

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

**TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* L. CAMPEIRAS EXPOSTAS À
DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE DO FIPRONIL**

ALINE ASTOLFI

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

BOTUCATU-SP

2021

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

**TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* L. CAMPEIRAS EXPOSTAS À
DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE DO FIPRONIL**

ALINE ASTOLFI
Engenheira Agrônoma

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

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

BOTUCATU-SP
2021

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Astolfi, Aline.

Transcriptoma de abelhas *Apis mellifera* L. campeiras
expostas à dose ambientalmente relevante do fipronil / Aline
Astolfi. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Samir Moura Kadri

Capes: 50405004

1. Agroquímicos. 2. Expressão gênica. 3. Transcriptoma.

Palavras-chave: Agrotóxico; Expressão gênica;
Transcriptoma.

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu filho Leonardo e espero que esta minha conquista seja para ele, um motivo de orgulho, assim este sentimento será recíproco entre nós. Amo-te infinito!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar preciso agradecer a minha família pelo incentivo e apoio. Á minha mãe, fonte inspiradora que me encoraja a prosseguir. Ao meu pai pelo apoio, suporte e compreensão. Ao meu irmão Edson Henrique pelo suporte técnico do computador todas as vezes que precisei de auxílio, principalmente este período de adaptação necessária ao ensino remoto. Em especial às minhas irmãs e ao meu filho. Á minha irmã Vanessa que me despertou para que eu pensasse em um caminho diferente para a minha carreira profissional, me fazendo enxergar que eu poderia voltar a estudar para me atualizar e, posteriormente retornar para a minha área de formação, Agronomia. Á minha irmã Ingrid que apoiou e me deu força no dia da prova de seleção, foi comigo até Botucatu e me encorajou para que eu acreditasse no meu potencial e na minha capacidade. Ela também exaltou a beleza da Fazenda Lageado – UNESP Botucatu, trazendo pra mim a confirmação do acerto no passo dado porque neste lugar me sinto em casa desde a graduação. E também em especial ao meu filho Leonardo pela paciência, compreensão e apoio todas as vezes que precisei da autonomia dele em casa diante da minha ausência devido aos estudos.

Quero agradecer ao Professor Ricardo de Oliveira Orsi, meu orientador, pela oportunidade que ele me deu de voltar para a faculdade e para a Apicultura, área tão importante para mim, da qual eu tanto gosto e com a qual eu tinha vontade de voltar a trabalhar. O amor que sinto pelas abelhas e o encanto que eu enxergo no mundo delas é inspirador pra mim. Graças e esta oportunidade que o Professor Ricardo me proporcionou, pude vivenciar novamente o manejo das colmeias de *Apis mellifera* e adquirir inúmeros novos conhecimentos em Apicultura e em outras áreas tratadas nas disciplinas do programa de pós-graduação da FMVZ – UNESP – Botucatu – SP, além de conhecer novas pessoas que somaram na minha vida novas amizades. Também quero agradecer ao meu coorientador, Samir Moura Kadri, pela atenção, paciência e solicitude de sempre, em ensinar, em responder as minhas perguntas e no acompanhamento da execução do experimento na fase de laboratório.

Impossível não agradecer os demais docentes com os quais tive contato nesta pós-graduação e aprendi muito, me atualizando em assuntos conhecidos e aumentando o meu conhecimento com novos assuntos e inovações que surgiram.

Preciso agradecer todas as pessoas do setor de Apicultura e do grupo Nectar – Núcleo de ensino, ciência e tecnologia em apicultura racional, docentes, colegas de turma, amigos e funcionários. Todos me acolheram com muito carinho e me ajudaram a executar a parte prática de campo do meu projeto. Agradeço ao funcionário Maurício que não mediu esforços para me

