

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	<p>Mendes, Daniel Diego</p> <p>Efeito da dose ambientalmente relevante do fungicida piraclostrobina no transcriptoma de abelhas <i>Apis mellifera</i> L / Daniel Diego Mendes. -- Botucatu, 2022</p> <p>62 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu</p> <p>Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi</p> <p>Coorientador: Samir Moura Kadri</p> <p>1. Agrotóxicos. 2. Expressão gênica. 3. Transcriptoma. I. Título.</p>
-------	---

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 *Apis mellifera* (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).

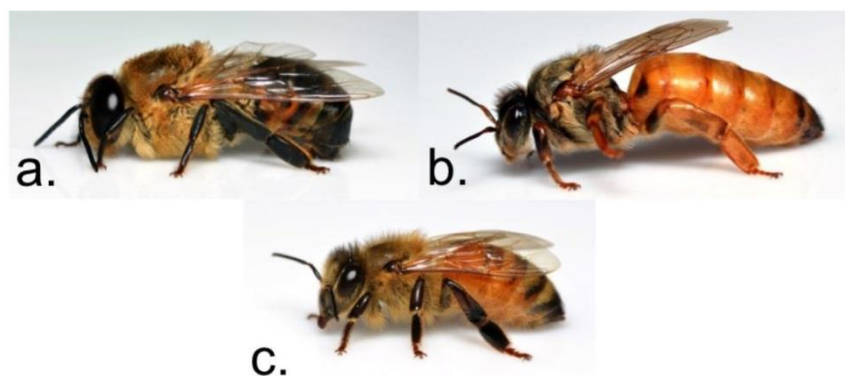


Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de *Apis mellifera* (a- Zangão, b- Rainha, c- Operária). Fonte: <http://blogs.ifas.ufl.edu/edis/2015/12/02/the-social-organization-of-honey-bees/>.

As operárias possuem suas funções ligadas com seu desenvolvimento fisiológico ou necessidade da colônia. Entre o 1° e 3° dia de vida realizam a limpeza na colônia e são denominadas “faxineiras”. Entre o 4° e 12° dia alimentam as larvas e produzem a geleia real, sendo denominadas “nutrizes”. Entre o 13° e 18° dia, produzem cera e constroem os favos, sendo conhecidas como “engenheiras”. Entre o 19° e 20° 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).

2. Importância da abelha *Apis mellifera*

A apicultura praticada de forma racional (uso de técnicas adequadas de manejo) gera renda a milhares de pessoas no mundo, por meio da produção de produtos apícolas, com propriedades nutricionais e terapêuticas, como por exemplo: o mel (alimento energético, produzido à base de néctar e enzimas salivares); o pólen (alimento rico em proteínas e vitaminas, produzido à base dos gametas masculinos das plantas); a geleia real (alimento de alto valor biológico, rico em vitaminas do complexo B), a própolis (composto de resinas vegetais, com propriedades terapêuticas), a apitoxina (oriunda de glândulas produtoras de veneno) e a cera (produzida por glândulas cerígenas). Esses produtos podem ser usados principalmente em setores industriais do ramo alimentício, farmacêutico, cosmético e têxtil (Romanova et al., 1990; Iancu et al., 2012; Sain et al., 2017).

Embora alguns fatores abióticos como o vento, ajudem na polinização de algumas espécies de plantas, são os fatores bióticos que representam os agentes mais proeminentes, com cerca de 87% das espécies de plantas com flores do mundo polinizadas por animais, sendo as abelhas responsáveis por mais da metade desse montante, portanto as abelhas são fundamentais para manter a biodiversidade e equilíbrio em ecossistemas naturais (Klein et al., 2007; Ollerton et al., 2011; Hung et al., 2018; Reilly et al., 2020; Patel et al., 2021).

Além de manter a homeostase em ambientes naturais, as abelhas são responsáveis também por aumentar a qualidade e produtividade em culturas agrícolas, com 75% das culturas agrícolas do mundo polinizadas por animais. Estimando-se com base no aumento da produtividade das safras, que os polinizadores, geram um lucro em torno de US\$ 235 a US\$ 577 bilhões anuais na agricultura mundial (Klein et al., 2007; Potts et al., 2016; Reilly et al., 2020; Jordan et al., 2021).

No Brasil entre todas as safras cultivadas, mais de 60% dependem ou se beneficiam da polinização fornecida principalmente por 250 espécies de abelhas, que contribuem num total de US\$ 12 bilhões na agricultura, com os maiores valores obtidos na soja (US \$ 5,7 bilhões), café (US\$ 1,9 bilhão), tomate (US\$ 992 milhões), algodão (US\$ 827 milhões), grãos de cacau (US\$ 533 milhões) e laranja (US\$ 522 milhões) (Giannini et al., 2015; Giannini et al., 2020).

As abelhas *A. mellifera* se destacam entre os polinizadores, por não possuírem especificidade com nenhuma espécie vegetal, com amplo raio de forrageamento e

possibilidade de serem manejadas e transportadas, podendo ser uma solução para amenizar os danos em ecossistemas com deficiência de polinizadores (Hung et al., 2018; Reilly et al., 2020).

Entretanto, apesar do reconhecimento de sua importância, diversos estudos demonstram a ocorrência de uma redução global de polinizadores nativos e de abelhas melíferas (Biesmeijer et al., 2006; Lebuhn et al., 2013; Paudel et al., 2015; Pires et al., 2016; Potts et al., 2016; Sánchez-Bayo et al., 2019; Pereira et al., 2021; Zattara et al., 2021; Patel et al., 2021), conhecido como síndrome *Colony Collapse Disorder (CCD)* ou Distúrbio do Colapso das Colônias, descrito primeiramente em 2006, nos EUA.

Entre as principais causas ligadas a este fenômeno, destacam-se a fragmentação e o desmatamento de áreas com vegetação nativa; mudanças climáticas; aparecimento e disseminação de doenças e parasitas; introdução de espécies exóticas e cultivos transgênicos e uso excessivo de agrotóxicos (Cox-Foster et al., 2007; Goulson et al., 2015; Grassl et al., 2018; Pereira et al., 2020).

3. Efeitos dos Agrotóxicos nas abelhas *Apis mellifera*

Dentre as causas citadas anteriormente, que estão causando a diminuição no número de colônias no mundo, o uso intensivo de agrotóxicos, conhecidos também como pesticidas, fitossanitários, agroquímicos ou defensivos agrícolas, é um fator que apresenta relevância (Sgolastra et al., 2017; Tosi et al., 2019).

Os agrotóxicos são definidos segundo a legislação brasileira, como: produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Brasil, 2021).

Com a intensificação da agricultura e o cultivo de extensas áreas de monoculturas, têm aumentado a incidência de pragas e doenças em cultivos agrícolas no mundo. A capacidade de muitas pragas agrícolas desenvolverem resistência em longo prazo a muitos agrotóxicos é preocupante, pois causa um ciclo vicioso que torna o uso de novos produtos cada vez mais frequente (Aktar et al., 2009; Georghiou et al., 2012; Pires et al., 2016). O uso generalizado de agrotóxicos de forma intensiva leva ao aumento do índice de contaminação no solo, ar, águas superficiais e subterrâneas,

gerando alterações na fauna e flora, provocando amplo desequilíbrio ecológico (Potts et al., 2016; Woodcock et al., 2017; Bloom et al., 2021).

