

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/01/2024

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until January 18, 2024

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

**EFEITO DA DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE DO FUNGICIDA
PIRACLOSTROBINA NO TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* L.**

DANIEL DIEGO MENDES

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para o título de
Mestre.

**BOTUCATU – SP
2022**

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

**EFEITO DA DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE DO FUNGICIDA
PIRACLOSTROBINA NO TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* L.**

DANIEL DIEGO MENDES

Orientador: Prof. Assoc. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Co-orientador: Prof. Dr. Samir Moura Kadri

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para o título de
Mestre.

**BOTUCATU– SP
2022**

M538e Mendes, Daniel Diego
Efeito da dose ambientalmente relevante do fungicida
piraclostrobina no transcriptoma de abelhas *Apis mellifera* L / Daniel
Diego Mendes. -- Botucatu, 2022
62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Samir Moura Kadri

1. Agrotóxicos. 2. Expressão gênica. 3. Transcriptoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Daniel Diego Mendes, nascido em 24 de junho de 1996, na cidade de São Paulo, filho de Francisco Dyonisio Cardoso Mendes e Vânia Haddad Diego, ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, em abril de 2014 e graduou-se em dezembro de 2019. Em março de 2020 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia da UNESP -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0244634392946473>

E-mail: d.mendes@unesp.br

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente, aos meus pais: Francisco Dyonisio Cardoso Mendes e Vania Haddad Diego, por terem me dado à vida, e muito mais do que isso me ensinaram, que independente da dificuldade que apareça um homem tem que manter os seus valores.

E todos os amigos e familiares que foram primordiais ao longo da minha pós-graduação, me dando motivação e sendo meu esteio nos momentos difíceis que encontrei ao longo desse caminho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao professor Dr. Ricardo de Oliveira Orsi e ao Dr. Samir Moura Kadri, os quais me ajudaram a me encontrar profissionalmente e despertar minha paixão pelo mundo da apicultura. E por terem me apoiado de diversas formas ao longo da minha pós-graduação e darem todo suporte para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de estudar em um programa de excelência, ao grupo de estudo NECTAR (Núcleo de ensino, ciência e tecnologia em apicultura racional) aonde aprendi abundantemente e tenho muito orgulho de fazer parte.

A presente pesquisa foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, desta forma também agradeço a CAPES pela oportunidade.

*“Cada dia te convencerás um pouco mais, que os
animais são menos estúpidos do que dizem, ao contrário
dos homens”*

(Constancio Vigil)

RESUMO GERAL

As abelhas são organismos essenciais para manter o equilíbrio de ecossistemas naturais, e aumentar a produtividade em muitas culturas agrícolas, e também ajudam a gerar renda para milhares de famílias, por meio da produção de produtos apícolas (mel, pólen, própolis entre outros). No entanto apesar da sua importância ser conhecida existe uma crescente preocupação com a redução global de polinizadores nativos e abelhas melíferas no mundo, sendo um dos principais fatores responsáveis por esse fenômeno, a contaminação do meio ambiente por agrotóxicos. No presente trabalho avaliou-se o efeito da ingestão da dose ambientalmente relevante (DAR) do fungicida piraclostrobina (Comet®), em abelhas *Apis mellifera* na fase de campeiras. Para isso foram marcadas abelhas recém-emergidas e reintroduzidas às suas respectivas colônias. Após 21 dias, estas foram coletadas e distribuídas em dois tratamentos: controle e piraclostrobina. Logo em seguida, as abelhas foram mantidas em jejum por três horas para esvaziar a vesícula nectarífera, sendo oferecido o alimento contaminado ou não, com o fungicida piraclostrobina na DAR de 850 ppb/abelha. Após uma e quatro horas de exposição, essas abelhas foram coletadas para a análise do transcriptoma cerebral. Constatou-se por meio da análise das mudanças na expressão gênica, que o fungicida piraclostrobina afeta abelhas *Apis mellifera*, acarretando em diversas alterações como: desregulação do metabolismo da glicose e da respiração celular, homeostase do hormônio insulina e hormônio juvenil e ativação do sistema antioxidante.