ajudar e me orientar em tudo o que precisei realizar no setor. E em especial aos meus amigos e parceiros de experimento, Isabella Cristina de Castro Lippi, Daniel Diego Mendes e Juliana Sartori Lunardi, com os quais aprendi muitas coisas, para a minha carreira e para a minha vida. Agradeço á Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ – UNESP, Câmpus de Botucatu, assim como o Programa de Pós-graduação pela orientação, pela sua estrutura da qual pude usufruir para o desenvolvimento do meu mestrado e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudo á mim concedida, extremamente importante para mim este período, o meu, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado 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.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	02
1. Abelha <i>Apis mellifera</i> : caraterísticas e breve histórico	02
2. Importância econômica da <i>Apis mellifera</i>	05
3. Declínio das populações de abelhas	07
4. Efeito dos agrotóxicos nas abelhas	08
5. Inseticida fipronil	11
6. Transcriptoma	16
7. Conceito de Saúde única (One-health)	17
OBJETIVOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II - FIPRONIL EM DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE AFETA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L.	43
Resumo	44
Abstract	45
Introdução	46
Material e métodos	48
Resultados e discussão	50
Conclusão	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO III – IMPLICAÇÕES	63

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II - FIPRONIL EM DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE AFETA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS *Apis mellifera* L.

Tabela 1 - Genes diferencialmente expressos

51

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- Figura 1 – Estrutura química do fipronil - (5-amino-1- [2,6-dicloro - 4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril) Fonte: TINGLE et al. (2003). **12**
- Figura 2 – Representação da ação do fipronil no receptor GABA. Fonte: Adaptado de BLOOMQUIST (2015). **13**
- Figura 3 – Fatores que influenciam a saúde das abelhas em escalas diferentes. Os pontos de sobreposição ilustram a necessidade de uma abordagem de Saúde Única para enfrentar os desafios à saúde das abelhas (DONKERSLEY et al., 2020). **18**

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Abelha *Apis mellifera*: características e breve histórico

A *Apis mellifera* L. é um inseto social com ferrão, da tribo Apini, ordem Hymenoptera e família Apidae, que vive em grandes colônias com castas especializadas (RAMOS & CARVALHO, 2007). De acordo com Bomfim et al. (2017), em geral, uma colmeia bem populosa tem uma rainha, de 60 a 80 mil abelhas operárias e de zero até 400 zangões.

O desenvolvimento de todos os indivíduos da colônia compreende os estágios de ovo, larva e pupa permanecendo três dias na fase de ovo e seis dias na fase de larva. Já a fase de pupa varia em função da casta e também da subespécie de abelha, durando em média, sete dias para rainha, quinze dias para os zangões e doze dias para as operárias. Dessa forma, rainha, zangões e operárias levam em média, respectivamente, 16, 24 e 21 dias para completar seu desenvolvimento, desde o ovo até a emergência (PAGE; PENG, 2001).

A rainha é responsável pela reprodução realizando a postura de ovos que darão origem á novos indivíduos, manutenção da coesão e organização da colônia por meio da produção de feromônios (RAMOS & CARVALHO, 2007), ela é o único indivíduo que se alimenta, durante todo o desenvolvimento larval e vida adulta com geleia real e pode viver até 5 anos , mas a viabilidade da sua postura é reduzida conforme envelhece (EMBRAPA, 2003).

Segundo Rhodes (2011), para uma cópula eficiente a rainha necessita em média de 12 zangões durante o voo nupcial, e faz a postura de milhares de ovos diariamente garantindo a perpetuação da colônia. Os ovos fertilizados podem dar origem a fêmeas operárias ou rainhas, dependendo da alimentação e das dimensões do alvéolo em que se desenvolvem; já os óvulos

não fertilizados se desenvolvem por partenogênese arrenótoca, originando apenas machos, neste caso, apenas zangões.

Os zangões não possuem estrutura específica com relação à execução de tarefas dentro da colônia, sendo sua única função a de fecundar a abelha princesa (rainha virgem) durante o voo nupcial. Eles alcançam a maturidade sexual com doze dias de idade e morrem após o acasalamento devido ao desprendimento de seus órgãos sexuais que ficam ligados à genitália da rainha (GALLO et al., 2002). O zangão vive, em média, 80 a 90 dias (ÁLVAREZ, 2010; CARANTÓN, 2006) e pode ser expulso da colônia pelas operárias em períodos de escassez de alimento (FREE, 1980).

As operárias realizam o trabalho de manutenção da colméia, incluindo alimentação da cria e da rainha, construção de favos, coleta e processamento do alimento, defesa e limpeza da colônia, entre outros. Estas tarefas são cumpridas de acordo com a maturidade fisiológica das operárias (fenômeno conhecido como poliestismo etário), sendo que muitas delas estão relacionadas ao estado funcional das glândulas exócrinas (CRUZ-LANDIM, 1992, 1994).