A alta capacidade de forrageamento e dependência dos insetos polinizadores por recursos naturais, inclusive as abelhas melíferas, tornam esses insetos susceptíveis à exposição de agrotóxicos usados na agricultura, que acabam sendo contaminados de forma direta por contato, quando exploram áreas durante a aplicação destes produtos, ou de forma indireta por ingestão de água ou fontes de alimentos (néctar e pólen) que foram contaminados (Simon-Delso et al., 2014; Piechowicz et al., 2018).

O problema se agrava quando essas substâncias tóxicas são levadas para a colônia pelas operárias campeiras, contaminando recursos fundamentais como o mel e pólen, o qual provoca uma cascata de contaminação intra-colonial, que causa uma série de distúrbios fisiológicos e comportamentais, comprometendo a produtividade ou até levando a colônia a colapso (Fine et al., 2017).

É importante ressaltar que os agrotóxicos usados nas lavouras podem alcançar áreas fora do perímetro onde foram aplicados, devido à deriva pela ação de ventos e contaminação de águas subterrâneas e superficiais. Os agrotóxicos sistêmicos (produtos que possuem a capacidade de entrar no floema da planta) também devem ser levado em consideração, por possuírem a capacidade de entrar na cadeia solo-água-plantas, contaminando recursos em plantas nativas que crescem próximo as áreas tratadas, o que torna uma via de exposição crônica aos polinizadores (Piechowicz et al., 2018).

Outro fator relevante é o efeito residual dos produtos no ecossistema, o que causa um acúmulo de diferentes classes de agrotóxicos nos recursos essenciais para as abelhas, levando a diversos efeitos sinérgicos (Sgolastra et al., 2017; Tosi et al., 2019; Azpiazu et al., 2021; Bloom et al., 2021). A toxicidade e a persistência dos agrotóxicos após sua aplicação são específicas para cada molécula e dependem das doses utilizadas e das condições climáticas (Sánchez-Bayo et al., 2014).

Um dos parâmetros utilizados na mensuração da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas é a determinação da DL_{50} (Dose Letal Média). Esse parâmetro determina a quantidade de um ingrediente ativo (i.a.) capaz de matar 50% da população exposta por ingestão ou contato a um produto, geralmente em um período de 24 ou 48h (Devillers, 2002).

Quando os recursos coletados pelas abelhas apresentam concentrações de agrotóxicos superiores ou iguais a DL_{50} , ocorre à contaminação aguda, o que provoca mortalidade em curto espaço de tempo. Já quando as abelhas são expostas a doses sub-

letais (inferiores a DL_{50}), a alta mortalidade não é esperada; no entanto ocorrem diversos efeitos crônicos como: alterações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e neurológicas, o que compromete o bem-estar e a manutenção das colônias (Devillers, 2002; Johnson, 2015; Sánchez-Bayo et al., 2017).

As classes de agrotóxicos mais utilizadas no mundo são os herbicidas, inseticidas e fungicidas, que são classificados de acordo com os alvos sobre os quais atuam e pelo efeito de ação do ingrediente ativo sobre organismos-alvo (Carneiro et al., 2015).

No Brasil, a classificação toxicológica de um produto formulado é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), com base nos resultados dos estudos toxicológicos agudos, com a formulação pretendida e deve ser determinada e identificada com os respectivos nomes das categorias e cores nas faixas do rótulo dos produtos: I - Categoria 1 - Produto Extremamente Tóxico (faixa vermelha); Categoria 2 - Produto Altamente Tóxico (faixa vermelha); III - Categoria 3 – Produto Moderadamente Tóxico (faixa amarela); IV - Categoria 4 - Produto Pouco Tóxico (faixa azul); V - Categoria 5 – Produto Improvável de Causar Dano Agudo (faixa azul); e VI - Não Classificado – Produto Não Classificado (faixa verde) (Anvisa, 2019).

A obrigatoriedade de uma avaliação ambiental como requisito para o registro de agrotóxicos no Brasil passou a vigorar com a Lei Federal nº 7.802/89. A função de classificar e realizar a avaliação ambiental dos agrotóxicos, estabelecendo suas classificações quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA), é destinada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Os produtos aprovados devem ser identificados da seguinte forma: categoria I - Altamente perigoso ao meio ambiente; categoria II - Muito perigo ao meio ambiente; categoria III - Perigoso ao meio ambiente; categoria IV - Pouco perigoso ao meio ambiente (Brasil, 2021).

A classificação da PPA dos produtos usados no Brasil busca saber o seu potencial de transporte entre os diferentes compartimentos ambientais, como o ar, solo e água. Para os organismos não alvos foi adotado da seguinte forma: organismos do solo, a partir de micro-organismos e minhocas; organismos aquáticos, a partir de algas, micro crustáceos e peixes; organismos aéreos, aves e abelhas; e toxicidade sistêmica para mamíferos. No geral, os estudos de toxicidade considerados para as classificações, são estudos de toxicidade aguda, utilizando espécies de organismos internacionalmente padronizadas, no sentido de favorecer a comparação dos efeitos adversos entre os

diferentes produtos avaliados pelo IBAMA e pelas demais agências internacionais responsáveis pela avaliação de agrotóxicos (IBAMA, 2021).

4. Fungicida piraclostrobina e seus efeitos em abelhas

Os fungicidas representam uma das classes de agrotóxicos mais detectada em produtos apícolas, perdendo apenas para os acaricidas, que são aplicados diretamente nas colônias, para controle do ácaro *Varroa destructor*. Esse alto grau de contaminação dos recursos coletados pelas abelhas por fungicidas, está ligado ao fato de haver poucas restrições impostas ao produto ser aplicado no período de floração das culturas agrícolas e de muitas vezes serem usados de forma curativa ou preventiva (Pettis et al., 2013; Piechowicz et al., 2018).

A classificação dos fungicidas é geralmente baseada na natureza química e no modo de ação do produto contra o patógeno e podem ser divididos em: - Protetores: são usados para formar uma película superficial no vegetal para prevenir a germinação ou estabelecimento de esporos fúngicos. - Erradicantes: eliminam uma infecção fúngica já estabelecida. - Curativos: atenuam os sintomas ou reparam os danos provocados pelos patógenos. - Sistêmicos: os quais apresentam baixa toxicidade para os mamíferos e alta eficiência no controle de doenças fúngicas (Hahn et al., 2014).

Os fungicidas apresentam baixa toxicidade aguda para abelhas adultas, porém causam muitos problemas crônicos, como: prejudicar a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, afetar a estrutura e função da membrana celular, transdução de sinais, respiração, mitose e divisão celular (Yang et al., 2011; Johnson, 2015; Campbell et al., 2016; Yoder et al., 2017; Cullen et al., 2019; Nicodemo et al., 2020).

Além dos efeitos fisiológicos para abelhas, a contaminação da dieta por fungicidas causam alterações comportamentais ou mortalidade das crias e prejudica a manutenção de fungos benéficos, responsáveis pela preservação e digestão do pólen da colônia, reduzindo o valor nutricional desse alimento para as abelhas (Anderson et al., 2011; Engel et al., 2012; Yoder et al., 2013; Tadei et al., 2019; Ardalani et al., 2021). Alguns fungicidas podem provocar também efeito de repelência, diminuindo a atividade de forrageamento das abelhas logo após sua aplicação em uma cultura (Bajiyá et al., 2020; Bloom et al., 2021)

Dentre os fungicidas sistêmicos que possuem a capacidade de entrar no floema das plantas, contaminando o néctar, pólen e resinas, se destaca o grupo das

estrobilurinas (compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus*), onde um dos principais componentes ativo é a piraclostrobina (Figura 2) (Girolami et al, 2009; Piechowicz et al., 2018).

