquecimento na categoria de componentes celulares, com 21 termos; os processos biológicos e funções moleculares foram enriquecidos com 14 e 10 termos, respectivamente (Figura 3A). Consideravelmente no tratamento em que abelhas receberam a dose subletal do inseticida, um maior número de termos foi enriquecido nas categorias funcionais, sobretudo aos processos biológicos, enriquecido com 33 termos; seguido pelas funções moleculares (n = 24 termos) e componentes celulares (n = 12 termos) (Figura 3B).

Os termos significativamente enriquecidos nos processos biológicos em abelhas que consumiram a dose letal e subletal do fipronil após uma hora de exposição estão principalmente associados aos processos biossintéticos e metabólicos, tradução e

transporte de macro e micromoléculas. Na categoria de componentes celulares, os termos enriquecidos estão predominantemente relacionados aos ribossomos e suas subunidades; muitos DEGs envolvidos em vias de complexo de canais catiônicos também foram enriquecidas, como canais de íons metálicos, cálcio e potássio depende de voltagem. Os DEGs correspondentes as funções moleculares estão envolvidos em vias associadas aos ribossomos e atividade de canais dependente de voltagem, sendo os principais termos enriquecidos (Figura 3 - A e B).

A análise de GO para os DEGs na intersecção dos tratamentos, ou seja, que ocorreram em ambos os tratamentos, evidenciaram que no tratamento após uma hora de exposição, a categoria de processos biológicos foi enriquecida com 20 termos, seguido pelas funções moleculares (n = 16 termos) e componentes celulares (n = 10 termos), respectivamente (Figura 4). As principais vias enriquecidas na categoria de processos biológicos a partir da GO incluem os processos de tradução, processos biossintéticos e metabólicos. As funções moleculares foram enriquecidas principalmente sobre as estruturas de ribossomos, atividades de estruturas moleculares e de canais de transporte; similarmente, a categoria funcional de componentes celulares teve maior significância em DEGs envolvidos com as estruturas celulares de ribossomos e canais de transporte.



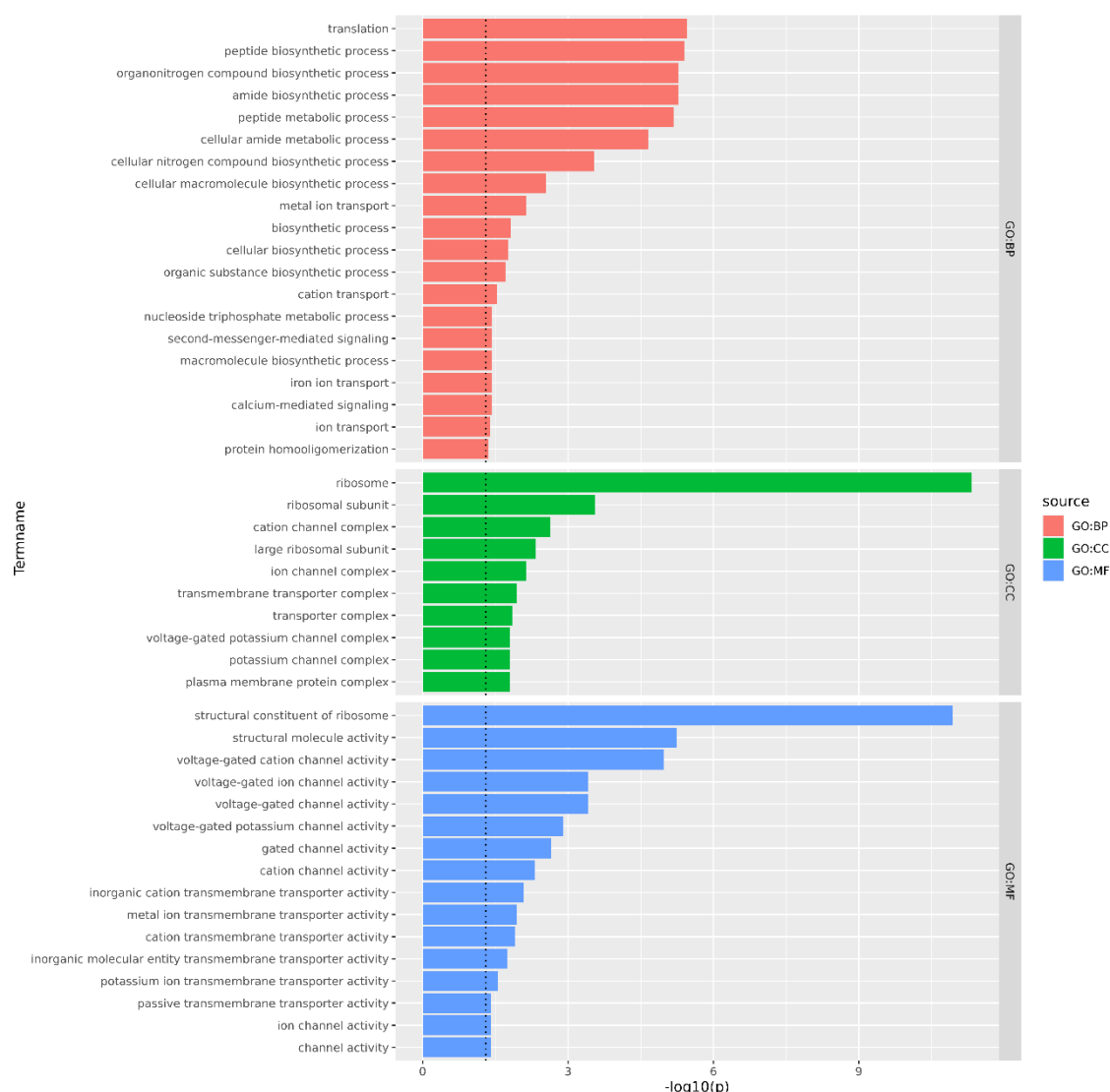


Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após uma hora de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Após quatro horas de exposição, as funções moleculares apresentaram um maior enriquecimento, com oito termos; tanto os processos biológicos quanto os componentes celulares foram enriquecidos com apenas um termo em cada categoria (Figura 5A). Os DEGs de funções moleculares estão principalmente associados a atividade de monooxigenase, atividades de oxidoreductase e ligações de íons de ferro e tetrapirrol. Os BP apontam DEGs associados principalmente ao processo metabólico de carboidratos; já os CC principalmente à região extracelular.

Já as abelhas que receberam a dose subletal do fipronil por quatro horas apresentaram enriquecimento de apenas duas categorias funcionais, cinco termos enriquecendo as funções moleculares e apenas um termo enriquecendo os processos

biológicos (Figura 5B). As vias enriquecidas nas MF foram atividade monooxigenase, ligações de íons de ferro, tetrapirrol, oxidoredutase e heme; nos BP a única via enriquecida foi de região extracelular.

Em relação a interseção realizada para os DEGs do tratamento de quatro horas de exposição, a categoria de funções moleculares apresentou elevado número de termos enriquecidos ($n = 13$ termos), em comparação com os BP e CC, com apenas um termo enriquecendo as respectivas categorias funcionais de GO (Figura 6).

Assim como a GO dos DEGs que receberam a dose letal do fipronil, a intersecção entre os DEGs (dose letal e subletal) apontam o processo metabólico de carboidratos como a única via enriquecida de BP; o enriquecimento da via associada a região extracelular em CC; e nas MF a atividade monooxigenase e oxidoredutase, além de genes atribuídos às ligações de íons de ferro, tetrapirrole e heme.

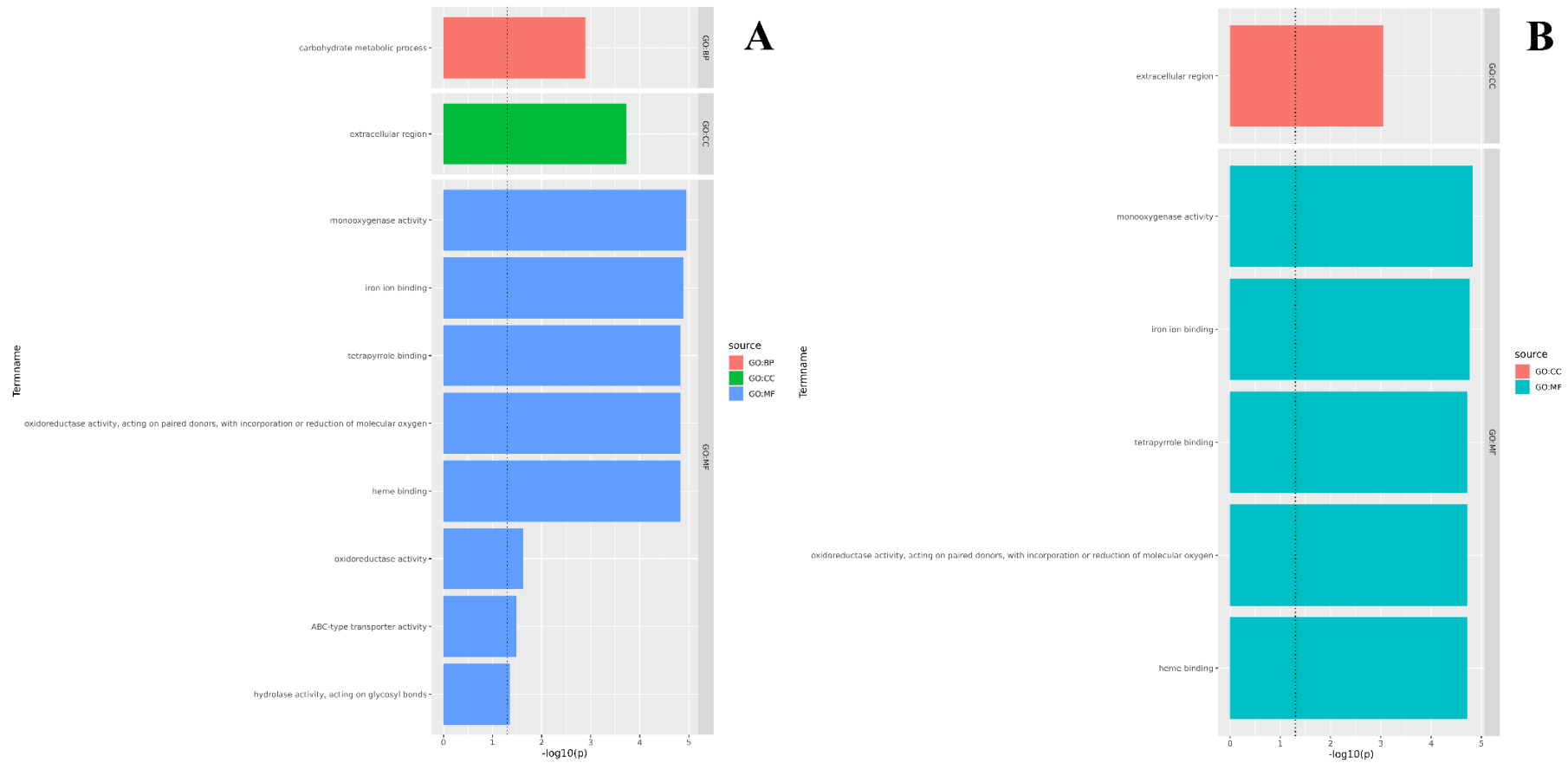


Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após quatro horas de exposição via ingestão a dose letal (A) e subletal (B) do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

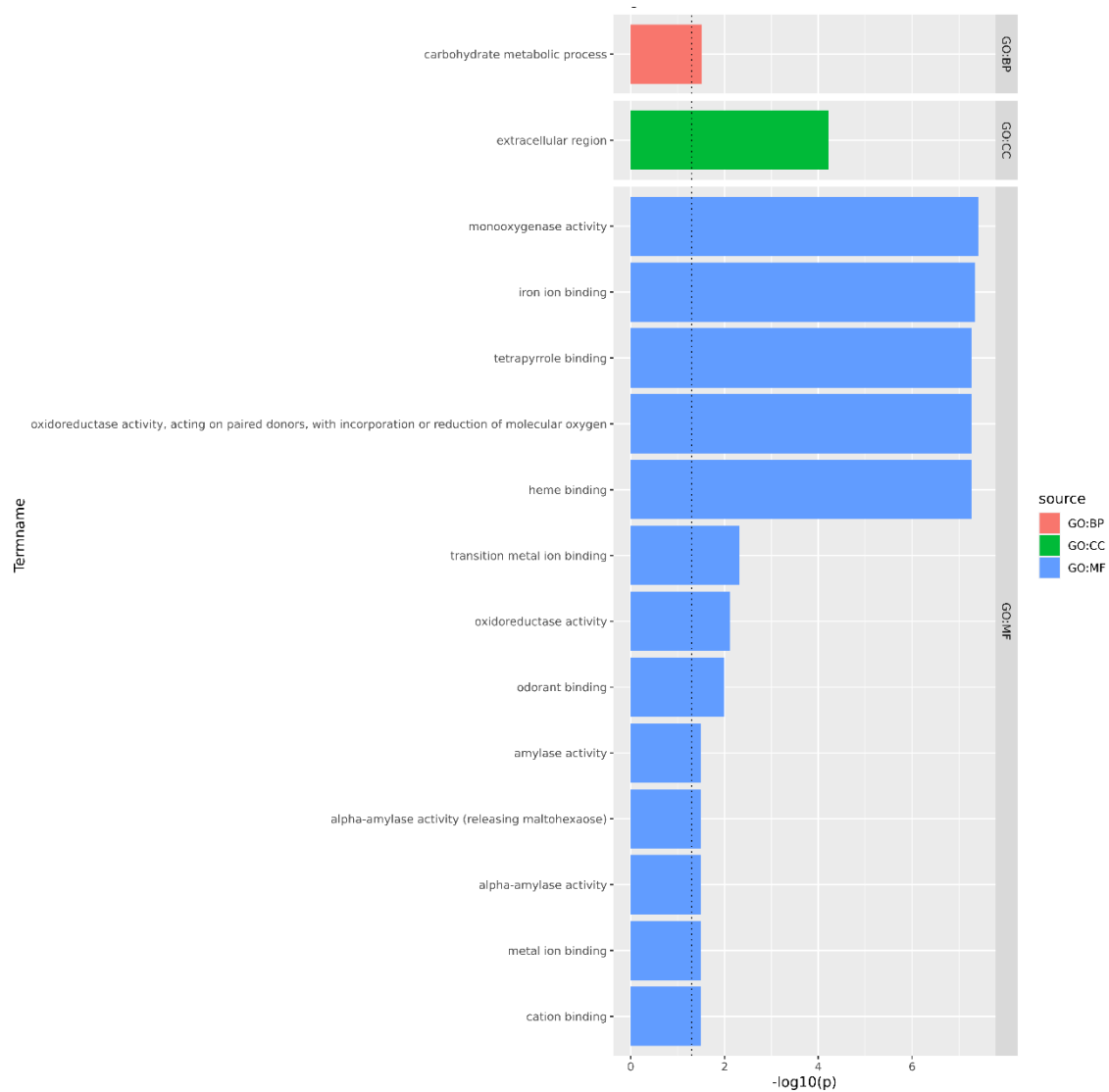


Figura 6. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após quatro horas de exposição via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Levando em consideração o grande número de DEGs nos respectivos tratamentos, na Tabela 2 são apresentados os dez principais genes diferencialmente expressos mais significativos em relação ao valor de logFC para cada tratamento ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$); sendo selecionados para cada tratamento cinco genes suprarregulados e infrarregulados já caracterizados (Fent et al. 2020). A análise do agrupamento de todos os DEGs em comum após uma e quatro horas de exposição ao inseticida fipronil estão disponíveis nos dados suplementares (Apêndices 1 e 2).

As abelhas expostas por uma hora a dose letal do fipronil apresentaram infrarregulação de genes envolvidos no reparo da molécula de DNA (LOC100577751), resposta imunológica (LOC408917), síntese de proteínas e adesão celular (LOC102655710, LOC412791); houve suprarregulação de genes associados ao transporte e componentes da membrana (LOC100576458, LOC107965279), proteínas associadas à detecção de odores (*Obp14*), assim como genes estruturais da cutícula (LOC724199).

Ao mesmo período de exposição (uma hora), porém com a dose subletal ingerida pelas abelhas, genes associados a produção de moléculas de adenosina trifosfato - ATP (LOC726367), locomoção (LOC551706) e produção de enzimas responsáveis pela metabolização de proteínas (LOC410583) diminuíram sua expressão (infrarregulados). No mesmo tratamento, houve um aumento da regulação de genes associados principalmente a digestão de proteínas (LOC551180), receptores e componentes da membrana (LOC100576135, LOC107965279) e contração muscular (LOC102656116).