Do 1º ao 3º dia de vida, as operárias são faxineiras e trabalham na limpeza de qualquer sujidade que exista dentro da colmeia. Do 4º ao 12º dia passam a ser nutrizes e alimentam as larvas, produzem geleia real e alimentam a rainha. Do 13º ao 18º dia, chamadas de construtoras ou engenheiras, produzem cera e constroem os favos. Do 19º ao 20º dia de vida são abelhas guarda e ficam na entrada do ninho defendendo seu território contra qualquer predador. E, finalmente, do 21º dia em diante, se tornam campeiras fazem os serviços externos no campo coletando resinas, pólen, néctar e água (GALLO et al, 2002).

Para manter sua colônia numerosa e saudável, a *Apis mellifera* possui diversos comportamentos específicos importantes, como o defensivo, que representa a defesa da colméia

contra diversos predadores atraídos pelos estoques de mel e pólen, além da abundância de cria presente na colmeia (DE SOUZA, 2012).

Outro comportamento importante para o bem-estar da colônia é a termorregulação, estratégia utilizada para controlar o microclima no interior da colmeia (DOMINGOS e GONÇALVES, 2014), principalmente próximo as crias, as quais são bastante sensíveis á qualquer variação de temperatura (STABENTHEINER et al., 2010).

Já a capacidade de comunicação e orientação são comportamentos essenciais utilizados para localizar os alimentos e locais de nidificação (abrigos), avisar sobre a presença de predadores, atração sexual, agregação, abandono ou enxameação da colônia (SOUZA SÁ et al., 2018); envolvendo substâncias químicas (feromônios), danças, sinais físicos, percepções visuais, sonoras, magnéticas e gravitacionais (GRÜTER e LEADBEATER, 2014).

As abelhas melíferas também apresentam o comportamento exameatório reprodutivo, que ocorre geralmente quando as condições ambientais são boas com abundância de alimento e as colônias se desenvolvem ficando muito populosas tornando pequeno o espaço físico ocupado pelo ninho. Por outro lado, se o problema for diminuição do fluxo de alimentos devido à escassez de pasto apícola ou altas temperaturas a enxameação é chamado de migratório ou por abandono (DINIZ, 1990); e ainda apresenta o comportamento higiênico caracterizado pela capacidade de detecção e remoção de crias mortas e/ou doentes nas células visando minimizar os riscos de disseminação de infecção dentro da colmeia (BIGIO et al., 2013).

A *Apis mellifera* não é uma abelha nativa do Brasil, ela foi introduzida em 1839, trazida da região de Porto – Portugal para o Rio de Janeiro, pelo Padre Jesuíta Antônio Carneiro Aureliano, para fins religiosos através da utilização da cera de abelha na fabricação de velas (FRANCOY, 2007). Mais tarde, em 1845 colonizadores alemães trouxeram abelhas negras da Alemanha (*Apis mellifera mellifera*) e para os estados do sul do Brasil. Entre 1870 e 1880,

Frederico Hanemann trouxe abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) para o Rio Grande do Sul, em 1895, foi a vez do padre Amaro Van Emelen que instalou apiários em Pernambuco com abelhas trazidas da Itália (RANGEL, 2006) e Emílio Schenk, em 1906, também importou abelhas italianas, porém vindas da Alemanha, aumentando as populações de *Apis mellifera* no Brasil.

Em 1956, o professor Warwick E. Kerr trouxe para o Brasil rainhas *Apis mellifera scutellata* do continente africano e instalou um apiário de quarentena no horto florestal (Camacua) em Rio Claro – SP para a realização de pesquisas visando aumentar a produção nacional de mel e a sanidade das colônias (KERR, 1967). Contudo, em 1957, zangões africanos escaparam e iniciou-se o processo de cruzamento com as subespécies europeias, dando origem ao híbrido fértil chamado abelha africanizada (PEREIRA; CHAUD-NETTO, 2005) que apresenta características comportamentais, produtivas, morfológicas e genéticas, predominantes da subespécie africana, (KERR, 1967; DE JONG, 1996).