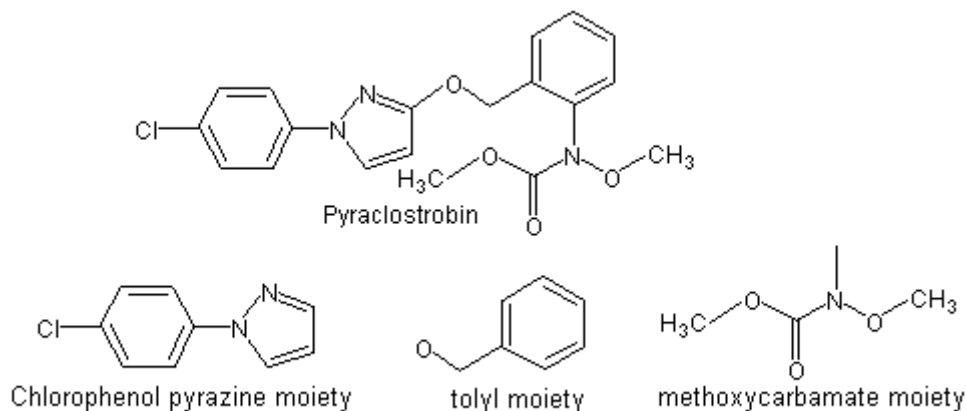


Figura 2. Piraclostrobina e seus principais metabólitos. Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2003pr10.htm#bio>.

No Brasil, existem 27 produtos com autorização para comercialização, em diversas formulações contendo a piraclostrobina, para aplicação ao combate de diversas pragas causadas por fungos, em variadas culturas como: aveia, soja, trigo, citros, café, milho, cana-de-açúcar, uva, eucalipto, cebola, tomate, cenoura, cevada, feijão, maçã, manga, mamão, banana, batata, melão, melancia, algodão, alho, amendoim, pepino, pimentão e entre outras (BRASIL, 2021).

O principal modo de ação da piraclostrobina contra fungos é através da inibição da enzima quinona oxidase (Qo1), ligando-se ao sítio Qo do citocromo b (proteína encontrada na mitocôndria de células eucarióticas) e parte do citocromo bc1 (Complexo III), impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (Ghini e Kimati, 2000) (figura 3).

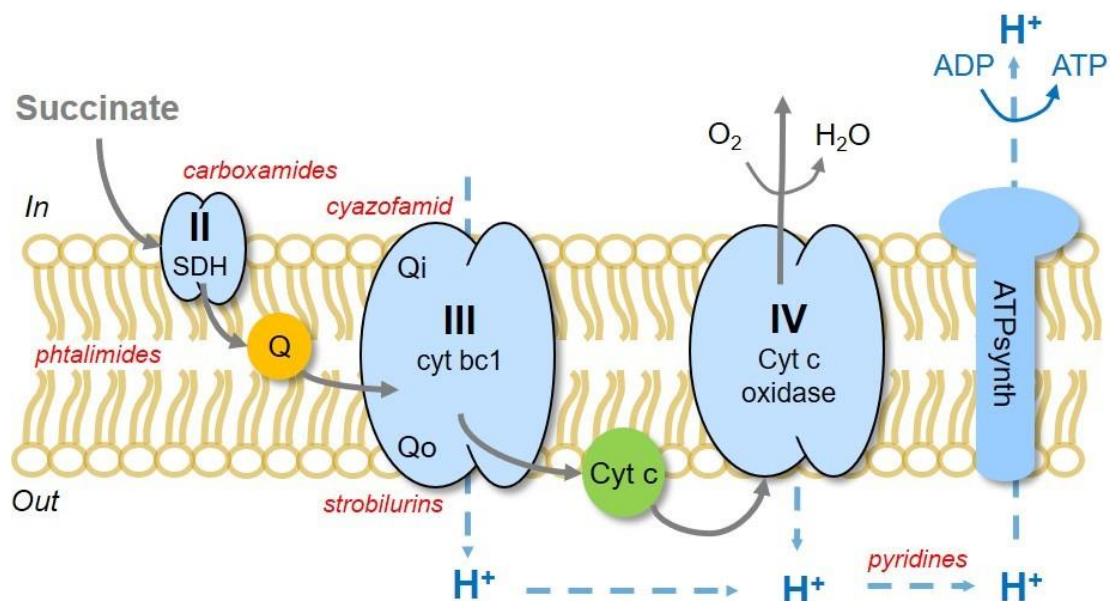


Figura 3. Modo de ação de fungicidas inibidores da respiração mitocondrial. Fonte: <https://www.linkedin.com/pulse/fungicide-mode-of-action-labcoat-guide-pesticides-harry-teicher-phd>.

O fato de a respiração mitocondrial ser um processo metabólico comum em todos os organismos, pode levar a problemas de seletividade, ou seja, o fungicida piraclostrobina pode gerar alterações não apenas em fungos, mas também nas vias metabólicas de organismos não alvos da aplicação, incluindo as abelhas, prejudicando a formação de ATP, afetando diversas funções celulares (Anderson et al., 2011; Engel et al., 2012; Yoder et al., 2013; Zaluski et al., 2017; Tadei et al., 2019; Nicodemo et al., 2020; Zaluski et al., 2020).

Segundo Nicodemo et al. (2020), o fungicida piraclostrobina, que atua nas mitocôndrias fúngicas, afeta negativamente a bioenergética mitocondrial das abelhas, o que é especialmente crítico para a atividade de voo exigente de energia das abelhas na fase de forrageiras. Tadei et al. (2019) também constatou que embora o fungicida não tenha mostrado efeitos nas taxas de sobrevivência, afetou as abelhas, reduzindo a distância percorrida e a velocidade média, devido a uma possível diminuição na produção de Trifosfato de Adenosina (ATP) durante o desenvolvimento, reforçando o efeito tardio da exposição larval a esses pesticidas.

A toxicidade do fungicida é altamente dependente de sua dose ingerida pelas abelhas (Thompson et al., 2014). Os efeitos do fungicida piraclostrobina em doses ambientalmente relevantes (850 ppb) que são frequentemente encontradas nas plantas

visitadas por abelhas, causam alterações morfológicas nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas em abelhas nutrízes (Zaluski et al., 2017). Foi também constatado que doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina (850 ppb), podem causar alterações na expressão de proteínas e processos metabólicos em abelhas nutrízes (Zaluski et al., 2020).

A ingestão do fungicida piraclostrobina na fase larval não causa problemas no desenvolvimento pós-embrionário nem mortalidade aguda; porém pode prejudicar o epitélio intestinal de larvas e abelhas adultas, com imunomarcção para morte celular e aumento da intensidade da marcação de quitina na matriz peritrófica, indicando efeito tardio do fungicida, afetando negativamente a saúde da colônia (Domingues et al., 2021).