Palavras-chave: abelhas; agrotóxicos; expressão gênica;

ABSTRACT

Bees are essential organisms to maintain the balance of natural ecosystems, and increase productivity in many agricultural crops, and they also help generate income for thousands of families, through the production of bee products (honey, pollen, propolis, among others). However, despite its importance being known, there is a growing concern about the global reduction of native pollinators and honey bees in the world, being one of the main factors responsible for this phenomenon, the contamination of the environment by pesticides. In the present work, the effect of ingestion of the environmentally relevant dose (DAR) of the fungicide pyraclostrobin (Comet®) was evaluated in *Apis mellifera* bees in the field stage. For this, newly emerged bees were marked and reintroduced to their respective colonies. After 21 days, they were collected and distributed in two treatments: control and pyraclostrobin. Soon after, the bees were fasted for three hours to empty the nectariferous vesicle, being offered the contaminated food or not, with the fungicide pyraclostrobin in the DAR of 850 ppb/bee. After one and four hours of exposure, these bees were collected for brain transcriptome analysis. It was found, through the analysis of changes in gene expression, that the fungicide pyraclostrobin affects *Apis mellifera* bees, causing several changes such as: dysregulation of glucose metabolism and cellular respiration, homeostasis of the hormone insulin and juvenile hormone and activation of the antioxidant system.

Keywords: bees; pesticides; gene expression

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de <i>Apis mellifera</i> (a- Zangão, b- Rainha, c- Operária).....	12
Figura 2. Piraclostrobina e seus principais metabólitos. .	19
Figura 3. Modo de ação de fungicidas inibidores da respiração mitocondrial.....	20

CAPÍTULO II - FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDO CEREBRAL DE ABELHAS *Apis mellifera* L.

Figura 1. Análise de componentes principais (PCA), método de agrupamento usando o conjunto completo de dados de expressão de registro de todas as replicas para duas condições: grupo experimental Controle (C) e Piraclostrobina (P).	39
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA AFETA A EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDO CEREBRAL DE ABELHAS *Apis mellifera* L.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos no transcriptoma do tecido cerebral da <i>Apis mellifera</i>	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DAR	Dose ambientalmente relevante
DL ₅₀	Dose letal média
µL	Microlitro
ppb	Partes por bilhão
µg	Micrograma
i.a	Ingrediente ativo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1. Noções básicas sobre as abelhas <i>Apis mellifera</i>	2
2. Importância da abelha <i>Apis mellifera</i>	5
3. Efeitos dos Agrotóxicos nas abelhas <i>Apis mellifera</i>	6
4. Fungicida piraclostrobina e seus efeitos em abelhas	9
5. Transcriptoma	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO II - FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDO CEREBRAL DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L.	25
Resumo.	26
Abstract	26
Introdução	27
Material e métodos	28
Resultados e Discussão	29
Conclusão	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO III - IMPLICAÇÕES.....	48

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Noções básicas sobre as abelhas *Apis mellifera*

No período Cretáceo Inferior, entre 100 e 120 milhões de anos atrás, com o aparecimento das plantas angiospermas, muitos insetos mudaram o seu hábito alimentar; entre eles um grupo de vespas (família Sphecidae) abandonou totalmente o hábito predatório, substituindo a alimentação de procedência animal pela vegetal, dando origem das abelhas (Michener, 1974; Cappellari et al., 2013; Gupta, 2014). Essa mudança gerou um mutualismo entre planta e inseto, no qual as plantas forneciam alimento por meio do néctar (alimento energético) e pólen (alimento proteico), e em troca as abelhas e outros insetos polinizadores ajudavam na reprodução das espécies vegetais, através da transferência de grãos de pólen (gameta masculino das plantas), para o estigma (parte do aparelho reprodutor feminino), da mesma flor (autopolinização) ou de uma outra flor da mesma espécie (polinização cruzada) (Bronstein et al., 2006; Rech et al., 2014; Ollerton et al., 2021).