As populações dessas abelhas poli-híbridas logo se expandiram pela América do Sul e Central onde estabeleceram grandes populações selvagens (SHEPPARD et al., 1991a,b; WINSTON, 1992) e apresentam bons índices de produção de mel, resistência a doenças, eficiência na polinização de inúmeras culturas (SABBAG e NICODEMO, 2011), além de alta defensividade (FUNARI et al., 2004).

2. Importância econômica da *Apis mellifera*

A apicultura é a criação racional de abelhas, uma atividade sustentável que possibilita a geração de renda para produtores rurais (FREITAS et al., 2004) e uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos três requisitos da sustentabilidade: econômico fornecendo renda,

social ocupando a mão de obra familiar ou contratada e ecológico contribuindo na conservação da flora nativa (OLINTO et al., 2015).

Os principais produtos gerados por meio da apicultura são mel, cera, própolis, geleia real, pólen e apitoxina (FREITAS et al., 2004). O mel é o principal objetivo da exploração apícola brasileira (CNA/SENAR, 2021) utilizado como adoçante natural em inúmeras receitas de comidas e bebidas, além de ser utilizado na fabricação de doces, balas, barras de cereais, vinagre de mel, molho de mostarda, entre outros (MILESKI, 2016). Em 2019, a China ocupava o primeiro lugar em produção mundial de mel, com 444 mil toneladas, seguida pela Turquia com 109 mil toneladas, Canadá com 80 mil toneladas produzidas, Argentina em quarto lugar com 78 mil toneladas. Já o Brasil produziu naquele ano 45.981 mil toneladas de mel (FAO, 2020).

Além do mel, os apicultores também podem explorar outros produtos apícolas com grande potencial de crescimento no Brasil como a própolis que apresenta propriedades funcionais, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, imunomodulatória, analgésica e antiviral (AL-WALI et al., 2012).

O pólen apícola possui grande importância nutricional, sendo fonte de proteínas, gorduras, minerais, carboidratos, aminoácidos e vitaminas (MARCHINI et al., 2006), além de auxiliar no fortalecimento do sistema imunológico (STANDIFER, 1980), possuir ação antioxidante retardando o envelhecimento (CARPES et al., 2008) e atuar no sistema digestivo regulando a flora intestinal (NOGUEIRA, 2012).

A cera é outro produto apícola muito promissor de interesse nas indústrias têxteis, de papel, polidores, processamento de alimentos, vernizes, impermeabilizantes e na pós-colheita de frutos é utilizada para a melhoria do aspecto e conservação (PAN, 2018).

A geleia real é utilizada como alimento funcional devido a sua ação rejuvenescedora, sendo bastante procurada pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas, agregando mais valor aos

produtos (GARCIA-AMOEDO; ALMEIDA-MURADIAN, 2002); e a apitoxina ou veneno da abelha pode ser utilizada como anti-inflamatório, antirreumático, anticoagulante, e vasodilatadora (GODINHO, 2016).

A polinização é um serviço ecossistêmico que também pode ser explorado economicamente pelos apicultores uma vez que as abelhas são os polinizadores mais importantes para diversas culturas agrícolas (POTTS et al., 2016). A *Apis mellifera* é a espécie de abelha mais utilizada para este tipo de serviço (AIZEN & HARDER, 2009) devido ao seu comportamento generalista visitando grande diversidade de flores para obter seu alimento (IMPERATRIZ-FONSECA & NUNES-SILVA, 2010) e pela facilidade de manejo das suas colmeias (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012).

Desta forma, a apicultura representa uma possibilidade real de negócio e inclusão social, com baixo investimento inicial, ocupação para todos os membros da família, dispensa a propriedade de terra porque os apiários podem ser instalados em áreas de terceiros por meio de locação ou cessão de uso, contribui para a conservação da natureza porque depende dos recursos naturais para produzir, pode ser consorciada com outras atividades como as culturas agrícolas e tem grande diversidade de produtos e serviço, como a polinização (SEBRAE, 2009).

Apesar de todas estas vantagens e seu enorme potencial, a atividade da apicultura vem sendo ameaçada pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, os quais podem comprometer colônias inteiras num curto espaço de tempo ou provocar o declínio das populações de abelhas de forma lenta por meio da contaminação dos recursos coletados e consumidos por elas (FREITAS et al., 2009, POTTS et al., 2016).