5. Transcriptoma

A descrição do genoma da abelha *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) disponível em bancos de dados gratuitos e o surgimento de técnicas da genética molecular, como desenvolvimento da técnica de qPCR (Reação em cadeia polimerase), sequenciadores moleculares e avanços na área de bioinformática, possibilitou identificar e correlacionar genes específicos, levando a diversas descobertas sobre essa espécie (Li et al., 2019; Vázquez et al., 2020).

Uma técnica da genética molecular, capaz de analisar com maior precisão os efeitos causados pela piraclostrobina, é a análise do Transcriptoma, pois permite a análise global de todos os transcritos de RNA mensageiro em única análise, possibilitando analisar a expressão total dos genes do tecido analisado em um momento específico em resposta a estímulos internos e externos, como ambiental ou nutricional, do organismo modelo de estudo (Passos, 2015; López-Osorio, 2020). Esta análise molecular vem sendo utilizada em estudos com abelhas *A. mellifera* com diversos agrotóxicos, como imidaclopride (Li et al., 2019), e glifosato (Vázquez et al., 2020), demonstrando alterações na expressão de genes envolvidos em importantes vias fisiológicas as abelhas.

Portanto espera-se com essa pesquisa, obter informações a respeito do efeito do fungicida piraclostrobina (Comet[®]), no perfil de expressão gênica de tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera*, por meio da avaliação de alterações dos processos biológicos e moleculares. Por meio desta ferramenta serão avaliadas quais vias metabólicas são

alteradas e quais genes apresentam a maior alteração no perfil de expressão nesta situação, para melhor entendimento de como o organismo em estudo reage frente a este agrotóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v.2, n.1, p.1-12, 2009.

ANDERSON, K.E.; SHEEHAN, T.H.; ECKHOLM, B. J.; MOTT, B.M.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v.58, n.4, p.431-444, 2011.

ARDALANI, H.; VIDKJÆR, N.H.; KRYGER, P.; FIEHN, O.; FOMSGAARD, I.S. Metabolomics unveils the influence of dietary phytochemicals on residual pesticide concentrations in honey bees. **Environment International**, v.152, p.106503, 2021.

AZPIAZU, C.; BOSCH, J.; BORTOLOTTI, L.; MEDRZYCKI, P.; TEPER, D.; MOLOWNY-HORAS, R.; SGOLASTRA, F. Toxicity of the insecticide sulfoxaflor alone and in combination with the fungicide fluxapyroxad in three bee species. **Scientific reports**, v.11, n.1, p.1-9, 2021.

BAJIYA, M.R., ABROL, D.P. Effect of insecticides on foraging behaviour of honeybee (*Apis mellifera*. L) on mustard (*Brassica napus*). **Journal of entomology and zoology studies**, v.8, p.1226-1230, 2020.

BIESMEIJER, J.C.; ROBERTS, S.P.; REEMER, M.; OHLEMÜLLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SETTELE, J. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v.313, n.5785, p.351-354, 2006.

BLOOM, E.H.; WOOD, T.J.; HUNG, K.L.J.; TERNEST, J.J.; INGWELL, L.L.; GOODELL, K.; SZENDREI, Z. Synergism between local-and landscape-level pesticides reduces wild bee floral visitation in pollinator-dependent crops. **Journal of Applied Ecology**, 2021.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** (Anvisa). Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/>> Acessado em: 11 jun, 2021.

BRASIL. Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (Lei Federal dos agrotóxicos). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 Jan. 2002. Seção 1, p.1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários** (Agrofit). Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acessado em: 15 abr, 2021.

BRASIL. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis** (Ibama). Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/avaliacao-ambiental/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola>> Acessado em: 10 jun, 2021.

BRONSTEIN, J.L.; ALARCÓN, R.; GEBER, M. The evolution of plant–insect mutualisms. **New Phytologist**, v.172, n.3, p.412-428, 2006.

CAMPBELL, J.B.; NATH, R.; GADAU, J.; FOX, T.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; HARRISON, J.F. The fungicide Pristine[®] inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. **Journal of insect physiology**, v.86, p.11-16, 2016.

CAPPELLARI, S.C.; SCHAEFER, H.; DAVIS, C.C. Evolution: pollen or pollinators— which came first?. **Current Biology**, v.23, n.8, p.R316-R318, 2013.

CARNEIRO, F. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

COX-FOSTER, D.L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C.; PALACIOS, G.; EVANS, J.D.; MORAN, N.A.; MARTINSON, V. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v.318, p.283-286, 2007.

- CRANE, E.E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. Routledge, 1999.
- 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.
- DANFORTH, B. Bees - a primer. **Current Biology**, v.17, n.5, p.R156-R161, 2007.
- DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v.77, n.2, p.67-70, 1996.
- DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J; PHAM-DELÉGUE, M-H. (Orgs.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, p.56-66, 2002.
- 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.
- ENGEL, P.; MARTINSON, V.G.; MORAN, N.A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honeybee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.27, p.11002-11007, 2012.
- FINE, J.D.; COX-FOSTER, D.L.; MULLIN, C.A. An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. **Scientific Reports**, v. 7, p.1–9, 2017.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; LOISEAU, A.; OLDROYD, B.P.; HEPBURN, H.R.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**, v.86, n.4, p.420-430, 2001.

GEORGHIOU, G.P. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. Springer Science & Business Media, 2012.

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

GIANNINI, T.C.; ALVES, D.A.; ALVES, R., CORDEIRO, G.D.; CAMPBELL, A.J.; AWADE, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v.51, p.406-421, 2020.

GIANNINI, T.C.; CORDEIRO, G.D.; FREITAS, B.M. SARAIVA, A.M; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal Economic Entomology**, v.108, n.3, p. 849-857, 2015.

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.

GUPTA, R.K. Taxonomia e distribuição de diferentes espécies de abelhas. In: **Apicultura para alívio da pobreza e segurança de subsistência**. Springer, Dordrecht. p.63-103 , 2014.

HAHN, M. A ameaça crescente de resistência a fungicidas em fungos fito patogênicos: Botrytis como um estudo de caso. **Journal of chemical biology**, v.7, n.4, p.133-141, 2014.

HUNG, K.L.J.; KINGSTON, J.M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D.A.; KOHN, J.R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.285, n.1870, p.20172140, 2018.

IANCU, R.; OPREAN, L.; CODOI, V. Organic beekeeping and bee products. **Scientific Papers Series A Agronomy**, v.15, n.1, p.2285-5785, 2012.

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

JORDAN, A.; PATCH, H.M.; GROZINGER, C.M.; KHANNA, V. Economic dependence and vulnerability of United States agricultural sector on insect-mediated pollination service. **Environmental Science & Technology**, v.55, n.4, p.2243-2253, 2021.

KERR, W.E. The history of the introduction of Africanized bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v.39, p.3-5, 1967.

KLEIN, A.M.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v.274, n.1608, p.303-313, 2007.

LEBUHN, G.; DROEGE, S.; CONNOR, E.F.; GEMMILL-HERREN, B.; POTTS, S. G.; MINCKLEY, R.L.; CANE, J. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. **Conservation Biology**, v.27, n.1, p.113-120, 2013.

LI, Z.; YU, T.; CHEN, Y.; HEERMAN, M.; HE, J.; HUANG, J.; SU, S. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning

induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide biochemistry and physiology**, v.156, p.36-43, 2019.

