

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

EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO HERBICIDA GLIFOSATO NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS NA FASE DE
CAMPEIRAS

JAINÉ DA LUZ SCHEFFER

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Junho, 2022

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

EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO HERBICIDA GLIFOSATO NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS NA FASE DE
CAMPEIRAS

JAINÉ DA LUZ SCHEFFER

Orientador: Prof. Dr. Orientador Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Junho, 2022

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Scheffer, Jaine da Luz.

Efeito de dose letal e subletal do herbicida glifosato no transcriptoma de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras / Jaine da Luz Scheffer. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - 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. Agroquímicos. 2. Herbicidas. 3. Expressão gênica.
4. Criação de abelhas. 5. Glifosato.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Apicultura; Expressão gênica; Herbicida.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Jaine da Luz Scheffer, nascida em 21 de agosto de 1996 na cidade de Torres/RS, é filha de Jair Maier Scheffer e Alzeni Matos da Luz Scheffer. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus de Dom Pedrito/RS, em março de 2015 e graduou-se em fevereiro de 2020. Em agosto de 2020 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita “Filho” – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu/SP, onde foi bolsista temporária pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e posteriormente, até a conclusão do curso, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq.

À minha filha, que mesmo sem saber, me encoraja todos os dias, sendo meu maior incentivo para seguir em frente.

Aos meus pais que me ensinaram a valorizar cada oportunidade e nunca deixaram de me apoiar.

Dedico com amor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Jair Maier Scheffer e Alzeni Matos da Luz Scheffer, que me incentivaram a ir em busca de um futuro melhor, nunca mediram esforços para investir na minha educação. Serei eternamente grata por todo cuidado e carinho com a Ísis para que eu pudesse estar concluindo mais uma etapa da minha vida, foram fundamentais para eu chegar até aqui.

Ao meu irmão, Adilso Matos da Luz, que mesmo distante, nunca deixou de estar ao meu lado.

À minha filha, Ísis da Luz Scheffer, que é tudo na minha vida, minha força e o motivo de eu ir em busca de um futuro promissor para nós duas.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela orientação, amizade e apoio, tanto na vida profissional, quanto pessoal. Agradeço imensamente pela confiança depositada e pela oportunidade para realização desta dissertação. Muito obrigado pela paciência, dedicação, compreensão e por fazer crescer ainda mais o meu encanto pelas abelhas.

Ao Dr. Samir Moura Kadri, pelo auxílio nos estudos de expressão gênica, ensinamento na área de genética molecular e pela total dedicação a esta pesquisa. Grata pelo apoio e amizade.

Aos amigos de Pós-graduação, em especial a Isabella Lippi, Juliana Lunardi, Paulo Ito e Yan Souza Lima, pelo companheirismo e amizade ao longo desta etapa.

Ao grupo NECTAR – Núcleo de ensino, ciência e tecnologia em apicultura racional, que me proporcionou inúmeros aprendizados; aos integrantes que me ajudaram de certa forma na execução do projeto. Obrigada também pela amizade e experiências compartilhadas.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ – UNESP, Câmpus de Botucatu, bem como ao Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de estudo à mim concedida.

E finalmente agradeço a Deus, que me enviou forças para superar as dificuldades e colocou pessoas certas em meu caminho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Abelha no néctar da flor, bebê no seio materno,
renovação da vida, amor”!*

Djalma CMF

RESUMO GERAL

As abelhas são consideradas eficientes agentes polinizadores, e devido a sua característica generalista na busca de recursos alimentares disponibilizados pelas plantas, ficam sujeitas a situações desfavoráveis encontradas no ambiente, como os agrotóxicos. Dentre eles, o herbicida glifosato tem seu uso autorizado na maioria das culturas, sendo o mais comercializado nacionalmente. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a toxicidade do glifosato a partir de alterações no perfil de expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras por meio de teste de ingestão. Para isso, abelhas recém-emergidas de nove colônias foram marcadas na região do pronoto e devolvidas às suas respectivas colônias; após 21 dias, 180 abelhas no total foram coletadas das colônias experimentais. Para os testes de ingestão, estas abelhas foram acondicionadas em placas Petri perfuradas, onde se mantiveram em jejum por 3 horas, totalizando seis repetições com cinco abelhas cada, sendo fornecido então o xarope de mel contendo ou não a dose letal (273,93 µg/abelha) e subletal do glifosato (2,73 µg/abelha). Após 1 e 4 horas de exposição, 15 abelhas foram coletadas aleatoriamente para as análises do transcriptoma do tecido cerebral. O RNA total de cada tratamento foi extraído pelo método de Trizol. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) que apresentaram significância estatística foram considerados quando p-valor ajustado para múltiplas comparações $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$. Após a exposição das abelhas ao alimento contendo glifosato, 691 genes foram diferencialmente expressos após uma hora, sendo 404 genes para a dose letal e 538 genes para a dose subletal, com 251 genes expressos em comum para ambas as doses do herbicida. Após quatro horas de exposição das abelhas, foram diferencialmente expressos 499 genes para a dose letal e 483 genes para a dose subletal, totalizando 784 genes diferencialmente expressos, sendo 198 genes expressos para ambas as doses. Observou-se que, independente da dose utilizada, o herbicida glifosato promoveu alterações na expressão de genes relacionados a importantes vias do sistema nervoso das abelhas na fase de campeiras após uma hora de exposição. Após quatro horas de exposição, observou-se mudanças na expressão de genes relacionados a processos metabólicos e também a organelas intracelulares. Pode-se concluir que o herbicida glifosato afeta a expressão gênica de abelhas campeiras expostas de forma aguda, podendo interferir na sua microbiota intestinal, imunidade, sistema cognitivo e, conseqüentemente, no desenvolvimento da colônia.

Palavras-chave: agrotóxicos; apicultura; expressão gênica; herbicida.

ABSTRACT

Bees are considered efficient pollinating agents, and due to their generalist characteristic in the search for food resources made available by plants, they are subject to unfavorable situations found in the environment, such as pesticides. Among them, the herbicide glyphosate has its use authorized in most crops, being the most commercialized nationally. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the toxicity of glyphosate from changes in the gene expression profile of Africanized field bees *Apis mellifera* by means of an ingestion test. For that purpose, newly emerged bees from nine colonies were marked in the pronotum region and returned to their respective colonies; after 21 days, a total of 180 bees were collected from the experimental colonies. For the ingestion tests, these bees were placed in perforated Petri dishes, where they were maintained fasting for 3 hours, totaling six repetitions with five bees each, and then the honey syrup was supplied with or without the lethal dose (273, 93 µg/bee) and sublethal glyphosate (2,73 µg/bee). After 1 and 4 hours of exposure, 15 bees were randomly collected for brain tissue transcriptome analysis. Total RNA from each treatment was extracted by the Trizol method. The differentially expressed genes (DEGs) that showed statistical significance were considered when p-value adjusted for multiple comparisons $< 0,05$ and $|\log_2 FC| \geq 2$. After exposure of the bees to the food containing glyphosate, 691 genes were differentially expressed after one hour, 404 genes for the lethal dose and 538 genes for the sublethal dose, with 251 genes expressed in common for both doses of the herbicide. After four hours of exposure of the bees, 499 genes were differentially expressed for the lethal dose and 483 genes for the sublethal dose, totaling 784 differentially expressed genes, with 198 genes expressed for both doses. It was observed that, regardless of the dose used, the herbicide glyphosate promoted changes in the expression of genes related to important pathways in the nervous system of bees in the forager stage after one hour of exposure. After four hours of exposure, changes were observed in the expression of genes related to metabolic processes and also to intracellular organelles. It can be concluded that the herbicide glyphosate affects the gene expression of acutely exposed forager bees, which may interfere with their intestinal microbiota, immunity, cognitive system and, consequently, the development of the colony.

Keywords: pesticide; beekeeping; gene expression; herbicide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 2. Fórmula estrutural do herbicida Glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine]	22
Figura 3. Representação do mecanismo de ação do glifosato na planta por meio da rota do ácido chiquímico. (A) Via do ácido chiquímico com suas respectivas reações químicas sem a atuação do glifosato, com a formação de aminoácidos aromáticos (aa aromático); (B) Via do ácido chiquímico com a atuação do glifosato impedindo ação da enzima EPSPs por competição com o PEP (fosfoenolpiruvato); (1) enzima 5enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs)	23

CAPÍTULO 2

Figura 1. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma hora (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.	51
Figura 2. Histograma do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) infraregulados e supraregulados entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.	52
Figura 3. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF).	53
Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF)	54

Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 55

Figura 6. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal. A cor vermelha indica funções moleculares (MF). 56

Figura 7. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 57

Figura 8. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 58

Figura 9. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 1 hora de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle. 60

Figura 10. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 4 horas de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle. 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Fases do ciclo de desenvolvimento das diferentes castas de uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	15
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Consumo médio do xarope de mel ($\mu\text{L}/\text{abelha}$) contaminado ou não com a dose letal ($273,93 \mu\text{g}/\text{abelha}$) e subletal ($2,73 \mu\text{g}/\text{abelha}$) do glifosato pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas, durante 1 e 4 horas de exposição.....	50
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
Considerações Iniciais	14
1. Revisão de Literatura	14
1.1 Biologia das abelhas <i>Apis mellifera</i> , sua importância ambiental, social e econômica	14
1.2 Agrotóxicos.....	18
1.3 Características gerais do herbicida glifosato.....	21
1.3.1 Efeitos do glifosato em abelhas	25
1.4 Genética molecular: técnicas de análises de expressão gênica.....	28
2. Objetivos Gerais	33
Referências	34
CAPÍTULO 2	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT	45
1. Introdução	46
2. Material e Métodos	47
3. Resultados.....	50
3.1. Consumo do alimento	50
3.2. Genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos pelo glifosato	50
4. Discussão	62
Referências	68
ANEXOS	74
CAPÍTULO 3	75
IMPLICAÇÕES.....	76

CAPÍTULO 1

Considerações Iniciais

1. Revisão de Literatura

1.1 Biologia das abelhas *Apis mellifera*, sua importância ambiental, social e econômica

O Brasil, segundo Queiroga et al. (2015), oferece condições favoráveis para a atividade apícola em virtude da sua ampla área territorial com flora diversificada e clima tropical propício, o que possibilita a maximização da produção, geração de emprego e renda, principalmente à agricultura familiar. O país possui aproximadamente 3.000 espécies de abelhas; no entanto, a subespécie *Apis mellifera* africanizada, oriunda da hibridização entre raças europeias (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica*) e africana (*A. mellifera scutellata*), é a mais conhecida, amplamente difundida e utilizada comercialmente (SILVA et al., 2015).

Em uma colônia de abelhas é encontrada três diferentes castas (Figura 1), dentre elas, uma rainha, até 400 zangões e aproximadamente 30.000 a 80.000 abelhas operárias (WIESE, 2020). Por serem insetos holometábolos, o ciclo de desenvolvimento das três castas envolve uma transição em etapas distintas numa sequência de: ovo, larva, pré-pupa, pupa e inseto adulto; onde, independente da casta, permanecem três dias na fase de ovo, seis dias na fase de larva, e a partir daí as fases de pré-pupa e pupa variam conforme as castas, durando em média sete dias para rainha, 12 dias para operárias e 15 dias para zangões, totalizando respectivamente 16, 21 e 24 dias para completar seu desenvolvimento, conforme detalhes da Tabela 1 (BOMFIM et al., 2017; WIESE, 2020).

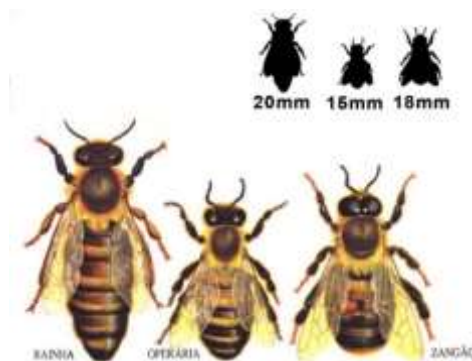


Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de *Apis mellifera*. Fonte: Editado de Bomfim et al. (2017).

Tabela 1. Ciclo de desenvolvimento das crias das diferentes castas de uma colônia de *Apis mellifera*

TEMPO (dias)	FASES		
	RAINHA	OPERÁRIA	ZANGÃO
1° ao 3°	Ovo	Ovo	Óvulo
3°	Eclosão do ovo	Eclosão do ovo	Eclosão do ovo
3° ao 8°	Larva	Larva	Larva
8°	Célula operculada	Larva	Larva
8° ao 9°	A larva tece o casulo	A célula é operculada; a larva tece o casulo	A célula é operculada; a larva tece o casulo
10° ao 10° ½	Pré-pupa	Pré-pupa	Tece o casulo
11°	Pupa	Pré-pupa	Pré-pupa
12°	Pupa	Pupa	Pré-pupa
16°	Inseto adulto	Pupa	Pupa
21°	-	Inseto adulto	-
24°	-	-	Inseto adulto

Fonte: Editado de Bomfim et al. (2017).

Essas três castas distintas anatomicamente, morfologicamente, fisiologicamente e comportamentalmente (ROBINSON et al., 1991; WIESE, 2020) apresentam um grande nível de organização social para o trabalho a partir da divisão de tarefas na colônia. A rainha é a única fêmea fértil e por isso é responsável pela postura de ovos fecundados (diploides), dando origem as abelhas operárias, e não fecundados (haploides), originando zangões em números adequados para a manutenção do equilíbrio populacional da colônia. Além disso, produz feromônios que indicam sua presença na colmeia, mantendo a coesão da colônia (WIESE, 2020). A função do zangão é unicamente fecundar as abelhas rainhas virgens nos voos nupciais (WIESE, 2020). Já as operárias, são fêmeas inférteis e cabe a elas a realização da maior parte das atividades de trabalho na colmeia, seguindo uma ordem determinada pela idade ou maturidade fisiológica do indivíduo, também denominada de polietismo etário ou polifenismo, contudo estão sujeitas a mudanças de funções de acordo com as necessidades da colônia (FREE, 1980; WIESE, 2020).

Dessa forma, as operárias do primeiro ao terceiro dia de vida realizam atividades como faxineiras, fazendo a limpeza da colmeia e das células para a postura e armazenagem de

alimentos; do quarto ao décimo quarto dia desempenham o papel de abelhas nutrizas, sendo responsáveis pela produção de geleia real, alimentação larval e da rainha; do décimo quarto ao vigésimo dia são encarregadas à produção de cera e à construção de favos, conhecidas como abelhas engenheiras; aos 20 dias ficam na entrada da colmeia vigiando e defendendo o ninho contra qualquer invasão, e por isso, são denominadas de guardiãs; e do vigésimo primeiro dia até o final de suas vidas, se tornam abelhas campeiras, por ser o período em que se dedicam na coleta de alimentos e produtos do campo para a colmeia (WIESE, 2020).

A criação racional destas abelhas é intitulada de apicultura e tem como finalidade a produção de pólen, própolis, cera, geleia real, apitoxina e mel (ASSAD et al., 2019), sendo este de maior produtividade e o mais conhecido popularmente por ser o foco principal da atividade. De fato, os benefícios econômicos, nutritivos e medicinais provenientes desses produtos retratam a relevância da apicultura (PEREIRA et al., 2003). Entretanto, as abelhas foram consideradas, pelo Earthwatch Institute em uma reunião da Royal Geographical Society de Londres, no ano de 2008, os seres vivos mais importantes do planeta Terra (ASOREY, 2019), sobretudo, por se destacarem como eficientes polinizadoras devido as suas características biológicas e comportamentais (WOLFF, 2017), mas também pela sua estreita relação de mutualismo com as plantas (PINHEIRO et al., 2014).

As plantas além de servirem como fonte de alimento proteico e energético, como o pólen e o néctar, respectivamente, também disponibilizam de recursos florais, como a resina, para construção de células de cria e ninho, contribuindo para a sobrevivência da colônia de maneira geral; e como via de troca, as abelhas operárias campeiras ao forragear as plantas em busca destes alimentos e/ou recursos florais, se tornam visitantes frequentes de uma determinada espécie de planta com flor, promovendo, principalmente, a reprodução cruzada das mesmas (PINHEIRO et al., 2014; FREITAS e SILVA, 2015; WIESE, 2020).

A maioria das espécies vegetais que produz flores (cerca de 87%) necessita do processo de polinização, sendo os insetos importantes polinizadores bióticos da flora do planeta (FREITAS e SILVA, 2015; BOMFIM et al., 2017). Dentro desse contexto, de acordo com Freitas e Silva (2015), as abelhas prestam serviços ecossistêmicos a partir da polinização de mais de 50% das plantas das florestas tropicais, mais de 80% do Cerrado brasileiro e 73% das plantas cultivadas, tornando as abelhas importantes agentes ecológicos e econômicos, tanto para ecossistemas naturais quanto para a agricultura (BOMFIM et al., 2017). Essa atuação das abelhas nos ecossistemas naturais auxilia na reprodução, manutenção da variabilidade genética e perpetuação das espécies vegetais, enquanto que nas regiões agrícolas ela provoca ganhos na produção, como aumentar o número de vagens ou frutos vingados e a quantidade de grãos por

vagem, e também interfere na qualidade de frutos e sementes, como na sua massa, formato e tamanho; aumentando assim a produtividade, lucratividade e rentabilidade do produtor (FREITAS e SILVA, 2015; BOMFIM et al., 2017; WIESE, 2020).

Embora existam algumas culturas que são independentes da polinização, outras, são dependentes de polinizadores ou beneficiadas por eles e contribuem com 35% do volume de produção mundial de alimentos, os quais são utilizados em larga escala pela sociedade humana (IPBES, 2016; BOMFIM et al., 2017; BPBES, 2019; COLMEIA VIVA, 2020). Globalmente, a contribuição anual dos polinizadores para as principais culturas diretamente ligadas a estes agentes é de US\$ 212 bilhões (BOMFIM et al., 2017), e de acordo com a Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecosistêmicos (BPBES) (2019), no Brasil, os serviços ecosistêmicos de polinização para produção de alimentos são estimados em R\$ 43 bilhões por ano. No entanto, quando se trata das áreas naturais e da biodiversidade esse valor não é estimado, visto que os serviços ecosistêmicos de polinização estão na base da cadeia alimentar (BOMFIM et al., 2017).

Além de contribuir para a manutenção e a preservação dos ecossistemas, a cadeia produtiva da apicultura é uma atividade agropecuária capaz de causar impactos positivos tanto sociais quanto econômicos, proporcionando geração de emprego, fluxo de renda e diversos produtos de interesse econômico e alimentício à humanidade, principalmente no ambiente da agricultura familiar (PEREIRA, 2003; BOMFIM et al., 2017). Os meios de subsistência baseados na apicultura são uma âncora para muitas economias rurais, pois a atividade consegue ser realizada com um investimento mínimo, diversas formas de propriedade apoiam o acesso, o tempo e a localização são flexíveis, além disso, diversos produtos podem ser vendidos e a nutrição familiar e os benefícios medicinais podem ser derivados dela; e existem inúmeras ligações com instituições culturais e sociais (IPBES, 2016).

Segundo dados do relatório divulgado pela Plataforma Intergovernamental de Serviços Ecosistêmicos e Biodiversidade (IPBES) (2016), mundialmente, 81 milhões de colmeias produzem por ano 65.000 toneladas de cera de abelha e 1,6 milhão de toneladas de mel, das quais aproximadamente 518.000 toneladas são comercializadas. Para a sociedade, os polinizadores são uma fonte de múltiplos benefícios além do fornecimento de alimentos, contribuindo diretamente para medicamentos, biocombustíveis, fibras, materiais de construção, instrumentos musicais, artes e ofícios e como fontes de inspiração para arte, música, literatura, religião e tecnologia.

A espécie *Apis mellifera*, por possuir um perfil generalista na busca de recursos alimentares, percorrendo em média três quilômetros (BOMFIM et al., 2017), está sujeita a

alcançar plantações de culturas que utilizam agrotóxicos, e se contaminar a partir do contato ou ingestão dessas substâncias que podem ser prejudiciais a elas, trazendo consequências individuais e quanto colônia também. A redução nas populações de abelhas ou até mesmo a morte delas pela contaminação por agrotóxicos impede a produção de mel e derivados (CARNEIRO et al., 2015), e afeta a polinização, provocando sérios prejuízos econômicos da atividade, pois para a maioria das espécies de plantas, sem esses agentes polinizadores não seria possível produzir sementes, grãos, amêndoas, castanhas, frutas, vagens, folhagens, raízes, óleos vegetais, essências, corantes naturais, dentre outros (BOMFIM et al., 2017). Além disso, é importante considerar que estes insetos ajudam a manter a variação de espécies de plantas (CARNEIRO et al., 2015) e a redução ou até mesmo a extinção das espécies afetam a biomassa geral do ecossistema (SÁNCHEZ-BAYO e WYCKHUYS, 2019), uma vez que as abelhas são constituintes da base da cadeia alimentar que mantêm o equilíbrio (FREITAS e SILVA, 2015).