3. Declínio das populações de abelhas

As abelhas vêm sofrendo o impacto de fatores bióticos e abióticos típicos de cada região,

atuantes dentro e fora das colmeias (MORETTO, 1997), comprometendo a produção de mel, acompanhada do enfraquecimento das colônias.

A causa deste impacto ainda não está bem clara, no entanto a fragmentação das matas nativas, o uso indiscriminado dos agrotóxicos, as mudanças climáticas, cultivos de plantas transgênicas, são alguns fatores apontados como prejudiciais a sobrevivência das abelhas (POTTS, 2010), no entanto, acredita-se que a combinação de mais de um fator causa a sobrecarga de estresse sobre as colônias contribuindo para a diminuição das populações de abelhas no mundo (GOULSON et al., 21 2015).

Esses declínios populacionais de abelhas afetam o serviço de polinização, provocando impactos negativos ecológicos e econômicos, afetando significativamente a manutenção da diversidade de plantas silvestres, a estabilidade do ecossistema, produção de culturas agrícolas, segurança alimentar e bem-estar humano (KLEIN et al., 2007; STOKSTAD, 2007; POTTS, 2010, SPIVAK et al., 2011), além de trazer prejuízos econômicos para os apicultores através da redução da produção de mel, própolis e outros produtos apícolas.

4. Efeitos dos agrotóxicos nas abelhas

Woodcock et al. (2017) e Belsky e Joshi (2019) indicaram que a exposição aos agrotóxicos afeta negativamente a manutenção de populações de abelhas selvagens e domésticas.

No campo, a contaminação das abelhas pode ocorrer de forma direta, quando as campeiras fazem o forrageamento no mesmo período de aplicação do agrotóxico ou de forma indireta, quando coletam e levam para a colônia recursos (pólen, néctar, água e resina) contaminados, provocando posteriormente uma cascata de contaminação intracolônia, causando uma série de problemas podendo levar a colônia ao declínio (SANCHEZ-BAYO &

GOKA, 2014; FINE et al., 2017).

As abelhas melíferas apresentam intensa capacidade de forrageamento e explorando ampla área no entorno da colmeia por isso é considerada um importante bioindicador de contaminação do ambiente (PIRES et al., 2016; WOODCOCK et al., 2017). Por outro lado, os agrotóxicos usados nas lavouras podem alcançar áreas fora do perímetro onde foram aplicados, devido à ação de ventos e a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, podendo entrar na cadeia solo-água-plantas, contaminando plantas nativas que crescem próximo das áreas tratadas (SIMON-DELISO et al., 2014; PIECHOWICZ et al., 2018).

Ao entrarem em contato com os agrotóxicos, as abelhas sofrem alterações comportamentais, anatômicas e fisiológicas (BERENBAUM & LIAO, 2019). Degrandi-Hoffman et al., (2015), Sanchez-Bayo e Goka (2016) verificaram que a exposição crônica das abelhas aos agrotóxicos afeta as capacidades cognitiva, olfativa, comunicação, locomoção e orientação das abelhas; assim como reduz a longevidade das abelhas adultas e prejudica o desenvolvimento das larvas, causa má formação ou mortalidade das crias, reduz a expressão de genes do sistema imunológico e do sistema detoxicação, além de aumentar a susceptibilidade das abelhas a doenças e parasitas comprometendo o desenvolvimento das colônias (DECOURTYE et al., 2005; NOCELLI et al., 2012). A longevidade das abelhas adultas é comprometida mesmo quando a exposição ao agrotóxico ocorre na fase larval, apresentando assim um efeito tardio nas abelhas após a emergência (TADEI et al., 2019).

A rainha criada em colônias contaminadas apresentam os tecidos do seu ovário danificados, alta taxa de mortalidade, rejeição por parte das abelhas operárias da sua colônia, bem como dificuldades no acasalamento e na postura de ovos (SANTOS et al., 2016). As colônias contaminadas por agrotóxicos também apresentam redução da emergência e trocas mais frequentes de suas rainhas (SANDROCK et al., 2014).

A exposição de zangões a doses subletais de inseticidas promove a redução da

concentração e viabilidade de espermatozóides e aumenta a mortalidade (STRAUB et al., 2016), comprometendo a fertilidade e a reprodução das abelhas, uma vez que a rainha inseminada por zangões contaminados apresentam menor número de espermatozóides saudáveis na espermateca (WILLIAMS et al., 2015; WU-SMART & SPIVAK, 2016).