LÓPEZ-OSORIO, F.; WURM, Y. Healthy Pollinators: Evaluating Pesticides with Molecular Medicine Approaches. **Trends in Ecology & Evolution**, v.35, n.5, p.380-383, 2020.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Harvard University Press, 1974.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F.E.; DE JONG, D.; BIZERRA, P.F.V.; TAVARES, M.A.; BELLINI, W.C.; 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.

OLLERTON, J. **Pollinators and Pollination: Nature and Society**. Pelagic Publishing Ltd, 2021.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v.120, n.3, p.321-326, 2011.

PAGE JR., R.; PENG, C.Y.S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, v.36, n.4, p.695-711, 2001.

PASSOS, G. **Transcriptomics in Health and Disease**. 1^a Edição. Switzerland: Springer International Publishing, 344, 2015.

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.

PAUDEL, Y.P.; MACKERETH, R.; HANLEY, R.; QIN, W. Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: current status, impacts and potential drivers of decline. **Journal of Agricultural Science**, v.7, n.6, p.93-109, 2015.

PEREIRA, F.W.; CARNEIRO, L.; GONÇALVES, R.B. More losses than gains in ground-nesting bees over 60 years of urbanization. **Urban Ecosystems**, v.24, n.2, p. 233-242, 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.

PINTO, M.A.; RUBINK, W.L.; PATTON, J.C.; COULSON, R.N.; JOHNSTON, J.S. Africanization in the United States: replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. **Genetics**, v.170, n.4, p.653-1665, 2005.

PIRES, C.S.S.; PEREIRA, F.D.M.; LOPES, M.T.D.R.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J.S.; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.

POTTS, S.G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T.; AIZEN, M.A.; BIESMEIJER, J.C.; BREEZE, T.D.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v.540, n.7632, p.220-229, 2016.

RECH, A.R.; AVILA-JUNIOR, R.S.; SCHLINDWEIN, C. Síndromes de polinização: especialização e generalização. In: Rech, A.R, *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, **Biologia da polinização**, p.172-180, 2014.

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.

ROMANOVA, E.B. Beekeeping products as raw materials for the pharmaceutical industry. **Khimiko-FarmatsevticheskiiZhurnal**, v.24, n.8, p.51-53, 1990.

RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* LI Material and methods. **Apidologie**, v. 9, n.4, p.363-381, 1978.

SAIN, V.; NAIN, J. Economics and Importance of Beekeeping. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v.1, n.7, p.1833-1834, 2017.

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

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J.M. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v.26, n.9, p.1199-1206, 2017.

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

SEELEY, T.D. **The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies.** Harvard University Press, 1995.

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.

SIMON-DELISO, N.; SAN MARTIN, G.; BRUNEAU, E.; MINSART, L.A.; MOURET, C.; HAUTIER, L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. **PloS one**, v.9, n.7, 2014.

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.

THOMPSON, H.M.; FRYDAY, S.L.; HARKIN, S.; MILNER, S. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. **Apidologie**, v.45, n.5, p.545-553, 2014.

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.

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, p.114148, 2020.

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**. 2ª Ed.– Guaíba: Agrolivros, p.17, 2005.

WINSTON, M.L. **A Biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, p.276, 2003.

WOODCOCK, B.A.; BULLOCK, J.M.; SHORE, R.F.; HEARD, M.S.; PEREIRA, M. G.; REDHEAD, J.; PEYTON, J. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. **Science**, v.356, n.6345, p.1393-1395, 2017.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **International Scholarly Research Notices**, v.2011, n.130289, p.1-8, 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.

YODER, J.A.; JAJACK, A.J.; ROSSELOT, A.E.; SMITH, T.J.; YERKE, M.C.; SAMMATARO, D. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.76, n.10, p.587-600, 2013.

ZALUSKI, R.; BITTARELLO, A.C.; VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; DE MAGALHAES PADILHA, P.; DA SILVA FERNANDES, M.; 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 honey bees, *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.

CAPÍTULO II

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

Atualmente, os fungicidas são a classe de agrotóxicos mais detectados em produtos apícolas, sendo a piraclostrobina uma das moléculas mais usadas na agricultura e capaz de causar efeitos prejudiciais nas abelhas. No presente estudo 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. Observou-se que abelhas expostas por ingestão a DAR de piraclostrobina, apresentaram alterações no padrão de expressão gênica do sistema antioxidante, respiração celular, metabolismo de glicose e regulação do hormônio juvenil e do hormônio insulina.

Palavras-chave: abelhas; agrotóxicos; expressão gênica.

PYRACLOSTROBIN FUNGICIDE AFFECTS GENE EXPRESSION IN BEES
BRAIN TISSUE *Apis mellifera* L.

Currently, fungicides are the most detected class of pesticides in bee products, with pyraclostrobin being one of the most used molecules in agriculture and capable of causing harmful effects on bees. In the present study, the effect of the ingestion of an 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 observed that bees exposed by ingestion of pyraclostrobin DAR, showed alterations in the gene expression pattern of the antioxidant system, cellular respiration, glucose metabolism and regulation of the juvenile hormone and the insulin hormone.

Keywords: bees; pesticides; gene expression

Introdução

A polinização feita pelas abelhas ajuda a manter o equilíbrio de ecossistemas naturais e aumentar a produtividade em muitas culturas agrícolas, além de gerar renda para milhares de famílias, por meio da produção de produtos apícolas (Reilly et al., 2020; Patel et al., 2021). Entretanto, apesar do reconhecimento de sua importância, existe uma crescente preocupação com a redução global de polinizadores nativos e abelhas melíferas no mundo (Sánchez-Bayo et al., 2019; Zattara et al., 2021).

Entre as principais causas ligadas a este fenômeno, destacam-se a fragmentação e o desmatamento de áreas com vegetação nativa, mudanças climáticas, aparecimento e disseminação de doenças e parasitas, introdução de espécies exóticas e cultivos transgênicos e uso excessivo de agrotóxicos (Goulson et al., 2015; Grassl et al., 2018; Pereira et al., 2020). Entre as causas citadas, o uso de agrotóxicos é um fator que apresenta relevância, devido aos impactos que podem causar ao meio ambiente (Sgolastra et al., 2017; Tosi et al., 2019).

Os fungicidas são uma das classes de agrotóxicos mais detectada em produtos apícolas, perdendo apenas para os acaricidas, que são aplicados diretamente nas colônias, para controle do ácaro *Varroa destructor* (Pettis et al., 2013; Piechowicz et al., 2018). E apesar de apresentarem baixa toxicidade aguda para abelhas adultas, causam problemas crônicos, prejudicando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, afetando a estrutura e função da membrana celular, transdução de sinais, respiração, mitose e divisão celular (Yoder et al., 2017; Cullen et al., 2019; Nicodemo et al., 2020).