Nos tratamentos em que as abelhas foram submetidas ao inseticida por quatro horas, houve uma similaridade nos DEGs, independente das dosagens testadas. Havendo uma diminuição relevante na regulação de genes que codificam proteínas de ligação odorante (*Obp2*, *Obp1*, *Obp6*, *Obp5*); já o aumento da expressão (suprarregulação) foram representadas por genes associados principalmente aos componentes estruturais dos ribossomos (DL_{50} = LOC113219340, LOC113219383, LOC113219387; DS_{ub} = LOC113219340, LOC113219387), além da degradação de fosfolipídios (LOC107965279) e resposta imunológica (LOC113218873).

Tabela 2. Principais genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas via ingestão a dose letal e subletal do inseticida fipronil durante uma e quatro horas de exposição.

Gene	Descrição do gene	Função	Expressão	logFC
1 hora – Dose Letal				
LOC100577751	LIM/homeobox protein Lhx5	Reparo do DNA	Infrarregulado	-6,15
LOC408917	Mitogen-activated protein kinase 15	Resposta celular ao estresse	Infrarregulado	-5,98
LOC102655710	Basic proline-rich protein	Síntese de proteínas	Infrarregulado	-5,85
LOC410809	Protein pygopus	Ligação de íons metálicos	Infrarregulado	-5,72
LOC412791	Flocculation protein FLO11	Adesão celular	Infrarregulado	-5,58
LOC100576458	Urea transporter 2	Atividade de transporte transmembranar	Suprarregulado	4,00
<i>Obp14</i>	Odorant binding protein 14	Receptores olfativos	Suprarregulado	4,09
LOC724199	Early nodulin-75	Componente estrutural da cutícula	Suprarregulado	4,16
LOC107965279	Pancreatic lipase-related protein 2	Degradação dos fosfolipídios	Suprarregulado	5,46
LOC100576677	DNA repair protein RAD51 homolog 4	Reparo do DNA	Suprarregulado	5,55
1 hora – Dose Subletal				
LOC102655710	Basic proline-rich protein	Síntese de proteínas	Infrarregulado	-6,16
LOC726367	Glycerate kinase-like	Fosforilação oxidativa	Infrarregulado	-5,98
LOC100577751	LIM/homeobox protein Lhx5	Reparo do DNA	Infrarregulado	-5,97
LOC551706	Unconventional myosin-Ixb	Atividade motora	Infrarregulado	-5,91
LOC410583	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Aminotransferase	Infrarregulado	-5,74
LOC551180	Aminopeptidase N	Digestão intermediária de proteínas	Suprarregulado	3,82
LOC100576135	Glutamate receptor 1-like	Receptores de membrana	Suprarregulado	3,95
LOC107965279	Pancreatic lipase-related protein 2	Degradação dos fosfolipídios	Suprarregulado	4,37
LOC102656116	Allatotropin-like	Contração muscular	Suprarregulado	4,93
LOC102654608	Homeobox protein ceh-19	Ligação de DNA	Suprarregulado	5,55
4 horas – Dose Letal				
<i>Obp2</i>	Odorant binding protein 2	Receptores olfativos	Infrarregulado	-11,13
<i>Obp1</i>	Odorant binding protein 1	Receptores olfativos	Infrarregulado	-10,65

Gene	Descrição do gene	Função	Expressão	logFC
<i>Obp6</i>	Odorant binding protein 6	Receptores olfativos	Infrarregulado	-9,09
<i>Obp5</i>	Odorant binding protein 5	Receptores olfativos	Infrarregulado	-5,80
LOC726362	4-coumarate--CoA ligase 1	Atividade de ligase	Infrarregulado	-5,10
LOC113219340	large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Suprarregulado	4,96
LOC113218873	Putative leucine-rich repeat-containing protein	Regulação imunológica	Suprarregulado	4,96
LOC113219383	Large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Suprarregulado	4,96
LOC113219387	Large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Suprarregulado	4,96
LOC107965279	Pancreatic lipase-related protein 2	Degradação dos fosfolipídios	Suprarregulado	4,96
4 horas – Dose Subletal				
<i>Obp2</i>	Odorant binding protein 2	Receptores olfativos	Infrarregulado	-10,63
<i>Obp1</i>	Odorant binding protein 1	Receptores olfativos	Infrarregulado	-9,78
<i>Obp6</i>	Odorant binding protein 6	Receptores olfativos	Infrarregulado	-9,18
LOC552229	Esterase B1	Atividade de hidrólise	Infrarregulado	-6,89
<i>Obp5</i>	Odorant binding protein 5	Receptores olfativos	Infrarregulado	-6,18
LOC112935903	Cytochrome P450 6a14-like	Desintoxicação xenobiótica	Suprarregulado	3,91
LOC113219340	Large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Suprarregulado	4,30
LOC113219387	Large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Suprarregulado	4,91
LOC107965279	Pancreatic lipase-related protein 2	Degradação dos fosfolipídios	Suprarregulado	5,03
LOC113218873	Putative leucine-rich repeat-containing protein	Regulação imunológica	Suprarregulado	5,11

DISCUSSÃO

Diferentes estudos têm demonstrado o efeito prejudicial do inseticida fipronil para abelhas melíferas, abelhas-sem-ferrão e silvestres (Zaluski et al. 2015; Roat et al. 2017; Bovi et al. 2018). No entanto, muitos desses estudos têm se concentrado na avaliação da mortalidade relacionada à dosagem ou em efeitos comportamentais (Renzi et al. 2016; Lunardi et al. 2017; Bovi et al. 2018; Mulvey e Cresswell 2020). Recentemente, a aplicação de técnicas avançadas de análise genética, como o transcriptoma em abelhas expostas aos agrotóxicos, tem se mostrado uma abordagem promissora para compreender de forma mais abrangente os efeitos causados por esses produtos químicos (Dai 2021; Gao 2020, 2022; Astolfi et al. 2022). A abordagem gênica tem contribuído para maior conhecimento dos efeitos globais dos agrotóxicos, preenchendo lacunas importantes na compreensão dos seus impactos em organismos não-alvo, como as abelhas (Fent et al. 2020; Astolfi et al. 2022; Tosi et al. 2022).

Foi observado que as abelhas apresentaram taxa de consumo significativamente maior de xarope não contaminado, em relação ao consumo de xarope contendo doses letais e subletais de fipronil durante o período de uma hora. Existem diversas evidências científicas indicando inseticidas com efeitos repelentes, podendo levar as abelhas a evitar áreas tratadas, devido seu contato direto ou à sua presença residual nas flores (Sgolastra et al. 2018; Wu et al. 2021; Cullen et al. 2023).

O acentuado número de genes diferencialmente expressos (DEGs) no tratamento por uma hora de exposição ($n = 2391$ genes) em relação ao período de quatro horas ($n = 147$ genes), pode estar associado a uma maior resposta do sistema imune logo após a exposição ao fipronil (James e Xu 2012; Decio et al. 2021; Orčić et al. 2022). A intoxicação com inseticidas pode induzir reações imunes que ocorrem rapidamente, requerendo a síntese de novas moléculas com funções de sinalização, realização de tarefas celulares e proliferação de células imunes adicionais (James e Xu 2012; Bajgar et al. 2015; Dolezal et al. 2019). Durante a primeira hora de exposição, é provável que tenha ocorrido uma resposta mais intensa ao estresse, que após quatro horas, retornaram aos seus níveis normais de expressão, promovendo redução no número de DEGs ao decorrer do período de exposição (El-Seedi et al. 2022).

Em relação a análise de ontologia gênica, foi possível verificar as principais vias afetadas em cada tratamento, associado as respectivas categorias funcionais enriquecidas. No tratamento após uma hora de exposição, ambas as dosagens apresentaram similaridade nas vias enriquecidas, sendo os processos biossintéticos e metabólicos, tradução e transporte de macro e micromoléculas as principais vias agrupadas em BP (processos biológicos). A exposição aos

inseticidas pode afetar uma variedade de processos biossintéticos e metabólicos em insetos, isso inclui o metabolismo de xenobióticos e atividade das monooxigenases, que atuam na detoxificação e eliminação dos agrotóxicos (Pisa et al. 2015; Nauen et al. 2022; Ranganathan et al. 2022). Adicionalmente, o fipronil pode interferir na regulação hormonal das abelhas, afetando a produção de energia, alterando a síntese de proteínas e causando distúrbios no desenvolvimento e funcionamento celular (Holder et al. 2018; Gonçalves et al. 2022). Por atuar como um antagonista do receptor GABA, o fipronil interrompe a funcionalidade normal do sistema nervoso dos insetos, resultando em hiperexcitação neuronal que pode afetar a expressão gênica em várias vias metabólicas, biossintéticas e de transporte, incluindo genes envolvidos na síntese de proteínas, carboidratos, lipídios e no transporte de macro e micromoléculas (Pisa et al. 2015; Gonçalves et al. 2022).

A exposição ao inseticida modificou a expressão gênica relacionada aos ribossomos e suas subunidades nas abelhas, podendo afetar a síntese de RNA ribossomal, montagem de ribossomos e controle da síntese proteica (Shi et al. 2017). A alteração de diversas vias envolvidas aos ribossomos devido à contaminação por agrotóxicos vem sendo relatada em múltiplas pesquisas com outros inseticidas (Shi et al. 2017; Wu et al. 2017; Gao et al. 2020; Flores et al. 2021), havendo consequências significativas no metabolismo, desenvolvimento, resposta ao estresse e funcionamento celular das abelhas contaminadas (Mao e Jing 2007; Shi et al. 2017; Wu et al. 2017).

Os resultados obtidos a partir de vias enriquecidas na ontologia genética (GO), revelam que a exposição ao fipronil causa impacto nas funções dos canais iônicos, podendo gerar perturbações tanto no equilíbrio iônico quanto na transmissão de sinais elétricos nas células. Ao bloquear diretamente esses canais, o fipronil interfere no fluxo normal de íons, além de modular a atividade dos canais iônicos, alterando sua abertura, fechamento ou condutância, levando ao desequilíbrio na transmissão de sinais nervosos e alteração das funções fisiológicas destes insetos (Dong 2007; Murillo et al. 2011). Uma evidência da influência negativa do fipronil nos canais iônicos é sua ação danosa nos canais Ca^{2+} dos insetos, podendo ter efeitos prejudiciais na sinalização neuronal, contração muscular e no metabolismo energético, desencadeando na disfunção neuronal, distúrbios comportamentais, redução na capacidade de locomoção e voo (Dong 2007; Wu et al. 2021). Os sinais de Ca^{2+} também desempenham um papel crucial na aprendizagem e memória das abelhas, devido o Ca^{2+} ser utilizado em todas as etapas do processamento da informação odorante, desde a detecção pela antena até a integração, aprendizado e memorização (Wu et al. 2021; Paten et al. 2022).

Referente aos DEGs após uma hora expostas à dose letal do inseticida fipronil, as abelhas apresentaram uma infrarregulação (*downregulated*) na expressão de genes envolvidos em funções de desenvolvimento e adesão celular (*LIM/homeobox protein Lhx5*, *Mitogen-activated protein kinase 15*, *Basic proline-rich protein*, *Flocculation protein FLO11*). A diminuição na expressão destes genes pode comprometer a capacidade das abelhas responderem adequadamente ao estresse causado pelo inseticida, afetando sua adaptação metabólica e sobrevivência (Zhao et al. 2007; Krizsan et al. 2014; Liu et al. 2020; Farhadi et al. 2023). Além disso, o gene *Protein pygopus*, associado à via de sinalização Wnt e essencial para o desenvolvimento e regulação de processos biológicos, também apresentou infrarregulação (Parker et al. 2002). Segundo Martin e Kimelman (2009), a via de sinalização Wnt está envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central das abelhas, na determinação do destino celular durante a metamorfose e na formação de órgãos reprodutivos. Por outro lado, uma hora de exposição à dose letal do fipronil, também apresentou suprarregulação (*upregulated*) de genes envolvidos principalmente em processos de desintoxicação e detecção de substâncias xenobióticas (*Urea transporter 2*, *Odorant binding protein 14*, *Early nodulin-75*) (Schwaighofer et al. 2014; Nie et al. 2018), além de genes que contribuem para o metabolismo de lipídios e defesa contra danos ao DNA (*Pancreatic lipase-related protein 2*, *DNA repair protein RAD51 homolog 4*) (Lee et al. 2010; Collins et al. 2021).

Quando expostas a dose subletal do fipronil, após uma hora de exposição, foi constatado infrarregulação de genes envolvidos em processos metabólicos, de desenvolvimento e transporte celular (*Glycerate kinase-like*, *LIM/homeobox protein Lhx5*, *Unconventional myosin-Ixb*, *Ornithine aminotransferase*); assim como infrarregulação do gene *Basic proline-rich protein*, responsável por codificar a proteína rica em prolina. As proteínas ricas em prolina estão predominante na hemolinfa dos insetos, podendo estar envolvidas na resposta e adaptação a diferentes tipos de estressores, como os ambientais (ex. temperatura, umidade e radiação ultravioleta) e fisiológicos (ex. desidratação, lesões e toxinas) (Micheu et al. 2000). Segundo Teulier et al. (2016), as prolinas também podem estar envolvidas no voo de himenópteras. Embora as abelhas utilizem principalmente carboidratos como fonte de energia, a prolina pode ser utilizada como combustível alternativo para apoiar o metabolismo muscular desde as condições de repouso até a alta taxa de produção de energia necessária durante o voo (Arrese e Soulages 2010; Teulier et al. 2016). Neste mesmo tratamento (dose subletal, uma hora), a suprarregulação de genes associados a digestão de proteínas e lipídios (*Aminopeptidase N*, *Pancreatic lipase-related protein 2*), neurotransmissores (*Glutamate receptor 1-like*),

regulação hormonal e de expressão gênica (*Allatotropin-like*, *Homeobox protein ceh-19*) foram verificados. Sugerindo uma resposta compensatória das abelhas contaminadas para diminuir os efeitos negativos do inseticida; englobando uma série de processos, tais como: processos de digestão e obtenção de nutrientes, transmissão sináptica e processos de desenvolvimento e diferenciação celular (Belzunces et al. 2012; Pashte e Patil 2017).

Após quatro horas de exposição ao fipronil, a GO mostrou que os termos de MF (funções moleculares) estavam principalmente associados a atividade de monooxigenase, atividades de oxidoreductase e ligações de íons de ferro e tetrapirrol. As monooxigenases desempenham um papel essencial nos insetos expostos aos inseticidas, estando envolvidas no metabolismo e detoxificação dessas substâncias (Haas e Nauem 2021; Nauen et al. 2022). Essas enzimas tem como os principais representantes à família dos citocromos P450 e são responsáveis pela modificação química dos inseticidas, tornando-os mais solúveis em água e facilitando sua eliminação no organismo dos insetos (Nauen et al. 2022); de modo geral, o aumento da atividade das monooxigenases pode estar envolvida no processo de metabolização e neutralização dos compostos tóxicos do fipronil, visando reduzir sua concentração e minimizar seus efeitos adversos nas abelhas (Feyereisen 2012; Haas e Nauem 2021).

As abelhas quando expostas ao fipronil por quatro horas, apresentam infrarregulação de genes similares, independente da dosagem testada. Com exceção dos genes *Esterase B1* e *4-coumarate--CoA ligase 1*, relacionados com respostas antioxidante e desintoxicação em insetos (Fent et al. 2020; Zhang et al. 2023); os demais genes infrarregulados são pertencentes a família de proteínas de ligação odorantes – OBPs (*Obp1*, *Obp2*, *Obp5*, *Obp6*). As OBPs estão predominantemente expressas nos tecidos quimiossensoriais, como as antenas e os palpos maxilares, sendo responsáveis pela detecção e discriminação de odores pelas abelhas (Schwaighofer et al. 2014). Essas proteínas pequenas e solúveis em água se ligam e transportam moléculas odorantes hidrofóbicas, aumentando a sensibilidade e a especificidade do sistema olfativo das abelhas (Forêt e Maleszka 2006). A infrarregulação dos genes da família *Obp* podem ter efeitos prejudiciais na detecção e reconhecimento de odores, podendo afetar a capacidade de forrageamento das abelhas, diminuir a eficiência de comunicação, impedir a identificação de feromônios e recursos florais (Li et al. 2015; Mayack 2023); impactando inclusive a estrutura social da colônia, como o reconhecimento da rainha, organização de tarefas e defesa contra invasores (Forêt e Maleszka 2006; Schwaighofer et al. 2014).