1.2 Agrotóxicos

Os agrotóxicos, segundo a Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (art. 2º, inciso I), são produtos químicos, físicos ou biológicos utilizados para controlar seres vivos considerados danosos a flora e a fauna (BRASIL, 1989). Além dessa terminologia, também pode ser conhecido como pesticidas, praguicidas, defensivos agrícolas, agroquímicos ou produtos fitossanitários; no entanto, a legislação brasileira utiliza o termo agrotóxico como padrão (SCHIESARI, 2012). Estes, são divididos pela classe de uso considerando o seu alvo, sendo os herbicidas utilizados para controlar plantas daninhas, inseticidas para controlar insetos-praga, fungicidas para fungos, bactericidas para bactérias, acaricidas para ácaros, dentre outros (SCHIESARI, 2012; INCA, 2021).

De acordo com o Art. 39 da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, os agrotóxicos são classificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em função da sua toxicidade aguda, em: Categoria I, produto extremamente tóxico (faixa vermelha); Categoria II, produto altamente tóxico (faixa vermelha); Categoria III, produto moderadamente tóxico (faixa amarela); Categoria IV, produto pouco tóxico (faixa azul); Categoria V, produto improvável de causar dano agudo (faixa azul); e Não Classificado, produto não classificado (faixa verde) (BRASIL, 2019).

Os agrotóxicos também possuem uma classificação baseada no seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), que é de responsabilidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), segundo disposições da Portaria 84,

de 15 de outubro de 1996, em: Classe I, produto altamente perigoso; Classe II, produto muito perigoso; Classe III, produto perigoso; e Classe IV produto pouco perigoso (IBAMA, 1996). Todavia, o Projeto de Lei 6299/02 (Pacote do Veneno) que flexibiliza ainda mais o uso de agrotóxicos no país está em tramitação no Senado Federal para revogar a lei atual sobre agrotóxicos (Lei 7.802/89), já tendo sido aprovado pela Câmara dos Deputados; o projeto prevê, entre outros pontos, centralizar ao Ministério da Agricultura (MAPA) as tarefas de fiscalização e análise dos pesticidas, desautorizando da Anvisa e Ibama (PIOVESAN, 2022).

Em um contexto mundial, no ano de 2019 o Brasil se destacou como terceiro maior usuário de agrotóxicos, sendo a China líder desse ranking, seguida dos Estados Unidos da América (FAO, 2019). Conforme boletim do IBAMA (2020), a quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil vem aumentando desde o ano de 2009, passando de 306.785,10 toneladas para 686.349,87 toneladas em 2020, o que representa um aumento de aproximadamente 223,72%. Dentre as classes de uso os herbicidas são considerados os principais agrotóxicos comercializados nacionalmente, ocupando 60,29% (413.833,41 ton.) do total de agrotóxicos, seguido dos fungicidas (15,82%) e inseticidas (11,76%) (IBAMA, 2020). Outros dados do Instituto demonstram que o glifosato e seus sais lideram a lista dos dez ingredientes ativos mais comercializados no país no ano de 2020, com 246.017,51 toneladas, correspondendo a aproximadamente 35% do consumo total de agrotóxicos no Brasil.

É inegável que o auxílio de tecnologias em campo, incluindo os agrotóxicos, tem proporcionado aumento da produtividade agrícola, tornando o país reconhecido mundialmente pelas suas grandes safras (MORAES, 2019). Entretanto, segundo Carneiro et al. (2015), este aumento é decorrente da expansão de culturas, crescente resistência de plantas daninhas, fungos e insetos, e aumento de doenças nas lavouras, o que demanda a aplicação crescente e constante destes agrotóxicos, principalmente de herbicidas, como o glifosato.

O emprego de agrotóxicos acarreta na contaminação de diferentes compartimentos ambientais por tempos variados; no ar, por exemplo, tal contaminação é decorrente dos mecanismos de aplicação na pulverização em forma de aerossóis, podendo ser carregado com maior intensidade pelos ventos quando pulverizado por aviões. Já no solo, pode decorrer do descarte inadequado e/ou derramamento do produto, que por lixiviação podem alcançar o lençol freático, e por condução das águas de chuva podem atingir as águas subterrâneas, resultando em alterações na fauna, flora e desequilíbrio ecológico, trazendo maiores problemas à própria agricultura a partir da proliferação de pragas e doenças e impactos diretos na manutenção de todos os polinizadores, inclusive as abelhas (AUGUSTO et al., 2015).

De acordo com o Manual do IBAMA, redigido por Cham et al. (2020), a capacidade de uma substância ou produto em causar efeitos prejudiciais em determinado organismo refere-se à toxicidade, e um dos parâmetros utilizados para mensurá-la, realizado por meio de testes ecotoxicológicos com espécies de interesse, é a determinação da Dose Letal (DL_{50}), que representa a quantidade estimada de um ingrediente ativo (I.A) que está associada com a mortalidade de 50% da população testada, a partir da ingestão ou do contato com o produto, em um período de no máximo 96h.

Baseada na toxicidade dos agrotóxicos, a exposição das abelhas pode ser aguda ou crônica, sendo que para os testes agudos, as abelhas são submetidas a uma dose superior ou igual a DL_{50} com o intuito de avaliar o efeito de uma única exposição do agente estressor em um curto espaço de tempo (CHAM et al., 2020). Por outro lado, para investigar os efeitos crônicos, as abelhas são expostas repetidamente a níveis subletais do estressor (doses inferiores a DL_{50}) em um período maior de vida do organismo ou em estágios de vida mais críticos, como na fase larval (CHAM et al., 2020). Neste caso, segundos estes autores, é avaliado a maior dose na qual não se observou nenhum efeito, ou a menor na qual foi possível observar algum efeito.

As abelhas campeiras ao saírem para forragear, entram em contato com praticamente todas os compartimentos do meio ambiente (água, solo, ar, vegetação) ficando expostas a riscos ambientais que podem causar efeitos adversos resultantes da ação de um agente estressor (LIMA e ROCHA, 2012; CHAM et al., 2020). Assim sendo, os recursos essenciais para a manutenção das abelhas e construção das colônias são contaminados pelo uso de agrotóxicos, dos quais o néctar e o pólen são alimentos coletados para suprir as exigências da colônia e garantir o armazenamento destes para períodos de escassez de floradas (LIMA e ROCHA, 2012).

Em campo, existem dois cenários de exposição das abelhas aos agrotóxicos: a área tratada (*in crop*), onde é realizado o plantio de culturas de interesse com aplicação de agrotóxicos, e fora da área tratada (*off crop*), a qual não faz parte do cultivo, mas por estar localizada na área adjacente pode ser atingida pela aplicação do produto na área tratada (CHAM et al., 2020). Em tais cenários, as abelhas ficam susceptíveis a intoxicação pelos agrotóxicos por diferentes vias, sendo que as principais são por contato direto, indireto e ingestão (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014; CHAM et al., 2020).

Nas áreas agrícolas (*in crop*), as campeiras podem se contaminar diretamente pelo contato com as partículas suspensas provenientes da pulverização dos agrotóxicos; pelo contato com resíduos encontrados nas superfícies que foram atingidas pela deposição do produto, como folhas, resinas, pólen, solo e exsudatos; pela ingestão de néctar, pólen e água contaminados a partir da deposição do produto aplicado por pulverização ou pela translocação do produto

aplicado nas sementes, no tronco ou no solo; e ainda pela inalação de gotículas dos agrotóxicos (LIMA e ROCHA, 2012; CHAM et al., 2020). Segundo Lima e Rocha (2012), os agrotóxicos sistêmicos quando aplicados são absorvidos pelo tecido vegetal, incluindo o que compõe o grão de pólen, tornando real a provável contaminação do néctar e pólen.

Já fora da área tratada (*off crop*), a contaminação durante o forrageamento acontece diretamente pelo contato com a deriva da pulverização e/ou da poeira originária da semeadura de sementes tratadas; essa deriva pode atingir superfícies nas quais as abelhas podem entrar em contato com os produtos, assim como podem ingerir o néctar e o pólen contaminados por essa mesma via de deposição, e ainda, estar expostas pela translocação de resíduos do produto que foi aplicado no solo (CHAM et al., 2020).

Diferentemente das abelhas que realizam o forrageamento, as que ficam na colônia desempenhando outras funções podem se intoxicar cronicamente por meio de recursos vegetais trazidos e estocados na colônia que contém doses subletais de diferentes agrotóxicos (CHAM et al., 2020). De acordo com Lima e Rocha (2012), vários agrotóxicos são absorvidos pelos lipídios dos grãos de pólen e sua toxicidade pode permanecer por tempo prolongado no alimento, resultando na contaminação das abelhas coletoras e na introdução do recurso contaminado na colônia, afetando as larvas ao longo do processo de alimentação pelas abelhas nutrizas.

1.3 Características gerais do herbicida glifosato

O glifosato é um ácido orgânico fraco pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, que consiste em três grupos funcionais, um fosfonato, um amino e um carboxilato, tendo como nome químico “N-(phosphonomethyl)glycine”, cuja fórmula molecular é $C_3H_8NO_5P$ e sua fórmula estrutural é demonstrada na Figura 2 (EL-SEBAE et al., 1994; LIMA et al., 2019; ANVISA, 2021).

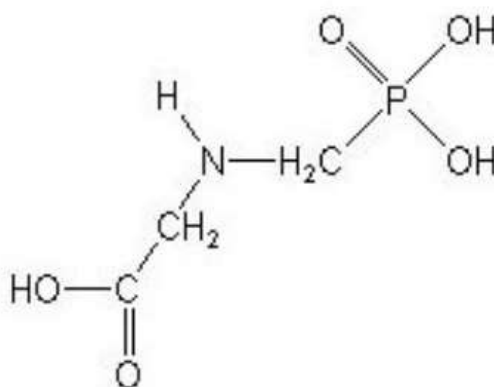


Figura 2. Fórmula estrutural do herbicida Glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine]. Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Esse ingrediente ativo é um potente herbicida inibidor-enzimático (TONI et al., 2006) utilizado para controle de plantas daninhas em diversos ambientes, tanto agrícolas (uso em plantas infestantes de culturas) quanto não agrícolas (aplicação em margens de rodovias e ferrovias, pátios industriais, etc.) e também como domissanitário (jardinagem amadora) (ANVISA, 2021). É classificado como não-seletivo e de amplo espectro, o que possibilita um controle tanto de monocotiledôneas como de dicotiledôneas, apresenta ação sistêmica na planta, sendo translocado principalmente via floema para os tecidos meristemáticos e, além disso, é usado em pós-emergência das plantas infestantes e como dessecante (CARVALHO, 2013), onde sua aplicação é feita geralmente por meio da pulverização, sendo absorvido pelas regiões clorofiladas (folhas e tecidos verdes), principalmente pelas folhas, a partir das quais se espalha por toda a planta (KRUSE et al., 2000), cuja eficiência depende da retenção da molécula na superfície foliar, da penetração foliar, da translocação na planta até o sítio de ação e da inibição da enzima-alvo (KIRKWOOD e MCKAY, 1994).

O mecanismo de ação do glifosato na planta (Figura 3), bem como em fungos e a maioria das bactérias, se dá por inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) por competição pelo substrato fosfoenolpiruvato (PEP), os quais participam da via de metabolização do ácido shiquímico (KRUSE et al., 2000; ROMAN et al., 2005; BATTISTI et al., 2021). Esta, quando não ativada interfere na síntese de corismato e no controle da entrada de carbono na via shiquimato (GEIGER e FUCHS, 2002) ocasionando um bloqueio na biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, triptofano e tirosina) (AMARANTE JUNIOR et al., 2002) que produzem a maior parte da massa seca da planta (GEIGER e FUCHS, 2002) e influenciam diretamente na síntese proteica e produção de

compostos secundários que atuam como precursores (YAMADA e CASTRO, 2007). Eventos relacionados com a desregulação da rota do ácido shiquímico prejudicam a formação dos tecidos da planta, resultando em parada do crescimento, disfunção celular e consequentemente morte lenta da mesma (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; GEIGER e FUCHS, 2002; YAMADA e CASTRO, 2007).

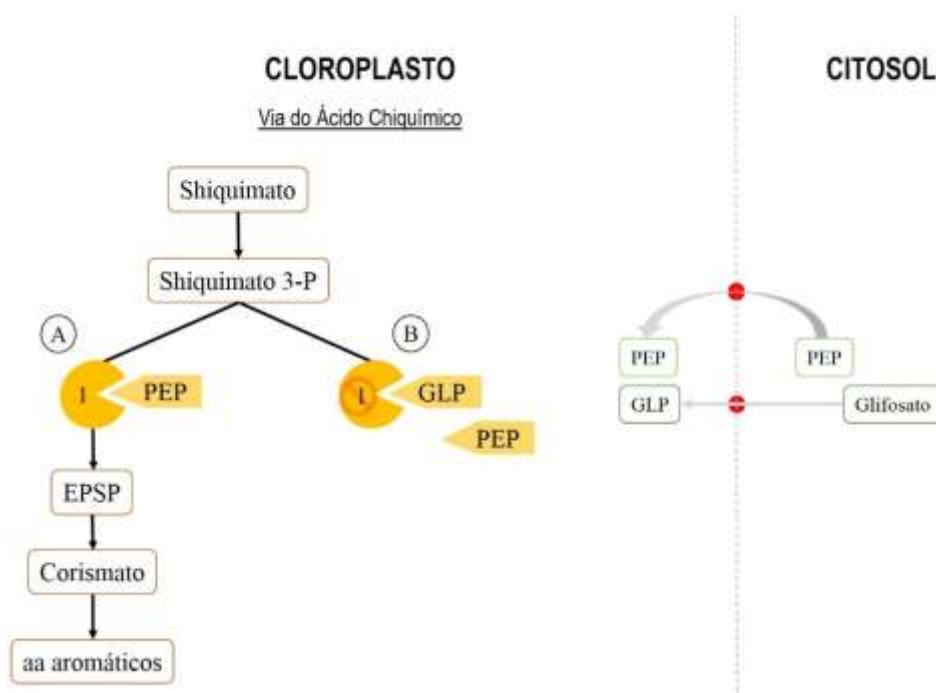


Figura 3. Representação do mecanismo de ação do glifosato na planta por meio da rota do ácido chiquímico. (A) Via do ácido chiquímico com suas respectivas reações químicas sem a atuação do glifosato, com a formação de aminoácidos aromáticos (aa aromático); (B) Via do ácido chiquímico com a atuação do glifosato impedindo ação da enzima EPSPs por competição com o PEP (fosfoenolpiruvato); (1) enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs). Fonte: Adaptado de Geiger e Fuchs, 2002; Roman et al., 2005.

Segundo a AGROFIT (2021), existem diversos produtos autorizados para comercialização com diversas formulações contendo o glifosato, os quais possuem uma ampla utilização agrícola em variadas culturas, sendo 73 culturas autorizadas pela ANVISA (2021).

Quando o glifosato é pulverizado, parte do produto é absorvido diretamente e fica na planta-alvo, e parte é conduzido para o solo (GALLI e MONTEZUMA, 2005), onde pode sofrer os processos de degradação e/ou adsorção (MORAES e ROSSI, 2010), podendo ainda ser mineralizado, imobilizado ou lixiviado; no entanto, não sofre volatilização considerável por possuir baixa pressão de vapor (BAI e OGBOURNE, 2016).

A rota de degradação do glifosato no solo é realizada predominantemente pela flora microbiana por processos aeróbicos e anaeróbicos, sendo a mineralização considerada o mecanismo primário desta degradação, tendo o produto utilizado como fonte de energia e fósforo para os microrganismos a partir de duas rotas catabólicas, resultando na produção do ácido aminometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito, sob ação das bactérias *Anthrobacter atrocyaneus* e *Flavobacterium* sp. e do próprio metabolismo da planta; sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase) (a sarcosina entra no metabolismo destes microorganismos e de outros, degradando-se); entre outros compostos (KRUSE et al., 2000; AMARANTE JUNIOR et al., 2002; GALLI e MONTEZUMA, 2005; BÖHM e ROMBALDI, 2010; BAI e OGBOURNE, 2016).

A disponibilidade de carbono orgânico (C) lábil no solo influencia as atividades microbianas, mas nem sempre o aumento deste pode estimular a ação dos microrganismos e de mineralização devido a sorção do glifosato ser aumentada pela matéria orgânica do solo. Para o meio ambiente, o aumento da adsorção do glifosato ao C orgânico é interessante, pois retarda a lixiviação e permite a liberação e degradação gradual no solo, porém a aplicação frequente do herbicida pode saturar o sistema orgânico de C (BAI e OGBOURNE, 2016).

Carvalho (2013) afirma que o glifosato no solo se encontra na forma aniônica, com tendência a ficar na fase líquida e ser absorvido pelas plantas ou ser lixiviado; porém seu coeficiente de adsorção é tão alto que quando entra em contato com o solo é rapidamente e fortemente adsorvido, não sendo absorvido pelas raízes nem lixiviado. No entanto, a alta adsorção é dependente do baixo pH e concentração de fosfato, alta matéria orgânica e teor de argila, e altas concentrações de Al e Fe no solo (PRATA et al., 2000; BAI e OGBOURNE, 2016). Por outro lado, estes autores descrevem que caso estas características do solo estejam de maneira opostas, há uma diminuição na capacidade de adsorção causando como consequência o aumento da lixiviação.

Devido a essas possibilidades, a permanência do glifosato no ambiente (meia-vida) pode variar dias ou meses, a depender das propriedades do solo e condições ambientais variáveis (BAI e OGBOURNE, 2016). A partir de uma revisão realizada por estes autores, onde foram compilados trabalhos com diferentes tipos de solo e coeficientes de adsorção, o tempo de semi-vida do glifosato e do seu principal metabólito (AMPA) encontrados pode ser duradouro, variando entre 0,8-151 e 10-98 dias, respectivamente. Já, segundo Galli e Montezuma (2005), afirmam que a meia-vida média (tempo médio necessário para que a metade da quantidade aplicada do produto seja degradada) é de 32 dias.

De acordo com a ANVISA (2021), o glifosato é classificado como pouco tóxico (Categoria IV) à saúde humana na modalidade de jardinagem amadora e para as demais não apresenta classificação. Apesar disso, a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) classificou o mesmo como provável carcinogênico para humanos (Grupo 2A), como também, concluiu que há fortes evidências de genotoxicidade. Recentemente, segundo a Nota Técnica N° 12 emitida pela ANVISA (2020) sobre a reavaliação do herbicida glifosato, este ingrediente ativo não apresenta características mutagênicas (mutações no DNA), teratogênicas (embriões ou fetos) e carcinogênicas (cancerígeno), não é desregulador endócrino (não afeta o sistema hormonal) e não é tóxico para a reprodução, o que demonstra divergência entre as avaliações. Em relação ao potencial de periculosidade ambiental, o glifosato é considerado um produto perigoso ao meio ambiente (Classe III) (AGROFIT, 2021).

1.3.1 Efeitos do glifosato em abelhas

Embora os agrotóxicos produzidos sejam projetados para permitir ações cada vez mais específicas contra determinados tipos de organismos, ainda podem afetar indiscriminadamente outros indivíduos de diferentes táxons, levando principalmente a efeitos subletais e de longo prazo. Cox (1995) afirma que embora não seja esperado para um herbicida, a exposição de animais ao glifosato, incluindo insetos benéficos, pássaros, peixes e minhocas, causa danos e até mesmo a redução de suas populações mesmo em baixas concentrações.

Além disso, atualmente, outros pesquisadores também têm mostrado por meio de suas publicações, que o uso do glifosato pode afetar organismos não-alvo e causar efeitos negativos, como em peixes (ARMILIATO et al., 2014; PANETTO et al., 2020), crustáceos (AVIGLIANO et al., 2018; CANOSA et al., 2019; PALA, 2019), anfíbios (PAGANELLI et al., 2010; WAGNER et al., 2016), ratos, camundongos (BALI et al., 2019; ROS et al., 2020), e em humanos (GASNIER et al., 2009; THONGPRAKAISANG et al., 2013; CONNOLLY et al., 2020).