Dentre os fungicidas sistêmicos que possuem a capacidade de entrar no floema das plantas, contaminando o néctar, pólen e resinas, se destaca o grupo das estrobilurinas (compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus*), onde um dos principais componentes ativos encontrado é a piraclostroquina (Girolami et al., 2009; Piechowicz et al., 2018). O modo de ação da piraclostroquina contra fungos é por meio da inibição da enzima quinona oxidase (Qo), ligando-se ao sítio Qo do citocromo b (proteína encontrada na mitocôndria de células eucarióticas) e parte do citocromo bc1 (Complexo III), impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (Ghini e Kimati, 2000)

O fato da respiração mitocondrial ser um processo metabólico comum em diversos organismos, pode causar alterações nas vias metabólicas de organismos não alvos, incluindo as abelhas (Johnson e Percel, 2013; Yoder et al., 2017), causando

problemas como: Afetar negativamente a bioenergética mitocondrial das abelhas (Nicodemo et al., 2020). Influenciar no comportamento de abelhas jovens, reduzindo a distância percorrida e a velocidade média, devido a uma possível diminuição na produção de ATP (Tadei et al., 2019). Prejudicar o epitélio intestinal de larvas e abelhas adultas, afetando negativamente a saúde da colônia (Domingues et al., 2021). Alterações morfológicas nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas e mudanças na expressão de proteínas e processos metabólicos (Zaluski et al., 2017; Zaluski et al., 2020).

Portanto o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do fungicida piraclostrobina (Comet[®]), em dose ambientalmente relevante, no perfil de expressão gênica do tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera*, por meio da avaliação do transcriptoma, para melhor entendimento de como o organismo em estudo reage frente a este agrotóxico.

Material e métodos

O experimento foi realizado na Área de Apicultura da Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil (22°50'30.16"S; 48°25'41.90"W) altitude média de 623 m.

Foram utilizadas quatro colônias de abelhas *Apis mellifera* alojadas em núcleos modelo Langstroth, padronizadas visualmente quanto ao número de quadros contendo favos de cria e alimento. Para a obtenção das abelhas operárias na fase de campeiras, três quadros contendo cria operculada, de cada colmeia, foram envolvidos com tecido filó e devolvidos nas suas respectivas colmeias. Para a confirmação da idade aproximada da cria, observou-se a coloração dos olhos de duas pupas de cada quadro, para se certificar que já estavam escuros, indicando que a cria estava próxima ao nascimento (Roat, 2008).

Após 24 horas, as abelhas recém-emergidas que estavam confinadas no tecido filó foram marcadas na região do pronoto (parte dorsal do tórax), com caneta atóxica. Posteriormente, os quadros foram retirados do tecido filó e reintroduzidos em suas colônias de origem (Roat et al., 2014). Após 21 dias, 120 abelhas marcadas foram capturadas e distribuídas em placas Petri (perfuradas para garantir a ventilação) e mantidas em jejum por um período de três horas para esvaziar a vesícula nectarífera, a fim de garantir o consumo do alimento oferecido. Os tratamentos foram feitos em

triplicata, com dez abelhas cada repetição. Em seguida, foi fornecido 1,0 mL de xarope de mel (mel + água na proporção de 1:1), contendo ou não a piraclosrobina na dose ambientalmente relevante (média das doses que são frequentemente encontradas no pólen e no “bee bread” apícola) de 850 ppb/abelha (Comet® 250 g i.a. L-1; Basf, Alemanha)(Zaluski et al., 2017). O consumo de alimento foi avaliado, pesando-se os cochos antes (com 1mL de xarope) e após o período experimental afim de certificar-se que as abelhas se alimentaram em todos os grupos experimentais.

Após uma e quatro horas, 30 abelhas de cada tratamento foram anestesiadas por baixa temperatura, logo após acondicionadas em tubos falcon devidamente identificados, levadas em caixa de isopor com gelo para o laboratório do IBTEC – Instituto de Biotecnologia da UNESP – Campus de Botucatu, e imediatamente congeladas em freezer -80° C, para a realização da análise do transcriptoma.

Em laboratório, as abelhas foram divididas em cinco amostras para cada grupo experimental, sendo que cada amostra era composta por três cabeças. Após serem decaptadas e retirados os olhos, para evitar possíveis contaminações causadas pela pigmentação dos olhos, estas foram maceradas para exposição do material cerebral. O RNA total foi extraído dos pools cerebrais de abelhas campeiras *A. mellifera* (03 cérebros por pool) pelo método de TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). As concentrações de RNA foram aferidas em cada amostra no equipamento Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As bibliotecas de cDNA foram construídas com 200 ng de RNA total usando o Kit de Preparação de Biblioteca de mRNA SureSelect (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da biblioteca foram sequenciados usando uma plataforma Illumina Nextseq (Illumina, San Diego, EUA), em uma corrida de extremidade única de 150 pb.

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 como referência o Amel_HAV3.1 da NCBI. A análise da expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq2. Os genes que apresentaram um valor de p ajustado inferior a 0,05 foram considerados como significativamente regulados.

Resultados e Discussão

Consumo do alimento oferecido

Não houve diferença significativa no consumo de alimento entre o tratamento controle e contaminado, tanto para uma hora ($32,0 \pm 7,0$ e $29,0 \pm 5,0$ $\mu\text{L}/\text{abelha}$, respectivamente) e quatro horas ($38,0 \pm 2,2$ e $44,0 \pm 1,2$ $\mu\text{L}/\text{abelha}$, respectivamente) (teste T, $P > 0,05$).

Análise de Componentes Principais (PCA)

O tratamento com piraclostrobina por uma hora não promoveu alteração na expressão gênica das abelhas. Portanto, os resultados apresentados serão referentes ao consumo de alimento contaminado por quatro horas. O conjunto completo de dados filtrados foi submetido para a Análise de Componentes Principais - PCA e agrupamento hierárquico.

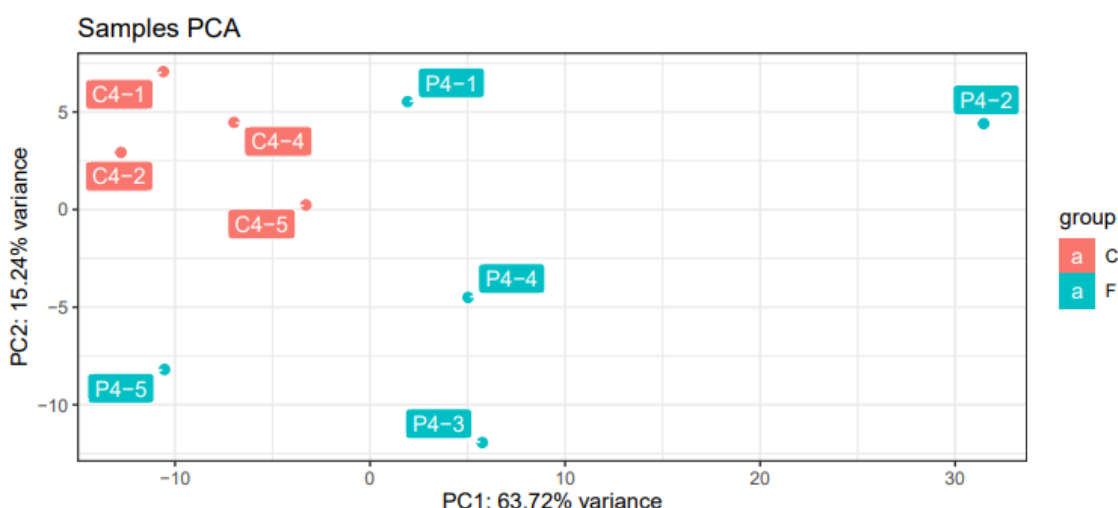


Figura 1. Análise de componentes principais (PCA), método de agrupamento usando o conjunto completo de dados de expressão de registro de todas as réplicas para duas condições: grupo experimental Controle (C) e Piraclostrobina (P).