Abelhas contaminadas com inseticidas apresentam aumento da taxa de apoptose em células do sistema nervoso e inibição bioenergética mitocondrial, resultando na redução da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (NICODEMO et al., 2014).

O aumento da ocorrência de apoptose em células do intestino médio também foi observado em abelhas expostas a inseticidas podendo reduzir a digestão e absorção de nutrientes levando a imunossupressão, prejudicando a manutenção da atividade do sistema imunológico (DA SILVA CRUZ et al., 2010).

Alteração no desenvolvimento de glândulas mandibulares e hipofaríngeas, responsáveis pela secreção de geleia real, também foi observada em abelhas nutrízes expostas a doses subletais do inseticida fipronil, fungicida piraclostrobina e suas associações (ZALUSKI et al., 2017). Essa contaminação também prejudica a expressão gênica das principais proteínas componentes da geleia real: MRJP1, MRJP2, MRJP4, e MRJP5; indicando que as abelhas nutrízes sofrem disfunções das suas glândulas hipofaríngeas, comprometendo a qualidade da geleia real produzida (ZALUSKI et al., 2017 e ZALUSKI, et al., 2020). A alteração da expressão da proteína MRJP1, por exemplo, é um alerta importante porque esta proteína tem propriedades antimicrobianas que são essenciais para a saúde das larvas e diminuem a susceptibilidade aos agentes patogênicos (VEZETEU et al., 2017 e THE UNIPROT CONSORTIUM., 2017).

O mercado mundial de agrotóxicos cresceu cerca de 93% nos últimos 10 anos, enquanto que no Brasil esse crescimento foi de 190%, explicitando que o modelo de agricultura desenvolvida atualmente no país está cada vez mais dependente dos produtos fitossanitários,

justificando o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (DOS SANTOS et al., 2018; SHARMA et al., 2019, IBGE, 2020).

Em 2017, os agricultores brasileiros usaram 540 mil toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos, cerca de 50% a mais que em 2010 (IBAMA, 2017), sendo que os estados do Mato Grosso, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Bahia realizaram 83% das compras totais de agrotóxicos do país no período 2015-2017 (DE MORAES, 2019).

Em 2019, o Brasil aprovou o registro de 474 agrotóxicos, o maior número documentado pelo Ministério da Agricultura desde 2005 (ANVISA, 2020) e entre os inseticidas mais utilizados no nosso país está o fipronil que foi desenvolvido entre os anos 1985 e 1987 (TINGLE et al., 2003), chegou ao mercado em 1993 como o primeiro fenilpirazol para controle de pragas (TOMLIN, 2000) e foi considerado um dos inseticidas mais bem-sucedidos por mais de uma década por ser altamente versátil.

5. Inseticida fipronil

O fipronil é um inseticida sistêmico fenil-pirazol (Figura 1), amplamente utilizado para controlar pragas na agropecuária, no meio urbano e doméstico (SIMON-DELSO et al., 2015); a sua classificação toxicológica é de categoria de perigo 2 – produto altamente tóxico e do potencial de periculosidade ambiental II – produto muito perigoso ao meio ambiente e no Brasil ele é comercializado nas seguintes formulações: isca granulada – Blitz® (0,03g/kg) usada como formicida com aplicação terrestre; suspensão concentrada – Standak® (250 g/L) usado no tratamento de sementes; granulado – Regent® 20 G (20g/kg) usado como inseticida com aplicação no solo; granulado dispersível - Regent® 800 WG (800 g/kg) usado como inseticida

com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada - Klap® (200g/L) como formicida e inseticida com aplicação terrestre e aérea (ZALUSKI et al., 2014).

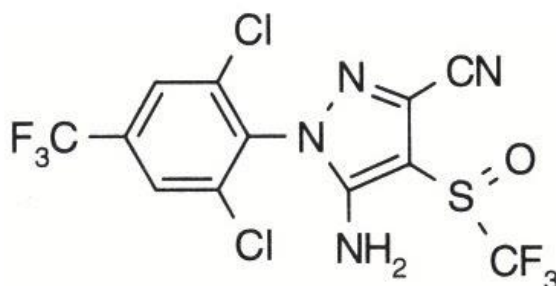


Figura 1 - Estrutura química do fipronil - (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril) Fonte: TINGLE et al. (2003).