Para as abelhas a única problemática encontrada pela utilização de herbicidas estava associada a redução da diversidade floral, as quais poderiam servir como locais para nidificação e fontes de alimentos (pólen e néctar) para as abelhas, fazendo com que as populações desses insetos tivessem prejuízos na sua manutenção (MONQUERO e OLIVEIRA, 2018; GUPTA et al., 2019). No entanto, a partir de estudos já realizados com a espécie de abelhas *Apis mellifera*, evidenciou-se que a exposição das abelhas ao herbicida glifosato pode causar alterações em

aspectos comportamentais, fisiológicos, de desenvolvimento, genéticos e, consequentemente, produtivos (BOILY et al., 2013; HERBERT et al., 2014; BALBUENA et al., 2015; HELMER et al., 2015; JUMARIE et al., 2017; DAI et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2020a; VÁZQUEZ et al., 2020b; MOTTA et al., 2022). Também existem estudos científicos demonstrando efeitos prejudiciais do glifosato na sobrevivência e atividade de voo de abelhas nativas e mamangavas, que levam ao comprometimento do crescimento da colônia, do forrageamento e, por consequência, da polinização (ABDALLA et al., 2016; SEIDE et al., 2018; NOCELLI et al., 2019).

Para agrotóxicos sistêmicos com aplicação foliar, como é o caso do glifosato, o tempo de exposição pode ser maior quando comparado aos agrotóxicos não sistêmicos, aumentando a possibilidade de contaminação das abelhas pelas vias de contato direto, indireto e por ingestão, causando modificações em atributos relacionados ao tamanho da população e estabilidade das colônias devido a uma provável redução da força e sobrevivência, fecundidade da rainha, sucesso do ninho e sobrevivência individual, além de acarretar em alterações comportamentais; a quantidade e qualidade dos produtos da colmeia também são afetados pela redução da produção de mel, cera e própolis; e por fim, a contribuição à biodiversidade de polinizadores fica comprometida em virtude da redução da riqueza e abundância de espécies (CHAM et al., 2020).

Em pesquisas utilizando amostras de mel, cera e pão de abelha, analisados por diferentes técnicas, foram detectados resíduos quanto ao herbicida glifosato (RUBIO et al., 2014; BERG et al., 2018; THOMPSON et al., 2019; EL AGREBI et al., 2020; SOUZA et al., 2020), o que possibilita inferir que os produtos apícolas podem ser usados como bioindicadores para descrever os impactos ambientais resultantes do uso de pesticidas e gerar dados para avaliar os riscos para a saúde humana pelo consumo desses produtos contaminados.

Sendo assim, para entender a influência do herbicida glifosato sobre as abelhas *A. mellifera*, Boily et al., (2013) utilizaram abelhas engaioladas e, em seu estudo, encontraram ligeira diminuição na atividade de acetilcolinesterase (AChE) em resposta ao glifosato. Herbert et al. (2014) realizaram um teste de extensão da probóscide e verificaram que, tanto a presença de concentrações subletais quanto letais de glifosato, afetaram a capacidade de resposta gustativa à sacarose e o desempenho de aprendizado para os grupos expostos a dose realistas de campo, tornando ineficiente a coleta de recursos; apesar disso, não foi encontrado nenhum efeito sobre a atividade locomotora de forrageamento e dança nestas abelhas, sugerindo que o glifosato é levado à colmeia e disseminado entre os indivíduos ali presentes.

No estudo de Helmer et al. (2015), foram avaliados níveis de antioxidantes e peroxidação lipídica, mas não foi observada relação entre eles; no entanto foi encontrado alteração no sistema carotenoide-retinóide das abelhas por doses subletais também realistas em campo, ocasionando diminuição nos níveis de γ -caroteno e no seu derivado all-trans-retinol (at-ROH), podendo influenciar no metabolismo de carotenoides ou retinóides. Também foram observados pequenos decréscimos nos níveis de proteína, e essa depleção pode impactar sua funcionalidade e levar à deterioração do estado físico do organismo. Já em outro estudo, o glifosato misturado com atrazina, cádmio e ferro afetou diferentes etapas na via de metabolização da vitamina A, e a mistura dos herbicidas promoveu a peroxidação de lipídios (aumento de 30 a 40%) nas abelhas contaminadas com doses ambientalmente relevantes (JUMARIE et al., 2017).

Balbuena et al. (2015) verificaram que as abelhas *A. mellifera* alimentadas com solução de xarope contendo 10 mg/L de glifosato passaram mais tempo realizando voos de regresso e indiretos para a colmeia, prejudicando sua capacidade cognitiva necessária para recuperar e integrar informações espaciais para retornar à colmeia com sucesso. Segundo Vázquez et al. (2020a), as habilidades cognitivas estão relacionadas à quantidade e a qualidade do sono das abelhas, por isso, ao avaliarem a exposição das abelhas ao glifosato (50 ng), observaram diminuição na atividade antenal e na frequência do sono.

A sobrevivência de cria exposta cronicamente ao glifosato a 4mg/L e 20 mg/L foi reduzida, bem como o peso das larvas a 0,8 ou 4 mg/L de glifosato, enquanto o glifosato a 20 mg/L afetou as comunidades bacterianas intestinais de abelhas recém-emergidas, alterando sua diversidade e riqueza de espécies, sugerindo que altas concentrações de glifosato são deletérias para abelhas imaturas (DAI et al., 2018). Os resultados do estudo de Vázquez et al. (2018) mostraram que o glifosato é um estressor que afeta o desenvolvimento larval, tardando a muda e reduzindo o peso das mesmas.

Motta et al. (2018), utilizando abelhas operárias, também estudaram a influência do glifosato na microbiota intestinal, e seus resultados demonstraram que esse herbicida afeta a composição da microbiota intestinal benéfica, potencializando problemas à saúde das abelhas, tornando-as mais suscetíveis a estressores ambientais, incluindo má nutrição e patógenos. Blot et al. (2019) observaram alterações na abundância dos principais táxons bacterianos, demonstrando efeitos subletais na microbiota intestinal das abelhas pela exposição ao glifosato. Porém, quando submetidas a esporos do parasita intestinal *Nosema ceranae* não foram observados efeitos significativos a esta infecção parasitária. Motta e Moran (2020) trabalharam com abelhas recém-emergidas (estágio em que adquirem a microbiota) e com operárias com a

microbiota intestinal já estabelecida e puderam verificar que, independente da idade ou período de exposição, as doses subletais de glifosato (0,04 a 1,0 mM) afetaram a microbiota intestinal das abelhas testadas.

Faita et al. (2018), avaliando a exposição de concentrações subletais em abelhas operárias nutrízes, constataram que o herbicida causou alterações na ultraestrutura celular das glândulas hipofaríngeas, levando a uma regressão das glândulas, mas sem alterações na quantidade de geleia real produzida, e degeneração precoce do retículo endoplasmático rugoso (RER) compatível com o envelhecimento. Além disso, alterações morfológicas e estruturais também foram encontradas nas mitocôndrias, podendo fazer com que suas funções bioenergéticas sejam diminuídas e, por consequência, desencadear outros danos celulares relacionados à depleção de ATP, como a apoptose. Nos dados encontrados por Gregorc e Ellis (2011) o glifosato induziu elevada morte celular apoptótica em glândulas salivares, ovários e no intestino médio de larvas de abelhas na concentração de 400 ppm.

Vázquez et al. (2020b), utilizaram larvas de abelhas expostas cronicamente (120h) ao herbicida glifosato e fizeram uma abordagem transcriptômica para avaliar o perfil de expressão gênica destas abelhas testadas, e a partir dos seus resultados, foi possível observar que, embora 29% apresentaram-se assintomáticas, 19 transcritos, ligados principalmente à resposta defensiva e aos processos de metabolismo intermediário, foram diferencialmente expressos. Além disso, as funcionalidades foram ligadas a enzimas com atividade catalítica e redox, sugerindo que houve aumento do catabolismo e metabolismo oxidativo em larvas de abelhas.

1.4 Genética molecular: técnicas de análises de expressão gênica

A biologia molecular é um campo de estudo amplo que abrange áreas da biologia, química, genética e bioquímica, tendo como foco o estudo da estrutura e função do material genético, investigando as interações entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre os ácidos nucleicos – ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) – e síntese proteica (SCHAEFER, 2006). A genética e a engenharia genética dispõem de ferramentas para obtenção, identificação e caracterização de genes, permitindo compreender sua função individualmente em células e organismos (SCHAEFER, 2006; ALBERTS et al., 2017).

A genética molecular se desenvolveu depois que Watson e Crick descreveram a estrutura da molécula de DNA em 1953, apresentando o padrão mais comum de ligação de hidrogênio entre bases nitrogenadas, onde A (adenina) está ligado a T (timina) e G (guanina)

se liga a C (citosina) para formar interações específicas (CHRISTOFF, 2017). De acordo com a autora, a ordem em que esses diferentes nucleotídeos se arranjam na molécula de DNA determina a informação genética que um organismo precisa para funcionar; o RNA também possui a capacidade de armazenar e transmitir informações genéticas, porém o seu único filamento normalmente apresenta a formação de estruturas secundárias. Essa sequência combinada nas moléculas de ácidos nucleicos presentes em um núcleo, uma célula, um organismo ou um grupo de espécies correlatas é um dos principais alvos de estudo da genômica (CHRISTOFF, 2017; GRIFFITHS et al., 2019).

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são formados por nucleotídeos, que são compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um ou mais grupamentos fosfatos; essa estrutura química é importante para a estabilidade das moléculas, pois permite que suas ligações não sejam desfeitas facilmente, no entanto diferem-se pela estrutura da molécula de açúcar, sendo no DNA uma desoxirribose e no RNA uma ribose (CHRISTOFF, 2017). O ácido desoxirribonucleico (DNA) está localizado no interior da célula, todavia, em procariotos está disperso no citoplasma, e em eucariotos no núcleo e em organelas específicas (mitocôndrias e cloroplastos) (NONOHAY e HEPP 2017). Possui uma estrutura complementar e por isso é encontrado nas células em hélice dupla, composto por nucleotídeos com quatro tipos de bases nitrogenadas, duas púricas (adenina – A e guanina – G), e duas pirimídicas (citosina – C e timina – T); já o ácido ribonucleico (RNA) é encontrado em fita simples e uma das bases nitrogenadas pirimídicas que o compõe é a uracila (U), diferentemente do DNA que é a timina (T) (CHRISTOFF, 2017).

Um gene é definido como um segmento de DNA que contém as instruções genéticas para a produção de uma proteína específica (PIMENTA e LIMA, 2015; ALBERTS et al., 2017), já o conjunto de todos os genes (regiões codificadoras de RNA e proteínas), juntamente com sequências intergênicas (regiões não codificadoras), é chamado de genoma (ZAHA et al., 2014; PIMENTA e LIMA, 2015), e este, é a sequência de bases nitrogenadas completa do DNA de um organismo que contém toda informação genética gravada em forma de código (NICHOLAS, 2012; ALBERTS et al., 2017) que determinam as características de uma espécie, bem como as de um indivíduo (PIMENTA e LIMA, 2015), predizendo a natureza das proteínas da célula, e em que momento e lugar elas devem ser produzidas (ALBERTS et al., 2017; GRIFFITHS et al., 2019).

As proteínas são constituídas por aminoácidos e possuem uma variedade de funções no organismo dos seres vivos, estando envolvidas, por exemplo, com a imunidade, transporte de substâncias, aceleração das reações químicas, comunicação celular e outras especificações

(NICHOLAS, 2012; PIMENTA e LIMA, 2015; GRIFFITHS et al., 2019). Toda vez que surge a necessidade de uma proteína específica pela célula, há uma comunicação intracelular entre o núcleo e o ribossomo, onde ocorrem os processos de transcrição e tradução, respectivamente (PIMENTA e LIMA, 2015).

A transcrição é um processo de síntese de um filamento de RNA, denominado RNA mensageiro (RNAm), a partir da cópia da sequência de bases específica do gene codificador da proteína solicitada, contida em uma fita de DNA molde, em uma sequência complementar de bases no RNAm (PIMENTA e LIMA, 2015; GRIFFITHS et al., 2019). O RNAm é composto por uma sequência de três nucleotídeos, chamados de códons, os quais formarão um aminoácido particular e, em conjunto, darão origem a determinada proteína (NICHOLAS, 2012; PIMENTA e LIMA, 2015). No entanto, para isso, o ribossomo, que é a organela responsável pela produção de proteína, precisa realizar uma leitura da informação contida no RNAm e traduzir a sequência de bases do filamento de RNAm em aminoácidos que compõe a proteína, tal processo é denominado de tradução (PIMENTA e LIMA, 2015; GRIFFITHS et al., 2019).

De acordo com Nicholas (2012), no momento em que um tecido está em produção de polipeptídeos (junção de aminoácidos) possui quantidades relativamente altas de RNA mensageiro maduro (RNAm) específicas para esses polipeptídeos. As técnicas de biologia molecular realizam vários procedimentos usando ácidos nucleicos de amostras biológicas - DNA ou RNA - como matérias-primas, e para uma análise molecular eficiente, é necessário separá-los de outros componentes celulares usando técnicas de extração de DNA ou RNA (NONOHAY e HEPP, 2017) e reproduzi-los em quantidades adequadas para estudo (GRIFFITHS et al., 2019). Diante disso, se o RNAm é extraído desse tecido e nucleotídeos e transcriptase reversa são adicionados ao RNAm, uma fita de DNA complementar (cDNA) pode ser sintetizada, e então, adicionando mais nucleotídeos e a enzima DNA polimerase, o cDNA de fita simples pode ser copiado em cDNA de fita dupla; dessa forma, este cDNA corresponde a expressão gênica, isto é, aos genes que estavam ativos no tecido quando o RNAm foi extraído (NICHOLAS, 2012).

Com o intuito de compreender diferentes processos biológicos, celulares e fisiológicos, a análise da expressão gênica tem sido utilizada em diversas espécies sob condições experimentais específicas (MORGANTE e BLAWID, 2016). Ao longo da evolução tecnológica, tecnologias como qRT-PCR, Microarray e Transcriptoma (RNA-Seq), estão entre as diferentes técnicas existentes para analisar a expressão dos genes (MORGANTE e BLAWID, 2016), inclusive sendo aplicadas em pesquisas semelhantes a temática deste trabalho.

A técnica qRT-PCR ou PCR quantitativa em tempo real, consiste em realizar a amplificação da amostra, determinada por dois *primers* conhecidos, e quantificação do número de moléculas produzidas a cada ciclo em uma única etapa, a partir da detecção de sinais fluorescentes (PIMENTA e LIMA, 2015; MORGANTE e BLAWID, 2016; NONOHAY e HEPP, 2017). No trabalho realizado por Gregorc et al. (2012), as análises de alterações de expressão gênica em larvas de abelhas *Apis mellifera* expostas a nove pesticidas, dentre eles o glifosato, e/ou desafiadas com o ácaro *Varroa destructor*, foram medidas por PCR quantitativo (qPCR), utilizando *primers* determinados para patógenos e genes específicos envolvidos em processos fisiológicos, saúde das abelhas, imunidade e/ou desintoxicação de xenobióticos; e assim, foram demonstrados em seus resultados que houve impactos definitivos de pesticidas e parasitismo *Varroa* na expressão gênica larval de abelhas.

A técnica de Microarray ou Microarranjos possibilita obter informações simultaneamente de um grande número de genes (NICHOLAS, 2012), podendo conter até 100.000 fragmentos de DNA conhecidos e marcados com corantes fluorescentes (sondas) (PIMENTA e LIMA, 2015). Essa sonda consiste em cDNA ou em segmentos sintetizados de interesse, chamados de oligonucleotídeos, e a ligação dessas sondas marcadas a um arranjo acontece mediante o processo de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos; estes arranjos representam a maioria ou todas as sequências codificadoras conhecidas, portanto, estimando as quantidades relativas da fluorescência emitida por cada “pingo” (ou ponto), o grau de ativação de cada um dos genes representados no arranjo pode ser medido automaticamente no tecido infectado (NICHOLAS, 2012; PIMENTA e LIMA, 2015).

Trabalhos que avaliaram a influência da exposição de pesticidas nos níveis de expressão gênica em abelhas, fizeram uso da tecnologia de microarray visando diferentes genes; Schmehl et al. (2014) utilizando o genoma inteiro de *A. mellifera*, obtiveram resultados relacionados a alteração da expressão de genes de desintoxicação, comportamento, imunidade e nutrição; Smet et al. (2017) utilizaram genes relacionados à imunidade e desintoxicação para determinar mudanças na expressão gênica relacionadas ao estresse e destacaram diferentes efeitos na resposta das abelhas.

Atualmente, os genomas da maioria dos organismos foram descritos por técnicas moleculares, como o sequenciamento de genes (PIMENTA e LIMA, 2015). Entre as diversas técnicas de sequenciamento em larga escala que surgiram, os *Next Generation Sequencing* (NGS) ou sequenciamento de próxima geração, caracterizam-se pela sua alta capacidade em gerar dados em uma única corrida do equipamento quando comparado à sequenciamento de

primeira geração, economizando tempo e custo por base (PIMENTA e LIMA, 2015; CHRISTOFF, 2017).

O método conhecido como sequenciamento por síntese da *Illumina*, usado nesse trabalho, consiste em um fluxo de trabalho dividido em quatro etapas, que compreende a formação de uma biblioteca a partir da fragmentação do DNA em tamanhos iguais e compatíveis com a tecnologia, com adição de adaptadores e marcadores; a amplificação (cópia) em ponte desses fragmentos e formação de *clusters*; sequenciamento (leitura) da ordem dos nucleotídeos a partir da emissão de uma fluorescência de cada *cluster*; e a análise dos dados gerados; as etapas de clusterização (amplificação) e sequenciamento são realizadas no instrumento (ALBERTS et al., 2017; CHRISTOFF, 2017; ILLUMINA, 2021).

O RNA-Seq é caracterizado pela capacidade de obter informações de todos os genes contidos no RNA originalmente extraído de amostras de determinado organismo ou tecido específico, desenvolvido para analisar, mapear e quantificar o perfil de transcriptomas, sendo também um importante instrumento na identificação de novas espécies de RNA (HRDLICKOVA et al., 2017). O transcriptoma é o conjunto completo de genes transcritos e expressos em uma célula sujeita a determinada condição (WANG et al., 2009). Sua análise possibilita determinar quais tipos, quando e onde cada gene é expresso em determinado tecido do organismo e, também, quantificar essa expressão (SANGI e BIANCHETTI, 2017; GRIFFITHS et al., 2019). Segundo Wang et al. (2009), esse estudo torna-se importante para interpretação dos elementos funcionais do genoma e revelação dos constituintes moleculares das células e tecidos. Na pesquisa de Zhao et al. (2020), as abelhas utilizadas foram submetidas a contaminação por glifosato comercial e para as análises de expressão gênica fizeram uso do RNA-Seq, encontrando efeitos adversos na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, digestivo, nervoso, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, crescimento e desenvolvimento de ambas espécies de abelha alvo do estudo.

Esses avanços tecnológicos em biologia molecular e sequenciamento em larga escala permitem extensas análises genômicas e transcriptômicas, mesmo em organismos sem informação genética prévia, auxiliando no entendimento de genes importantes para rotas metabólicas e vias fisiológicas (CHRISTOFF, 2017). As análises de dados genéticos, bioquímicos e de biologia molecular são realizadas por meio de ferramentas computacionais denominada bioinformática, cujo objetivo principal é revelar a vasta quantidade de dados obtidos por meio de sequências de DNA, envolvendo múltiplas linhas de conhecimento como a ciência da computação, engenharia de softwares, matemática, estatística e biologia molecular (PROSDOCIMI, 2007).

2. Objetivos Gerais

Objetivou-se com o presente estudo verificar a toxicidade letal e subletal do herbicida glifosato no perfil de expressão gênica por meio da análise do transcriptoma do tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras decorrente da exposição por ingestão ao pesticida, com isso, identificar os genes alterados e analisar sua função.