Genes diferencialmente expressos

Após a exposição por ingestão das abelhas á dose ambientalmente relevante da

piraclostrobina foram identificados 17 genes diferencialmente expressos (Tabela 1), podendo ser mais (upregulated) ou menos (downregulated) expressos, quando comparados ao tratamento controle.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos no transcriptoma do tecido cerebral da *Apis mellifera*.

GENE	LOCUS	DIREÇÃO DA REGULAÇÃO	EXPRESSÃO DO GENE
Esterase FE4	LOC409173	Upregulated	Ativação das enzimas do grupo carboxilesterase
Esterase E4-like	LOC113219221	Downregulated	Ativação das enzimas do grupo carboxilesterase
Calcyphosin-like protein	LOC409367	Upregulated	Codifica a família EF-hand de sensores e moduladores de cálcio
Proton-coupled amino acid transporter-like protein pathetic	LOC410741	Downregulated	Codifica a famílias de SLC, que são responsáveis pelo transporte de açúcar na dieta
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 homolog	LOC410516	Downregulated	Expressa a proteína NUBP que é um fator de montagem do cluster Fe-S citosólico
Laccase-5	LOC552811	Downregulated	Subfamília multicopper oxidase (MCO), que inclui a maioria das lacases de insetos
Diphthine methyltransferase	LOC100577136	Upregulated	Expressão do domínio WD40, com uma ampla variedade de funções
Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	LOC410638	Upregulated	Ativa a enzima que catalisa a descarboxilação de vários L-aminoácidos aromáticos

Kinesin 2C	LOC411814	Downregulated	Ativa motores moleculares importantes no transporte intracelular de organelas
Protein bowel	LOC410399	Downregulated	Atua como um importante fator de transcrição
Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3	LOC409050	Downregulated	Ativa dominios fundamentais na transdução de sinais
Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	LOC410733	Downregulated	Expressa enzimas importantes na catalise da glicose e na oxirredutase
Piezo-type mechanosensitive ion channel component	LOC408427	Downregulated	Ativa componentes dos canais catiônico e iônico mecanossensíveis
Helicase domino	LOC413341	Downregulated	Expressa a enzima que medeia a troca dependente de ATP da histona
Não caracterizado	LOC113218789	Upregulated	Não estudada
Não caracterizado	LOC102655788	Upregulated	Não estudada
Não caracterizado	LOC408608	Upregulated	Não estudada

Entre os genes diferencialmente expressos, dois estão ligados ao sistema de desintoxicação das abelhas e se correlacionam com a família das enzimas carboxilesterase (CarEs). Em geral, a desintoxicação xenobiótica envolve a conversão de substâncias solúveis em lipídios em metabólitos excretáveis solúveis em água, onde a estrutura da toxina é alterada enzimaticamente e a torna incapaz de interagir com locais alvo lipofílicos. Tal funcionalização é efetuada principalmente pelas carboxilesterases

(CarEs), citocromo P450 monooxigenases (P450) e glutathione S-transferases (GSTs) que são as principais enzimas de desintoxicação metabólica estão envolvidas na desintoxicação de inseticidas e no desenvolvimento de resistência em populações de insetos (Berenbaum & Johnson., 2015).

O gene esterase FE4 (LOC409173) apresentou aumento de sua expressão no tecido cerebral de abelhas contaminadas com o fungicida. A alta expressão desse gene, pode indicar que houve um estresse oxidativo causado pela piraclostrobina, levando a ativação do sistema antioxidante, procurando manter a homeostase do organismo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem causando danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA et al. 2010). Este gene é responsável pela ativação de enzimas do grupo carboxilesterases (CarEs). Essas enzimas metabólicas desempenham papéis essenciais na desintoxicação de várias substâncias nocivas e compostos exógenos por suas funções metabólicas relevantes (ou seja, catálise de éster, sulfato e hidrólise de amido) (LIU et al., 2015). Segundo Manli et al. (2018), quando o gene esterase FE4 foi inativado por meio de RNA de interferência, observou-se declínio nos níveis de múltiplos genes antioxidantes (AccSOD, AccGST, AccTrx, AccMsrA, dentre outros) e as atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) foram regulados negativamente, confirmando que esse gene funciona como um importante mecanismo antioxidante em abelhas *Apis cerana cerana*.

O gene esterase E4-like (LOC113219221), também está ligado com a ativação do grupo das carboxilesterases (CarEs), porém apresentou sua expressão reduzida em tecido cerebral de abelhas expostas a piraclostrobina. O gene esterase E4-like pode atuar de forma parecida com a esterase hormônio juvenil, funcionando como um regulador de casta através da hidrólise de éster, que é considerado o principal fator metabólico para a rota da degradação de hormônio juvenil (JH) na maioria dos insetos. Abelhas expostas ao fungicida carbendazim apresentaram nível desordenado de hormônio juvenil e atraso no desenvolvimento (Wang et al., 2018; Wang et al., 2021), sugerindo que a baixa expressão do gene esterase E4-like causada pela piraclostrobina, poderia afetar os níveis de JH no organismo de abelhas *Apis mellifera*, podendo promover desregulações no controle geral do metabolismo, polimorfismo de casta, polietismo etário, reprodução e fisiologia (Bonetti et al., 1994; Mackert et al., 2008; Wang et al., 2018). Alterações nesse hormônio pode ser relacionado também com o desenvolvimento de glândulas mandibulares em *Apis mellifera* (Salles et al., 2004), o

que pode estar envolvido com alterações morfológicas nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas em abelhas na fase de nutrízes expostas a piraclostrobina (Zaluski et al., 2017).

A baixa expressão dos genes: kinesin 2C (LOC411814), cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 (LOC410516) e laccase-5 (LOC552811), sugere que a piraclostrobina causa danos na respiração celular de abelhas *Apis mellifera*, o que pode acarretar na redução da síntese de trifosfato de adenosina (ATP), conforme relatado por Nicodemo et al., (2020), onde indentificaram que a exposição das abelhas *Apis mellifera* ao fungicida piraclostrobina, afeta negativamente a bioenergética mitocondrial, o que leva ao enfraquecimento do indivíduo e falta de energia, o que é especialmente crítico para a atividade de voo, exigente de energia das abelhas forrageiras. Zaluski et al., (2020), encontraram uma expressão reduzida de proteínas associadas a síntese energética em abelhas expostas por ingestão a DAR de piraclostrobina o que pode afetar a realização de múltiplas tarefas executadas pelas abelhas operárias, afetando negativamente a sanidade da colônia.

O gene da kinesin 2C (LOC411814), está envolvido com motores moleculares dependentes de microtúbulos, que desempenham papéis importantes no transporte intracelular de organelas, sendo os principais motores para o transporte rápido de mitocôndrias em axônios do sistema nervoso de *Drosophila* (Hollenbeck e Saxton, 2005; Pilling et al., 2006). Assim, mitocôndrias metabolicamente comprometidas com declínio na capacidade de produção de energia, desencadeiam a liberação da ancoragem citoesquelética através da repressão do kinesin, levando ao transporte retrógrado para o corpo celular, onde estas mitocôndrias são fechadas em membranas por autofagocitose e, em seguida degradadas pela fusão com lisosomos (Rodriguez-Enriquez et al., 2004; Miller e Sheetz., 2004). O que sugere que esse gene atua de forma similar na *Apis mellifera*, indicando que a baixa expressão desse gene, está ligada a possíveis danos nas mitocôndrias do tecido cerebral.