Os genes suprarregulados após a exposição de quatro horas, independente da dosagem, foram *Large subunit ribosomal RNA* (LOC113219340, LOC113219383, LOC113219387),

Pancreatic lipase-related protein 2 e *Putative leucine-rich repeat-containing protein*, genes envolvidos principalmente na síntese de proteínas, digestão de lipídios e resposta imune dos insetos (Shi et al. 2017; Wu et al. 2017; Gao et al. 2020; Collins et al. 2021). Adicionalmente, foi observado uma suprarregulação na expressão do gene relacionado à desintoxicação xenobiótica (*Cytochrome P450 6a14-like*). Este é um gene responsável pela codificação de enzimas pertencentes à família do citocromo P450, que desempenham papel importante no metabolismo e na desintoxicação de substâncias estranhas ao organismo, incluindo inseticidas (Nauen et al. 2022). Assim, após uma resposta de estresse nas abelhas expostas ao fipronil, o aumento na expressão do gene *Cytochrome P450 6a14-like* pode ser entendido como uma tentativa de neutralizar os compostos tóxicos do inseticida (Fent et al. 2020). Além de exercer um papel significativo na desintoxicação de xenobióticos, essas enzimas são importantes para as vias de biossíntese e degradação de compostos endógenos, como feromônios, hidroxiecdisona e hormônio juvenil, que desempenham papéis cruciais no crescimento e desenvolvimento dos insetos (Zhao et al. 2018; Nauen et al. 2022).

Os resultados deste estudo indicam que a exposição ao fipronil resulta em modificações na expressão gênica das abelhas, abrangendo as vias metabólicas, de transporte, sinalização e desintoxicação, independentemente da dose e duração da exposição. Também foi verificada alterações na expressão de genes relacionados aos ribossomos, canais iônicos e proteínas de ligação odorante nas abelhas, associados as funções celulares, comportamento de forrageamento e comunicação.

REFERÊNCIAS

- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-225.
- Astolfi A, Kadri SM, de Castro Lippi IC, Mendes DD, Alonso DP, Ribolla PEM, Oliveira Orsi R (2022) Field relevant doses of fipronil affect gene expression in honey bees *Apis mellifera*. *Apidologie* 53(6): 69.
- Bajgar A, Kucerova K, Jonatova L, Tomcala A, Schneedorferova I, Okrouhlik J, Dolezal T (2015) Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS Biology* 13(4): e1002135.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43: 348-370.
- Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, ..., Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure: neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 35-67.
- Bovi TS, Zaluski R, Orsi RO (2018) Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90: 239-245.
- Camilli MP, Kadri SM, Alvarez MVN, Ribolla PEM, Orsi RO (2022) Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. *BMC Genomics* 23(1): 282.
- Cech R, Zaller JG, Lyssimachou A, Clausen P, Hertoge K, Linhart C (2023) Pesticide drift mitigation measures appear to reduce contamination of non-agricultural areas, but hazards to humans and the environment remain. *Science of The Total Environment* 854: 158814.
- Collins DH, Wirén A, Labédan M, Smith M, Prince DC, Mohorianu I, ..., Bourke AF (2021) Gene expression during larval caste determination and differentiation in intermediately eusocial bumblebees, and a comparative analysis with advanced eusocial honeybees. *Molecular Ecology* 30(3): 718-735.
- Corby-Harris V, Jones BM, Walton A, Schwan MR, Anderson KE (2014) Transcriptional markers of sub-optimal nutrition in developing *Apis mellifera* nurse workers. *BMC Genomics* 15(1): 1-16.
- Costa CP, Leza M, Duennes MA, Fisher K, Vollaro A, Hur M, ..., Woodard SH (2022) Pollen diet mediates how pesticide exposure impacts brain gene expression in nest-founding bumble bee queens. *Science of The Total Environment* 833: 155216.
- Cullen MG, Bliss L, Stanley DA, Carolan JC (2023) Investigating the effects of glyphosate on the bumblebee proteome and microbiota. *Science of The Total Environment* 864: 161074.
- Dai J, Shu R, Liu J, Xia J, Jiang X, Zhao P (2021) Transcriptome analysis of *Apis mellifera* under benomyl stress to discriminate the gene expression in response to development and immune systems. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 56(6): 594-605.
- Decio P, Ustaoglu P, Derecka K, Hardy IC, Roat TC, Malaspina O, et al. (2021) Thiamethoxam exposure deregulates short ORF gene expression in the honey bee and compromises immune response to bacteria. *Scientific reports* 11(1): 1-10.

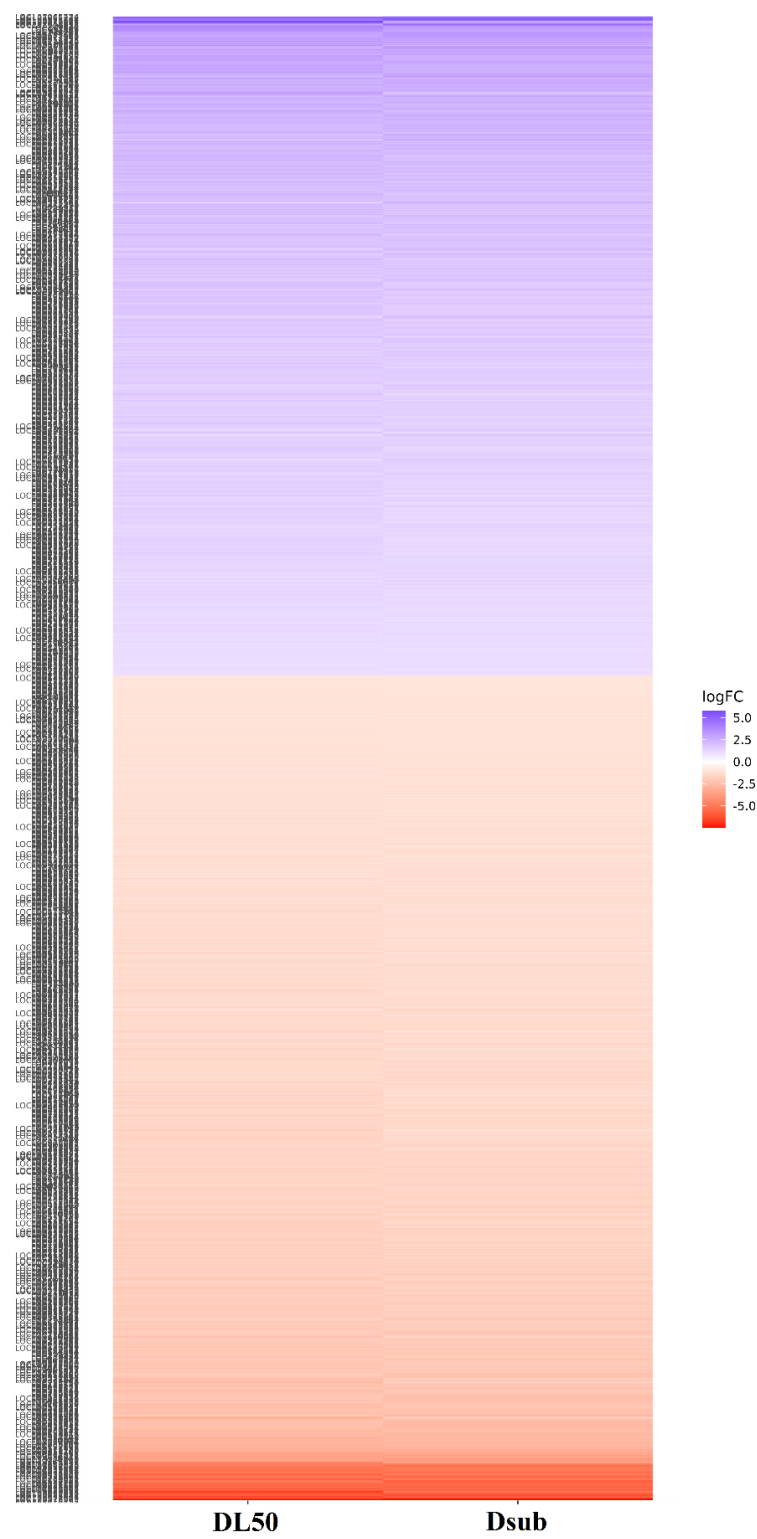
- Dolezal T, Krejcova G, Bajgar A, Nedbalova P, Strasser P (2019) Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect biochemistry and molecular biology* 109: 31-42.
- Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience* 7: 17-30.
- El-Seedi HR, Ahmed HR, El-Wahed AAA, Saeed A, Algethami AF, Attia NF (2022) Bee stressors from an immunological perspective and strategies to improve bee health. *Veterinary Sciences* 9(5): 199.
- Farhadi A, Tang S, Huang M, Yu Q, Xu C, Li E (2023) Identification of key immune and stress related genes and pathways by comparative analysis of the gene expression profile under multiple environmental stressors in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology* 135: 108695.
- Fent K, Schmid M, Christen V (2020) Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution* 259: 113715.
- Feyereisen R (2012) Insect CYP genes and P450 enzymes. In *Insect molecular biology and biochemistry*, pp. 236-316. Academic Press.
- Flores ME, McNamara-Bordewick NK, Lovinger NL, Snow JW (2021) Halofuginone triggers a transcriptional program centered on ribosome biogenesis and function in honey bees. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 139: 103667.
- Forêt S, Maleszka R (2006) Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome research* 16(11): 1404-1413.
- Gao J, Jin SS, He Y, Luo JH, Xu CQ, Wu YY (2020) Physiological analysis and transcriptome analysis of Asian honey bee (*Apis cerana cerana*) in response to sublethal neonicotinoid imidacloprid. *Insects* 11(11): 753.
- Gao J, Yang Y, Ma S, Liu F, Wang Q, Wang X, et al. (2022) Combined transcriptome and metabolite profiling analyses provide insights into the chronic toxicity of carbaryl and acetamiprid to *Apis mellifera* larvae. *Scientific Reports* 12(1): 16898.
- García MG, Sánchez JIL, Bravo KAS, Cabal MDC, Pérez-Santín E (2022) Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. *Science of The Total Environment* 157291.
- Gonçalves S, Vasconcelos MW, Mota TFM, Lopes JMH, Guimaraes LJ, Miglioranza KSB (2022) Identifying global trends and gaps in research on pesticide fipronil: a scientometric review. *Environmental Science and Pollution Research* 29(52): 79111-79125.
- Goulson D (2013) Neonicotinoids and bees: What's all the buzz?. *Significance* 10(3): 6-11.
- Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS (2007) Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science* 32(3): 189-199.
- Haas J, Nauen R (2021) Pesticide risk assessment at the molecular level using honey bee cytochrome P450 enzymes: A complementary approach. *Environment International* 147: 106372.

- Holder PJ, Jones A, Tyler CR, Cresswell JE (2018) Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(51): 13033-13038.
- James RR, Xu J (2012) Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of invertebrate pathology* 109(2): 175-182.
- Krizsan A, Volke D, Weinert S, Sträter N, Knappe D, Hoffmann R (2014) Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70 S ribosome. *Angewandte Chemie International Edition* 53(45): 12236-12239.
- Lee DH, Pan Y, Kanner S, Sung P, Borowiec JA, Chowdhury D (2010) A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* 17(3): 365-372.
- Li H, Wu F, Zhao L, Tan J, Jiang H, Hu F (2015) Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: implication for olfactory dysfunction. *International journal of biological macromolecules* 81: 624-630.
- Li Z, Yu T, Chen Y, Heerman M, He J, Huang J, ... 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.
- Linhart C, Niedrist GH, Nagler M, Nagrani R, Temml V, Bardelli T (2019) Pesticide contamination and associated risk factors at public playgrounds near intensively managed apple and wine orchards. *Environmental Sciences Europe* 31: 1-16.
- Liu J, Wang L, Zhou G, Gao S, Sun T, Liu J, Gao B (2020) Midgut transcriptome analysis of *Clostera anachoreta* treated with lethal and sublethal Cry1Ac protoxin. *Archives of insect biochemistry and physiology* 103(4): e21638.
- Lunardi JS, Zaluski R, Orsi RO (2017) Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 50-56.
- Mao L, Jing X (2007) Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Current genomics* 8(1): 43-49.
- Martin BL, Kimelman D (2009) Wnt signaling and the evolution of embryonic posterior development. *Current Biology* 19(5): R215-R219.
- Mayack BK (2023) Modeling disruption of *Apis mellifera* (honey bee) odorant-binding protein function with high-affinity binders. *Journal of Molecular Recognition* 36(5): e3008.
- Micheu S, Crailsheim K, Leonhard B (2000) Importance of proline and other amino acids during honeybee flight: (*Apis mellifera carnica* POLLMANN). *Amino acids* 18: 157-175.
- Mulvey J, Cresswell JE (2020) Time-dependent effects on bumble bees of dietary exposures to farmland insecticides (imidacloprid, thiamethoxam and fipronil). *Pest Management Science* 76(8): 2846-2853.
- Murillo L, Hamon A, Es-Salah-Lamoureux Z, Itier V, Quinchard S, Lapied B (2011) Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology* 32(6): 828-835.
- Nauen R, Bass C, Feyereisen R, Vontas J (2022) The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance. *Annual review of entomology* 67: 105-124.

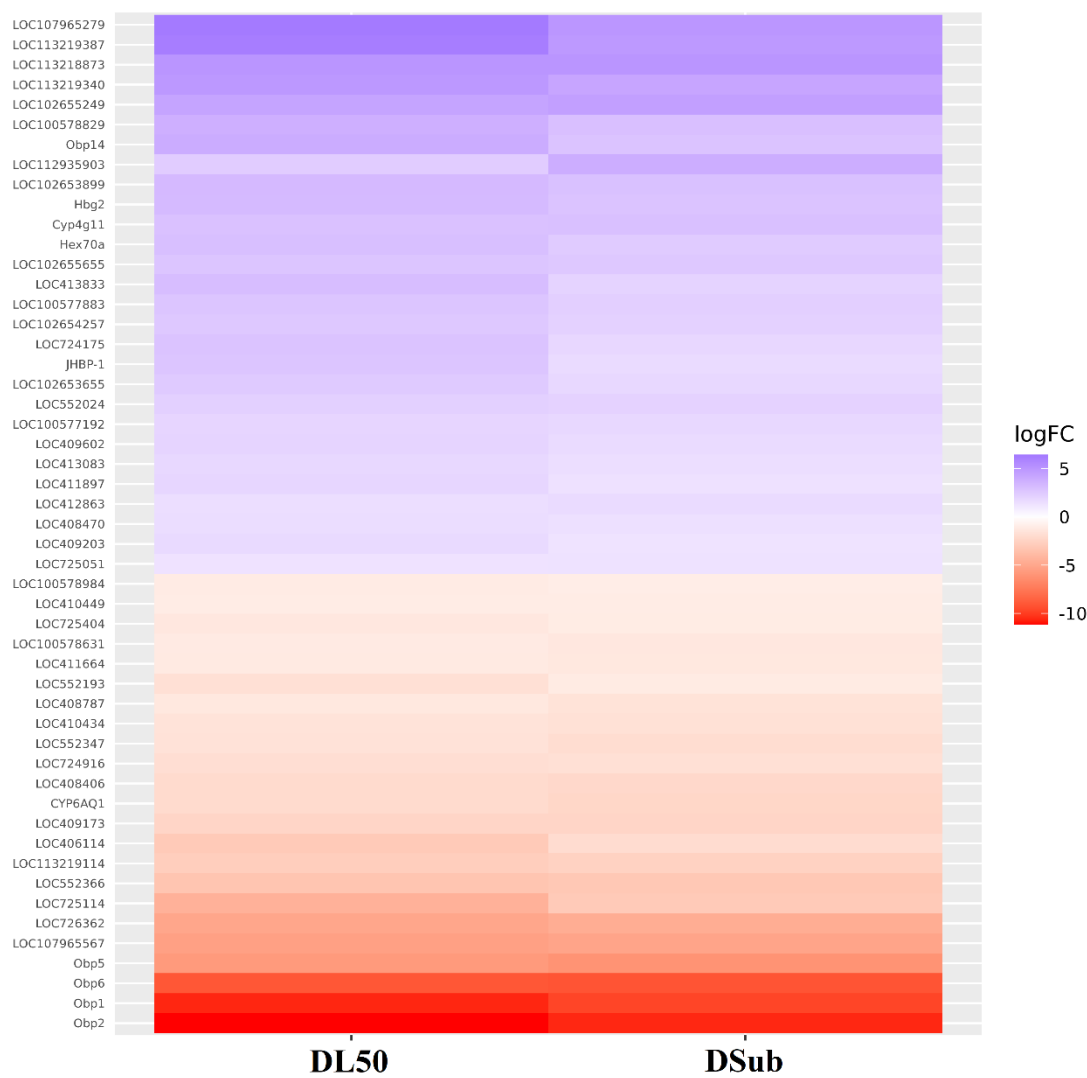
- Nie H, Xu S, Xie C, Geng H, Zhao Y, Li J (2018) Comparative transcriptome analysis of *Apis mellifera* antennae of workers performing different tasks. *Molecular genetics and genomics* 293: 237-248.
- Orčić SM, Čelić TV, Purać JS, Vukašinović EL, Kojić DK (2022) Acute toxicity of sublethal concentrations of thiacloprid and clothianidin to immune response and oxidative status of honey bees. *Apidologie* 53(4): 50.
- Parker DS, Jemison J, Cadigan KM (2002) Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 129: 2565-2576.
- Pashte VV, Patil CS (2017) Impact of different insecticides on the activity of bees on sunflower. *Research on Crops* 18(1): 153-156.
- Paten AM, Colin T, Coppin CW, Court LN, Barron AB, Oakeshott JG, Morgan MJ (2022) Non-additive gene interactions underpin molecular and phenotypic responses in honey bee larvae exposed to imidacloprid and thymol. *Science of the Total Environment* 814: 152614.
- Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 68-102.
- Ranganathan M, Narayanan M, Kumarasamy S (2022) Importance of metabolic enzymes and their role in insecticide resistance. In *New and future development in biopesticide research: Biotechnological exploration*, pp. 243-260. Singapore: Springer Nature Singapore.
- Renzi MT, Amichot M, Pauron D, Tchamitchian S, Brunet JL, Kretzschmar A (2016) Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127: 205-213.
- Roat TC, Carvalho SM, Palma MS, Malaspina O (2017) Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(6): 1652-1660.
- Rortais A, Arnold G, Dorne JL, More SJ, Sperandio G, Streissl F (2017) Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of the Total Environment* 587: 524-537.
- Schwaighofer A, Pechlaner M, Oostenbrink C, Kotlowski C, Araman C, Mastrogiacomo R (2014) Insights into structural features determining odorant affinities to honey bee odorant binding protein 14. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446(4): 1042-1046.
- Sgolastra F, Arnan X, Cabbri R, Isani G, Medrzycki P, Teper D, Bosch J (2018) Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. *Proceedings of the Royal Society B* 285(1885): 20180887.
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences* 1: 1-16.
- Shi TF, Wang YF, Liu F, Qi L, Yu LS (2017) Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 110(6): 2283-2289.