Existem atualmente mais de 25.000 espécies de abelhas já descritas, sendo a maioria das espécies solitárias e apenas uma pequena parte são eusociais e produzem mel (Danforth, 2007; Gupta, 2014), dentre as quais se encontra a espécie *Apis mellifera* (Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Família: Apidae). As abelhas do gênero *Apis* são oriundas do noroeste da África ou do Oriente Médio, sendo encontradas amplamente distribuídas no mundo (Ruttner et al., 1978 ; Franck et al., 2001; Winston, 2003).

As abelhas *Apis mellifera* apresentam complexa organização social, divididas em castas, representadas em condições naturais, por uma rainha, milhares de operárias e centenas de zangões (Figura 1) (Seeley, 1995; Page e Peng, 2001).

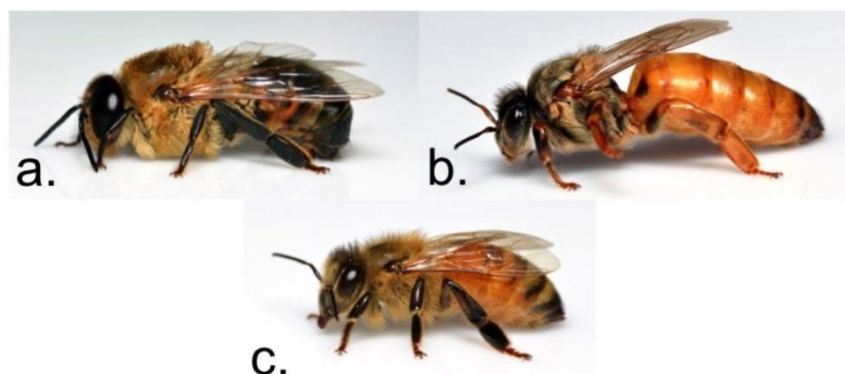


Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de *Apis mellifera* (a- Zangão, b- Rainha, c- Operária). Fonte: <http://blogs.ifas.ufl.edu/edis/2015/12/02/the-social-organization-of-honey-bees/>.

As operárias possuem suas funções ligadas com seu desenvolvimento fisiológico ou necessidade da colônia. Entre o 1º e 3º dia de vida realizam a limpeza na colônia e são denominadas “faxineiras”. Entre o 4º e 12º dia alimentam as larvas e produzem a geleia real, sendo denominadas “nutrizes”. Entre o 13º e 18º dia, produzem cera e constroem os favos, sendo conhecidas como “engenheiras”. Entre o 19º e 20º dia são “guardiãs”, ficando no alvado (entrada da colmeia) defendendo seu território. Após os 21 dias de idade são denominadas “campeiras”, tendo como função principal buscar recursos como: resinas, pólen, néctar e água, os quais são recursos essenciais para a manutenção da colônia e para a produção apícola (Danforth, 2007; Gupta, 2014).

A única fêmea fértil da colônia é a rainha, sendo responsável pela oviposição na qual as fêmeas são geradas a partir de ovos fecundados (diplóides) e os machos de óvulos não fecundados (haplóides), e também por manter a ordem social, através da emissão de feromônios. Após sua emergência, a rainha realiza geralmente um único voo nupcial, onde é fecundada em média por 12 zangões, que preenchem com sêmen uma estrutura denominada espermateca (reservatório de espermatozóides), para ser utilizado durante toda sua vida produtiva (Seeley et al., 1995).

O número de zangões na colônia varia de acordo com a disponibilidade de recursos na natureza, pois não possuem função específica com relação à execução de tarefas dentro da colônia, sendo sua única função assim que atingem a maturidade sexual com cerca de 18 dias de vida, a de fecundar a abelha princesa (rainha virgem), logo após a cópula perdem seu órgão reprodutor e morrem por perda de hemolinfa (Page e Peng, 2001).