O gene cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 (LOC410516), expressa o Homólogo NUBP2 do fator de montagem do cluster Fe-S citosólico, que é uma proteína transportadora intermediária implicada na transferência de aglomerado Fe-S para o complexo I presente na respiração celular. Alterações nessa proteína causa deficiência do complexo I, levando a disfunção mitocondrial (Sheftel et al., 2009; Tucker et al., 2012). Segundo Mandilaras e Missirlis., (2012) esse gene está implicado no metabolismo e relógio circadiano de *Drosophila*, codificando componentes da

máquina CIA, e *IscA1*, que é um Fe-S proteína-esqueleto com previsão de localização nas mitocôndrias.

O gene laccase-5 (LOC552811), faz parte da família multicopper oxidases (MCOs), obteve sua expressão reduzida no tecido cerebral. Essa família possui a capacidade de catalisar a oxidação de uma ampla gama de substratos inorgânicos e aromáticos, acoplando a redução do oxigênio à água (Solomon et al., 2008; Wang et al., 2018). Os MCOs se relacionam com o citocromo c, que faz parte do complexo IV da fosforilação oxidativa da respiração celular (Solomon et al., 1996; Kosman et al., 2010).

Sugere-se que a regulação positiva para os genes aromatic-L -amino-acid decarboxylase (LOC410638), diphthine methyltransferase (LOC100577136) e calcyphosin-like protein (LOC409367), estão envolvidos com a regulação dopaminérgica, regulando a secreção de insulina, induzida por uma possível hiperglicemia, causada pela ingestão de piraclostrobina.

O aromatic-L-amino-acid decarboxylase (LOC410638) ou também conhecido como dopa decarboxylase DDC, catalisa a descarboxilação de vários L-aminoácidos aromáticos. Fisiologicamente, o DDC é responsável pela produção de dopamina e serotonina por meio da descarboxilação de 3,4-dihidroxifenilalanina e 5-hidroxitriptofano, respectivamente. Nos insetos, a dopamina serve como neurotransmissores, neuromoduladores ou neuro-hormônios clássicos (Osborne et al., 1996; Neckameyer et al., 2002) Um dos hormônios que a dopamina é capaz de regular é a insulina, através da sinalização de receptores de dopamina e regulação do Ca intracelular (Ustione et al., 2013). Rubí et al (2005) mostraram que a dopamina exógena pode inibir a secreção de insulina estimulada pela glicose.

O gene diphthine methyltransferase (LOC100577136) está ligado a expressão do domínio WD40, encontrado em uma série de proteínas eucarióticas que cobrem uma ampla variedade de funções, incluindo adaptadores e reguladores em transdução de sinal (Neer et al., 1994). A família de proteínas de repetição WD compreende mais de 30 proteínas diferentes que compartilham um motivo de repetição altamente conservado. Os membros desta família incluem a proteína G, que atua como um importante receptor de dopamina (Ivanina et al., 2000).

O gene da calcyphosin-like protein (LOC409367) codifica a família EF-hand de sensores e moduladores de cálcio, que é o segundo mensageiro universal em todos os organismos multicelulares, mediando uma variedade de processos celulares (Heizmann

et al., 1991). Este gene está envolvido com a fosfolipase C que aumenta os níveis de Ca intracelular se relacionando com a sinalização da dopamina (Ivanina et al., 2000; Ustione et al., 2013).

Pode-se deduzir pela baixa regulação dos genes:, glucose dehydrogenase (LOC410733) e proton-coupled amino acid transporter-like protein pathetic (LOC410741) que a ingestão da piraclostrobina, afetou o metabolismo da glicose no organismo da *Apis mellifera*, o que indica que a baixa regulação desses genes, foi uma tentativa de manter a homeostase da glicose no tecido cerebral.

O gene da glucose dehydrogenase (LOC410733), está implicado na metabolização de carboidratos com papéis importantes na biologia das abelhas, como armazenamento de espermatozoides, biossíntese de cutículas e metabolismo de glicose (Kunieda et al., 2006). Nie et al., (2018) sugeriram que este gene em antenas de abelhas enfermeira, pode estar envolvido no metabolismo da glicose, para fornecer energia de forma abundante para os comportamentos de abelhas nutrizas. Zaluski et al., (2020) encontraram uma expressão reduzida de proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos em abelhas expostas por ingestão a DAR de piraclostrobina.

O gene proton-coupled amino acid transporter-like protein pathetic (LOC410741) está relacionado com uma proteína semelhante a um transportador de aminoácido acoplado a próton patética, a qual esta ligada na expressão da família de portadores de soluto (SLC), que são as principais famílias implicadas no transporte de açúcar na dieta (Weiler et al., 2017; Denecke et al., 2020). Este gene tem uma relação direta com a SLC5, a qual foi mostrado ter um importante papel no transporte de glicose no cérebro de *Drosophila* (Freeman et al., 2003; Desalvo et al., 2014). Sugere-se que esse gene atua de forma semelhante no organismo da *Apis mellifera*.

A baixa expressão dos genes, protein bowel (LOC410399) e helicase domino (LOC413341) indicam que a ingestão de piraclostrobina, influenciou em componentes moduladores da expressão gênica. Zaluski et al., (2020) encontraram uma expressão reduzida de proteínas associadas transcrição e tradução em abelhas expostas por ingestão a DAR de piraclostrobina.

O gene protein bowel (LOC410399), apresentou baixa expressão, este está relacionado com o domínio clássico denominado dedo de zinco (C2H2) que funciona como estrutura de ligação de DNA ou proteína, coordenando um íon de zinco nos dois resíduos invariantes de cisteína e histidina, atuando em fatores de transcrição eucariótica. (Klug et al., 1999; Iuchi et al., 2001)

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.1255957, 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*. **Metallomics**, 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.

CAPÍTULO III

Implicações

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, onde estudos indicam que um dos principais fatores responsáveis por esse fenômeno, seja a contaminação do meio ambiente por agrotóxicos.

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.

Mostrando que o uso de ferramentas moleculares como o transcriptoma podem esclarecer de forma mais precisa de como os agrotóxicos usados na agricultura afetam o meio ambiente. Podendo analisar a nível molecular as alterações fisiológicas causadas em insetos polinizadores não alvo da aplicação, mas que acabam sendo contaminados de forma indireta por esses produtos químicos. Deste modo, espera-se que os resultados encontrados nesse estudo, possam contribuir com o meio científico, proporcionando informações importantes para os próximos trabalhos relacionados ao efeito dos agrotóxicos em polinizadores e motivando para que mais pesquisas nessa área sejam feitas, contribuindo com um desenvolvimento sustentável da sociedade.

Outra contribuição benéfica para sociedade que essa pesquisa pode proporcionar é uma melhor conscientização ambiental da população. Alertando os produtores rurais dos efeitos ambientais que fungicidas como a piraclostrobina pode causar a fauna. Assim como ajudar no manejo preventivo para apicultores, que possuem seus apiários próximo de culturas agrícolas onde são usados fungicidas com princípios ativos iguais ou similares a piraclostrobina, mostrando que estes podem afetar cronicamente as abelhas, apresentando alterações em importantes vias fisiológicas, o que pode prejudicar a longo prazo o bem-estar das abelhas e conseqüentemente a produtividade da colônia.