- Singh NS, Sharma R, Singh SK, Singh DK (2021) A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. *Environmental Research* 199: 111316.
- Stehle S, Schulz R (2015) Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(18): 5750-5755.
- Teulier L, Weber JM, Crevier J, Darveau CA (2016) Proline as a fuel for insect flight: enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283(1834): 20160333.
- Thompson HM, Hunt LV (1999) Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology* 8: 147-166.
- Tosi S, Sfeir C, Carnesecchi E, Chauzat MP (2022) Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. *Science of the Total Environment* 156857.
- Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D (2021) Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(3): 1112.
- Wu YY, Luo QH, Hou CS, Wang Q, Dai PL, Gao J (2017) Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee *Apis mellifera* L. *Scientific Reports* 7(1): 15943.
- Wu YY, Pasberg P, Diao QY, Nieh JC (2021) Flupyradifurone reduces nectar consumption and foraging but does not alter honeybee recruitment dancing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207: 111268.
- Zaller JG, Kruse-Platz M, Schlechtriemen U, Gruber E, Peer M, Nadeem I (2022) Pesticides in ambient air, influenced by surrounding land use and weather, pose a potential threat to biodiversity and humans. *Science of the Total Environment* 838: 156012.
- Zaluski R, Kadri SM, Alonso DP, Martins Ribolla PE, Oliveira Orsi R (2015) Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34(5): 1062-1069.
- Zanni V, Galbraith DA, Annoscia D, Grozinger CM, Nazzi F (2017) Transcriptional signatures of parasitization and markers of colony decline in Varroa-infested honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 87: 1-13.
- Zhang Y, He XJ, Barron AB, Li Z, Jin MJ, Wang ZL (2023) The diverging epigenomic landscapes of honeybee queens and workers revealed by multiomic sequencing. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 155: 103929.
- Zhao H, Peng Z, Du Y, Xu K, Guo L, Yang S (2018) Comparative antennal transcriptome of *Apis cerana cerana* from four developmental stages. *Gene* 660: 102-108.
- Zhao Y, Kwan KM, Mailloux CM, Lee WK, Grinberg A, Wurst W (2007) LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(32): 13182-13186.

APÊNDICES



Apêndice 1. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via ingestão após uma hora de exposição.



Apêndice 2. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via ingestão após quatro horas de exposição.

CAPÍTULO III

RESPOSTAS TRANSCRIPTÔMICAS EM ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*) APÓS EXPOSIÇÃO TÓPICA AO INSETICIDA FIPRONIL

RESUMO

Considerando os perigos da exposição aos agrotóxicos ao longo de suas rotas de forrageamento, as abelhas estão sujeitas à contaminação por resíduos de inseticidas provenientes de aplicações ou pela deriva em áreas onde esses insetos nidificam e coletam recursos. O objetivo deste estudo foi verificar as alterações gênicas causadas pela contaminação tóxica da dose letal e subletal do inseticida fipronil após dois períodos de exposição aguda, em abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras. As abelhas foram contaminadas com 2 µL de água contaminada contendo a DL₅₀ (0,009 µg/abelha), DSub (0,0009 µg/abelha) e apenas água (controle) na região do pronoto, permanecendo expostas ao fipronil por dois períodos de exposição (uma e quatro horas). Após a exposição, o tecido cerebral das abelhas foi utilizado para análise do transcriptoma. A exposição das abelhas ao inseticida fipronil resultou em alterações na expressão gênica. Doses subletais provavelmente levaram a mecanismos adaptativos e de defesa, com maior número de genes diferencialmente expressos. Porém, doses letais causam danos graves e apresentaram resposta gênica mais limitada. O fipronil afetou genes relacionados à resposta imune, reparo de DNA, metabolismo de xenobióticos e detoxificação. Também comprometeu vias envolvidas na percepção visual, podendo afetar a localização de alimento e a sobrevivência das abelhas em campo. Esses achados ressaltam que a exposição aos inseticidas pode comprometer a sobrevivência, forrageamento e funções cognitivas das abelhas, com implicações para a saúde das colônias e a polinização de plantas cultivadas e silvestres.

Palavras-chave: abelhas campeiras; exposição aguda; DEGs; desintoxicação.

TRANSCRIPTOMIC RESPONSES IN AFRICANIZED BEES (*Apis mellifera*) FOLLOWING TOPICAL EXPOSURE TO THE INSECTICIDE FIPRONIL

ABSTRACT

Considering the risks of pesticide exposure along their foraging routes, bees are susceptible to contamination by insecticide residues from applications or pesticide drift to areas where these insects nest and collect resources. The aim of this study was to investigate the gene expression changes caused by topical contamination with lethal and sublethal doses of the insecticide fipronil after two periods of acute exposure in forage bees *Apis mellifera* Africanized. Bees were contaminated with 2 μ L of water solution containing the LD₅₀ (0.009 μ g/bee), SD (0.0009 μ g/bee), or water only (control) on the pronotum, and were exposed to fipronil for two exposure periods (one and four hours). After exposure, the brain tissue of the bees was used for transcriptomic analysis. The exposure of bees to the insecticide fipronil resulted in gene expression alterations. Sublethal doses likely induce adaptive and defense mechanisms, resulting in a greater number of differentially expressed genes. However, lethal doses cause severe damage and show a more limited gene response. Fipronil affected genes related to immune response, DNA repair, xenobiotic metabolism, and detoxification. It also compromised pathways involved in visual perception, potentially affecting food location and bee survival in the field. These findings emphasize that exposure to insecticides can impair the survival, foraging, and cognitive functions of bees, with implications for colony health and the pollination of cultivated and wild plants.

Keywords: Foraging bees; acute exposure; DEGs; detoxification.

INTRODUÇÃO

Durante o processo de forrageamento, as abelhas podem entrar em contato com os agrotóxicos pela ingestão de alimento contaminado ou a partir do contato direto com os produtos químicos (Sanchez-Bayo e Goka, 2014; Kopit e Pitts-Singer, 2018). Durante a aplicação de agrotóxicos em áreas agrícolas e sua dispersão para as áreas adjacentes, as abelhas que forrageiam nas imediações de aplicação podem ser expostas à exsudação de gotículas ou entrar em contato com superfícies contaminadas, mesmo após a pulverização dos agrotóxicos, representando risco de exposição contínuo para as abelhas (Fairbrother et al., 2014; Serrão et al., 2022).

Durante o processo de contaminação, as abelhas podem ser expostas aos agrotóxicos de forma aguda, com contato direto em altas concentrações por um curto período de tempo, ou de forma crônica, com exposição a baixas concentrações ao longo de um período prolongado (Blacquiere et al., 2012; Siviter et al., 2018). Ambas as formas de exposição podem causar efeitos prejudiciais às abelhas, afetando sua fisiologia, comportamento e capacidade de reprodução (Shi et al., 2017; Lu et al., 2020; Piovesan et al., 2020; Gonzalez et al., 2022).

A quantidade de agrotóxicos que as abelhas são expostas desempenham um papel importante nos efeitos observados nesses insetos (Arena e Sgolastra 2014). A dose letal (DL_{50}) é a quantidade necessária para causar a morte imediata de ao menos 50% das abelhas expostas. Por outro lado, a dose subletal refere-se às concentrações de agrotóxicos que não resultam em morte imediata, mas podem afetar adversamente a saúde e o comportamento das abelhas (Aliouane et al., 2009; Lu et al., 2020). Essas doses subletais podem impactar vários aspectos, incluindo o sistema nervoso e imunológico, a reprodução, a capacidade de orientação e memória das abelhas (Colin et al., 2004; Benuszak et al., 2017; Kenna et al., 2019; Mayack et al., 2021). Além disso, os efeitos subletais também podem comprometer a sobrevivência e eficiência imunológica das abelhas, tornando-as mais vulneráveis às doenças e patógenos (Collison et al., 2016; Sánchez-Bayo et al., 2016).

Entre os agrotóxicos que têm demonstrado efeitos prejudiciais em abelhas, destaca-se o fipronil [(RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile], um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis, amplamente utilizado na agricultura para o controle de pragas em diversos cultivos agrícolas (Gonçalves et al., 2022). O fipronil atua inibindo o receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) nos insetos, resultando em superexcitação do sistema

nervoso e subsequente morte (Simon-Delso et al., 2015). No entanto, esse inseticida também tem sido associado a efeitos adversos em abelhas e outros organismos não-alvo (Pisa et al., 2015; Gonçalves et al., 2022). Estudos têm comprovado que a exposição a doses subletais de fipronil pode impactar negativamente o comportamento, a fisiologia e a saúde das abelhas, incluindo redução da capacidade de aprendizado e memória, alterações na atividade locomotora, diminuição da imunidade e maior suscetibilidade a doenças (Lunardi et al., 2017; Bovi et al., 2018; Piovesan et al., 2020; Astolfi et al., 2022). Esses efeitos podem comprometer a eficiência da polinização, a produtividade apícola e a sobrevivência das populações de abelhas (Pisa et al. 2015; Sánchez-Bayo et al. 2016).

Para obter uma compreensão mais aprofundada dos efeitos dos agrotóxicos nas abelhas, os estudos de análise do transcriptoma têm se mostrado uma abordagem promissora (Shi et al., 2017; Fent et al., 2020; Kablau et al., 2020; Astolfi et al., 2022). Essa técnica envolve a identificação e quantificação dos transcritos (RNAs mensageiros) presentes em células ou tecidos das abelhas em momentos específicos (Greenberg et al., 2015). Ao analisar o transcriptoma de abelhas expostas aos agrotóxicos, é possível identificar possíveis alterações na expressão dos genes das abelhas em resposta à exposição aos agrotóxicos, fornecendo informações sobre as respostas moleculares e os mecanismos de defesa desses insetos (Greenberg et al., 2015; Dickey et al., 2023).

Considerando a importância das abelhas *Apis mellifera* na produção apícola e na polinização de culturas agrícolas e plantas silvestres, bem como sua suscetibilidade à áreas contaminadas com inseticidas, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição tópica à dose letal e subletal do inseticida fipronil, após um período de exposição aguda, no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de abelhas *A. mellifera* africanizadas na fase campeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

As colmeias de abelhas melíferas africanizadas (*A. mellifera*) utilizadas no estudo estavam mantidas no apiário experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ-UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil (22° 50' 28" S, 48° 25' 43" O, elevação de 726 m). A utilização das abelhas no estudo foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMVZ/UNESP), registrado sob o protocolo nº 0006/2021.

Obtenção das abelhas em fase de campeiras

Para a coleta das abelhas em fase em campeiras, foram utilizadas dez colônias de *A. mellifera* africanizadas mantidas em colmeias padronizadas em relação ao número de quadros contendo favos de cria e alimento.

Inicialmente, foram retirados de cada colmeia dois quadros contendo favos com cria operculada, os quadros foram protegidos com bolsas confeccionadas com tecido filó e devolvidas para suas respectivas colmeias. Após o período de 24 horas, os quadros protegidos foram novamente retirados das colmeias e realizada a marcação das abelhas recém-emergidas com caneta atóxica na região do pronoto. Logo após a marcação das abelhas, as bolsas de filó foram retiradas e os quadros contendo as abelhas marcadas foram devolvidos para suas respectivas colmeias.

Após o período correspondente ao desenvolvimento das abelhas operárias até a fase de campeiras (21 dias), foram coletadas 180 abelhas previamente marcadas e acondicionadas em tubos tipo *Falcon* perfurados. Os tubos contendo as abelhas marcadas foram levados para anestesia por resfriamento em freezer (- 18°C), por aproximadamente dois minutos, possibilitando a manipulação dos insetos. As abelhas em fase de campeiras foram distribuídas em placas de *Petri* perfuradas e mantidas em jejum total por três horas, para o esvaziamento da vesícula melífera.

Exposição das abelhas ao inseticida fipronil via tópica

O xarope de mel (proporção 1:1) foi fornecido para as abelhas acondicionadas nas placas; considerando o consumo médio de 50 µL de xarope por abelha, correspondente ao volume médio da vesícula melífera (Thompson e Hunt, 1999).

A contaminação das abelhas com o inseticida foi realizada via tópica; para isso diluições com o ingrediente ativo fipronil (Sigma-Aldrich®; 98,8% de pureza) foram realizadas em água destilada a fim de obter a dose letal ($DL_{50} = 0,009 \mu\text{g/abelha}$) e subletal ($D_{\text{Sub}} = 0,0009 \mu\text{g/abelha}$) do inseticida (Zaluski et al. 2015; Lunardi et al. 2017; Bovi et al. 2018). As abelhas foram expostas as respectivas dosagens do inseticida com a aplicação de 2 µL da solução na região do tórax (pronoto) com auxílio de micropipeta monocanal; já nas abelhas do tratamento controle foi aplicado 2 µL de água destilada na região do pronoto.

Em cada tratamento foram utilizadas 30 abelhas, sendo realizado em sextuplicada, com cinco abelhas por repetição (abelhas contaminadas com três dosagens: DL_{50} , D_{Sub} e Controle; dois períodos de exposição: 1 e 4 horas). Após a exposição, as abelhas foram

coletadas e imediatamente congeladas, permanecendo armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da análise transcricional.

Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq

As cabeças das abelhas foram retiradas e foram removidos os olhos compostos de cada cabeça, a fim de evitar possíveis contaminações causadas pela pigmentação ocular; posteriormente as cabeças foram maceradas para a exposição do material cerebral e seguiram para extração do RNA total.

O RNA total foi extraído dos *pools* cerebrais de *A. mellifera* em fase de campeiras (três cérebros por *pool*) utilizando o protocolo de reagentes Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) (Chomczynski, 1993). As concentrações de RNA foram quantificadas em cada amostra usando um fluorômetro Qubit™ 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). Para a preparação das bibliotecas, foram utilizados 4000 ng de RNA total como amostra inicial para o sequenciamento de RNA Illumina (RNA-Seq) com a utilização do Kit SureSelect Strand Specific RNA Library Preparation (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) seguindo as instruções do fabricante.

As bibliotecas foram quantificadas por qPCR no aparelho StepOne Plus (Life Technologies) com o uso do NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® (New England BioLabs® Inc.). Posteriormente as bibliotecas foram diluídas a 12pM, carregadas na *flowcell* presente no NextSeq (Illumina, San Diego, EUA) e sequenciadas pelo método sequence by synthesis (SBS) por 50 ciclos no aparelho NextSeq, em fragmentos de 150pb.

Processamento dos dados RNA-Seq e análise de diferenças de expressões gênicas

O programa FASTQC foi usado para verificar o conteúdo do adaptador e avaliar a qualidade das leituras brutas. O alinhamento dos dados foi realizado com Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.12, utilizando o Amel_HAv3.1 do NCBI (RefSeq assembly accession: GCF_003254395.2) como referência. A matriz de contagem de recursos foi criada usando HTSeq v0.11.2 e o arquivo de anotação GTF de Amel_HAv3.1.