O presente estudo resultou no capítulo II, artigo intitulado “Glifosato altera o transcriptoma do tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera* africanizadas”, o qual será submetido ao periódico “**Apidologie**”, conforme suas regras de publicação.

Referências

ABDALA, F.C.; COSTA, M.J.; SAMPAIO, G.; CAMARGO, D.A.; PEDROSA, M.; NOGUEIRA, F.L.A. Efeito do cádmio e do glifosato na musculatura de mamangavas. **Ciência Tecnologia e Ambiente**. v.3, n.1, p.66-72, 2016.

AGROFIT. **Relatório Consolidado de Produtos Técnicos**. 2021. [online]. Disponível em: <http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit_cons&produtos_tecnicos_consolidado.rdf&p_nm_marca_comercial=&p_id_registrante_empresa=&p_nr_registro=&p_id_ingrediente_ativo=135&p_id_classe=8&p_tipo_relatorio=CONSOLIDADO&p_id_pessoa_juridica=&p_usuario=AGROFIT_CONS¶mform=no> Acesso em: 16 de dez. de 2021.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula**. 6ª edição. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2017.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **NOTA TÉCNICA Nº 12/2020/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**. 2020. [online]. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/Nota+T%C3%A9cnica+Final+-+Reavalia%C3%A7%C3%A3o+do+Glifosato.pdf/9f513821-c4e5-4be3-a538-ef1947034272>>. Acesso em: 28 de jan. de 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico: G01 – Glifosato**. 2021. [online]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4378json-file-1>>. Acesso em: 16 de jan. de 2022.

ARMILIATO, N.; AMMAR, D.; NEZZI, L.; STRALIOTTO, M.; MULLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v.77, n.7, p.405-414, 2014.

ASOREY, X. As abellas: máis que mel. In: CERNA: Revista galega de ecoloxía e medio ambiente, **Emerxencia climática**. Santiago de Compostela: ADEGA. n. 81, p. 17-18, 2019.

ASSAD, A.L.D.; BASSO, E.C.; GIOVANNI, R.; SOUZA, S.; CANHOS, D.A.L.; ALEIXO, K.P. GeoApis – Plataforma de informação sobre apicultura e meio ambiente. In: OLIVEIRA JUNIOR, J.M.B.; CALVÃO, L.B. (org). **A arte de criar abelhas**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora. p.68-78, 2019.

AUGUSTO, L.G.S.; CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.A.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N.M.X.; BÚRIGO, A.C.; FREITAS, V.M.T. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: CARNEIRO, F.F.; RIGOTTO, R.Q.; AUGUSTO, L.G.S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. (org). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

AVIGLIANO, L.; CANOSA, I.S.; MEDESANI, D.A.; RODRÍGUEZ, E.M. Effects of glyphosate on somatic and ovarian growth in the estuarine crab *Neohelice granulata*, during the pre-reproductive period. **Water, Air, & Soil Pollution**. v.229, n.2, p.1-9, 2018.

BAI, S.H.; OGBOURNE, S.M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**. v.23, n.19, p.18988-19001, 2016.

BALBUENA, M.S.; TISON, L.; HAHN, M.L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Effects of sub-lethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of Experimental Biology**. v.218, n.17, p.2799-2805, 2015.

BALI, Y.A.; KAIKAI, N-E.; BA-M'HAMED, S.; BENNIS, M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. **Toxicology**. v.415, p.18-25, 2019.

BATTISTI, L.; POTRICH, M.; SAMPAIO, A.R.; GHISI, N.C.; COSTA-MAIA, F.M.; ABATI, R.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. **Science of the Total Environment**. v.767, p.145397, 2021.

BERG, C.J.; KING, H.P.; DELENSTARR, G.; KUMAR, R.; RUBIO, F.; GLAZE, T. Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. **PLoS ONE**. v.13, n.7, p.e0198876, 2018.

BLOT, N.; VEILLAT, L.; ROUZÉ, R.; DELATTE, H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PLoS ONE**: v.14, n.4, e0215466, 2019.

BÖHM, G.M.B.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS: v.40, p.213-221, 2010.

BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**. v.20, n.8, p.5603-5614, 2013.

BOMFIM, I.G.A.; OLIVEIRA, M.O.; FREITAS, B.M. **Introdução a apicultura**. Fundação Universidade Estadual do Ceará – UECE. MedioTec. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/320907834_Introducao_a_apicultura>. Acesso em: 02 de mar. de 2022.

BPBES – Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. WOŁOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A.R.; VARASSIN, I.G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L.T.; BUENO, R.O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A.M.; SILVA, C.I. (org). **Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184p., 2019.

BRASIL. **Lei 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e

embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF, 1989. Disponível em: <<https://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/109753/lei-7802-89>>. Acesso em: 27 de jan. de 2022.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 294, de 29 de julho de 2019**. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=31/07/2019&jornal=515&pagina=78>>. Acesso em: 09 de fev. de 2022.

CANOSA, I.S.; ZANITTI, M.; LONNÉ, N.; MEDESANI, D.A.; GRECO, L.S.L.; RODRÍGUEZ, E.M. Imbalances in the male reproductive function of the estuarine crab *Neohelice granulata*, caused by glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.182, p.109405, 2019.

CARNEIRO, F.F.; RIGOTTO, R.Q.; AUGUSTO, L.G.S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. (org). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, L.B. **Herbicidas**. 1ª edição. Lages, SC: Edição do autor, 2013.

CHAM, K.O.; REBELO, R.M.; OLIVEIRA, R.P.; FERRO, A.A.; SILVA, F.E.C.V.; BORGES, L.O.; SARETTO, C.O.S.D.; TONELLI, C.A.M.; MACEDO, T.C. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília, DF: IBAMA/DIQUA, 114p., 2020.

CHRISTOFF, A.P. Genômica e sequenciamento de nova geração. In: TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. (orgs). **Marcadores moleculares na Era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p.21-50, 2017.

COLMEIA VIVA. **Manual de Boas Práticas**. Versão 4. 2020. [online]. Disponível em: <https://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2021/11/Folder-Manual-de-Boas-Praticas_2018-WEB.pdf> Acesso em: 20 de fev. de 2022.

CONNOLLY, A.; COGGINS, M.A.; KOCH, H.M. Human biomonitoring of glyphosate exposures: State-of-the-art and future research challenges. **Toxics**. v.8, n.3, p.60, 2020.

COX, C. Human exposure and ecological effects. **Journal of Pesticide Reform**. v.15, n.4, 1995.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIU, Y.; DIAO, Q. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.66, p.7786-7793, 2018.

EL AGREBI, N.; TOSI, S.; WILMART, O.; SCIPPO, M-L.; DE GRAAF, D.C.; SAEGERMAN, C. Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-

based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. **Science of The Total Environment**. v.704, p.135312, 2020.

EL-SEBAE, A.H.; EL SHATBY, A.; JANSSEN, E.D.P.; MENSINK, H. Environmental Health Criteria 159 - Glyphosate. **Biodegradation**, v.4, 1994.

FAITA, M.R.; OLIVEIRA, E.M.; VALTER, V.A.; ORTH, A.I.; NODARI, R.O. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. **Chemosphere**. v.211, p.566-572, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Pesticides Use**. 2019. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>>. Acesso: 24 de jan. de 2022.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EPU/EDUSP. v. 13, 79 p., 1980.

FREITAS, B.M.; SILVA, C.I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. In: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas – A.B.E.L.H.A. (org). **Agricultura e Polinizadores**. São Paulo: p.09-18, 2015.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: ACADCOM, 2005.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M-C.; SÉRALINI, G-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**. v.262, n.3, p.184-191, 2009.

GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A. Inhibitors of Aromatic Amino Acid Biosynthesis (Glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (eds). In: **Herbicide Classes in Development: Mode of Action, Targets, Genetic Engineering, Chemistry**. Springer Science & Business Media, 2002.

GREGORC, A.; ELLIS, J.D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide biochemistry and physiology**. v.99, n.2, p.200-207, 2011.

GREGORC, A.; EVANS, J.D.; SCHARF, M.; ELLIS, J.D. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). **Journal of insect physiology**. v.58, n.8, p.1042-1049, 2012.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J. **Introdução à genética**. 11ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Guanabarra Koogan, 2019.

GUPTA, D.; CHAUHAN, H.; GUPTA, S.; GUPTA, R. Effect of Colony Collapse Disorder on Honeybees. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**. v.16, n.10, 2019.

HELMER, S.H.; KERBAOL, A.; ARAS, P.; JUMARIE, C.; BOILY, M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived

antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**. v.22, p.8010–8021, 2015.

HERBERT, L.T.; VÁZQUEZ, D.E.; ARENAS, A.; FARINA, W.M. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of Experimental Biology**. v.217, n.19, p.3457- 3464, 2014.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**. v.8, n.1, p.e1364, 2017.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Some organophosphate insecticides and herbicides**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France: v.112, 2017.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=99498>>. Acesso em: 19 de jan. de 2022.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim 2020**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 19 de jan. de 2022.

ILLUMINA. **NextSeq 500: Guia do sistema**. 2021. [online]. Disponível em: <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/translations/nextseq-500-system-guide-15046563-ptb.pdf>. Acesso em: 15 de dez. de 2021.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Agrotóxico: causas e prevenções**. 2021. [online]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos#:~:text=Considerando%20o%20tipo%20de%20a%C3%A7%C3%A3o,acaricidas%2C%20desfolhantes%2C%20entre%20outros>>. Acesso em: 28 de jan. de 2022.

IPBES - Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. POTTS, S.G; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T. (eds). **The assessment report on pollinators, pollination and food production**. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany: 552 p., 2016.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. **Chemosphere**. v.168, p.163-170, 2017.

KIRKWOOD, R.C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, v.42, p.241-249, 1994.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas Inibidores da EPSPs: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**. Londrina-PR, v.1, n.2, p.139 – 146, 2000.

LIMA, J.D.M.; GOMES, D.S.; LIMA, A.M.; FRAZÃO, N.F.; SARMENTO, R.G. Caracterização teórica da molécula de glifosato. **Educação Ciência e Saúde**. v.6, n.2, p.1-14, 2019.

LIMA, M.C.; ROCHA, S.A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: Ibama, 2012.

MONQUERO, P.A.; OLIVEIRA, A.S. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas? **Revista Brasileira de Herbicidas**. v.17, n.1, p.95-105, 2018.

MORAES, P.V.D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**. v.9, n.3, p.22-35, 2010.

MORAES, R.F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, Brasília, DF, 2019.

MORGANTE, C.V.; BLAWID, R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. Petrolina, PE: **Embrapa Semiárido- Documentos (INFOTECA-E)**, 2016.

MOTTA, E.V.S.; RAYMANN, K.; MORAN, N.A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **PNAS**. v.115, n.41, p.10305-10310, 2018.

MOTTA, E.V.S.; MORAN, N.A. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. **mSystems**. v.5, n.4, e00268-20, 2020.

MOTTA, E.V.S.; POWELL, J.E.; MORAN, N.A. Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees. **Animal microbiome**: v.4, n.1, p.1-14, 2022.

NICHOLAS, F.W. **Introdução à genética veterinária**. 3ª edição. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012.

NOCELLI, R.C.F.; SOARES, S.M.M.; MONQUERO, P.A. Effects of Herbicides on the Survival of the Brazilian Native Bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta daninha**. Viçosa, v.37, e019220193, 2019.

NONOHAY, J.S.; HEPP, D. CAPÍTULO 1 - Técnicas e análises de biologia molecular. In: BRUNO, A.N. (org). **Biotecnologia II: Aplicações e tecnologias**. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2017.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S.L.; CARRASCO, A.E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chemical research in toxicology**. v.23, n.10, p.1586-1595, 2010.

PALA, A. The effect of a glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase (AChE) activity, oxidative stress, and antioxidant status in freshwater amphipod: *Gammarus pulex* (Crustacean). **Environmental Science and Pollution Research**., v.26, n.36, p.36869-36877, 2019.

PANETTO, O.S.; GOMES, H.F.; GOMES, D.S.F.; CAMPOS, E.; ROMEIRO, N.C.; COSTA, E.P.; CARMO, P.R.L.; FEITOSA, N.M.; MORAES, J. Os efeitos do Roundup® (glifosato [n-(fosfonometil) glicina]) no desenvolvimento embrionário e metabolismo energético do peixe zebra (*Danio rerio*). In: OLIVEIRA, R.J. (org). **Agronomia: jornadas científicas**. Guarujá, SP: Editor Científica Digital, v.2 p.123-135, 2020.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. **Mel e outros produtos**. Sistemas de Produção: Produção de Mel. Embrapa Meio-Norte. 2003. [online] Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckg3dhb02wx5eo0a2ndxy0opz78w.html>. Acesso em: 20 de dez. de 2020.

PIMENTA, C.A.M.; LIMA, J.M. **Genética aplicada à biotecnologia**. 1ª edição. São Paulo, SP: Érica, 112p. 2015.

PINHEIRO, F. Polinização por engodo. In: RECH, A.R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I.C. (org). **Biologia da Polinização**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Projeto Cultural. p.327-341, 2014.

PIOVESAN, E. Câmara aprova projeto que altera regras de registro de agrotóxicos. **Câmara dos Deputados**. Brasília, DF, 09/02/2022. Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/noticias/849479-camara-aprova-projeto-que-altera-regras-de-registro-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 22 de mar. de 2022.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.24, n.4, p.947-951, 2000.

PROSDOCIMI, F. **Curso online: introdução à bioinformática**. 2012. [online]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/334259730_CURSO_ON_LINE_INTRODUCAO_A_BIOINFORMATICA>. Acesso em: 10 de jan. de 2022.

QUEIROGA, C.F.M.A.; LEITE FILHO, F.G.; MACHADO, A.V.; COSTA, R.O. Cadeia Produtiva do Mel de Abelhas: Fonte Alternativa de Geração de Renda para Pequenos Produtores e Qualidade Físico-química do Mel. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. Garanhuns, PE: v.5, n.1, p.24-30, 2015.

ROBINSON, G.E.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; FELDLAUFER, M.F. Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid haemolymph titres in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, v.37, n.12, p.929-935, 1991.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Embrapa. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0#:~:text=COMO%20OS%20HERBICIDAS%20MATAM%20AS%20PLANTAS&text=A%20morte%20das%20plantas%20tratadas,assim%2C%20a%20planta%20%C3%A0%20morte.>>. Acesso em: 18 de fev. de 2022.

ROS, L. F.; TEODOZIO, C.P.; COSTA, A.J.A.; ROSSI, R.C.; BRINHOLI, R.B.; PACAGNELLI, F.L. Análise dos efeitos da exposição crônica oral ao herbicida à base de glifosato na remodelação cardíaca em ratos. *In: Colloquium Vitae*. ISSN: 1984-6436, p.10-15, 2020.

RUBIO, F.; GUO, E.; KAMP, L. Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *Journal Environmental & Analytical Toxicology*. v.5, n.249, p.2161-0525.1000249, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS ONE*. v.9, n.4, p.e94482, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K.A.G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*. v.232, p.08-27, 2019.

SANGI, S.; BIANCHETTI, R.E. Capítulo XXI – Da genômica à bioinformática. *In: RAYMUNDO, C.E.V. et al. (org). VII BOTÂNICA NO INVERNO 2017*. São Paulo, SP: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. p. 275, 2017.

SCHAEFER, R. Técnicas em biologia molecular. Concórdia, SC: **Embrapa Suínos e Aves-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

SCHIESARI, L. Defensivos agrícolas: Como evitar danos à saúde e ao meio ambiente. *Anapu: Série Boas Práticas*, v.8, 2012.

SCHMEHL, D.R.; TEAL, P.E.A.; FRAZIER, J.L.; GROZINGER, C.M. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*. v.71, p.177-190, 2014.

SEIDE, V.E.; BERNARDES, R.C.; PEREIRA, E.J.G.; LIMA, M.A.P. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*. v.243, Part B, p.1854-1860, 2018.

SILVA, C.I.; PACHECO FILHO, A.J.S.; FREITAS, B.M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. *In: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas – A.B.E.L.H.A. (org). Agricultura e Polinizadores*. São Paulo, SP: p.19-31, 2015.

SMET, L.; HATJINA, F.; IOANNIDIS, P.; HAMAMTZOGLOU, A.; SCHOONVAERE, K.; FRANCIS, F.; MEEUS, I.; SMAGGHE, G.; GRAAF, D.C. Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PloS ONE*. v.12, n.2, p.e0171529, 2017.

SOUZA, A.P.F.; RODRIGUES, N.R.; REYES, F.G.R. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey. *Food Additives & Contaminants: Part B*. v.14, n.1, p.40-47, 2020.

THOMPSON, T.S.; VAN DEN HEEVER, J.P.; LIMANOWKA, R.E. Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v.36, n.3, p.434-446, 2019.

THONGPRAKAISANG, S.; THIANANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and chemical toxicology**. v.59, p.129-136, 2013.

TONI, L.R.; SANTANA, H D.; ZAIA, D.A. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

VÁZQUEZ, D.E.; ILINA N.; PAGANO E.A.; ZAVALA, J.A.; FARINA, W.M. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. **PLoS ONE**. v.13, n.10, e0205074, 2018.

VÁZQUEZ, D.E.; BALBUENA, M.S.; CHAVES, F.; GORA, J.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. **Scientific Reports**. v.10, 2020a.

VÁZQUEZ, D.E.; LATORRE-ESTIVALIS, J.M.; ONS, S.; FARINA, W.M. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**. v.261, 2020b.

WAGNER, N.; MÜLLER, H.; VIERTEL, B. Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species. **Environmental Science and Pollution Research**. v.24, n.2, p.1495-1508, 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**. v.10, n.1, p.57-63, 2009.

WIESE, H. **Nova Apicultura**. Atualizado e ampliado por James Arruda Salomé. 10ª edição, Guaíba: Agrolivros, 544 p., 2020.

WOLFF, L.F. Abelhas: agentes de biodiversidade. In: BUSTAMANTE, P.G.; BARBIERI, R.L.; SANTILLI, J. (ed). **Conservação e uso da agrobiodiversidade** – Relatos de experiências locais. Brasília: Embrapa. v.3, p.257-286, 2017.

YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **Informações Agronômicas**, v.119, p.1-32, 2007.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia molecular básica**. 5ª edição. Porto Alegre, RS: Artmed, 2014.

ZHAO, H.; LI, G.; GUO, D.; WANG, Y.; LIU, Q.; GAO, Z.; WANG, H.; LIU, Z.; GUO, X.; XU, B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. **Science of The Total Environment**. v.744, p.140819, 2020.

CAPÍTULO 2

GLIFOSATO ALTERA O TRANSCRIPTOMA DO TECIDO CEREBRAL DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

A toxicidade do glifosato foi avaliada no perfil de expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas por meio de teste de ingestão. Para isso, 180 abelhas com 21 dias, previamente marcadas, foram coletadas de suas respectivas colmeias, mantidas em jejum por 3 horas, sendo então fornecido xarope de mel contendo ou não a dose letal e subletal do glifosato. Após 1 e 4 horas de exposição, 15 abelhas de cada tratamento foram coletadas para as análises do transcriptoma. Observou-se que, em ambas as doses, o glifosato alterou a expressão de genes relacionados ao sistema nervoso após 1 hora de exposição ao herbicida. Após 4 horas, houveram mudanças relacionadas a vias metabólicas e de organelas intracelulares. Conclui-se que o glifosato afeta a expressão gênica de abelhas campeiras, podendo interferir na sua microbiota e imunidade, bem como prejudicar vias do sistema nervoso, acarretando na disfunção do sistema cognitivo e, consequentemente, no desenvolvimento e atividades da colônia.

Palavras-chave: agrotóxicos; apicultura; expressão gênica; herbicida.

GLYPHOSATE ALTERS THE TRANSCRIPTOME OF THE BRAIN TISSUE OF AFRICANIZED *Apis mellifera* HONEYBEES

Glyphosate toxicity was evaluated in the gene expression profile of Africanized *Apis mellifera* bees through an ingestion test. For that purpose, 180 bees with 21 days of age, previously marked, were collected from their respective hives, were maintained fasting for 3 hours, and then the honey syrup was supplied with or without the lethal and sublethal dose of glyphosate. After 1 and 4 hours of exposure, 15 bees from each treatment were collected for transcriptome analysis. It was observed that, at both doses, glyphosate altered the expression of genes related to the nervous system after 1 hour of exposure to the herbicide. After 4 hours, there were changes related to metabolic pathways and intracellular organelles. It is concluded that glyphosate affects the gene expression of forager bees, which can interfere with their microbiota and immunity, as well as impair nervous system pathways, leading to cognitive system dysfunction and, consequently, to colony development and activities.