Os seus usos agrícolas são: aplicação no solo nas culturas de batata, cana-de-açúcar, milho; aplicação foliar nas culturas do algodão, arroz, eucalipto e soja; aplicação no solo nas culturas da acácia, araucária, pinus, seringueira e teca; aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, cevada, feijão, girassol, milho, pastagens, sorgo, soja e trigo; aplicação foliar de mudas em viveiros nas culturas de acácia, araucária, eucalipto, pinus, seringueira e teca; aplicação no controle de formigas e cupins, conforme aprovação em rótulo e bula no ambiente rural; aplicação na água de irrigação para o arroz irrigado Além do uso no campo, este inseticida também é autorizado para fins não agrícolas como: aplicação no controle de formigas, conforme aprovação em rótulo e bula no ambiente doméstico, com venda livre de suas formulações; aplicação no ambiente urbano, para controle de pragas urbanas por entidades especializadas e campanhas de saúde pública; aplicação para controle de pragas na jardinagem e também uso como preservante de madeira na fabricação de dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas, (ANVISA, 2020).

Este inseticida, assim como aproximadamente 90% dos inseticidas, apresenta ação

direta sobre o sistema nervoso central (SNC) dos insetos, afetando a transmissão e a condução do impulso nervoso ao longo das células nervosas depende da concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- ; entretanto, para que os estímulos nervosos sejam propagados de uma célula para outra, na região da sinapse, é necessária a ação de neurotransmissores como o ácido gama- aminobutírico - GABA (DOWSON, 1977).

Em uma situação normal o GABA é liberado do terminal nervoso pré-sináptico e se liga á proteína receptora, o canal é aberto e os íons de cloro (Cl^-) fluem para o neurônio pós-sináptico desencadeando o mecanismo de retorno ao repouso do sistema nervoso após ser excitado (BLOOMQUIST, 2015).

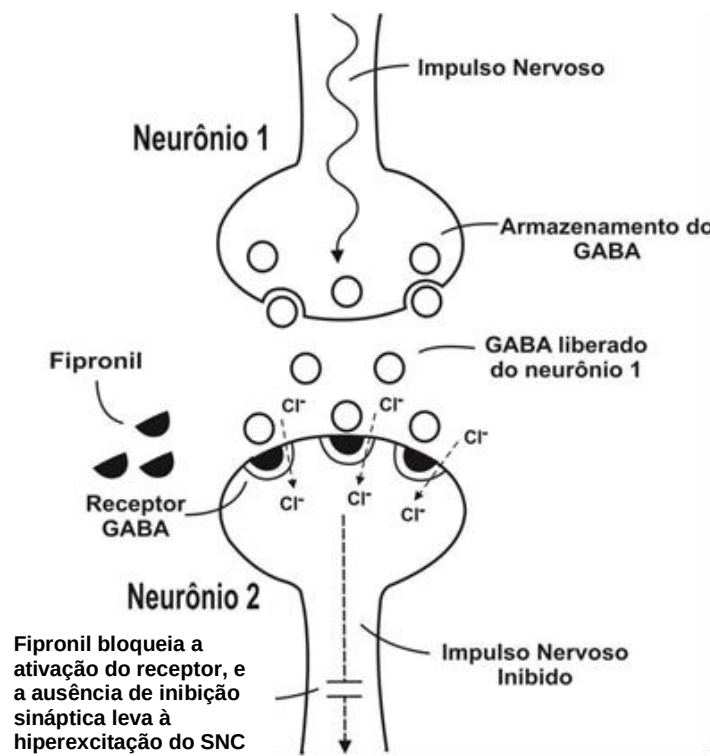


Figura 2 - Representação da ação do fipronil no receptor GABA. Fonte: Adaptado de BLOOMQUIST (2015).

Os inseticidas fenilpirazóis são antagonistas do neurotransmissor ligando-se aos

receptores do canal de cloro, impedindo ação do GABA e a entrada dos íons de Cl^- no neurônio pós-sináptico (Figura 1), tornando o fluxo dos impulsos nervosos constante e a hiperexcitação do SNC (BLOOMQUIST, 1993; KASHIWAQUI; GUERREIRO, 2015), seguida de paralisia e morte do inseto (SIMON-DELSO et al., 2015).