O homem deu início à exploração dos produtos fornecidos pelas abelhas há milhares de anos, com relatos de pinturas rupestres representando a extração do mel de maneira primitiva, em diversas partes do mundo, como no pequeno abrigo de ToghawanaDam, no Zimbábue – África, datada com aproximadamente 10.000 anos ou na Caverna das Aranhas, em Valência – Espanha, datada com aproximadamente 6.000 a.C (Crane, 1999).

Após muitos anos da extração do mel de forma extrativista e primitiva, o homem iniciou o processo de criação de abelhas em colmeias (de argila, palha ou madeira), principalmente no Egito Antigo e passou a criar os enxames em locais específicos (apiários) a fim de facilitar o manejo (Crane, 1999). No decorrer dos anos, com o desenvolvimento dos conhecimentos apícolas e surgimento de diferentes técnicas para criação de abelhas ao redor do mundo, houve um invento que revolucionou a apicultura. Em 1851, o americano Lorenzo Lorain Langstroth desenvolveu a colmeia de madeira com dimensões apropriadas e quadros móveis, que permite a inspeção de todos os favos da colmeia sem danificá-los. Neste modelo, utilizava o “espaço abelha” – um espaço livre entre 4,8 e 9,5 mm em todas as partes da colmeia que permite a circulação das abelhas, impedindo a construção de favos fora dos quadros facilitando o manejo. A colmeia padrão Langstroth, é utilizada atualmente como referência na apicultura mundial (Crane, 1999).

No Brasil, a primeira introdução de abelhas europeias foi da subespécie *A. mellifera mellifera* em 1839, quando colônias foram importadas para o Rio de Janeiro e, posteriormente, foram introduzidas no Sul do país abelhas *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera carnica* e *A. mellifera caucasica*, disseminando a espécie por grande parte do território nacional (Wiese, 2005).

Em 1956, foram importadas pelo pesquisador Warwick Estevam Kerr, abelhas rainhas africanas (*A. mellifera scutellata*), com o objetivo de melhorar a produção das colônias, devido à baixa produtividade das abelhas europeias, que não se adaptaram bem ao país. Porém em 1957, 26 enxames de abelhas africanas escaparam, e iniciou-se o processo de cruzamentos com as subespécies europeias, dando origem a um híbrido fértil, chamado de abelha africanizada (Kerr, 1967).

A abelha *A. mellifera* africanizada, apresenta características predominantes das abelhas africanas, como alta defensividade e rusticidade, e se adaptou muito bem as condições climáticas e florísticas do Brasil, sendo encontrada em quase todo território nacional (De Jong, 1996; Pinto et al., 2005).

O gene helicase domino (LOC413341), medeia a troca dependente de ATP da histona H2AV não modificada por sua forma fosforilada e acetilada, implicando na regulação genética ao nível de modificação da cromatina e remodelagem do nucleossomo (RUHF et al., 2001). Ogawa et al., (2003) sugeriram que um complexo de remodelação de cromatina dependente de ATP contendo a helicase domino interage com o domínio dedo de zinco (C2H2) para regular a expressão gênica.

O gene segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3 (LOC409050), desempenha um papel central na propagação sinalização celular, portanto pode afetar vários processos de desenvolvimento de uma célula (Sharma et al., 2018). Estudos de nocaute do DVL-3 sugerem que este gene é essencial para o desenvolvimento do tubo neural (Etheridge et al., 2008). Foi demonstrado em neurônios que a redução da regulação do DVL reduziu a formação de axônio, enquanto a superexpressão do DVL induziu a formação de múltiplos axônios, indicando que o DVL é necessário para a diferenciação do axônio em neurônios (Zhang et al., 2007). Portanto a baixa regulação desse gene, pode indicar que a piraclostrobina afetou negativamente a atividade de neurônios no tecido cerebral.

O gene piezo-type mechanosensitive ion channel component (LOC408427), apresentou baixa expressão, este gene está relacionado com um canal mecanossensível necessário para adaptar rapidamente correntes ativadas mecanicamente. As proteínas piezo são subunidades formadoras de poros de canais iônicos que se abrem em resposta a estímulos mecânicos, permitindo que íons carregados positivamente, fluam para a célula, modulando respostas celulares (Kim et al., 2012; Delmas et al., 2013).