Keywords: pesticides; beekeeping; gene expression; herbicide.

1. Introdução

O glifosato (GLY) possui alta taxa de uso desde que foi inserido no mercado em 1970, sendo considerado o herbicida mais utilizado mundialmente (GILL et al., 2018; DUKE, 2020), com 675 mil toneladas em média anualmente e com expectativa até 2025 de 830 mil toneladas a serem utilizadas (MAGGI et al., 2020). Este herbicida pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, tendo como nome químico “N-(phosphonomethyl)glycine”, cuja fórmula molecular é $C_3H_8NO_5P$, com foco no controle de plantas daninhas (EL-SEBAE et al., 1994; DILL et al., 2010).

O mecanismo de ação desse princípio ativo na planta, bem como em fungos e maioria das bactérias, se dá por inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) por competição pelo substrato fosfoenolpiruvato (PEP), os quais participam da via de metabolização do ácido shiquímico, importantes na biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, triptofano e tirosina), influenciando diretamente na síntese proteica e produção de compostos secundários que atuam como precursores (RICHMOND, 2018; BATTISTI et al., 2021).

Embora não seja esperado para um herbicida, a exposição de animais ao glifosato causa danos e até mesmo a redução de suas populações, mesmo que em baixas concentrações (COX, 1995). Para as abelhas, a maior problemática pela utilização de herbicidas estava associada a redução da diversidade floral, as quais poderiam servir como locais para nidificação e fontes de alimentos (pólen e néctar), fazendo com que as populações desses insetos tivessem prejuízos na sua manutenção (GUPTA et al., 2019). No entanto, a partir de estudos já realizados com a espécie de abelhas *Apis mellifera*, evidenciou-se que a exposição desses insetos ao herbicida glifosato pode causar alterações em aspectos comportamentais, fisiológicos, de desenvolvimento, genéticos e, conseqüentemente, produtivos (BOILY et al., 2013; HERBERT et al., 2014; BALBUENA et al., 2015; HELMER et al., 2015; JUMARIE et al., 2017; DAI et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2020a; VÁZQUEZ et al., 2020b; MOTTA et al., 2022).

Efeitos subletais (doses crônicas) podem ser tão prejudiciais, quanto os efeitos promovidos por doses letais (doses agudas), sendo importante o estudo nas abelhas. O transcriptoma, conjunto completo de genes transcritos e expressos em uma célula sujeita a determinada condição, é uma importante ferramenta para avaliar possíveis alterações na expressão gênica a partir da exposição a agrotóxicos, auxiliando na interpretação dos elementos

funcionais do genoma e revelação dos constituintes moleculares das células e tecidos (WANG et al., 2009).

Dessa forma, com a presente pesquisa objetivou-se verificar, por meio da análise do transcriptoma, se o herbicida glifosato em dose letal e subletal provoca alterações no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, na fase de campeiras.

2. Material e Métodos

Local do experimento

O experimento foi conduzido no apiário do setor de apicultura localizado na Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 49' Sul e 48° 24' Oeste. A área é caracterizada por um clima subtropical úmido com uma altitude média de 623m (CAMILLI et al., 2022).

Coleta das abelhas

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMVZ), protocolo nº 0008/2021.

Foram utilizadas nove colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizada, visualmente padronizadas em relação ao número de quadros contendo favos de cria e alimento. Para a obtenção das abelhas na fase de campeiras, foram retirados de cada colmeia experimental dois quadros contendo favos com cria operculada, envolvidos com tecido filó e devolvidos nas suas respectivas colmeias. Após 24 horas, as abelhas operárias recém-emergidas foram marcadas com caneta atóxica (marca Posca) na região dorsal do tórax (pronoto). Após a marcação, os quadros, assim como as abelhas marcadas, foram retirados do tecido filó e reintroduzidos em suas colônias de origem (ROAT et al., 2014).

Após 21 dias da reintrodução (fase de campeiras), foram coletadas 180 abelhas marcadas das colmeias no total com o uso de uma pinça entomológica, sendo imediatamente armazenadas em recipientes de plástico e anestesiadas em freezer a -18°C, aproximadamente, por um período de 1 a 2 minutos (ZALUSKI et al., 2015), a fim de possibilitar o manejo das mesmas nas etapas seguintes do experimento.

Grupos experimentais

As abelhas anestesiadas foram então distribuídas em placas de Petri (90x20mm) com suas respectivas tampas perfuradas para garantia da ventilação, e mantidas em jejum por um período de 3 horas para esvaziar a vesícula melífera. Posteriormente, foi fornecido xarope de mel (proporção de 1:1), durante uma e quatro horas (ZALUSKI et al., 2015), contendo a dose letal (273,93 µg/abelha) ou subletal (2,73 µg/abelha) do ingrediente ativo glifosato (Sigma-Aldrich®). Ambas doses foram determinadas previamente pelo grupo de pesquisa NECTAR.

Para o cálculo da concentração do glifosato, foi considerado o consumo de 50 µL por abelha, correspondente ao volume médio da vesícula melífera (THOMPSON e HUNT, 1999). O grupo controle recebeu apenas xarope de mel. O consumo de alimento foi avaliado pela pesagem dos cochos antes e após o período experimental. Esse experimento foi realizado em sextuplicada com cinco abelhas cada repetição, totalizando 30 abelhas por tratamento. Diferenças entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Após uma hora e quatro horas de exposição ao xarope, 15 abelhas de cada tratamento foram anestesiadas por baixa temperatura, acondicionadas em tubos falcon devidamente identificados, levadas em caixa de isopor com gelo para o laboratório do IBTEC – Instituto de Biotecnologia da UNESP – Câmpus de Botucatu, e imediatamente congeladas em ultrafreezer -80°C, para a realização da análise de transcriptoma.

Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq

Esta fase do experimento foi realizada no laboratório do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), onde as abelhas foram divididas inicialmente em quatro amostras para cada tratamento, contendo três cabeças por amostra, totalizando 12 cabeças por tratamento. Em continuidade, as abelhas foram decapitadas e tiveram seus olhos removidos para evitar possíveis contaminações causadas pela pigmentação ocular; posteriormente essas cabeças foram maceradas para a exposição do material cerebral.

O RNA total foi extraído dos pools cerebrais de abelhas *A. mellifera* 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. Os dados de qualidade de sequenciamento do RNA estão representados no Anexo 1.

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 $|\log_2 FC| \geq 2$.

3. Resultados

3.1. Consumo do alimento

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) no consumo do alimento contaminado ou não com dose letal e subletal do herbicida glifosato, tanto para uma hora quanto para quatro horas (Tabela 1).

Tabela 1. Consumo médio do xarope de mel ($\mu\text{L}/\text{abelha}$) contaminado ou não com a dose letal ($273,93 \mu\text{g}/\text{abelha}$) e subletal ($2,73 \mu\text{g}/\text{abelha}$) do glifosato pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas, durante 1 e 4 horas de exposição.

Período	Controle	Dose Letal	Dose Subletal
1 hora	19,5 $\pm$ 3,1	22,2 $\pm$ 2,7	22,0 $\pm$ 6,7
4 horas	30,0 $\pm$ 9,6	31,4 $\pm$ 9,3	36,5 $\pm$ 18,8

3.2. Genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos pelo glifosato

Após a exposição das abelhas ao alimento contendo glifosato, baseando-se em $FC > 2,0$ e $P < 0,05$, 691 genes foram diferencialmente expressos após uma hora, apresentando 404 genes para a dose letal (IG50) e 538 genes para a dose subletal (IGSUB), quando comparados ao tratamento controle, sendo 251 genes expressos em comum para ambas as doses do herbicida. Dos genes diferencialmente expressos após uma hora de exposição, 287 foram expressos exclusivamente no IGSUB e 153 no IG50 (Figura 1A).

Quando as abelhas foram expostas por quatro horas ao alimento contendo o glifosato, foram diferencialmente expressos 499 genes para IG50 e 483 genes para a dose IGSUB, totalizando 784 genes diferencialmente expressos (DEGs) em relação ao tratamento controle, sendo que 198 genes foram expressos em comum para ambas as doses. Dos genes diferencialmente expressos, 301 genes exclusivos do tratamento IG50 e 285 do IGSUB (Figura 1B).

De acordo com a Figura 1, observa-se que à medida que se aumentou o tempo de exposição das abelhas ao xarope contaminado, também houve aumento na expressão gênica.

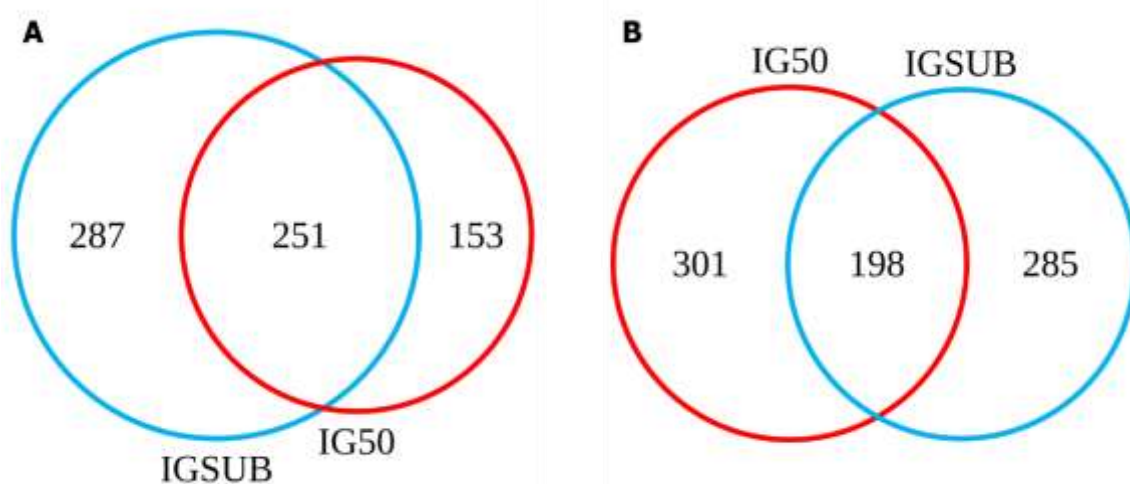


Figura 1. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma hora (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.

Dos genes diferencialmente expressos (DEGs) para o tratamento IG50 após uma hora de exposição ao alimento contendo glifosato, observou-se que 118 genes foram infraregulados e 286 foram supraregulados. Para o tratamento IGSUB observou-se que 166 genes foram infraregulados e 372 supraregulados (Figura 2A).

Quando as abelhas foram expostas por quatro horas ao alimento contendo dose letal do herbicida, foram identificados 249 genes infraregulados e 250 supraregulados. Quando as abelhas foram alimentadas com o alimento contendo dose subletal, observou-se 304 genes infraregulados e 179 foram supraregulados (Figura 2B).

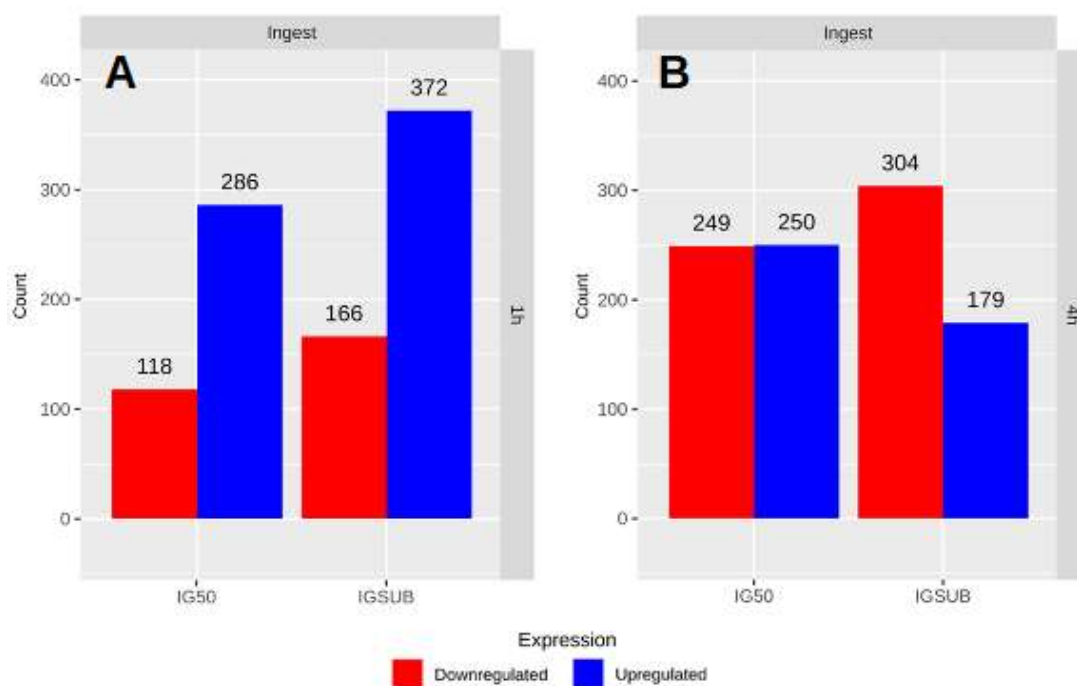


Figura 2. Histograma do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) infraregulados e suprarregulados entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.

Todos os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados no transcriptoma do tecido cerebral de abelhas campeiras foram classificados de acordo com categorias funcionais com base na ontologia gênica (GO). A partir dessa análise, observou-se que importantes processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC) foram estimulados independentemente da dose ou tempo de exposição ao herbicida (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Com relação a exposição das abelhas ao glifosato pelo período de uma hora, observaram-se alterações nos processos biológicos, sendo que a IG50 e os genes da interseção (genes expressos em comum para ambas as doses) afetaram a expressão de genes relacionados ao transporte de íons; por outro lado, a IGSUB afetou genes relacionados ao transporte de íons e processos de neurotransmissores. Com base nos termos GO para componentes celulares, observa-se que tanto o IG50, quanto a IGSUB e a interseção afetaram a expressão de genes relacionados a membrana plasmática, transporte de íons e processos relacionados a sinapse celular. Para a função molecular, observaram-se alterações em processos relacionados com transporte de íons, sinapse celular e função de receptores celulares quando utilizou-se IG50. Para a IGSUB e interseção observaram-se alterações nos processos de transporte de íons e

receptores celulares; entretanto, para a interseção observaram-se também alterações em processos relacionados ao DNA e RNA (Figuras 3, 4 e 5).

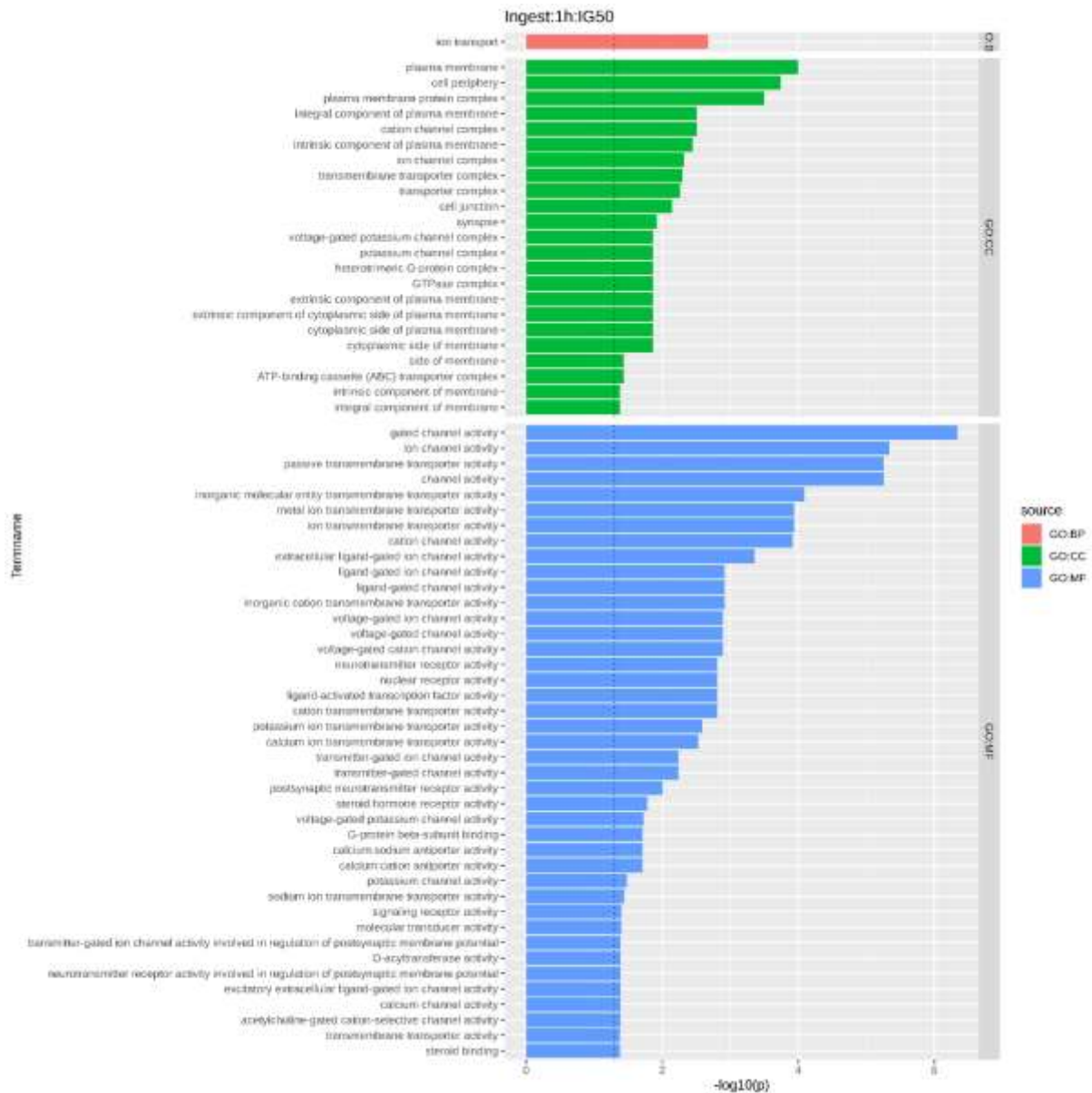


Figura 3. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF).