A análise dos dados, visualização e plotagem foram realizadas usando o RStudio para a linguagem R, incluindo o pacote ggplot2 v3.3.2. A análise de expressão diferencial foi realizada usando o pacote edgeR v3.30.3 disponível no projeto de software Bioconductor para a linguagem R. Os genes de baixa expressão foram filtrados mantendo os genes que tiveram a contagem por milhão maior que um em pelo menos duas das

amostras. As contagens foram normalizadas usando a normalização TMM. O modelo log-linear generalizado binomial negativo foi usado na análise de expressão diferencial, e o procedimento de Benjamini & Hochberg (FDR) foi usado para correções de testes múltiplos. Os genes foram considerados significativamente regulados com valor de p ajustado $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$.

Análise de ontologia genética

A análise de ontologia gênica foi realizada para as listas de genes identificados com expressão diferencial usando o pacote gprofiler2, uma interface R para as ferramentas g: Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Os valores de p do teste exato de Fisher foram ajustados pelo procedimento de Benjamini & Hochberg (FDR) para correção de múltiplos testes, e a significância estatística foi considerada quando o valor de p ajustado foi $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$.

RESULTADOS

Após uma hora de exposição, abelhas contaminadas com o inseticida fipronil apresentaram a alteração na expressão total de 804 genes ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$); sendo 772 genes diferencialmente expressos (DEGs) para a dosagem subletal, e 139 na dosagem letal do inseticida; 107 DEGs tiveram sua alteração na expressão em comum para ambas as dosagens testadas. Em relação aos DEGs exclusivos de cada dosagem, foram verificados 665 e 32 para a dose subletal e letal, respectivamente (Figura 1A).

Após o período de exposição de quatro horas ao fipronil, foi observado uma redução no número de DEGs nas abelhas, em ambas as dosagens testadas (Figura 1B). Um total de 329 genes tiveram sua expressão alteradas ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$); para o tratamento com a dose subletal, houve alteração na expressão de 321 genes e apenas 25 na dose letal, com a ocorrência em comum para ambas as dosagens de 17 genes. Para a dose subletal um total de 304 DEGs ocorreram exclusivamente no respectivo tratamento, e apenas oito em abelhas expostas à dosagem letal.

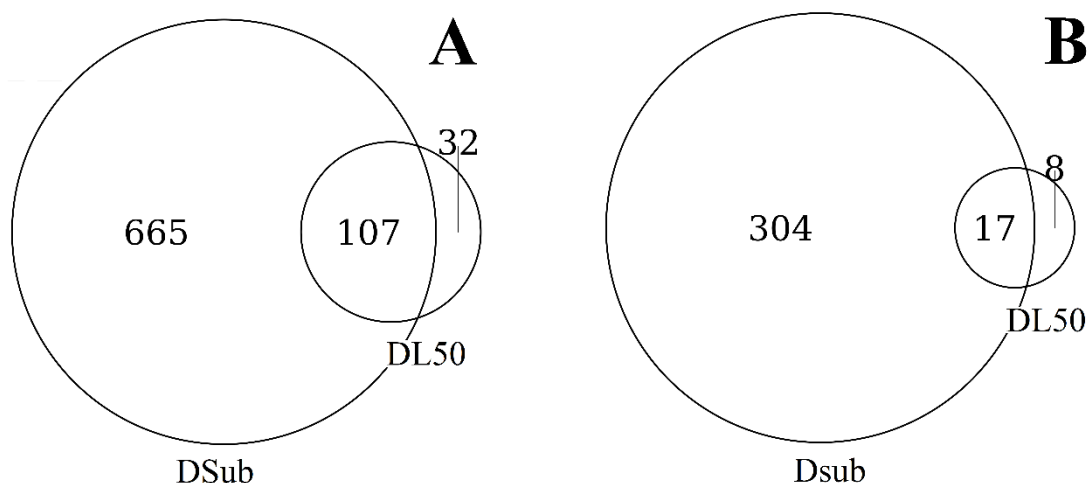


Figura 1. Diagrama de Venn indicando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas via tópica ao inseticida fipronil após o período de uma (A) e quatro horas (B) nas dosagens letal (DL₅₀) e subletal (Dsub) em comparação aos grupos controles.

Em relação a expressão dos DEGs nas abelhas contaminadas com o fipronil, foi observado um padrão nos tratamentos, havendo maior número de DEGs infrarregulados (*downregulated*) em todos os tratamentos. Após uma hora de exposição ao fipronil, 115 e 604 DEGs foram infrarregulados para a dosagem letal e subletal, respectivamente. E 24 e 168 dos genes diferencialmente expressos foram suprarregulados (*upregulated*) para as dosagens letal e subletal, respectivamente (Figura 2A).

Após uma exposição de maior período ao fipronil (quatro horas), foi observado um número reduzido de DEGs para o tratamento com a dose letal do inseticida (infrarregulação = 16 DEGs; suprarregulação = 9 DEGs). Já nas abelhas submetidas a contaminação com a dose subletal, 170 e 151 genes foram diferencialmente expressos com a infrarregulação e suprarregulação, respectivamente (Figura 2B).

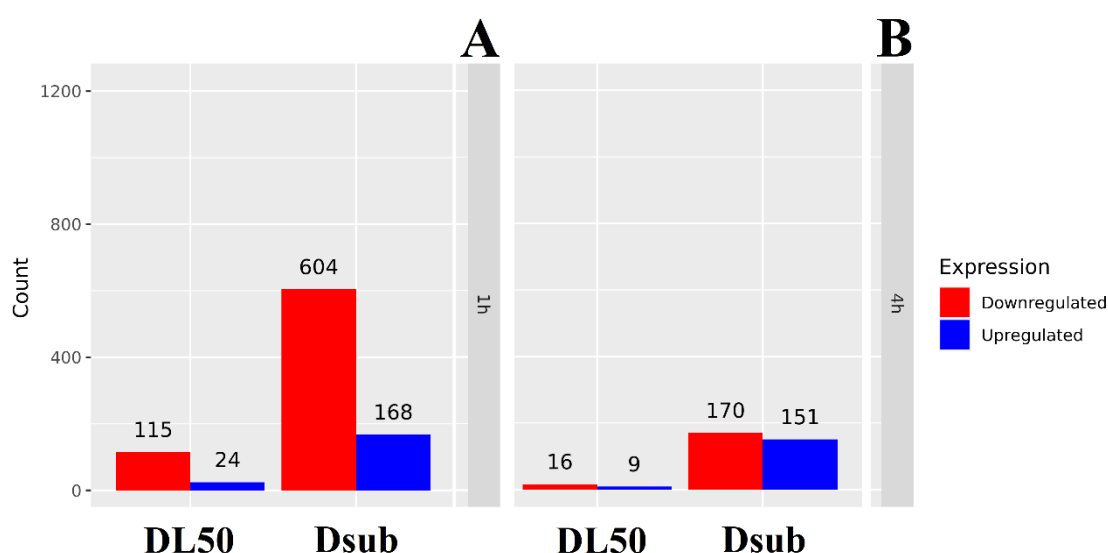


Figura 2. Histograma do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) infraregulados (*downregulated*) e supraregulados (*upregulated*) entre os grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas ao fipronil via tópica após o período de uma (A) e quatro horas (B) com a dose letal (DL₅₀) e subletal (Dsub) em comparação aos grupos controles.

A partir dos genes diferencialmente expressos nos tratamentos, as amostras foram submetidas a análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) e agrupadas em relação as suas categorias funcionais, sendo classificadas em processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC).

No tratamento após uma hora de exposição ao inseticida com a dose letal, os DEGs enriqueceram apenas a categoria funcional de componentes celulares, com DEGs associados a região extracelular (Figura 3A). Em contrapartida, as abelhas contaminadas com a dose subletal no mesmo período de exposição (uma hora), apresentaram o enriquecimento de duas categorias funcionais, processos biológicos (n = 31 termos) e funções moleculares (n = 7 termos) (Figura 3B).

Os principais termos enriquecidos na categoria de processos biológicos em abelhas que receberam a dose subletal do fipronil estão envolvidos na regulação de processos celulares, biológicos e de sinalização; além de diversos termos associados a fosforilação de proteínas, processos biossintéticos de macro e micromoléculas e respostas aos estímulos. Para a categoria de funções moleculares, os principais termos incluídos na categoria estão envolvidos em processos de ligação proteica, nas atividades de canais catiônicos dependes de voltagem e atividades enzimáticas que catalisam reações de fosforilação (Figura 3 B).

Não foram observadas diferenças significativas para a análise de GO entre os DEGs na intersecção entre tratamentos com as dosagens letal e subletal do inseticida fipronil após uma hora de exposição ($FC > 2,0$ e $p > 0,05$).

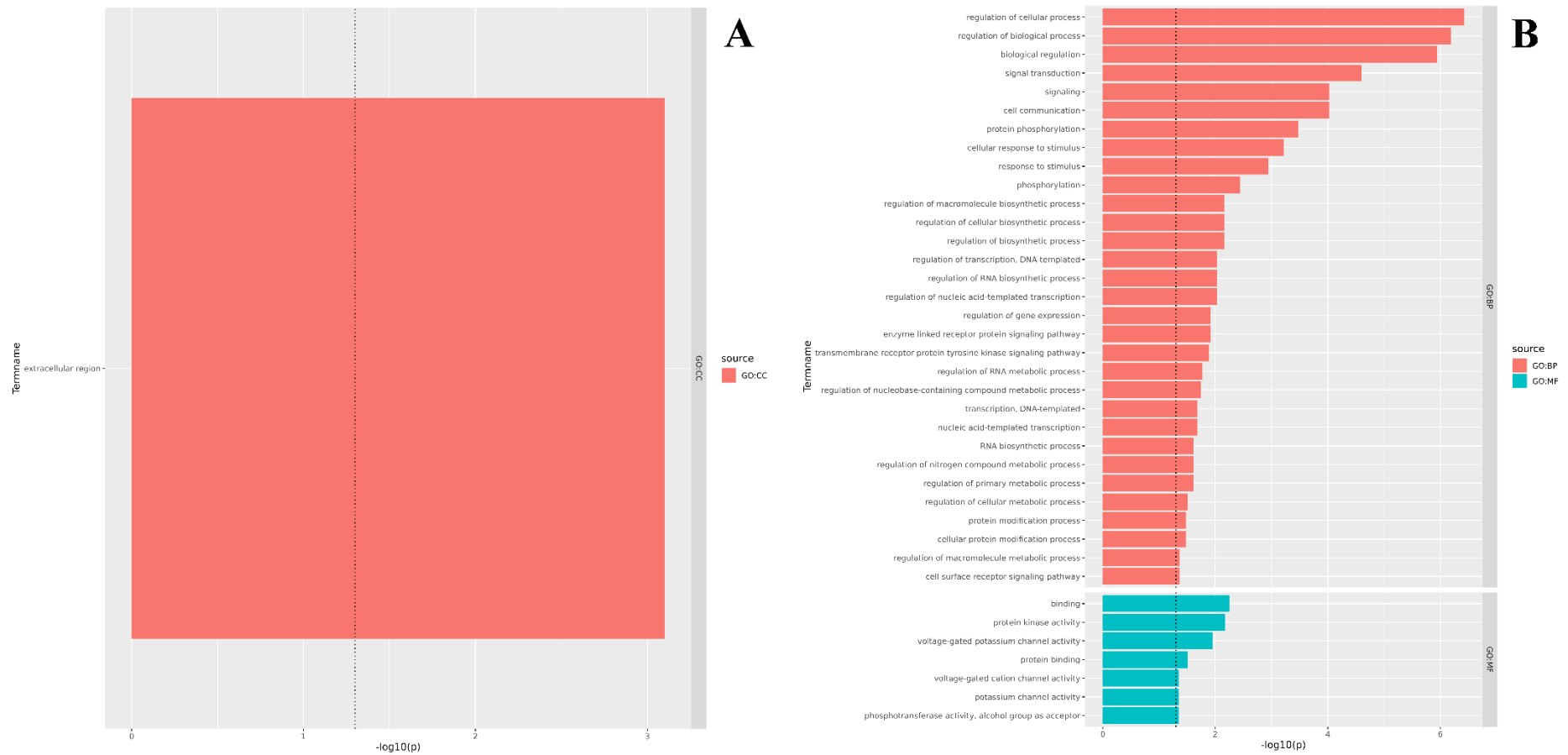


Figura 3. Análise de ontologia gênica (GO) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após uma hora de exposição via tópica a dose letal (A) e subletal (B) do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Com o aumento do período de exposição ao fipronil (quatro horas), foi verificado um aumento nos termos enriquecidos da categoria funcional de processos biológicos em abelhas expostas a dose letal do inseticida ($n = 25$ termos), em comparação a análise de ontologia gênica das abelhas expostas por apenas uma hora (Figura 4A). Os DEGs deste tratamento então associados principalmente as respostas aos estímulos externos, regulação positiva da transdução de sinais de proteínas, além de diversos termos referentes a percepção visual.

Nas abelhas expostas a dose subletal do fipronil por quatro horas, duas categorias funcionais foram enriquecidas, os processos biológicos ($n = 14$ termos) e funções moleculares ($n = 7$ termos) (Figura 4B). Na categoria de BP, os termos inseridos nesta categoria estão predominantemente envolvidos em vias fotorreceptoras, como fototransdução, detecção de estímulo luminoso, percepção visual e percepção sensorial. Na categoria de MF, o termo de atividade de fotorreceptores também foi enriquecido, além de termos relacionados na atividade de enzimas oxidoredutases, fosfolipases e lipases.

Em relação a interseção realizada para os DEGs nas dosagens letal e subletal do tratamento de quatro horas de exposição, a categoria de processos biológicos foi a única enriquecida significativamente, com 27 termos (Figura 5). Sendo principalmente associada com termos relativos a percepção visual pelas abelhas; como respostas a estímulos externos, detecção de luz, percepção visual e sensorial, respostas ao estímulo luminoso e fototransdução. Além de aspectos visuais, termos envolvidos em vias imunológicas também foram enriquecidas pelos DEGs, como resposta imune inata, defesa celular, defesa contra bactérias e processos gerais do sistema imunológico.

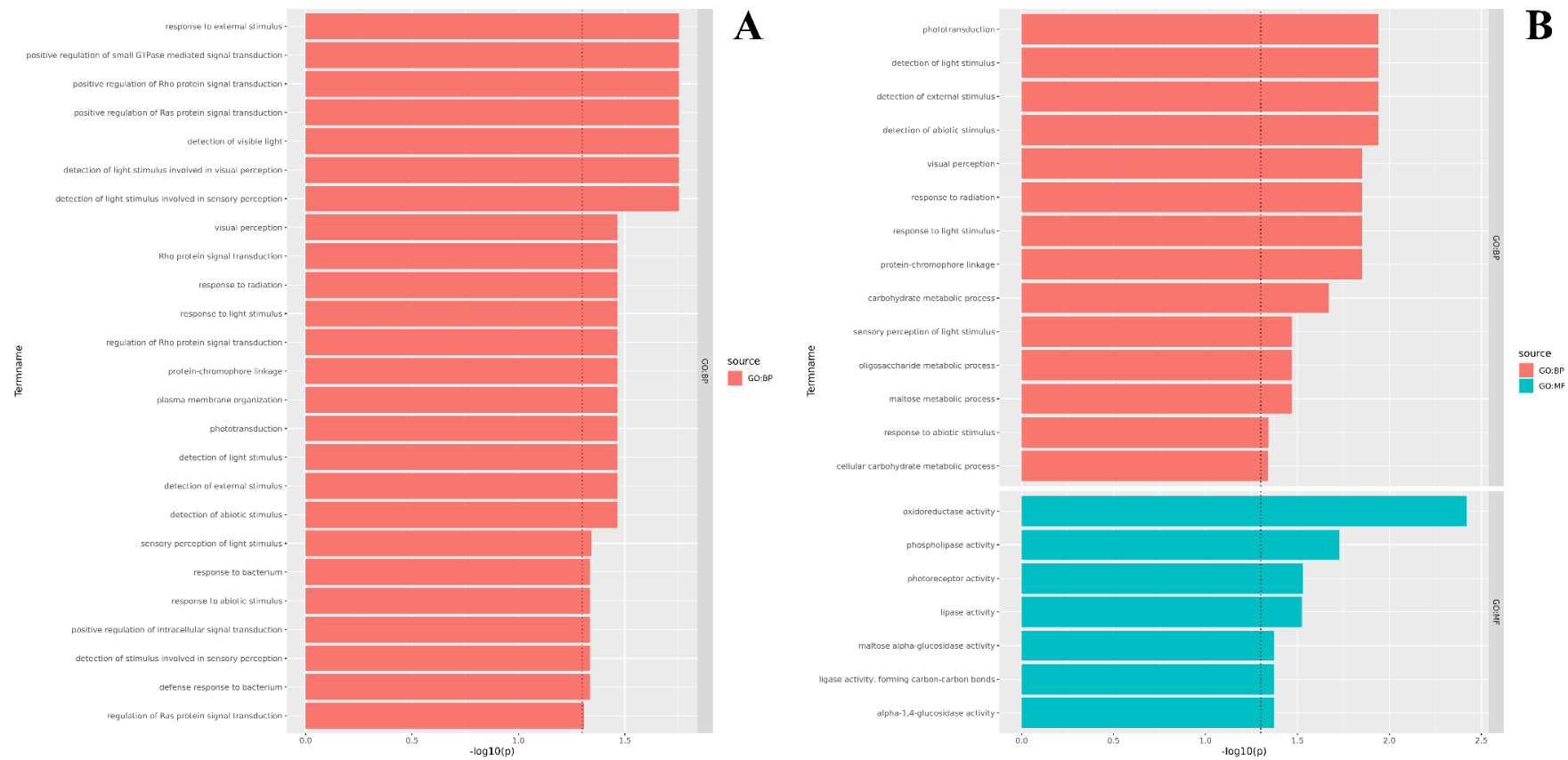


Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após quatro horas de exposição via tópica a dose letal (A) e subletal (B) do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