Os genes identificados LOC113218789, LOC102655788 e LOC408608 foram upregulated para as abelhas expostas a piraclostrobina, sugerindo futuros estudos de suas funções em abelha *Apis mellifera*.

Conclusão

Portanto o presente trabalho constatou por meio da análise das mudanças na expressão gênica, que o fungicida piraclostrobina afeta abelhas *Apis mellifera*, acarretando em diversas alterações como: desregulação do metabolismo da glicose e da respiração celular, homeostase do hormônio insulina e hormônio juvenil e ativação do sistema antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, A.C.; DOMINGUES, C.E.D.C.; COSTA, M.J.; SILVA-ZACARIN, E.C. M. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees?. **Journal of Apicultural Research**, v.59, n.5, p. 834-843, 2020.

BERENBAUM, M.R.; JOHNSON, R.M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current opinion in insect science**, v.10, p.51-58, 2015.

BONETTI, A.M.; da CRUZ-LANDIM, C.; KERR, W.E. Sex determination in bees XXX. Effects of juvenile hormone on the development of tergal glands in *Melipona*. **Journal of Apicultural Research**, v.33, n.1, p.11-14, 1994.

CULLEN, M.G.; THOMPSON, L.J.; CAROLAN, J.C.; STOUT, J.C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **PloS one**, v.14, n.12, p.e0225743, 2019.

DA COSTA DOMINGUES, C.E.; INOUE, L.V.B.; DA SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. **Environmental Pollution**, v.266, p.115267, 2020.

DA COSTA DOMINGUES, C.E.; INOUE, L.V.B.; DA SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.206, p.111395, 2020.

DELMAS, P., COSTE, B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. **Cell**, v.155, n.2, p.278-284, 2013.

DENECKE, S.M.; DRIVA, O.; LUONG, H.N.B.; IOANNIDIS, P.; LINKA, M.; NAUEN, R.; GEIBEL, S.; VONTAS, J. The Identification and Evolutionary Trends of the Solute Carrier Superfamily in Arthropods. **Genome biology and evolution**, v.12, n. 8, p.1429-1439, 2020.

DESALVO, M.K.; HINDLE, S.J.; RUSAN, Z.M.; ORNG, S.; EDDISON, M.; HALLIWILL, K.; BAINTON, R.J. The *Drosophila* surface glia transcriptome: evolutionary conserved blood-brain barrier processes. **Frontiers in neuroscience**, v.8, p.346, 2014.

DOMINGUES, C.E.; TADEI, R.; INOUE, L.V.B.; DA SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Effects of larval exposure to the fungicide pyraclostrobin on the post-embryonic development of Africanized *Apis mellifera* workers. **Environmental Advances**, v.4, p.100069, 2021.

ERBAN, T.; JEDELSKY, P.L.; TITERA, D. Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. **Apidologie**, v.44, n.4, p.404-418, 2013.

ETHERIDGE, S.L., RAY, S., LI, S., HAMBLET, N.S., LIJAM, N., TSANG, M., WYNshaw-BORIS, A. Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. **PLoS genetics**, v.4, n.11, p.e1000259, 2008.

FREEMAN, M.R.; DELROW, J.; KIM, J.; JOHNSON, E.; DOE, C.Q. Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. **Neuron**, v.38, n.4, p.567-580, 2003.

GHINI, R; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GIROLAMI, V.; MAZZON, L.; SQUARTINI, A.; MORI, N.; MARZARO, M.; DI BERNARDO, A.; GREATTI, M.; GIORIO, C.; TAPPARO, A. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of

intoxication for bees. **Journal of Economic Entomology**, v.102, n.5, p.1808-1815, 2009.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v.347, n. 6229, p.1255-1257, 2015.

GRASSL, J.; HOLT, S.; CREMEN, N.; PESO, M.; HAHNE, D.; BAER, B. Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. **Journal of invertebrate pathology**, v.159, p.78-86, 2018.