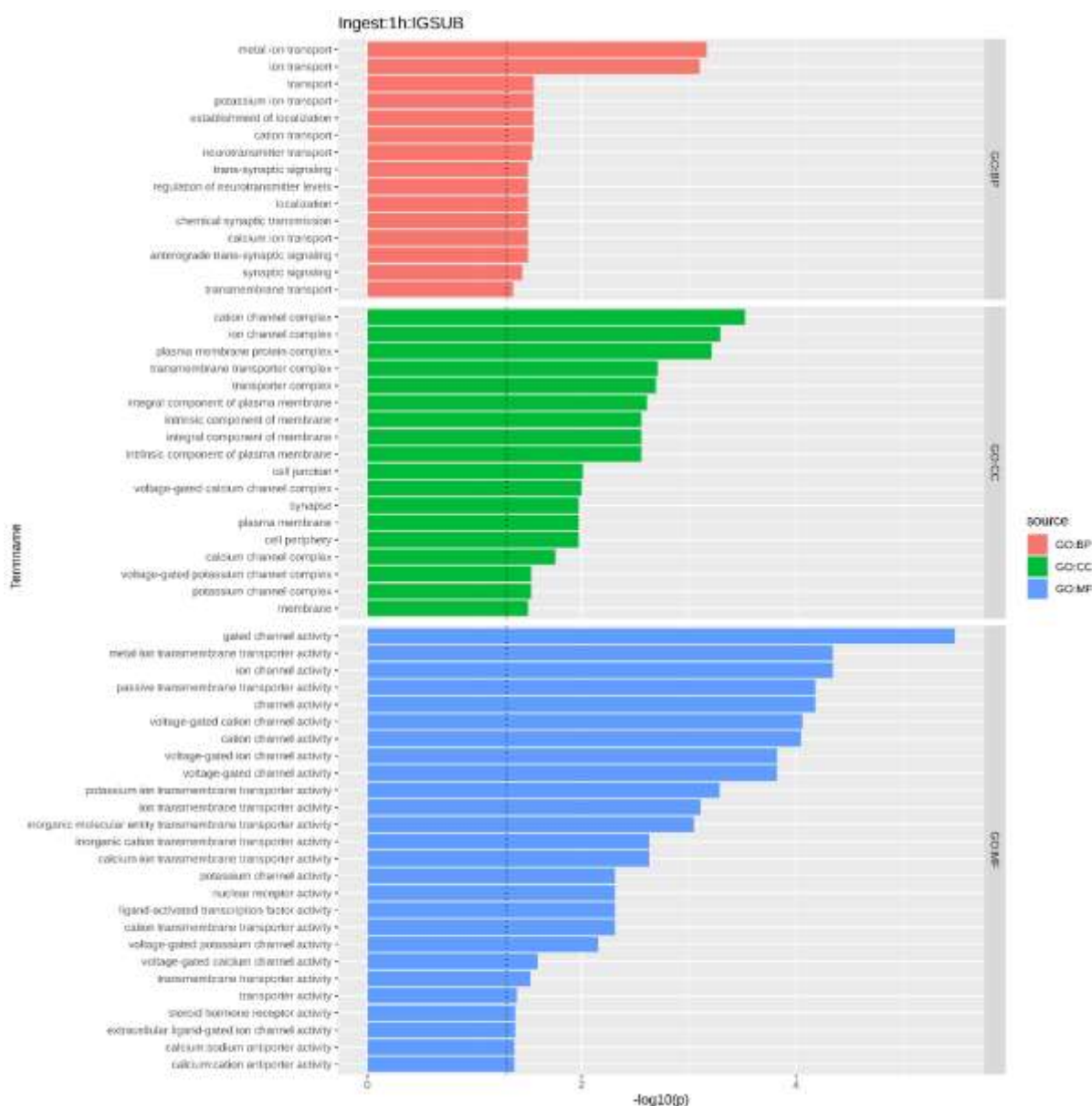


Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF)

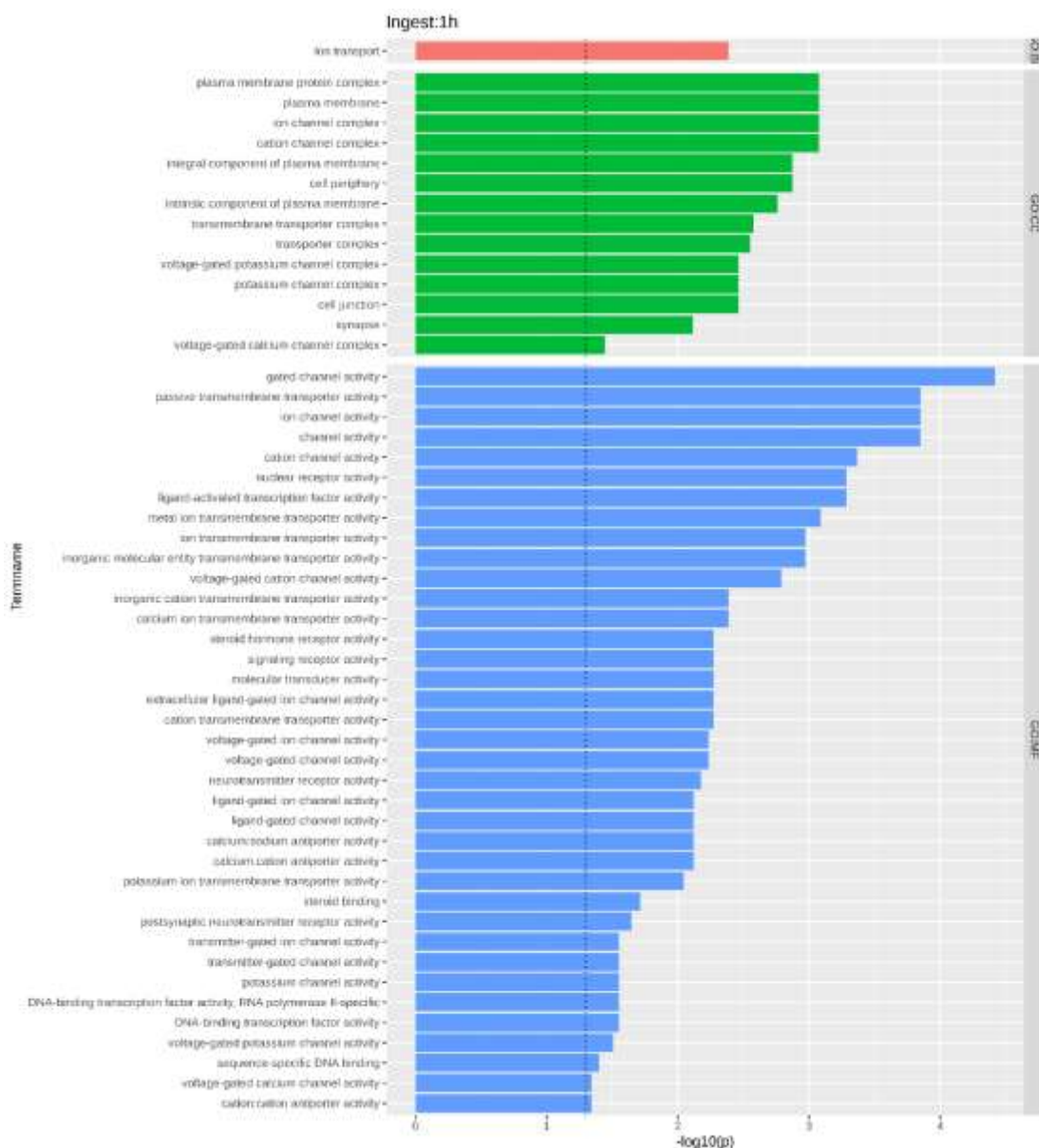


Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Com relação a exposição das abelhas ao glifosato, pelo período de quatro horas, observaram-se alterações nos processos biológicos apenas para a IGSUB e interseção, as quais afetaram a expressão de genes relacionados a tradução de DNA para RNA e processos metabólicos e biossintéticos. No que diz respeito aos componentes celulares, observou-se que a IGSUB e interseção afetaram processos relacionados a organelas intracelulares, com destaque para alterações ribossomais. Para a função molecular, observa-se que IG50, IGSUB e interseção afetaram a expressão de genes relacionados a alterações ribossomais (Figuras 6, 7 e 8).

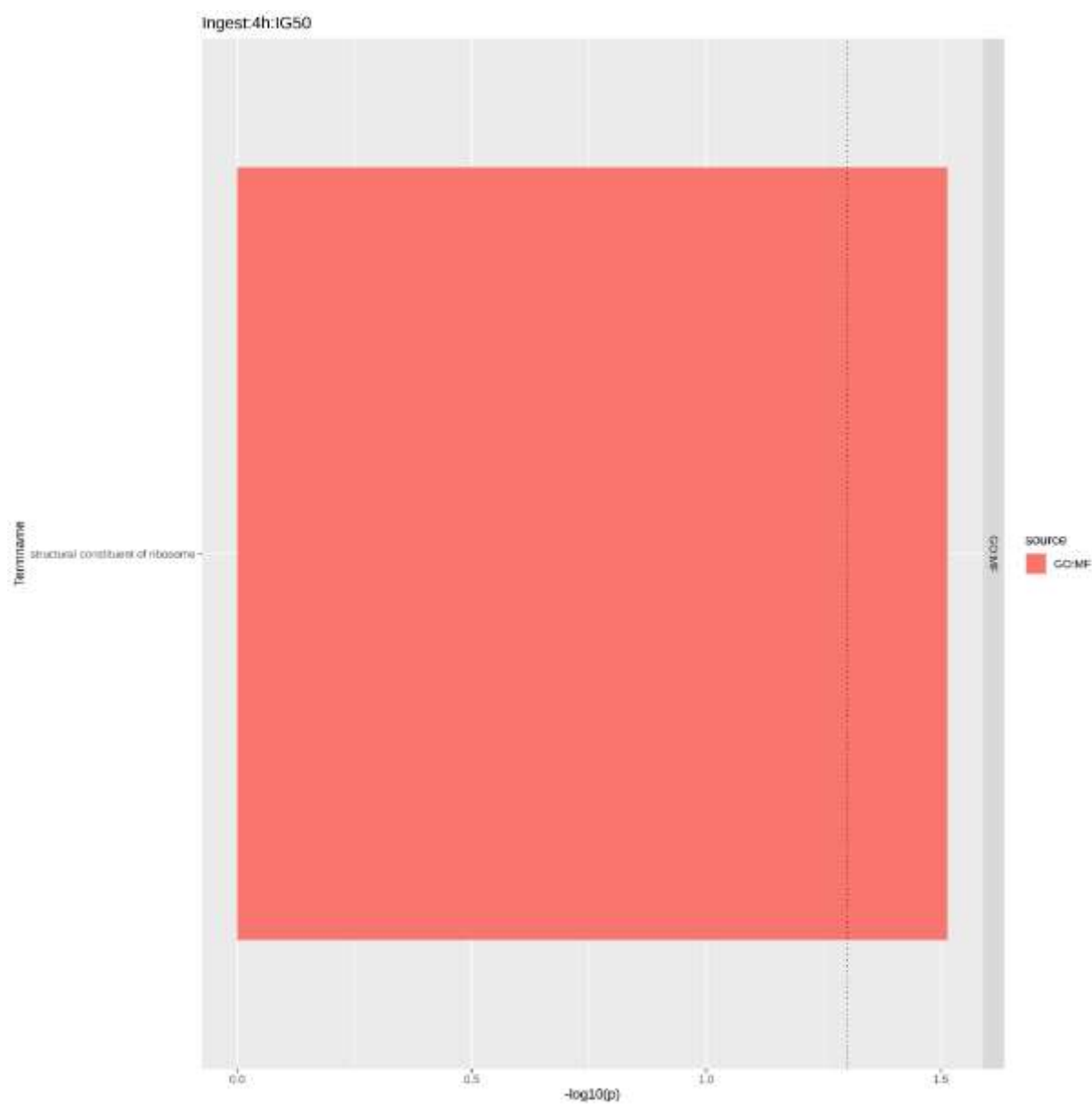


Figura 6. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal. A cor vermelha indica funções moleculares (MF).

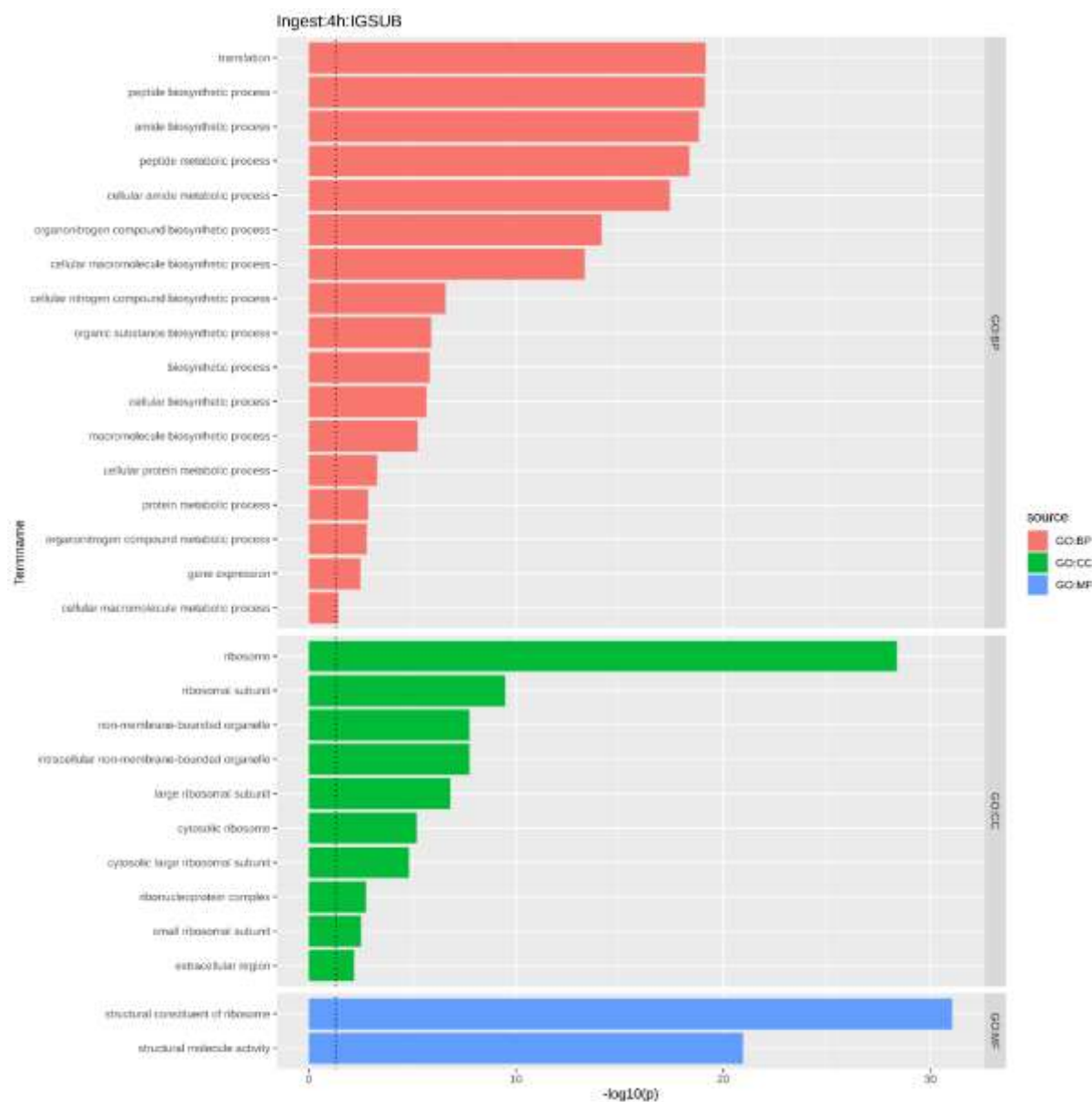


Figura 7. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

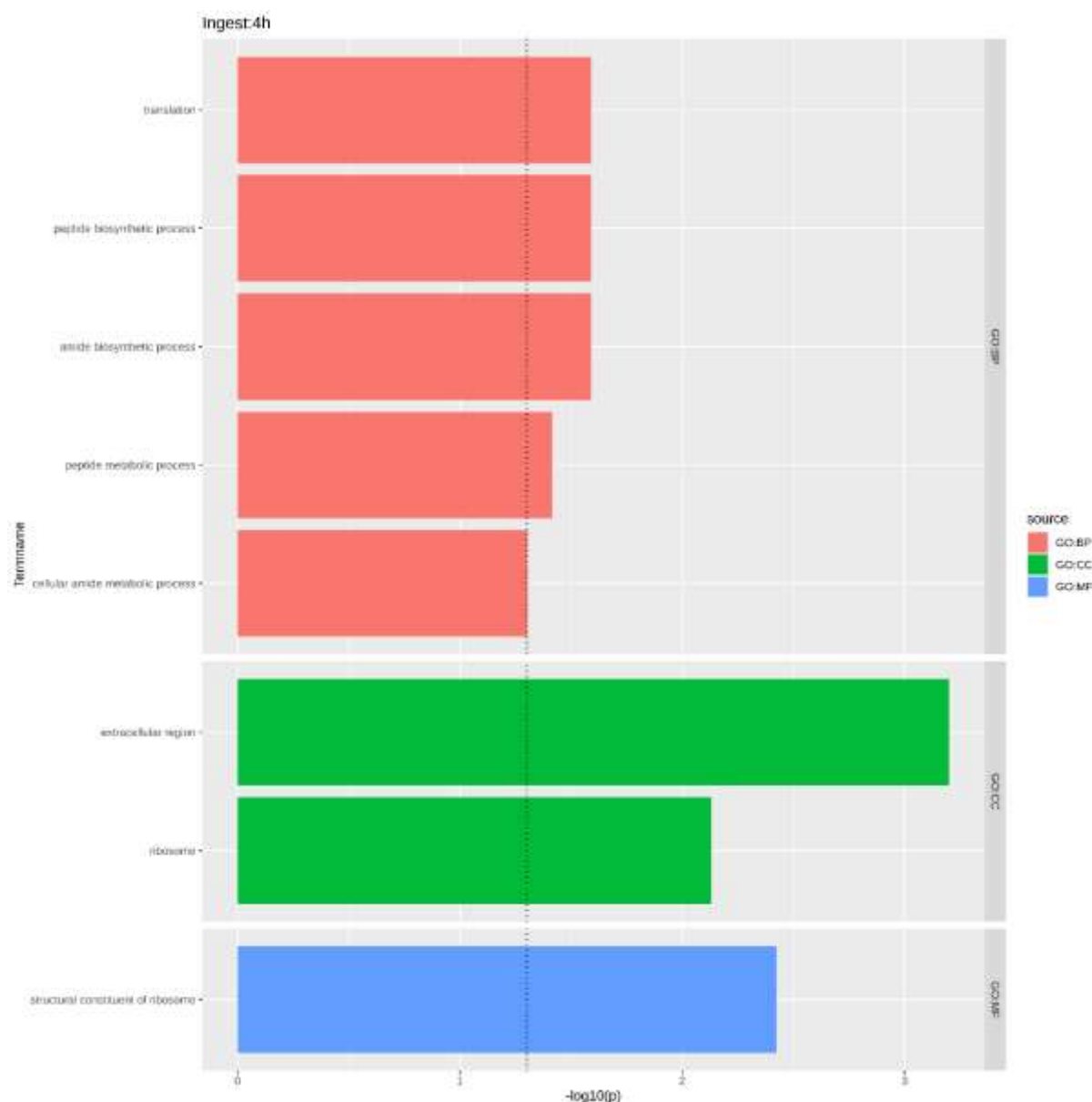


Figura 8. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF).

Os 251 genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados, na intersecção para a dose letal e subletal do glifosato, encontram-se nas Figuras 9 e 10.

Após 1 hora de exposição ao glifosato, observa-se que 24 genes são conhecidos na literatura científica, enquanto que os demais ainda não foram caracterizados. Dentre o total de genes caracterizados, 22 genes apresentaram aumento em sua expressão, em relação ao controle, sendo eles: CDC37, HSP90, NRX-1, nAChRa1, nAChRa7, ECR, BRP, CAC, MAD, AChE-2, BR-c, PHRF1, MBLK-1, GLUCL, Syt1, E75, OBP4, CAMKII, Ac3, Dll, EphR, Err.

Por outro lado, os genes “MRJP6” e “MRJP1” apresentaram redução em sua expressão quando comparados ao tratamento controle.

Após 4 horas de exposição, 198 genes foram identificados em ambas as doses, sendo que 19 genes foram caracterizados. Dos genes conhecidos, oito apresentaram aumento em sua expressão, sendo eles: Acph-1, FAR1, OBP15, CSP1, Cdc37, BRP, nAChRa1, nAChRa7. Os demais apresentaram sua expressão reduzida quando comparados ao controle, sendo eles: Def1, Gr10, A4, MRJP5, Y-h, MRJP4, MRJP7, MRJP1, MRJP2, MRJP3, Apd-1.

Independente da dose e tempo de exposição, cinco genes apresentaram alteração de expressão, sendo os genes CDC37, nAChRa1, nAChRa7 e BRP supregulados, e MRJP1 infraregulado.