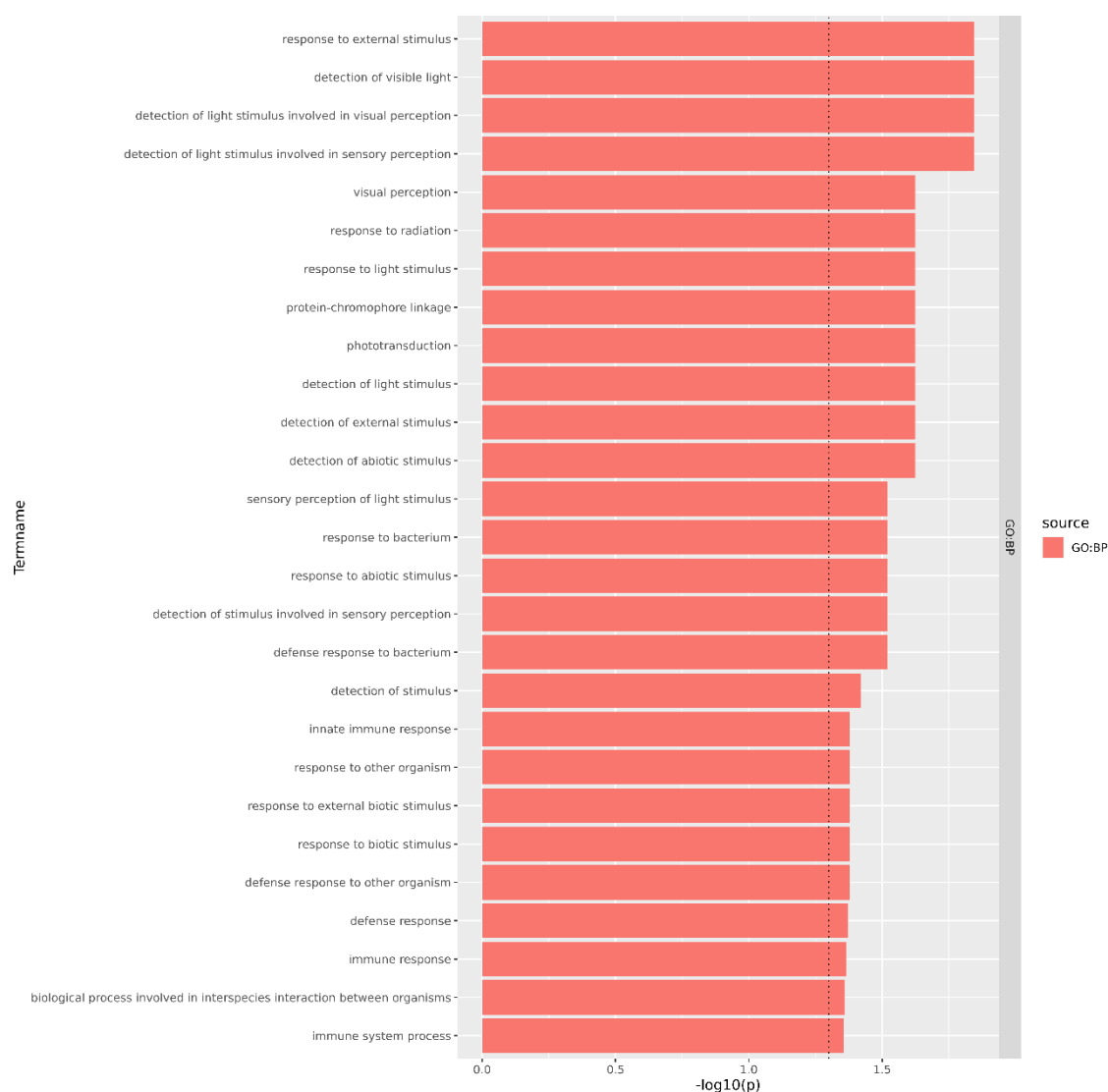


Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas após quatro horas de exposição via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Levando em consideração o representativo número de DEGs nos respectivos tratamentos, na Tabela 1 são apresentados os dez principais genes diferencialmente expressos mais significativos em relação ao valor de logFC para cada tratamento ($FC > 2,0$ e $p < 0,05$); sendo selecionados para cada tratamento cinco genes suprarregulados e infrarregulados já caracterizados (Fent et al., 2020). A análise do agrupamento de todos os DEGs em comum após uma e quatro horas de exposição ao inseticida fipronil estão disponíveis nos dados suplementares (Apêndices 1 e 2).

Após a exposição das abelhas a dose letal durante uma hora, os DEGs infrarregulados estão envolvidos principalmente na formação e movimentação de cílios e flagelos, movimento das organelas celulares e funções dos microtúbulos (LOC409770,

LOC107964284); além de genes envolvidos em processos de adesão do DNA (LOC726362) e componentes estruturais dos ribossomos (LOC113219340). Os DEGs que tiveram aumento na regulação da sua expressão (suprarregulação), também estão envolvidos em processos regulados pelos microtúbulos e membrana celular, especialmente pelo movimento de organelas pelos cílios e flagelos (LOC726582, LOC113218548, LOC107965181), além de genes responsáveis pela síntese proteica (LOC113218779) e resposta imunológica (LOC100577598).

Durante o mesmo período de exposição (uma hora), no entanto, quando as abelhas foram expostas a dose subletal do fipronil, genes associados as estruturas de ribossomos (LOC113219340, LOC113219387) e genes da família miRNAs (*Mir3759*, *Mir6049*) expressaram infrarregulação. Os DEGs que apresentaram suprarregulação no mesmo tratamento foram associados aos componentes estruturais da cutícula (LOC724199) e membrana (LOC100577797), além de genes envolvidos em processos de defesa inflamatória (LOC410297) e morte celular programada (LOC100576487).

Os DEGs em abelhas que receberam a dose letal durante quatro horas e foram infrarregulados, estão associados a digestão proteica (LOC410149, LOC725114), proteínas de recepção olfativa (*Obp6*) e desintoxicação xenobiótica (*CYP6AQ1*). E os genes diferencialmente expressos que foram suprarregulados estão envolvidos principalmente na atividade locomotora das abelhas (LOC410370, LOC100578955, LOC551259) e resposta imunológica inata (LOC406142).

Após a exposição da dose subletal do fipronil por quatro horas, genes infrarregulados mais significativos nas abelhas contaminadas estão envolvidos principalmente em componentes da membrana celular (LOC551805, LOC552829), regulação na expressão gênica (*Mir3759*), atividade de enzimas ligases (LOC726362) e no desenvolvimento de estruturas locomotoras das abelhas (LOC113219092). Genes associados a imunidade (LOC724803), microtúbulos (LOC113218548), proteínas estruturais (LOC726615) e síntese de ácidos graxos (LOC724226) foram suprarregulados; além do gene *Kakusei*, relacionado a atividade de forrageamento de abelhas campeiras.

Tabela 1. Principais genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas via tópica a dose letal e subletal do inseticida fipronil durante uma e quatro horas de exposição.

Gene	Descrição do gene	Função	Expressão	logFC
1 hora – Dose Letal				
LOC726362	4-coumarate--CoA ligase 1	Atividade de ligase	Infrarregulado	-7,04
LOC113219340	large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Infrarregulado	-6,07
Mir3759	microRNA mir-3759	Regulação da expressão gênica	Infrarregulado	-5,67
LOC409770	probable tubulin polyglutamylase TTLL1	Estruturação dos microtúbulos	Infrarregulado	-4,78
LOC107964284	midasin	Fusão de membranas e separação de microtúbulos	Infrarregulado	-4,46
LOC726582	prominin-like protein	Componente membranar	Suprarregulado	2,35
LOC113218548	cilia- and flagella-associated protein 251-like	Movimento celular por cílios e flagelos	Suprarregulado	2,38
LOC113218779	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase-like	Síntese proteica	Suprarregulado	2,70
LOC107965181	protein broad-minded-like	Regulação da membrana ciliar	Suprarregulado	3,39
LOC100577598	leucine-rich repeat extensin-like protein 3	Regulação imunológica	Suprarregulado	3,42
1 hora – Dose Subletal				
LOC113219340	large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Infrarregulado	-6,48
LOC726362	4-coumarate--CoA ligase 1	Atividade de ligase	Infrarregulado	-6,08
Mir3759	microRNA mir-3759	Regulação da expressão gênica	Infrarregulado	-5,77
Mir6049	microRNA mir-6049	Regulação da expressão gênica	Infrarregulado	-5,61
LOC113219387	large subunit ribosomal RNA	Componente estrutural de ribossomos	Infrarregulado	-5,25
LOC724199	early nodulin-75	Componente estrutural da cutícula	Suprarregulado	4,12
LOC100577797	small integral membrane protein 8	Componente celular da membrana	Suprarregulado	4,23
LOC100576487	apoptosis regulatory protein Siva	Resistência celular e indução de apoptose	Suprarregulado	4,48
LOC725308	histone H2A	Ligação de DNA	Suprarregulado	4,56
LOC410297	sorting nexin-16	Ligação de fosfatidilinositol e processo inflamatório	Suprarregulado	4,63
4 horas – Dose Letal				

Gene	Descrição do gene	Função	Expressão	logFC
LOC410149	carboxypeptidase Q	Componentes extracelulares e hidrólise de proteínas alimentares	Infrarregulado	-3,25
LOC726362	4-coumarate--CoA ligase 1	Atividade de ligase	Infrarregulado	-3,10
<i>Obp6</i>	odorant binding protein 6	Receptores olfativos	Infrarregulado	-2,78
<i>CYP6AQ1</i>	cytochrome P450 6AQ1	Desintoxicação xenobiótica	Infrarregulado	-2,50
LOC725114	chymotrypsin inhibitor	Digestão de proteínas	Infrarregulado	-2,49
LOC410370	actin-binding Rho-activating protein	Formação do citoesqueleto	Suprarregulado	1,46
LOC100578955	myosin-7	Contração muscular	Suprarregulado	1,57
LOC551259	titin	Contração muscular e músculos de voo	Suprarregulado	1,65
LOC551587	RNA-binding protein 24	Ligação de RNA	Suprarregulado	1,76
LOC406142	hymenoptaecin	Resposta imunológica inata	Suprarregulado	2,09
4 horas – Dose Subletal				
LOC551805	phospholipase B1, membrane-associated	Degradação dos fosfolipídios e constituinte da peçonha	Infrarregulado	-5,54
<i>Mir3759</i>	microRNA mir-3759	Regulação da expressão gênica	Infrarregulado	-5,41
LOC726362	4-coumarate--CoA ligase 1	Atividade de ligase	Infrarregulado	-4,80
LOC552829	phospholipase B1, membrane-associated-like	Degradação dos fosfolipídios e constituinte da peçonha dos himenópteros sociais	Infrarregulado	-4,55
LOC113219092	protein apterous-like	Desenvolvimento dos discos imaginais da asa	Infrarregulado	-4,44
LOC724803	neprilysin-4	Modulação da atividade neuronal e imunológica	Suprarregulado	2,39
LOC113218548	cilia- and flagella-associated protein 251-like	Movimento celular por cílios e flagelos	Suprarregulado	2,42
LOC726615	meiosis-specific nuclear structural protein 1	Proteína estrutural	Suprarregulado	2,63
LOC724226	acyl-CoA Delta(11) desaturase	Biossíntese de ácidos graxos	Suprarregulado	3,98
<i>Kakusei</i>	kakusei non-coding nuclear RNA	Atividade de forrageamento	Suprarregulado	5,21

DISCUSSÃO

As abelhas podem ser expostas aos inseticidas de diferentes formas, sendo a contaminação via tópica a mais comum (Aliouane et al., 2009; Collison et al., 2016). A exposição tópica ocorre quando as abelhas entram em contato diretamente com os agrotóxicos, seja ao pousarem em superfícies tratadas ou durante os procedimentos de controle de pragas, como a pulverização dos cultivos agrícolas (Sanchez-Bayo e Goka 2014; Benuszak et al., 2017). Nesse tipo de exposição, os agrotóxicos podem aderir à cutícula das abelhas e serem absorvidos por meio dos poros e glândulas, causando efeitos adversos em sua fisiologia e comportamento (Aliouane et al., 2009; Kopit e Pitts-Singer, 2018). Após a exposição via tópica, as abelhas podem ser afetadas de diversas formas, diminuindo sua sobrevivência, capacidade de reprodução, forrageamento e funções cognitivas (Lunardi et al., 2017; Bovi et al., 2018; Piovesan et al., 2020).

A exposição das abelhas ao fipronil resultou em alterações na expressão gênica, sendo observados 804 genes diferencialmente expressos (DEGs) após uma hora de exposição. No entanto, a diferença entre as doses subletal e letal do inseticida foi significativa ($D_{Sub} = 772$ DEGs; $DL_{50} = 139$ DEGs). Essa disparidade pode ser atribuída à capacidade das abelhas desenvolverem respostas adaptativas e mecanismos de defesa em doses subletais, enquanto as doses letais causam danos graves e morte rápida dos insetos (Colin et al., 2004; Lu et al., 2020; Decio et al., 2021). Diversas investigações mostram que as abelhas expostas a doses subletais ativam vias de sinalização e regulação gênica relacionadas à resposta imune, reparo de DNA, metabolismo de xenobióticos e detoxificação, resultando em maior regulação gênica (Johnson et al., 2006; Mao et al., 2011; Lu et al., 2020; Gonzalez et al., 2022; Nauen et al., 2022).

Após quatro horas de exposição ao fipronil, foi observada redução no número de genes diferencialmente expressos nas abelhas, tanto na dosagem subletal ($n = 321$ genes) quanto na dosagem letal ($n = 25$ genes). Uma possível explicação para essa diminuição pode ser atribuída à resposta imediata dos sistemas biológicos das abelhas ao inseticida (Lu et al., 2020). Em períodos de exposição mais curtos (exposição aguda), os mecanismos fisiológicos das abelhas podem não ter tempo suficiente para se adaptar ou regular completamente a expressão gênica em resposta ao inseticida, resultando em maior número de genes expressos diferencialmente com uma resposta inicial rápida (El-Seedi et al., 2022; Gonzalez et al., 2022). A exposição aguda aos inseticidas desencadeia respostas imediatas de estresse celular, incluindo a ativação de vias de sinalização intracelular, como a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsável pela regulação da expressão de genes envolvidos na resposta imune e inflamação nos insetos (Harwood e Dolezal, 2020). Além disso, genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e

processos de detoxificação, como as enzimas do citocromo P450, podem ser ativados para tentar neutralizar e eliminar o inseticida do organismo (Johnson et al., 2006; Nauen et al., 2022).

A partir da análise de ontologia gênica (GO) nas abelhas expostas a dose letal do fipronil por uma hora, foi verificado o enriquecimento de apenas uma categoria funcional, com DEGs associados à região extracelular. A alteração de genes envolvidos à região extracelular pode indicar uma resposta do sistema imunológico em relação ao agente tóxico (Lu et al., 2020; Thany, 2023). A região extracelular é composta por diversas moléculas e estruturas que desempenham funções essenciais na comunicação intercelular, defesa contra patógenos e manutenção da homeostase no organismo (Tsvetkov e Zayed, 2021). Ao serem expostas aos inseticidas, as abelhas podem desencadear uma resposta imune para combater o agente estranho e minimizar seus efeitos tóxicos; envolvendo a ativação de genes que integram a região extracelular, tais como aqueles envolvidos na produção de proteínas de sinalização, receptores de xenobióticos e moléculas relacionadas à resposta inflamatória (Nauen et al., 2022; Thany, 2023).