GREGORC A.; BOWEN I.D. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, Amitraz and Oxytetracycline. **Cell biology international**, v.24, n.5, p.319-324, 2000.

GREGORC, A.; ALBURAKI, M.; RINDERER, N.; SAMPSON, B.; KNIGHT, P.R.; KARIM, S.; ADAMCZYK, J. Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.1-13, 2018.

HEIZMANN, C.W.; HUNZLKER, W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. **Trends in biochemical sciences**, v.16, p.98-103, 1991.

HOLLENBECK, P.J.; SAXTON, W.M. The axonal transport of mitochondria. **Journal of cell science**, v.118, n.23, p.5411-5419, 2005.

IUCHI, S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v.58, n.4, p.625-635, 2001.

IVANINA, T., BLUMENSTEIN, Y., SHISTIK, E., BARZILAI, R., DASCAL, N. Modulation of L-type Ca²⁺ channels by Gβγ and calmodulin via interactions with N and C termini of α1C. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.51, p.39846-39854, 2000.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual Review Entomology**, v.60, p.415-434, 2015.

KIM, S.E., COSTE, B., CHADHA, A., COOK, B., PATAPOUTIAN, A. The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception. **Nature**, v.483, n.7388, p.209-212, 2012.

KOSMAN, D.J. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.15, n.1, p.15-28, 2010.

KUNIEDA, T.; FUJIYUKI, T.; KUCHARSKI, R.; FORET, S.; AMENT, S.A.; TOTH, A.L.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; KAMIKOUCHI, A.; KAGE, E.; MORIOKA, M.; BEYE, M.; KUBO, T.; ROBINSON, G. E.; MALESZKA, R. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. **Insect molecular biology**, v.15, n.5, p.563-576, 2006.

LIU, S.; GONG, Z.J.; RAO, X.J.; LI, M. Y.; LI, S.G. Identification of putative carboxylesterase and glutathione S-transferase genes from the antennae of the *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Science**, v.15, n.1, 2015.

LIU, S.; GONG, Z.J.; RAO, X.J.; LI, M.Y.; LI, S.G. Identification of putative carboxylesterase and glutathione S-transferase genes from the antennae of the *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Science**, v.15, n.1, 2015.

MA, M.; JIA, H.; CUI, X.; ZHAI, N.; WANG, H.; GUO, X.; XU, B. Isolation of carboxylesterase (esterase FE4) from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative resistance during adverse environmental stress. **Biochimie**, v.144, p.85-97, 2018.

MACKERT, A.; DO NASCIMENTO, A.M.; BITONDI, M.M.G.; HARTFELDER, K.; SIMÕES, Z.L.P. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L.—expression analysis and functional assays. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.150, n.1, p.33-44, 2008.

MANDILARAS, K.; MISSIRLIS, F. Genes for iron metabolism influence circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. **Metalomics**, v.4, n.9, p.928-936, 2012.

MAO, W.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.22, p.8842-8846, 2013.

MILLER, K.E.; SHEETZ, M.P. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. **Journal of cell science**, v.117, n.13, p.2791-2804, 2004.

NECKAMEYER, W.S., LEAL, S.M. Biogenic amines as circulating hormones in insects. In: **Hormones, brain and behavior**. Academic Press, p.141-165. 2002.

NEER, E.J.; SCHMIDT, C.J.; NAMBU DRIPAD, R.; SMITH, T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, v.371, n.6495, p.297-300, 1994.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F.E.; DE JONG, D.; BIZERRA, P.F.V.; TAVARES, M.A.; BELLINI, W.C.; VICENTE, E.F.; DE CARVALHO, A. Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.39, n.6, p.1267-1272, 2020.

NIE, H.; XU, S.; XIE, C.; GENG, H.; ZHAO, Y.; LI, J.; HUANG, W.; LIN, Y.; LI, Z.; SU, S. Comparative transcriptome analysis of *Apis mellifera* antennae of workers performing different tasks. **Molecular genetics and genomics**, v.293, n.1, p.237-248, 2018.