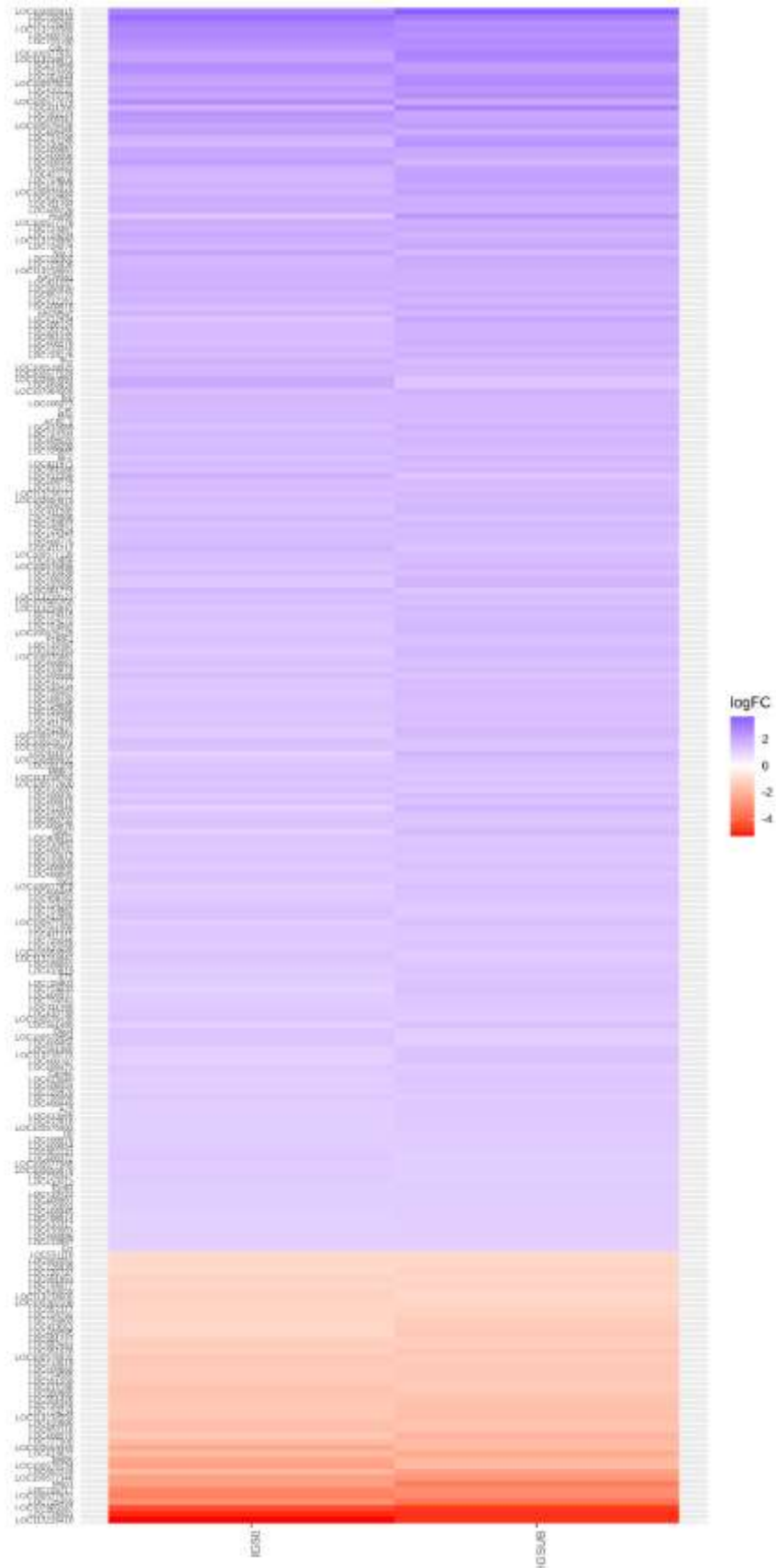


Figura 9. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 1 hora de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle.

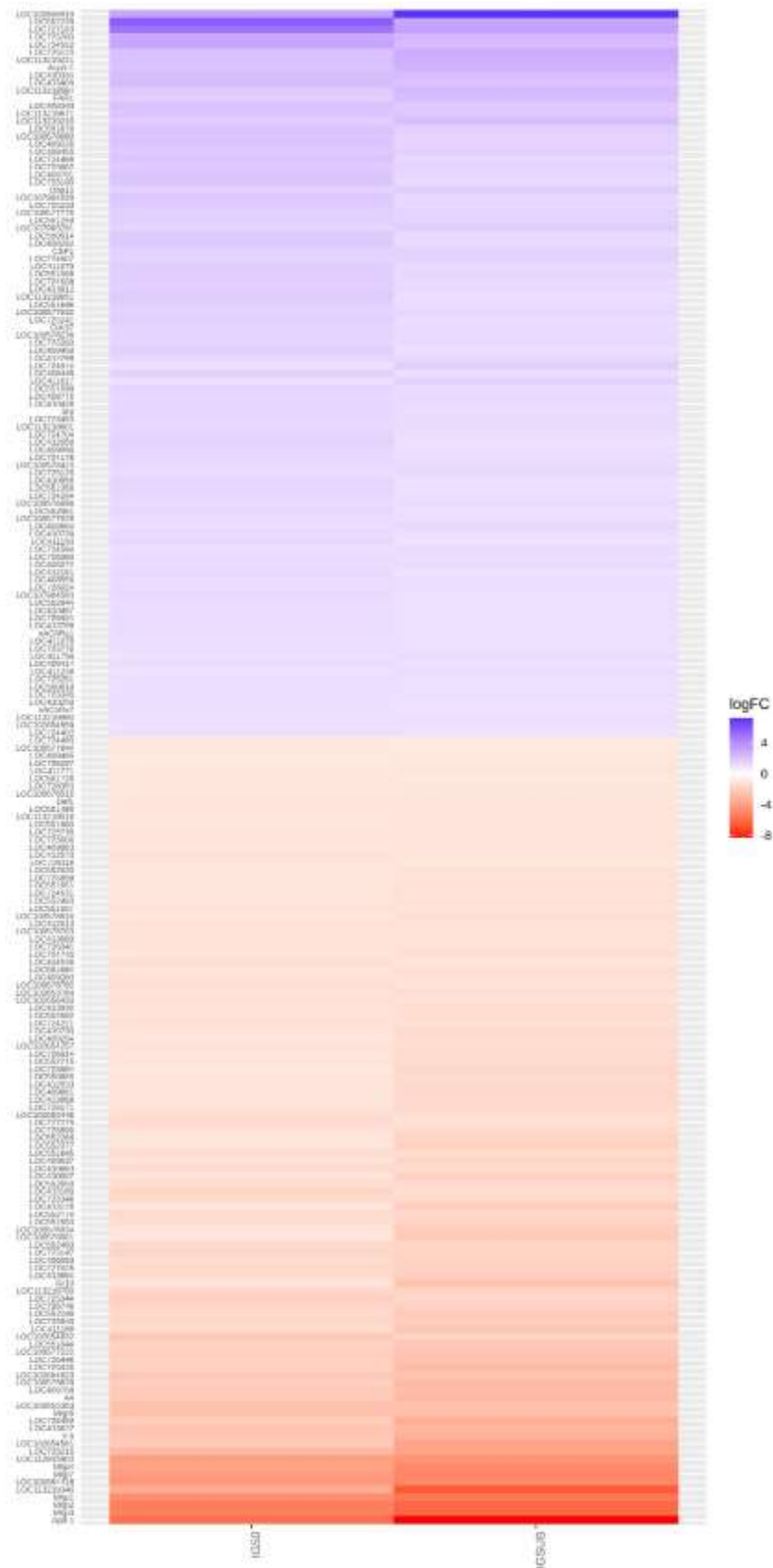


Figura 10. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 4 horas de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle.

4. Discussão

As abelhas operárias, a partir do vigésimo primeiro dia de vida assumem o papel de campeiras, dedicando-se exclusivamente à coleta de alimentos e produtos do campo para a colmeia (KILANI, 1999). Nesse período, o aprendizado de estímulos visuais e olfativos relacionados a fontes de alimentos e rotas de navegação se tornam fundamentais, refletindo em mudanças cerebrais (REINHARD e CLAUDIANOS, 2012). O sucesso da atividade de forrageamento é dependente desses processos de aprendizagem e memória desenvolvidos durante experiências vivenciadas por esses insetos, que ocorre normalmente ao visitar flores que oferecem néctar como recompensa (FARINA et al., 2019; TAN et al., 2022).

No presente estudo, observou-se que o glifosato modulou a expressão de genes tanto em 1 hora quanto em 4 horas após exposição, independente da dose utilizada do herbicida. Esses resultados demonstram a importância da realização de estudos utilizando doses subletais, as quais podem afetar o desenvolvimento larval e sua expressão gênica (VÁZQUEZ et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2020b). Os efeitos de concentrações subletais em abelhas demonstram também que estas tiveram a capacidade intelectual prejudicada, dificultando o seu retorno à colmeia, tendo a sensibilidade diminuída ao néctar e baixo desempenho de aprendizagem (HERBERT et al., 2014; BALBUENA et al., 2015). Além disso, estudos com outros agrotóxicos, como o fipronil, também utilizaram doses subletais e demonstraram efeitos prejudiciais às abelhas, desde seu desenvolvimento até a manutenção da colônia (ZALUSKI et al., 2015).

Este efeito prejudicial do glifosato pode ser reforçado pelo consumo semelhante do alimento pelas abelhas dos tratamentos, sugerindo que as concentrações utilizadas do herbicida não afetaram o seu consumo. A ausência do efeito no consumo de alimentos foi relatada anteriormente em abelhas expostas a diferentes concentrações (0,21 e 1,08 g/kg; 0,1 µg/L), sugerindo que o glifosato não apresenta efeito no paladar ou odor do alimento (BLOT et al., 2019; ALMASRI et al., 2021), podendo até promover aumento no consumo pelas abelhas na concentração 10 ppb (LIAO et al., 2017).

Analisando-se a exposição das abelhas ao herbicida após o período de uma hora, para ambas as doses, observaram-se mudanças significativas na expressão de genes relacionados a importantes vias do sistema nervoso, incluindo alterações de neurotransmissores, receptores, sinapses, complexo de íons e componentes de membrana.

Os genes OBP4 e OBP15 estão relacionados a família de genes da proteína de ligação ao odor e, além disso, desempenham função cognitiva nas abelhas (DENG et al., 2013; ZHAO

et al., 2020). O aumento em sua expressão após 1 e 4 horas de exposição ao glifosato, respectivamente, sugere que o herbicida alterou a sensibilidade do sistema olfativo e, com isso, a atividade de forrageamento também pode ser afetada, visto que as abelhas necessitam de aprendizagem e memória para navegação e identificação de recursos alimentares; desta forma, o aumento na expressão destes genes poderia ser uma tentativa de compensação do organismo das abelhas para restabelecer o funcionamento desses receptores olfativos. Diferentemente desses resultados, abelhas expostas a formulação comercial de glifosato apresentaram expressão de genes OBP infrareguladas, como OBP3, OBP9 e OBP15 tanto em *A. cerana cerana* quanto em *A. mellifera* (ZHAO et al., 2020), o que poderia reduzir a capacidade de estabelecer associações entre o odor e recompensa, necessitando de mais eventos de aprendizado para atingir níveis de respostas semelhantes as abelhas não contaminadas (HERBERT et al., 2014; LUO et al., 2021).

Para as sinapses correspondentes a aprendizagem olfativa dentro do cérebro das abelhas, são utilizados vários transmissores e receptores. Dentre os neurotransmissores, a acetilcolina (ACh) representa um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e o glutamato na junção neuromuscular; a inibição é mediada via GABA e canais de cloreto controlados por glutamato (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

A transmissão sináptica colinérgica (dependente de ACh) está envolvida na aquisição e recuperação dos processos cognitivos; para isso, existem pelo menos dois subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no cérebro das abelhas: dois β (β 1-2) e nove α (α 1-9), sendo localizados cinco deles em neurópilos olfatórios (α 2, α 4, α 8, α 7, β 1). Os nAChRs de abelhas são receptores ionotrópicos, seletivos a cátions com alta permeabilidade ao Ca^{2+} e capazes de mediar a transmissão sináptica excitatória rápida (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

Observou-se que a exposição das abelhas ao glifosato aumentou a expressão de duas subunidades nAChRs, sendo elas, nAChR α 1 e nAChR α 7, independentemente da dose e período. Este fato pode ser considerado uma resposta compensatória do organismo à perda funcional desses receptores no intuito de haver uma autorregulação pelo organismo, sugerindo que o glifosato pode afetar a aprendizagem tátil, olfativa e a memória de abelhas (ALIOUANE et al., 2009; CHRISTEN et al., 2016).

A enzima acetilcolinesterase (AChE), é responsável pela hidrólise desse neurotransmissor (ACh) nas regiões sinápticas das terminações nervosas (CASIDA e DURKIN, 2013; JOHNSON, 2014). Além disso, possui funções não neurológicas, atuando como uma molécula sinalizadora em resposta ao estresse (KIM et al., 2019). Observou-se que o gene

AChE-2 foi suprarregulado após o período de 1 hora de exposição ao glifosato. Desta forma, pode-se sugerir que o aumento de sua expressão pode ser uma tentativa de combater o agente estressor (glifosato) ou devido ao aumento da expressão dos receptores nicotínicos houve um consequente aumento da atividade enzimática na tentativa de restabelecer o repouso do neurônio.

O glifosato promoveu alterações nos canais de cloreto controlado por glutamato (GluCl) que estão envolvidos na neurotransmissão inibitória e na memória olfativa em abelhas, sendo expressos na maioria dos neurônios do lobo antenal (AL) de pupas e abelhas adultas (EL HASSANI et al., 2012; LEBoulle, 2012). A suprarregulação desse gene pode ter sido mais uma iniciativa do organismo de restabelecer o repouso do neurônio, assim como AChE, podendo induzir prejuízos na memória olfativa destas abelhas.

A alteração de NRX-1 também mostrou efeitos devido ao glifosato exposto durante 1 hora na alimentação das abelhas. Este gene codifica proteínas transmembranares, conhecidas como neurexinas, que auxiliam na conexão dos neurônios durante a sinapse, estando localizadas na membrana pré-sináptica (REISSNER et al., 2013), predominantemente nos corpos de cogumelos (MBs) do cérebro de abelhas adultas, sugerindo um papel dessas moléculas na formação de sinapses associadas ao processamento sensorial e aprendizagem (REINHARD e CLAUDIANOS, 2012). A suprarregulação encontrada em nossos resultados também foram observadas em abelhas privadas de estímulos sensoriais, indicando mau funcionamento das conexões neurais, causando interferência entre as conexões durante a sinapse, afetando negativamente os comportamentos e o aprendizado das abelhas (BISWAS et al., 2010).

O Mblk-1 é expresso preferencialmente em um subtipo de neurônios chamado células Kenyon do tipo grande no MBs do cérebro das abelhas, sendo identificado como um fator de transcrição envolvido nos circuitos neuronais regulado por ecdisteróides (PAUL et al., 2006; TAKAYANAGI-KIYA et al., 2017). Além disso, esse subtipo também expressa genes envolvidos na sinalização de Ca^{2+} , incluindo proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina, que estão envolvidos em funções sinápticas (CaMKII) (MATSUMURA et al., 2022), especificamente na aprendizagem e memória de longo prazo (MAYACK et al., 2021). Genes relacionados à função neural, como CaMKII, são candidatos a gene alvo Mblk-1 em MBs de abelhas operárias e, portanto, acredita-se que Mblk-1 está envolvido no aprendizado e memória das abelhas através da regulação transcricional desse gene relacionado à plasticidade sináptica (MATSUMURA et al., 2022). Por esse motivo, ambos genes foram suprarregulados neste estudo, o que implica que as abelhas contaminadas necessitaram de maior nível de atividade desses genes para formar a memória de aprendizagem.

BRP e CAC também estão relacionados a sinapse em abelhas e foram suprarregulados neste trabalho, sendo BRP (bruchpilot) expresso após ambos períodos (1 e 4 horas) e CAC (cacofonia) apenas após 1 hora de exposição do glifosato às abelhas. BRP é uma proteína âncora pré-sináptica localizada nos MBs (GEHRING et al., 2017), e CAC é um gene do canal de cálcio que parece estar associado ao sistema nervoso de *Drosophila* desempenhando muitas regulações de curto e longo prazo no desenvolvimento neuronal, função e plasticidade (PENG e WU, 2007). Se a redução dos níveis de BRP em *Drosophila melanogaster* também resulta na redução em densidade dos canais de Ca^{2+} e da liberação de vesículas sinápticas, alterando a plasticidade de curto prazo, logo, o contrário também pode ser verdadeiro, em que o aumento de BRP pode resultar no aumento da densidade dos canais de Ca^{2+} e da liberação de vesículas sinápticas, alterando sua plasticidade, acarretando na liberação excessiva do transmissor tendo uma plasticidade sináptica não padronizada (KITTEL et al., 2006). Se a atividade neuronal é suprimida e/ou alterada, uma resposta compensatória coerente pode estar sendo desencadeada, aumentando a expressão desses genes neste trabalho.

BR-C, assim como Mblk-1, é expresso seletivamente nas células Kenyon do tipo grande dos corpos de cogumelo no cérebro do trabalhador, enquanto o E75 é expresso em todos os subtipos de neurônios do corpo de cogumelo, o que sugere que ambos estão envolvidos na regulação da função cerebral; também é possível, no entanto, que esses genes funcionem independentemente do ecdisteróide, pois o nível de ecdisteróide da hemolinfa de operárias adultas é muito menor do que durante o desenvolvimento (PAUL et al., 2006). Apesar disso, o receptor de ecdisona (EcR) também foi suprarregulado, sugerindo uma ação sinérgica entre a expressão desses genes.

HSP90 e Cdc37 formam um grupo de genes que estão envolvidos no acompanhamento de neurônios cerebrais, conhecidos também como chaperonas, que são capazes de realizar o desenovelamento de proteínas permitindo que as mesmas desempenhem suas funções de forma adequada; além disso, podem reparar proteínas mal enroladas ou instáveis (CATAE et al., 2018). Nesse sentido, o aumento da expressão desses genes no presente estudo sugere que o glifosato pode induzir à desnaturação de proteínas neurais no cérebro das abelhas contaminadas. No entanto, esses genes podem atuar independentemente. Cdc37 interage com muitas quinases, estando envolvido em muitos processos celulares (junto ou não com HSP90), incluindo ácido desoxirribonucleico e síntese de proteínas, regulação do ciclo celular, transdução de sinal e transcrição (MACLEAN e PICARD, 2003). Já as HSP90 são proteínas de choque térmico relacionadas ao estresse, sendo superexpressa quando os organismos são expostos a choque térmico ou outros estressores ambientais, como pesticidas (XU et al., 2010).

Após quatro horas de exposição ao glifosato, observou-se alteração na expressão de genes relacionados aos processos metabólicos e biossintéticos, sugerindo atuação da molécula desse herbicida na microbiota intestinal das abelhas, uma vez que o papel da microbiota bem estabelecida e equilibrada na saúde desses insetos está associada a nutrição, digestão e metabolização de alimentos, biossíntese de nutrientes, incluindo a fermentação de carboidratos complexos e açúcares que não são digeríveis pela própria abelha, desintoxicação, proteção contra patógenos oportunistas e, conseqüentemente, desenvolvimento da imunidade (ENGEL et al., 2012; KWONG e MORAN, 2016; RODRIGUES et al., 2021). A alteração destas vias pode ter ocorrido devido as bactérias intestinais das abelhas possuírem a enzima alvo do glifosato (EPSPs) (MOTTA et al., 2018). Segundo Kwong e Moran (2016), a microbiota intestinal das abelhas é dominada por nove espécies bacterianas, dentre elas, cinco aglomerados de espécies bacterianas principais e quatro membros menos numerosos. Essa microbiota é adquirida, principalmente, por meio de interações sociais com outras abelhas operárias durante os primeiros dias de vida após o nascimento (RODRIGUES et al., 2021).

Diversos estudos têm demonstrado que o glifosato pode perturbar a microbiota intestinal das abelhas, causando não somente disbiose (MOTTA et al., 2018; BLOT et al., 2019; MOTTA e MORAN, 2020; MOTTA et al., 2020), como também pode alterar vias de resposta imune, infraregulando a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) produzidos pelas abelhas (MOTTA et al., 2022). De acordo com os autores, a produção de AMP é um dos componentes principais do sistema imune inato das abelhas, e a interrupção de suas vias pode promover consequências negativas à sua saúde.

O gene Def1 ou defensina1 está relacionado a defesa imunológica das abelhas e possui níveis de expressão muito altos nesses insetos (SHI et al., 2017); no entanto, nesse experimento foi encontrado uma infraregulação induzida pelo glifosato em abelhas expostas por 4 horas, podendo estar associado a ineficiência do sistema imunológico e defesa contra patógenos provocadas pelo herbicida. Zhao et al. (2020) utilizando glifosato comercial sobre *A. mellifera ligustica* e *A. cerana cerana* observaram supraregulação para esse gene, mostrando que esse produto induziu as abelhas a mitigar seus efeitos nocivos. Essa divergência dos resultados pode ser explicada devido ao agrotóxico utilizado neste estudo ser puro ao invés de formulações comerciais. Dessa forma, é possível que outros componentes presentes nas formulações possam promover essa supraregulação desse gene.