As abelhas contaminadas com a dose subletal após uma hora de exposição, apresentaram o enriquecimento de duas categorias funcionais: processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF). Os principais termos enriquecidos na categoria de processos biológicos em abelhas que receberam a dose subletal do fipronil fazem parte da regulação de processos celulares e de sinalização, além de diversos termos associados a fosforilação de proteínas, processos biossintéticos de macro e micromoléculas. Segundo Niu et al. (2023), a exposição aos inseticidas pode gerar alterações na expressão de genes que contribuem para a divisão e diferenciação celular, resposta a estímulos ambientais e vias de sinalização. Adicionalmente, os inseticidas podem interferir na fosforilação de proteínas, afetando a atividade de quinases e fosfatases, enzimas essenciais para a modulação de vias de sinalização celular (Chmiel et al., 2019; Zaluski et al., 2020).

Quanto à categoria de funções moleculares, os principais termos incluídos neste grupo fazem parte de processos de ligação proteica, atividades de canais catiônicos dependes de voltagem e atividades enzimáticas que catalisam reações de fosforilação. Diferentes estudos têm mostrado que a exposição aos inseticidas pode interferir na expressão de genes envolvidos em processos de ligação proteica, afetando a formação de complexos proteicos essenciais para a função celular (Fent et al., 2020). Também tem sido associado aos efeitos danosos causados pelos inseticidas, as alterações nas atividades de canais catiônicos dependentes de voltagem, prejudicando a regulação do equilíbrio iônico e transmissão de sinais elétricos em insetos (Dong, 2007; Murillo et al., 2011). Em himenópteros, a fosforilação de proteínas está

relacionada com inúmeros processos biológicos, como o desenvolvimento do sistema nervoso, regulação do metabolismo, resposta imunológica, regulação do crescimento e desenvolvimento, reprodução e comportamento (Cohen, 2002; Stanley et al., 2020); inclusive, desempenhando papel importante na regulação da atividade enzimática, na modulação da expressão gênica, na transdução de sinais e em muitos outros processos celulares e moleculares (Roat et al., 2020; Ye et al., 2022).

Em relação aos DEGs no tratamento com a dose letal do fipronil por uma hora, foi verificado a infrarregulação de genes envolvidos na defesa imunológica (*4-coumarate--CoA ligase 1*), síntese proteica (*Large subunit ribosomal RNA*), regulação gênica (*Mir3759*), funcionamento dos microtúbulos (*Probable tubulin polyglutamylase TTLL1*) e transporte celular (*Midasin*) (Rogowski et al., 2010; Shi et al., 2017; Zhang et al., 2023). Em contrapartida, genes suprarregulados (*upregulated*) neste tratamento, desempenham papel importante em processos de regulação gênica e proteica (*Protein broad-minded-like, 70 kDa peptidyl-prolyl isomerase-like*), além de estarem associados a resposta imune (*Leucine-rich repeat extensin-like protein 3*). Adicionalmente, os genes *Prominin-like protein* e *Cilia- and flagella-associated protein 251-like*, também suprarregulados, estão envolvidos na formação e função de estruturas celulares especializadas, como as microvilosidades, cílios e flagelos; consideradas estruturas importantes para a motilidade celular e percepção de estímulos ambientais pelas abelhas (Terra et al., 2006; Zhai et al., 2023).

No que diz respeito às abelhas expostas à dose subletal durante uma hora, os DEGs infrarregulados também estavam associados principalmente à síntese de proteínas, regulação gênica e defesa contra estressores [*Large subunit ribosomal RNA* (LOC113219340, LOC113219387), *microRNA* (*Mir3759*, *Mir6049*) e *4-coumarate--CoA ligase*] (Shi et al., 2017; Deng et al., 2020; Zhang et al., 2023). Por outro lado, os genes suprarregulados no referido tratamento, participam da estruturação do material genético e na regulação da expressão gênica (*Histone H2A*), transporte intracelular (*Sorting nexin-16*) e morte celular programada (*Apoptosis regulatory protein Siva*). A suprarregulação do gene *Apoptosis regulatory protein Siva* indica um desencadeamento de processos apoptóticos como resposta ao estresse químico induzido pelo fipronil (Mollah et al., 2020). A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, na homeostase e na eliminação de células danificadas ou indesejadas (Liu et al., 2012). Quando as abelhas são expostas aos inseticidas, as células de diferentes tecidos do organismo podem sofrer danos e estresse oxidativo, o que pode desencadear a ativação de vias de sinalização que levam à apoptose (Chakrabarti et al., 2020; Mollah et al., 2020).

Em abelhas expostas ao fipronil por quatro horas, independente da dosagem utilizada, os DEGs estavam principalmente associados à aspectos de percepção visual pelas abelhas, como: respostas aos estímulos externos, fototransdução, detecção de estímulo luminoso e percepção sensorial. Genes envolvidos na percepção visual desempenham um papel crucial na detecção e processamento de estímulos visuais, permitindo que as abelhas localizem fontes de alimento, percebam cores e se orientem espacialmente (Dyer et al., 2011). Assim, a exposição aos inseticidas pode afetar a expressão de genes relacionados as proteínas fotorreceptoras, como as opsinas, que são responsáveis pela absorção de luz pelos ommatídios e transmissão de sinais visuais para o sistema nervoso central dos insetos (Chakrabarti et al., 2019). Os olhos compostos das abelhas são constituídos por inúmeros ommatídios, que são unidades fotossensíveis responsáveis pela captação de luz. Cada ommatídio está conectado a um conjunto de células receptoras especializadas, as quais convertem a luz em impulsos elétricos que são então transmitidos ao cérebro para processamento (Ascher et al., 2001); quando essa habilidade visual é afetada pelo fipronil, pode gerar consequências negativas ao funcionamento da colônia, pois a percepção visual das abelhas às permite identificar flores com néctar e pólen, detectar predadores e orientar-se em relação à luz solar (ocelos), garantindo um adequado forrageamento durante seus voos (Dyer et al., 2011; Mayack et al., 2021).

Após a exposição da dose letal do fipronil (quatro horas), foi constatado a infrarregulação de genes que integram a digestão, absorção de nutrientes e resposta à estressores (*Carboxipeptidase Q*, *Chymotrypsin inhibitor*, *4-coumarate--CoA ligase 1*) (Roussel et al., 2001; Sui et al., 2009; Zhang et al., 2023). O gene *Obp6*, integrante da família OBP (*Odorant-binding proteins*), também sofreu infrarregulação neste tratamento. A principal função do gene *Obp6* é atuar como transportador de moléculas odorantes, facilitando sua ligação e transporte do ambiente externo até os receptores de odor nas células sensoriais das antenas (Forêt e Maleszka, 2006). Os possíveis efeitos da infrarregulação de genes OBP em abelhas incluem a diminuição da sensibilidade aos odores, o que pode afetar negativamente a capacidade das abelhas de detectar alimentos, feromônios e sinais de perigo; podendo assim, impactar seu comportamento de forrageamento, tornando-as menos eficientes na localização de fontes de recursos florais (Forêt e Maleszka, 2006; Li et al., 2015; Mayack, 2023). O gene *CYP6AQ1*, também infrarregulado, faz parte do metabolismo de diversos compostos, incluindo toxinas e xenobióticos (Nauen et al., 2022). Estudos sugerem que ele desempenha um papel importante na metabolização e desintoxicação de agrotóxicos e outros xenobióticos (Johnson et al., 2006; Mao et al., 2011). Quando este gene tem sua expressão infrarregulada, pode resultar em uma diminuição na capacidade das abelhas metabolizarem eficientemente os agrotóxicos, as

tornando mais suscetíveis aos seus efeitos tóxicos, impactando negativamente na sobrevivência das abelhas (Nauen et al., 2022).

Genes suprarregulados após a exposição de quatro horas a DL₅₀ do fipronil, são partes integrantes da função muscular nas abelhas (*Actin-binding Rho-activating protein - ABRA*, *Myosin-7*, *Titin*). Os referidos genes participam em modificações no citoesqueleto, integridade estrutural e função muscular dos insetos (Wu et al., 2010; Ma et al., 2021); assim, o fipronil pode comprometer a motilidade celular, formação de estruturas morfológicas (ex. asas, pernas e antenas), capacidade de resposta aos estímulos ambientais (ex. toque e gravidade), contração muscular e locomoção (Wu et al., 2010; Potts et al., 2018; Kenna et al., 2019). Outro gene suprarregulado no referido tratamento foi o *Hymenoptaecin*; este peptídeo catiônico rico em prolina possui propriedades antimicrobianas, atuando na resposta imunológica quando ativado após exposição a patógenos ou xenobióticos (Casteels et al., 1993). Devido a exposição aos inseticidas aumentar o estresse e a suscetibilidade das abelhas a doenças e infecções, a suprarregulação de *Hymenoptaecin* pode sugerir uma resposta das abelhas para reforçar sua resistência (Saltykova et al., 2005; Gregorc et al., 2012).

No tratamento com exposição subletal ao fipronil (quatro horas), a análise de expressão gênica revelou infrarregulação dos genes *Phospholipase B1* (LOC551805, LOC552829), associados a enzima que desempenha um papel importante no metabolismo dos lipídios e produção da apitoxina (Elieh Ali Komi et al., 2018). Além de genes envolvidos na expressão gênica (*Mir3759*) e síntese de metabólitos (*4-coumarato-CoA ligase 1*) (Deng et al., 2020; Zhang et al., 2023). A infrarregulação do gene *Protein apterous-like* (PAL) também foi verificada; este gene é um fator de transcrição responsável por regular a expressão genes envolvidos no crescimento e na diferenciação das células das asas (Ernst et al., 2022). A infrarregulação do gene PAL pode acarretar em anormalidades na formação das estruturas das asas, tais como redução de tamanho, formato anômalo ou assimetria. Essas alterações podem comprometer a capacidade de voo das abelhas, impactando sua locomoção, habilidade de busca por recursos alimentares e comportamento reprodutivo (rainha e zangões). Além disso, a diminuição da expressão do gene PAL pode ter efeitos sobre a expressão de outros genes relacionados ao desenvolvimento de tecidos e órgãos associados às asas, como os músculos envolvidos no voo e estruturas sensoriais (Elias-Neto et al., 2022; Ernst et al., 2022).

Genes envolvidos em processos de degradação de peptídeos (*Neprilysin-4*), estruturas celulares (*Cilia-and flagella-associated protein 251-like*), divisão celular (*Meiosis-specific nuclear structural protein 1*) e metabolismo lipídico (*Acyl-CoA Delta(11) desaturase*) foram suprarregulados após a exposição à dose subletal do fipronil por quatro horas. O gene *Kakusei*

(*Kakusei non-coding nuclear RNA*), que codifica o RNA não codificante nuclear, também sofreu suprarregulação, e embora sua função específica seja pouco conhecida, estudos sugerem seu envolvimento na regulação gênica (transcricional ou pós-transcricional) e na resposta adaptativa dos insetos ao estresse causado pelos agrotóxicos (Kiya et al. 2008, 2012). No entanto, Singh et al. (2020) propõem que o gene *Kakusei* pode estar envolvido no processo de forrageamento das abelhas, junto aos genes *egr-1* e *hr38*, por meio de seu papel na interação entre a aprendizagem, memória e comunicação das abelhas.

Os resultados deste estudo demonstram que a exposição tópica das abelhas ao fipronil resulta em alterações na expressão gênica, o que desencadeia respostas imediatas de estresse celular. Essas respostas incluem a ativação de vias de sinalização e regulação gênica relacionadas à resposta imune e ao metabolismo de xenobióticos. Além disso, o fipronil altera a regulação de genes envolvidos na digestão, absorção de nutrientes, resposta a estressores, função muscular e percepção de odores nas abelhas. Esses achados ressaltam a complexidade dos efeitos desse inseticida sobre as abelhas e enfatizam a importância de compreender as respostas moleculares e fisiológicas dos insetos polinizadores à exposição ao fipronil.

REFERÊNCIAS

- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., & Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(1), 113-122.
- Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 23, 324-334.
- Ascher, J. S., Danforth, B. N., & Ji, S. (2001). Phylogenetic utility of the major opsin in bees (Hymenoptera: Apoidea): a reassessment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1), 76-93.
- Astolfi, A., Kadri, S. M., Castro Lippi, I. C., Mendes, D. D., Alonso, D. P., Ribolla, P. E. M., & Oliveira Orsi, R. (2022). Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. *Apidologie*, 53(6), 69.
- Benuszak, J., Laurent, M., & Chauzat, M. P. (2017). The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research. *Science of The Total Environment*, 587, 423-438.
- Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 973-992.
- Bovi, T. S., Zaluski, R., & Orsi, R. O. (2018). Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 239-245.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054.
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & 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), e0233033.
- Chakrabarti, P., Sarkar, S., & Basu, P. (2019). Pesticide induced visual abnormalities in Asian honey bees (*Apis cerana* L.) in intensive agricultural landscapes. *Chemosphere*, 230, 51-58.
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Burton, J. P., & Reid, G. (2019). Deleterious effects of neonicotinoid pesticides on *Drosophila melanogaster* immune pathways. *MBio*, 10(5), e01395-19.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology*, 4(5), E127-E130.
- Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., & Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47, 387-395.
- Collison, E., Hird, H., Cresswell, J., & Tyler, C. (2016). Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health—a critical analysis. *Biological Reviews*, 91(4), 1006-1019.

- Decio, P., Ustaoglu, P., Derecka, K., Hardy, I. C., Roat, T. C., Malaspina, O., ... & Soller, M. (2021). Thiamethoxam exposure deregulates short ORF gene expression in the honey bee and compromises immune response to bacteria. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
- Deng, Y., Zhao, H., Shen, S., Yang, S., Yang, D., Deng, S., & Hou, C. (2020). Identification of immune response to sacbrood virus infection in *Apis cerana* under natural condition. *Frontiers in Genetics*, 11, 587509.
- Dickey, M., Walsh, E. M., Shepherd, T. F., Medina, R. F., Tarone, A., & Rangel, J. (2023). Transcriptomic analysis of the honey bee (*Apis mellifera*) queen brain reveals that gene expression is affected by pesticide exposure during development. *Plos one*, 18(4), e0284929.
- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7, 17-30.
- Dyer, A. G., Paulk, A. C., & Reser, D. H. (2011). Colour processing in complex environments: insights from the visual system of bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 952-959.
- Elias-Neto, M., Alvarez, N., Ventos-Alfonso, A., & Belles, X. (2022). Flight or protection: the genes Ultrabithorax and apterous in the determination of membranous and sclerotized wings in insects. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1981), 20220967.
- Elieh Ali Komi, D., Shafaghat, F., & Zwiener, R. D. (2018). Immunology of bee venom. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 54, 386-396.
- El-Seedi, H. R., Ahmed, H. R., El-Wahed, A. A. A., Saeed, A., Algethami, A. F., Attia, N. F., ... & Wang, K. (2022). Bee stressors from an immunological perspective and strategies to improve bee health. *Veterinary Sciences*, 9(5), 199.
- Ernst, D. A., Agcaoili, G. A., Merrill, A. N., & Westerman, E. L. (2022). A learning experience elicits sex-dependent neurogenomic responses in *Bicyclus anynana* butterflies. *bioRxiv*, 2022-07.
- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 719-731.
- Fent, K., Schmid, M., & Christen, V. (2020). Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*, 259, 113715.
- Forêt, S., & Maleszka, R. (2006). Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome research*, 16(11), 1404-1413.
- Gonçalves, S., Vasconcelos, M. W., Mota, T. F. M., Lopes, J. M. H., Guimaraes, L. J., Miglioranza, K. S. B., & Ghisi, N. D. C. (2022). Identifying global trends and gaps in research on pesticide fipronil: a scientometric review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(52), 79111-79125.
- Gonzalez, V. H., Hranitz, J. M., McGonigle, M. B., Manweiler, R. E., Smith, D. R., & Barthell, J. F. (2022). Acute exposure to sublethal doses of neonicotinoid insecticides increases heat tolerance in honey bees. *Plos one*, 17(2), e0240950.