OGAWA, H., UEDA, T., AOYAMA, T., ARONHEIM, A., NAGATA, S., FUKUNAGA, R. A SWI2/SNF2-type ATPase/helicase protein, mDomino, interacts

with myeloid zinc finger protein 2A (MZF-2A) to regulate its transcriptional activity. **Genes to Cells**, v.8, n.4, p.325-339, 2003.

OSBORNE, R.H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. **Pharmacology & therapeutics**, v.69, n.2, p.117-142, 1996.

PATEL, V.; PAULI, N.; BIGGS, E.; BARBOUR, L.; BORUFF, B. Why bees are critical for achieving sustainable development. **Ambio**, v.50, n.1, p.49-59, 2021.

PEREIRA, N.C.; DINIZ, T.O.; TAKASUSUKI, M.C.C.R. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n.7, p.142-152, 2020.

PETTIS, J.S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v.8, n.7, p. e70182, 2013.

PIECHOWICZ, B.; WOŚ, I.; PODBIELSKA, M.; GRODZICKI, P. The transfer of active ingredients of insecticides and fungicides from an orchard to beehives. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v.53, n.1, p.18-24, 2018.

PILLING, A.D.; HORIUCHI, D.; LIVELY, C.M.; SAXTON, W.M. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. **Molecular biology of the cell**, v.17, n.4, p.2057-2068, 2006.

REILLY, J.R.; ARTZ, D.R.; BIDDINGER, D.; BOBIWASH, K.; BOYLE, N.K.; BRITTAIN, C.; BROKAW, J.; CAMPBELL, J.W.; DANIELS, J.; ELLE, E.; ELLIS, J. D.; FLEISCHER, S. J.; GIBBS, J.; GILLESPIE, R. L.; GUNDERSEN, K. B.; GUT, L.; HOFFMAN, G.; JOSHI, N.; LUNDIN, O.; MASON, K.; MCGRADY, C.M.; PETERSON, S.S.; PITTS-SINGER, T. L.; RAO, S.; ROTHWELL, N.; ROWE, L.; WARD, K.L.; WILLIAMS, N. M.; WILSON, J.K.; ISAACS, R.; WINFREE, R. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. **Proceedings of the**

Royal Society B, v.287, n.1931, p.20200922, 2020.

ROAT, T.C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. Tese de doutorado - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2008.

ROAT, T.C.; DOS SANTOS-PINTO, J.R.A.; DOS 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.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.36, n.12, p.2463-2472, 2004.

RUBÍ, B., LJUBICIC, S., POURNOURMOHAMMADI, S., CAROBBIO, S., ARMANET, M., BARTLEY, C., MAECHLER, P. Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.44, p.36824-36832, 2005.

RUHF, M.L., BRAUN, A., PAPOULAS, O., TAMKUN, J.W., RANDSHOLT, N., MEISTER, M. The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. **Development**, v.128, n.8, p.1429-1441, 2001.

SALLES, H.C.; CRUZ-LANDIM, C. Efeito do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento da glândula mandibular em pupas de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.64, p.691-695, 2004.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K.A. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v.232, p.8-27, 2019.

SCHMEHL, D.R.; TEAL, P.E.; 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.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P.; BORTOLOTTI, L.; RENZI, M.T.; TOSI, S.; BOGO, G.; TEPER, D.; PORRINI, C.; HORAS-MOLOWNY, R.; BOSCH, J. Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. **Pest Management Science**, v.73, n.6, p.1236-1243, 2017.

SHARMA, M., CASTRO-PIEDRAS, I., SIMMONS JR, G.E., PRUITT, K. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. **Cellular signalling**, v.47, p.52-64, 2018.

SHEFTEL, A.D.; STEHLING, O.; PIERIK, A.J.; NETZ, D.J.; KERSCHER, S.; ELSÄSSER, H.P.; WITTIG, I.; BALK, J.; BRANDT, U.; LILL, R. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. **Molecular and cellular biology**, v.29, n.22, p.6059-6073, 2009.

SIMON, H.U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, n.5, p.415-418, 2000.