O gene A4 codificador da apolipoforina-III que é abundantemente expresso em glândulas mandibulares de abelhas (WU et al., 2017), foi infraregulado pela ação do glifosato neste trabalho. A apolipoforina III auxilia no carregamento do diacilglicerol, gerado a partir dos

estoques de triacilglicerol no corpo gorduroso através da ação do hormônio adipocinético, em lipoforina, a lipoproteína da hemolinfa; além disso, aumenta a capacidade de transporte de lipídios da lipoforina, cobrindo a superfície hidrofóbica em expansão resultante da captação de diacilglicerol. Desempenha um papel crítico no transporte de lipídios durante o voo de insetos e também pode desempenhar um papel nos mecanismos de defesa e na imunidade inata (NCBI). Assim, sugere-se que sua baixa expressão estaria relacionada a ineficiência do organismo na defesa contra a ação do agente estressor.

O gene CSP1 está incluso nas proteínas quimiossensoriais (CSPs) envolvidas na comunicação química das abelhas (NCBI) e apresentou aumento na sua expressão após 4 horas de exposição ao glifosato. Liu et al. (2020) sugerem que os CSPs têm ações complexas não apenas no sistema imunológico do inseto, mas também no sistema nervoso central e em praticamente todos os órgãos do corpo, tendo sua expressão enriquecida na cabeça, especificamente no cérebro, podendo estar relacionado ao transporte facilitado de ácidos graxos e vias mediadas por lipídios para adaptação, sinalização e defesa imunológica. Ainda, é proposto por esses autores que os genes da família CSP ativam a via do ômega 6 para produzir diacilglicerol (DAG), ativando a fosfolipase quinase C e a fosforilação de outras proteínas. Essa fosforilação está relacionada não apenas a despolarização/repolarização dos neurônios (canais de sódio/potássio), transdução de sinal (receptor transmembrana) e/ou contração muscular (proteína motora da miosina), mas também para a ativação de lipídios biossintéticos e degradativos, enzimas são essenciais para a degradação de xenobióticos, armazenamento de ácidos graxos e produção de feromônios.

A exposição das forrageiras ao glifosato induziu a redução na expressão de genes que normalmente são superexpressos em abelhas nutrízes. Os genes da proteína da geleia real (MRJPs e Y-h) foram infraregulados após 1 e 4 horas de exposição ao glifosato, exceto Y-h que foi expresso após 4 horas apenas. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a contaminação de abelhas na fase de nutrízes com doses letais ou subletais do glifosato poderia afetar a quantidade e qualidade da geleia produzida, afetando a nutrição, alterações comportamentais e desenvolvimento da colônia como um todo (FENT et al., 2020).

Pode-se concluir que o herbicida glifosato afeta a expressão gênica de abelhas melíferas na fase de campeiras expostas de forma aguda ou crônica, podendo afetar importantes vias metabólicas, interferindo na microbiota e defesa contra patógenos, bem como prejudicar vias do sistema nervoso, acarretando na disfunção do sistema cognitivo e, conseqüentemente, no desenvolvimento e atividades da colônia.

Referências

- ALIOUANE, Y.; EL HASSANI, A.K; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. 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.
- ALMASRI, H.; TAVARES, D.A.; DIOGON, M.; PIOZ, M.; ALAMIL, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J-C.; BELZUNCES, L.P. Physiological effects of the interaction between *Nosema ceranae* and sequential and overlapping exposure to glyphosate and difenoconazole in the honey bee *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.217, p.112258, 2021.
- BALBUENA, M.S.; TISON, L.; HAHN, M.L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Effects of sub-lethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of Experimental Biology**. v.218, n.17, p.2799-2805, 2015.
- BATTISTI, L.; POTRICH, M.; SAMPAIO, A.R.; GHISI, N.C.; COSTA-MAIA, F.M.; ABATI, R.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. **Science of the Total Environment**. v.767, p.145397, 2021.
- BISWAS, S.; REINHARD, J.; OAKESHOTT, J.; RUSSELL, R.; SRINIVASAN, M. V.; CLAUDIANOS, C. Sensory regulation of neuroligins and neurexin I in the honeybee brain. **Plos one**. v.5, n.2, p.e9133, 2010.
- BLOT, N.; VEILLAT, L.; ROUZÉ, R.; DELATTE, H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PLoS ONE**: v.14, n.4, e0215466, 2019.
- BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**. v.20, n.8, p.5603-5614, 2013.
- CAMILLI, M P.; KADRI, S.M.; ALVAREZ, M.V.N.; RIBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. **BMC genomics**. v.23, n.1, p.1-13, 2022.
- CASIDA, J.E.; DURKIN, K.A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**. v.58, n.1, p.99-117, 2013.
- CATAE, A.F.; DA SILVA MENEGASSO, A.R.; PRATAVIEIRA, M.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; ROAT, T.C. MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. **Pest management science**. v.75, n.3, p.607-615, 2019.
- CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**. v.50, n.7, p.4071-4081, 2016.
- CHOMCZYNSKI P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**. v.15, n.3, p.532-4, 536-7, 1993.

COX, C. Human exposure and ecological effects. **Journal of Pesticide Reform**. v.15, n.4, 1995.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIU, Y.; DIAO, Q. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.66, p.7786-7793, 2018.

DENG, Y.; YAN, H.; GU, J.; XU, J.; WU, K.; TU, Z.; JAMES, A.A.; CHEN, X. Molecular and functional characterization of odorant-binding protein genes in an invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. **Plos one**, v.8, n.7, p.e68836, 2013.

DILL, G.M.; SAMMONS, R.D.; FENG, P.C.C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHIEKH, A.; HONEGGER, M.B.J.L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.; HAUPFEAR, E.A. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NADULA, V.K. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management**. p.1-33, 2010.

DUKE, D. Glyphosate: Environmental fate and impact. **Weed Science**. v.68, n.3, p.201-207, 2020.

EL HASSANI, A.K.; SCHUSTER, S.; DYCK, Y.; DEMARES, F.; LEBOULLE, G.; ARMENGAUD, C. Identification, localization and function of glutamate-gated chloride channel receptors in the honeybee brain. **European Journal of Neuroscience**. v.36, n.4, p.2409-2420, 2012.

EL-SEBAE, A.H.; EL SHATBY, A.; JANSSEN, E.D.P.; MENSINK, H. Environmental Health Criteria 159 - Glyphosate. **Biodegradation**, v.4, 1994.

ENGEL, P.; MARTINSON, V.G.; MORAN, N.A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.27, p.11002-11007, 2012.

FARINA, W.M.; BALBUENA, M.S.; HERBERT, L.T.; GOÑALONS, C.M.; VÁZQUEZ, D.E. Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. **Insects**, v.10, n.10, p.354, 2019.

FENT, K.; HALTINER, T.; KUNZ, P.; CHRISTEN, V. Insecticides cause transcriptional alterations of endocrine related genes in the brain of honey bee foragers. **Chemosphere**. v.260, p.127542, 2020.

GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter systems in the honey bee brain: functions in learning and memory. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee neurobiology and behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media, p. 155-169, 2012.

GEHRING, K.B.; HEUFELDER, K.; DEPNER, H.; KERSTING, I.; SIGRIST, S.J.; EISENHARDT, D. Age-associated increase of the active zone protein Bruchpilot within the honeybee mushroom body. **PloS one**. v.12, n.4, p.e0175894, 2017.

GILL, J.P.K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S.; GIRDHAR, M. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**. v.16, n.2, p.401-426, 2018.

GUPTA, D.; CHAUHAN, H.; GUPTA, S.; GUPTA, R. Effect of Colony Collapse Disorder on Honeybees. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**. v.16, n.10, 2019.

HELMER, S.H.; KERBAOL, A.; ARAS, P.; JUMARIE, C.; BOILY, M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**. v.22, p.8010–8021, 2015.

HERBERT, L.T.; VÁZQUEZ, D.E.; ARENAS, A.; FARINA, W.M. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of Experimental Biology**. v.217, n.19, p.3457- 3464, 2014.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual Review Entomology**. v.60, n.1, p.415-434, 2014.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. **Chemosphere**. v.168, p.163-170, 2017.

KILANI, M. Biology of the honeybee. In: COLIN, M.E.; BALL, B.V.; KILANI, M. (eds.). **Bee disease diagnosis**. Options Méditerranéennes. Série B: Etudes et Recherches. Zaragoza: CIHEAM, n.25, p.9-24, 1999.

KIM, S.; KIM, K.; LEE, J.H.; HAN, S.H.; LEE, S.H. Differential expression of acetylcholinesterase 1 in response to various stress factors in honey bee workers. **Scientific reports**. v.9, n.1, p.1-10, 2019.

KITTEL, R.J.; WICHMANN, C.; RASSE, T.M.; FOUQUET, W.; SCHMIDT, M.; SCHMID, A.; WAGH, D.A.; PAWLY, C.; KELLNER, R.R.; WILLIG, K.I.; INFERNO, S.W.; BUCHNER, E.; HECKMANN, M.; SIGRIST, S.J. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. **Science**. v.312, n.5776, p.1051-1054, 2006.

KWONG, W.K.; MORAN, N.A. Gut microbial communities of social bees. **Nature reviews microbiology**, v.14, n.6, p.374-384, 2016.

LEBOULLE, G. Glutamate neurotransmission in the honey bee central nervous system. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee Neurobiology and Behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media. p. 171-184, 2012.

LIAO, L.H.; WU, W.Y.; BERENBAUM, M.R. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. **Scientific Reports**. v.7, n.1, p.1-8, 2017.

LIU, G.; XUAN, N.; RAJASHEKAR, B.; ARNAUD, P.; OFFMANN, B.; PICIMBON, J.F. Comprehensive history of CSP genes: Evolution, phylogenetic distribution and functions. **Genes**. v.11, n.4, p.413, 2020.

LUO, Q-H.; GAO, J.; GUO, Y.; LIU, C.; MA, Y-Z.; ZHOU, Z-Y.; DAI, P-P.; HOU, C-S.; WU, Y-Y.; DIAO, Q-Y. Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.1-8, 2021.

MACLEAN, M.; PICARD, D. Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. **Cell stress & chaperones**. v.8, n.2, p.114, 2003.

MAGGI, F.; LA CECILIA, D.; TANG, F.H.; MCBRATNEY, A. The global environmental hazard of glyphosate use. **Science of the Total Environment**. v.717, p.137167, 2020.

MATSUMURA, Y.; TO, T.K.; KOHNO, H.; KAKUTANI, T.; KUBO, T. Mblk-1/E93, an ecdysone related-transcription factor, targets synaptic plasticity-related genes in the honey bee mushroom bodies. PREPRINT (Version 1), **Research Square**, 2022.

MAYACK, C.; RÜKÜN, T.; ERCAN, N.; CANKO, E.; AVŞAR, B.; DYER, A.; GARCIA, J.; ÇAKMAK, İ. Sub-lethal pesticide exposure erases colour vision memory and affects flower constancy in foraging honey bees. PREPRINT (Version 1), **Research Square**, 2021.

MOTTA, E.V.S.; RAYMANN, K.; MORAN, N.A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **PNAS**. v.115, n.41, p.10305-10310, 2018.

MOTTA, E.V.S.; MORAN, N.A. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. **mSystems**. v.5, n.4, e00268-20, 2020.

MOTTA, E.V., MAK, M.; DE JONG, T.K.; POWELL, J.E.; O'DONNELL, A.; SUHR, K.J.; RIDDINGTON, I.M.; MORAN, N.A. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n.18, p.e01150-20, 2020.

MOTTA, E.V.S.; POWELL, J.E.; MORAN, N.A. Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees. **Animal microbiome**: v.4, n.1, p.1-14, 2022.

PAUL, R.K.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Expression of two ecdysteroid-regulated genes, Broad-Complex and E75, in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Zoological science**. v.23, n.12, p.1085-1092, 2006.

PENG, I-F.; WU, C-F. *Drosophila cacophony* channels: a major mediator of neuronal Ca^{2+} currents and a trigger for K^{+} channel homeostatic regulation. **Journal of Neuroscience**. v.27, n.5, p.1072-1081, 2007.

REINHARD, J.; CLAUDIANOS, C. Molecular Insights into Honey Bee brain plasticity. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee neurobiology and behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media, p. 359-372, 2012.

REISSNER, C.; RUNKEL, F.; MISSLER, M. Neurexins. **Genome biology**. v.14, n.9, p.1-15, 2013.

RICHMOND, M.E. Glyphosate: a review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies and Sciences**. v.8, n.4, p.416-434, 2018.

ROAT, T.C.; DOS SANTOS-PINTO, J.R.A.; SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.S. 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. DOI 10.1007/s10646-014- 1305-8

RODRIGUES, S.P.; DA SILVA, J.C.I.; DE OLIVEIRA, T.C.; DA SILVA, L.I.; MENEZES, N.C. O papel da microbiota bacteriana intestinal de abelhas eussociais: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v.10, n.14, p.e30101421623-e30101421623, 2021.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K.A.G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological Conservation**. v.232, p.08-27, 2019.

SHI, T.F.; WANG, Y.F.; LIU, F.; QI, L.; YU, L.S. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**. v.110, n.6, p.2283-2289, 2017.

TAKAYANAGI-KIYA, S.; KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Mblk-1 transcription factor family: its roles in various animals and regulation by NOL4 splice variants in mammals. **International journal of molecular sciences**. v.18, n.2, p.246, 2017.

TAN, S.; LI, G.; LIU, Z.; WANG, H.; GUO, X.; XU, B. Effects of glyphosate exposure on honeybees. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.90, p.103792, 2022.

THOMPSON, H.M.; HUNT, L.V. Extrapolating from Honeybees to Bumblebees in Pesticide Risk Assessment. **Ecotoxicology**: v.8, p.147-166, 1999.

VÁZQUEZ, D.E.; ILINA N.; PAGANO E.A.; ZAVALA, J.A.; FARINA, W.M. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. **PLoS ONE**. v.13, n.10, e0205074, 2018.

VÁZQUEZ, D.E.; BALBUENA, M.S.; CHAVES, F.; GORA, J.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. **Scientific Reports**. v.10, 2020a.

VÁZQUEZ, D.E.; LATORRE-ESTIVALIS, J.M.; ONS, S.; FARINA, W.M. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**. v.261, 2020b.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**. v.10, n.1, p.57-63, 2009.

WU, Y.; ZHENG, H.; CORONA, M.; PIRK, C.; MENG, F.; ZHENG, Y.; HU, F. Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions. **Scientific reports**. v.7, n.1, p.1-10, 2017.

XU, P.J.; XIAO, J.H.; XIA, Q.Y.; MURPHY, B.; HUANG, D.W. *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. **Insect molecular biology**. v.19, n.4, p.593-597, 2010.

ZALUSKI, R.; KADRI, S.M.; ALONSO, D.P.; RIBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. 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.

ZHAO, H.; LI, G.; GUO, D.; WANG, Y.; LIU, Q.; GAO, Z.; WANG, H.; LIU, Z.; GUO, X.; XU, B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. **Science of The Total Environment**. v.744, p.140819, 2020.

ANEXOS

Anexo 1. Qualidade dos dados de sequenciamento do RNA representada em porcentagem e número de reads. Todas as amostras de cada tratamento tiveram reads que foram classificados como Ambiguous (se ligaram em dois locais do genoma de referência), Feature (se ligaram em um local específico do genoma), No Feature (não se ligaram a nenhum local do genoma), e Low Quality (tiveram baixa qualidade no sequenciamento).

Sample	Ambiguous	Feature	No Feature	Low Quality
Gly-CTL1-IG1	0.9% (4712)	78.4% (402027)	16.7% (85425)	4.1% (20893)
Gly-CTL1-IG2	0.9% (1684)	73.9% (140836)	21.4% (40773)	3.9% (7410)
Gly-CTL1-IG3	1.1% (6628)	72.8% (454839)	20.1% (125528)	6.1% (37842)
Gly-CTL1-IG4	1% (5587)	72.8% (412909)	19.6% (110895)	6.7% (37838)
Gly-CTL4-IG1	1.1% (6693)	67.5% (420719)	22.7% (141210)	8.7% (54258)
Gly-CTL4-IG2	1.1% (5898)	71.1% (398371)	21% (117944)	6.9% (38417)
Gly-CTL4-IG3	1% (613275)	71.2% (43645890)	21.4% (13101723)	6.4% (3933732)
Gly-CTL4-IG4	1% (4950)	67.8% (331854)	23.6% (115648)	7.6% (37324)
Gly1-IG50-1	0.9% (10126)	78.4% (846628)	11.8% (127364)	8.9% (95862)
Gly1-IG50-2	1% (8485)	73.7% (600696)	18.5% (150528)	6.9% (55871)
Gly1-IG50-3	1% (9510)	72.7% (674626)	18.6% (172617)	7.7% (71576)
Gly1-IGSUB-1	0.9% (7375)	79.4% (671812)	11% (92686)	8.7% (73863)
Gly1-IGSUB-2	1% (8929)	73.1% (633412)	18.5% (160486)	7.4% (63853)
Gly1-IGSUB-4	0.8% (5058)	76.8% (486832)	12% (75813)	10.4% (66123)
Gly4-IG50-1	0.8% (5051)	76.5% (472971)	12.7% (78633)	10% (61742)
Gly4-IG50-2	0.9% (5632)	71.8% (439295)	18.3% (111904)	9% (54801)
Gly4-IG50-3	0.9% (11209)	71.8% (920840)	15.8% (202907)	11.5% (147117)
Gly4-IG50-4	1% (12389)	71.4% (901646)	17.9% (226364)	9.8% (123268)
Gly4-IGSUB-1	0.8% (8037)	64.2% (668360)	16.1% (167887)	18.9% (196898)
Gly4-IGSUB-2	0.7% (5517)	75.6% (577125)	12.4% (94718)	11.2% (85781)
Gly4-IGSUB-3	0.9% (12627)	68.9% (1009533)	15.5% (226878)	14.8% (217187)
Gly4-IGSUB-4	0.8% (5456)	76.3% (496454)	9.7% (62934)	13.2% (85532)

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

O uso de herbicidas é amplamente utilizado no planeta e muito se discute sobre seus efeitos em animais não alvo. Dentre estes, as abelhas estão sujeitas ao contato com o herbicida em suas atividades de colheita de recursos, seja por exposição por contato ou por ingestão de alimento contaminado.

Embora trabalhos de literatura tenham evidenciado seu efeito em abelhas do gênero *Apis*, estudos relacionados a expressão gênica são escassos. Neste trabalho avaliamos os efeitos da exposição aguda a duas doses do glifosato e evidenciamos alterações em importantes vias das abelhas, utilizando tecido cerebral. Estes efeitos demonstraram que a exposição ao glifosato pode afetar o sistema cognitivo, interferindo desta forma nas atividades de forrageamento, além de afetar a microbiota e a imunidade das abelhas.

Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas das abelhas ao estresse causado pela exposição à agrotóxicos e, com isso, reforçam a necessidade de maiores estudos e avaliações na liberação de agrotóxicos, uso racional de comercialização, em específico do herbicida glifosato, visto que a apicultura ainda carece de políticas públicas de proteção às abelhas e aos serviços que prestam, beneficiando o meio ambiente e a sociedade de modo geral.

Aqui, avaliamos o efeito de exposição de uma e quatro horas, consideradas agudas. Entretanto, se faz necessário o estudo do efeito crônico, quando o alimento contaminado é armazenado na colmeia. Além disso, estudos futuros podem ser realizados em outras espécies de abelhas utilizando este mesmo modelo de pesquisa, com o intuito de se verificar se as demais abelhas também respondem ao glifosato da mesma forma que os resultados encontrados no presente estudo. Outra proposta interessante é repetir esse trabalho em campo, tornando os resultados mais realísticos, ou até mesmo confirmando de tal forma os resultados encontrados neste em laboratório.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, sugere-se que sejam realizados experimentos utilizando-se de mais horas de exposição, supondo principalmente os efeitos a longo prazo. Outra sugestão que pode ser dada é em relação ao tecido alvo de estudo, pois diferentes genes podem ser encontrados em outros tecidos das abelhas nestas mesmas condições de experimento, como por exemplo o intestino, onde estão localizadas enzimas digestivas, antioxidantes, entre outras, que são interessantes e importantes na resposta das abelhas à agentes estressores, podendo causar consequências no seu desenvolvimento.