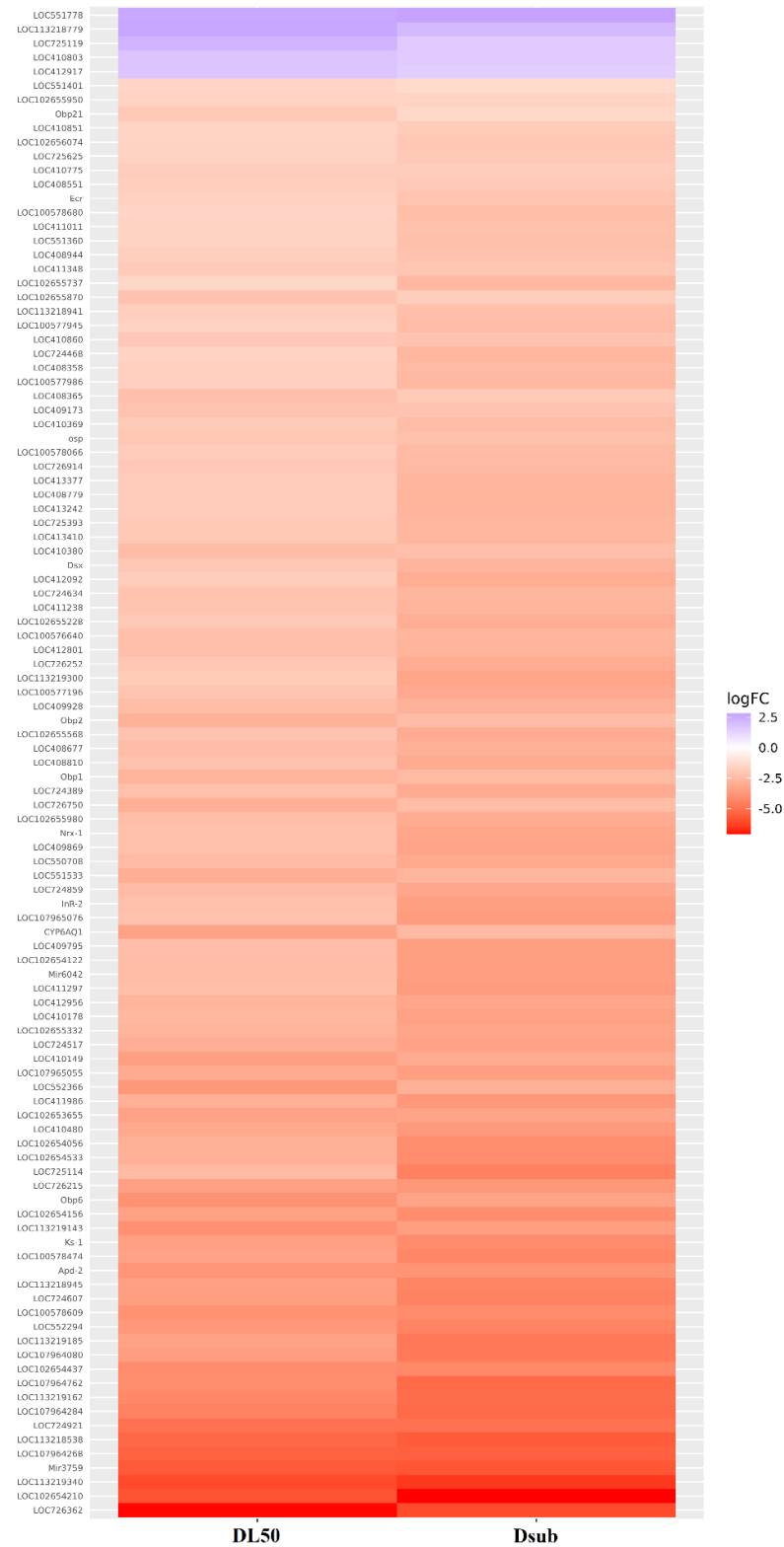
- Greenberg, J. K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S. R., Gu, X., Ament, S. A., ... & Ben-Shahar, Y. (2012). Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes, brain and behavior*, 11(6), 660-670.
- Gregorc, A., Evans, J. D., Scharf, M., & Ellis, J. D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of insect physiology*, 58(8), 1042-1049.
- Harwood, G. P., & Dolezal, A. G. (2020). Pesticide–virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses*, 12(5), 566.
- Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1046-1050.
- Kablau, A., Eckert, J. H., Pistorius, J., Sharbati, S., & Einspanier, R. (2020). Effects of selected insecticidal substances on mRNA transcriptome in larvae of *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104703.
- Kenna, D., Cooley, H., Pretelli, I., Ramos Rodrigues, A., Gill, S. D., & Gill, R. J. (2019). Pesticide exposure affects flight dynamics and reduces flight endurance in bumblebees. *Ecology and Evolution*, 9(10), 5637-5650.
- Kiya, T., Kunieda, T., & Kubo, T. (2008). Inducible-and constitutive-type transcript variants of kakusei, a novel non-coding immediate early gene, in the honeybee brain. *Insect molecular biology*, 17(5), 531-536.
- Kiya, T., Ugajin, A., Kunieda, T., & Kubo, T. (2012). Identification of kakusei, a nuclear non-coding RNA, as an immediate early gene from the honeybee, and its application for neuroethological study. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 15496-15509.
- Kopit, A. M., & Pitts-Singer, T. L. (2018). Routes of pesticide exposure in solitary, cavity-nesting bees. *Environmental Entomology*, 47(3), 499-510.
- Li, H., Wu, F., Zhao, L., Tan, J., Jiang, H., & Hu, F. (2015). Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: implication for olfactory dysfunction. *International journal of biological macromolecules*, 81, 624-630.
- Liu, K. Y., Yang, H., Peng, J. X., & Hong, H. Z. (2012). Cytochrome c and insect cell apoptosis. *Insect Science*, 19(1), 30-40.
- Lu, C., Hung, Y. T., & Cheng, Q. (2020). A review of sub-lethal neonicotinoid insecticides exposure and effects on pollinators. *Current pollution reports*, 6, 137-151.
- Lunardi, J. S., Zaluski, R., & Orsi, R. O. (2017). Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 50-56.
- Ma, S., Ma, T., Ren, M., Li, H., & Ma, Z. (2021). Insecticidal action of the botanical insecticide wilforine on *Mythimna separata* (Walker) related with the changes of ryanodine receptor expression. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112025.
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12657-12662.

- Mayack, B. K. (2023). Modeling disruption of *Apis mellifera* (honey bee) odorant-binding protein function with high-affinity binders. *Journal of Molecular Recognition*, 36(5), e3008.
- Mayack, C., Rükün, T., Ercan, N., Canko, E., Avşar, B., Dyer, A., ... & Çakmak, İ. (2021). Sublethal pesticide exposure erases colour vision memory and affects flower constancy in foraging honey bees. *Research Square*, 2021, 1-17.
- Mollah, M. M. I., Yeasmin, F., & Kim, Y. (2020). Benzylideneacetone and other phenylethylamide bacterial metabolites induce apoptosis to kill insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 449-457.
- Murillo, L., Hamon, A., Es-Salah-Lamoureux, Z., Itier, V., Quinchard, S., & Lapied, B. (2011). Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology*, 32(6), 828-835.
- Nauen, R., Bass, C., Feyereisen, R., & Vontas, J. (2022). The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance. *Annual review of entomology*, 67, 105-124.
- Niu, X. J., Wang, L. J., Meng, H., Wang, H. F., Xu, B. H., & Wang, C. (2023). Role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in response to pesticides in *Apis cerana cerana*. *Insect Science*, 30(1), 47-64.
- Piovesan, B., Padilha, A. C., Morais, M. C., Botton, M., Grützmacher, A. D., & Zotti, M. J. (2020). Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 42472-42480.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., ... & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental science and pollution research*, 22, 68-102.
- Potts, R., Clarke, R. M., Oldfield, S. E., Wood, L. K., de Ibarra, N. H., & Cresswell, J. E. (2018). The effect of dietary neonicotinoid pesticides on non-flight thermogenesis in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of insect physiology*, 104, 33-39.
- Roat, T. C., dos Santos-Pinto, J. R. A., Miotelo, L., de Souza, C. L., Palma, M. S., & Malaspina, O. (2020). Using a toxicoproteomic approach to investigate the effects of thiamethoxam into the brain of *Apis mellifera*. *Chemosphere*, 258, 127362.
- Rogowski, K., Van Dijk, J., Magiera, M. M., Bosc, C., Deloulme, J. C., Bosson, A., ... & Janke, C. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell*, 143(4), 564-578.
- Roussel, A., Mathieu, M., Dobbs, A., Luu, B., Cambillau, C., & Kellenberger, C. (2001). Complexation of two proteic insect inhibitors to the active site of chymotrypsin suggests decoupled roles for binding and selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38893-38898.
- Saltykova, E. S., Lvov, A. V., Ben'kovskaya, G. V., Poskryakov, A. V., & Nikolenko, A. G. (2005). Interracial differences in expression of genes of antibacterial peptides, Abaecin, Hymenoptaecin, and Defensin, in bees *Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera caucasica*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41(5), 506.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.

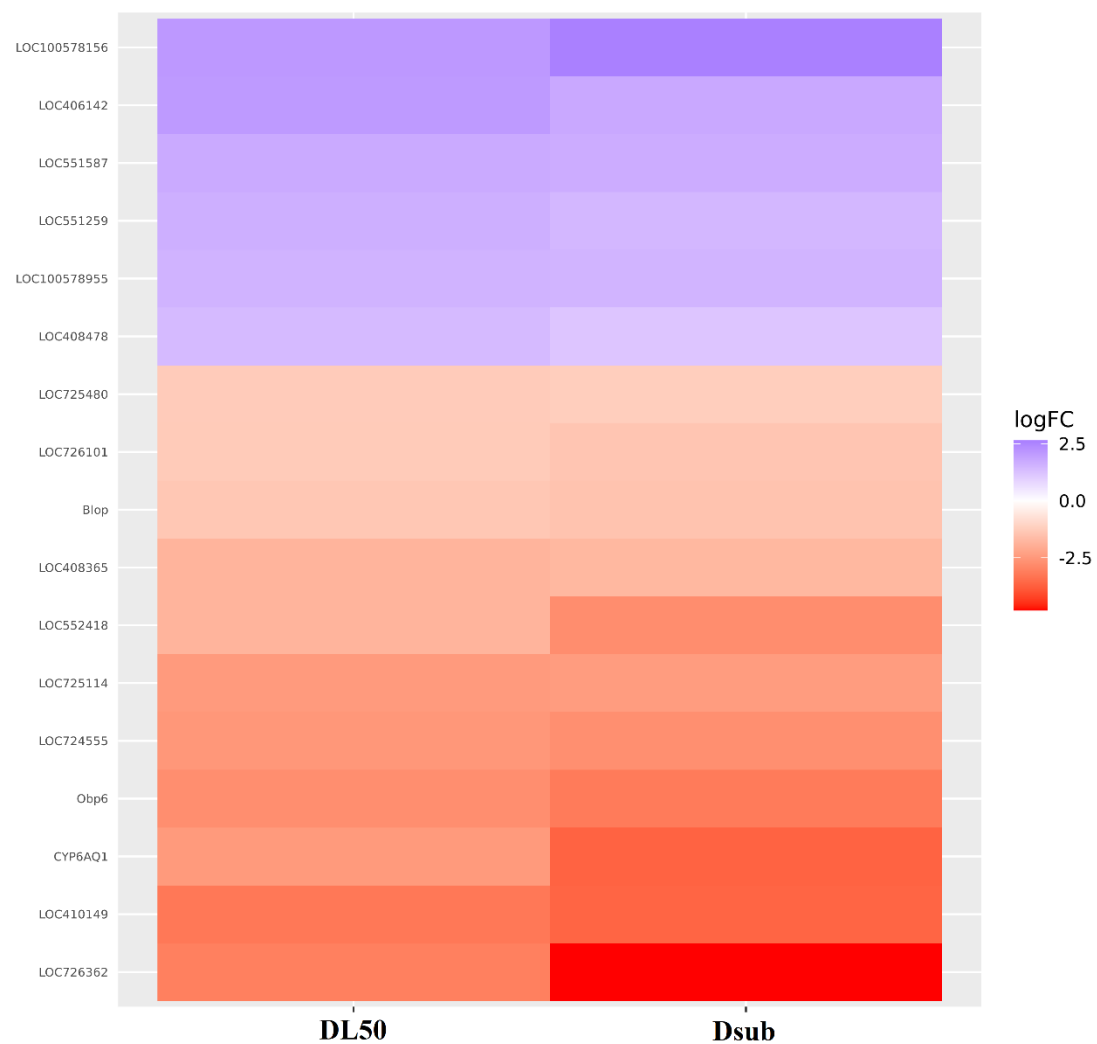
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment international*, 89, 7-11.
- Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., & Zanuncio, J. C. (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature*, 109(2), 17.
- Shi, T. F., Wang, Y. F., Liu, F., Qi, L., & Yu, L. S. (2017). Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 110(6), 2283-2289.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5-34.
- Singh, A. S., Takhellambam, M. C., Cappelletti, P., & Feligioni, M. (2020). Immediate early gene *kakusei* potentially plays a role in the daily foraging of honey bees. *Plos one*, 15(5), e022256.
- Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M. J., & Leadbeater, E. (2018). Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*, 55(6), 2812-2821.
- Stanley, D., Goodman, C. L., Ringbauer, J. A., & Song, Q. (2020). Prostaglandins influence protein phosphorylation in established insect cell line. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(1), e21725.
- Sui, Y. P., Liu, X. B., Chai, L. Q., Wang, J. X., & Zhao, X. F. (2009). Characterization and influences of classical insect hormones on the expression profiles of a molting carboxypeptidase A from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Insect molecular biology*, 18(3), 353-363.
- Terra, W. R., Costa, R. H., & Ferreira, C. (2006). Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78, 255-269.
- Thany, S. H. (2023). Molecular Mechanism of Action of Neonicotinoid Insecticides. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5484.
- Thompson, H. M., & Hunt, L. V. (1999) Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology*, 8, 147-166.
- Tsvetkov, N., & Zayed, A. (2021). Searching beyond the streetlight: Neonicotinoid exposure alters the neurogenomic state of worker honey bees. *Ecology and Evolution*, 11(24), 18733-18742.
- Wu, S., Liu, J., Reedy, M. C., Winkler, H., Tregear, R. T., Lucaveche, C., ... & Taylor, K. A. (2010). Electron tomography of cryofixed, isometrically contracting insect flight muscle reveals novel actin-myosin interactions. *Biophysical Journal*, 98(3), 216a.
- Ye, M., Nayak, B., Xiong, L., Xie, C., Dong, Y., You, M., ... & You, S. (2022). The role of insect cytochrome p450s in mediating insecticide resistance. *Agriculture*, 12(1), 53.
- Zaluski, R., Kadri, S. M., Alonso, D. P., Martins Ribolla, P. E., & Oliveira Orsi, R. (2015). Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects

- the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1062-1069.
- Zaluski, R., Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Padilha, P. D. M., Fernandes, M. D. S., ... & Orsi, R. D. O. (2020). Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Zhai, X. D., Zhang, S. Y., Chen, D., Li, W. J., Wang, J. J., & Wei, D. (2023). Comparative multi-tissue analyses identify testis-specific serine/threonine protein kinase (TSSK) genes involved in male fertility in the melon fly *Zeugodacus cucurbitae*. *Pest Management Science*.
- Zhang, Y., He, X. J., Barron, A. B., Li, Z., Jin, M. J., Wang, Z. L., ... & Zeng, Z. J. (2023). The diverging epigenomic landscapes of honeybee queens and workers revealed by multiomic sequencing. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 103929.

APÊNDICES



Apêndice 1. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via tópica após uma hora de exposição.



Apêndice 2. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas em comum após a exposição da dose letal e subletal do inseticida fipronil via tópica após quatro horas de exposição.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

Considerando os efeitos prejudiciais dos inseticidas em organismos não-alvo, como as abelhas, é fundamental compreender seu impacto em *Apis mellifera*, levando em conta a produção apícola e sua relevante função ecológica nos serviços de polinização. A perda de populações de abelhas e a diminuição dos serviços de polinização representam uma ameaça para a agricultura e a segurança alimentar. Isso ocorre porque parte substancial dos cultivos agrícolas depende da polinização realizada por abelhas e outros polinizadores. A ausência desse serviço de polinização resultaria em uma queda drástica na produção de alimentos, levando à escassez, aumento de preços e perda de diversidade alimentar. Além disso, as abelhas desempenham um papel vital na reprodução de plantas silvestres, contribuindo diretamente para a manutenção da biodiversidade nos ecossistemas.

O inseticida em questão, o fipronil, já foi proibido em mais de 40 países, com destaque para a União Europeia. No Brasil, a restrição do uso deste inseticida está em discussão em alguns estados, que buscam implementar políticas públicas visando à proteção dos serviços de polinização prestados pelas abelhas e à redução dos impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos na apicultura do país. Considerando a ampla variedade de cultivos agrícolas que ainda utilizam o fipronil para o controle de pragas, esta tese fornece dados científicos que destacam os danos causados pela contaminação por esse inseticida, mesmo em exposições de curto prazo ou em doses muito baixas.

Dessa forma, a promoção de práticas que protegem os serviços prestados pelos polinizadores e a implementação de políticas públicas que enfatizam a importância da aplicação responsável de agrotóxicos nas áreas agrícolas e o respeito pelas áreas de entorno se tornam urgentes e de interesse global. Os resultados deste estudo desempenham um papel significativo nesse contexto, contribuindo para a tomada de decisões baseadas em evidências científicas e fornecendo informações para a implementação de medidas destinadas a preservar a saúde das abelhas, garantindo, assim, a segurança alimentar e contribuindo com a manutenção da biodiversidade.