SOLOMON, E.I.; AUGUSTINE, A.J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, n.30, p.3921-3932, 2008.

SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical reviews**, v.96, n.7, p.2563-2606, 1996.

STULL, J.T. Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.4, p.2311-2312, 2001.

TADEI, R.; DOMINGUES, C.E.; MALAQUIAS, J.B.; CAMILO, E.V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C. Late effect of larval co-exposure to the insecticide

clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v.9, n.1, p.1-11, 2019.

TOSI, S.; NIEH, J.C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto[®]), on honeybees. **Proceedings of the Royal Society B**, v.286, n.1900, p.20190433, 2019.

TUCKER, E.J.; MIMAKI, M.; COMPTON, A.G.; MCKENZIE, M.; RYAN, M.T.; THORBURN, D.R. Next-generation sequencing in molecular diagnosis: NUBPL mutations highlight the challenges of variant detection and interpretation. **Human mutation**, v.33, n.2, p.411-418, 2012.

USTIONE, A., PISTON, D.W., HARRIS, P.E. Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. **Molecular endocrinology**, v.27, n.8, p. 1198-1207, 2013.

WANG, K.; CHEN, H.; LIN, Z.G.; NIU, Q.S.; WANG, Z.; GAO, F.C.; JI, T. Carbendazim exposure during the larval stage suppresses major royal jelly protein expression in nurse bees (*Apis mellifera*). **Chemosphere**, v.266, p.129011, 2021.

WANG, K.; FAN, R.-L.; JI, W.-N.; ZHANG, W.-W.; CHEN, X.-M.; WANG, S.; YIN, L.; GAO, F.-C.; CHEN, G.-H.; JI, T. Transcriptome analysis of newly emerged honeybees exposure to sublethal carbendazim during larval stage. **Frontiers in genetics**, v.9, p.426, 2018.

WANG, X.; YIN, S.; YANG, Z.; ZHOU, B. Drosophila multicopper oxidase 3 is a potential ferroxidase involved in iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.1862, n.8, p.1826-1834, 2018.

WEILER, A.; VOLKENHOFF, A.; HERTENSTEIN, H.; SCHIRMEIER, S. Metabolite transport across the mammalian and insect brain diffusion barriers. **Neurobiology of disease**, v.107, p.15-31, 2017.

WU, Y.Y.; ZHOU, T.; WANG, Q.; DAI, P.L.; XU, S.F.; JIA, H.R.; WANG, X. Programmed cell death in the honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) worker brain induced by imidacloprid. **Journal of economic entomology**, v.108, n.4, p. 1486-1494, 2015.

XU, C.; MIN, J. Structure and function of WD40 domain proteins. **Protein & cell**, v.2, n.3, p.202-214, 2011.

YODER, J.A.; NELSON, B.W.; JAJACK, A.J.; SAMMATARO, D. Fungi and the effects of fungicides on the honey bee colony. In: **Beekeeping-From Science to Practice**. Springer, Cham, p.73-90, 2017.

ZALUSKI, R.; BITTARELLO, A.C.; VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; DE MAGALHAES PADILHA, P.; DA SILVA FERNANDES, M.; BOVI, T.S.; ORSI, R.O. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. **Scientific reports**, v.10, n.1, p.1-11, 2020.

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

ZATTARA, E.E.; AIZEN, M.A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v.4, n.1, p.114-123, 2021.

ZHANG, X., ZHU, J., YANG, G.Y., WANG, Q.J., QIAN, L., CHEN, Y.M., LUO, Z. G. Desgrenhado promove a diferenciação de axônio regulando proteínas atípicas quinase C. **Biologia celular da natureza**, v.9, n.7, p.743-754, 2007.

ZHANG, Y.Y.; GUO, X.L.; LIU, Y.L.; LIU, F.; WANG, H.F.; GUO, X. Q.; XU, B. H. Functional and mutational analyses of an omega-class glutathione S-transferase (GSTO2) that is required for reducing oxidative damage in *Apis cerana cerana*. **Insect molecular biology**, v.25, n.4, p.470-486, 2016.