Pesquisas já demonstraram que a exposição das abelhas ao fipronil provoca danos morfológicos, fisiológicos e no metabolismo. Bernadou et al. (2009) relataram que a exposição da *Apis mellifera* ao inseticida resulta em prejuízos na aprendizagem e desempenho da memória, assim como na atividade motora das abelhas (ZALUSKI et al., 2015).

Embora o principal alvo do fipronil seja o sistema nervoso dos insetos, Cruz et al. (2010) observaram alterações no intestino médio, órgão importante para estudos de toxicidade, por ser parte do trato digestório, local mais exposto ao inseticida em contaminação oral (DENECKE et al., 2018). Alterações morfológicas no intestino médio como desorganização do epitélio, danos mitocondriais e ruptura da matriz peritrofílica (uma matriz extracelular que protege o epitélio do intestino médio), podem afetar a absorção e digestão de nutrientes (CRUZ et al., 2010).

Doses subletais de fipronil ocasionam desenvolvimento anormal das antenas e asas, e menor tamanho corporal dos novos indivíduos (MUÑOZ-CAPPONI et al., 2018). A má formação das antenas podem causar problemas no desenvolvimento das colônias, porque são responsáveis pelos sentidos do tato, olfato e audição; permitindo as abelhas sentirem o nível de umidade no ambiente, pressão do ar, temperatura, odor, vibrações sonoras, estímulos gustativos e contato tátil (SUWANNAPONG et al., 2011); auxiliando na comunicação intra-específica e a construção de novas células (KEVAN, 1987).

Por sua vez, a má formação das asas impede as abelhas campeiras de realizarem um forrageamento eficiente. De acordo com Decourtye et al. (2011), as abelhas expostas ao fipronil reduzem o número de viagens de forrageamento, significativamente em 10,3% em média,

porque as asas menores podem limitar a capacidade de voo e consequentemente reduzir a probabilidade de encontrar alimento.

As abelhas nutrízes expostas ao fipronil apresentaram mudanças em seu metabolismo relacionadas à biossíntese, síntese de proteínas envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono e dos aminoácidos, transcrição/tradução, ligação/desdobramento de proteínas, sistema antioxidante, sistema olfativo, aprendizagem e memória (ZALUSKI et al., 2020).

O fipronil é lentamente degradado no meio ambiente, sua meia-vida dura de 36 horas a 7 meses, o que aumenta o risco de exposição das abelhas campeiras a este composto (BONMATIN et al., 2015; SANTOS et al., 2016). O risco de contaminação aumenta considerando os seus metabólitos, fipronil-sulfeto e fipronil-sulfona, que são respectivamente, 6,6 e 1,9 vezes mais tóxicos à invertebrados que o fipronil em si (U.S.EPA., 1996).

A longa persistência e a natureza sistêmica do fipronil aumentam a sua probabilidade de contaminante ambiental (ZALUSKI et al., 2015) porque é absorvido pelas raízes e folhas, e transportado para todas as partes da planta, que se torna tóxica para os insetos nocivos às culturas agrícolas que estão sendo tratadas (CASTILHOS, 2018), assim como para os insetos não alvo, como os polinizadores.

Alterações fisiológicas e comportamentais comprometedoras à sobrevivência de toda a colônia (ZALUSKI, 2017), assim como deficiência no forrageamento ou o não retorno das campeiras para a colmeia (BENUSZAK et al., 2017), são prejuízos que podem ser provocados por doses pequenas, subletais e residuais, encontradas no campo através da coleta de pólen, néctar, água, resina ou também, gotas de gutação de culturas tratadas (BONMATIN et al., 2015), retidos no solo e na água. Essa dose subletal no campo é denominada dose ambientalmente relevante (DAR).

Segundo Desneux, et al. (2007) e Zaluski, et al. (2017), a exposição das abelhas a DAR compromete os sistemas de navegação, localização, memória e locomoção. Em 2020, Zaluski

et al. demonstraram com suas análises que a exposição das abelhas nutrizes ao fungicida piraclostrobina e ao inseticida fipronil individualmente e em combinação em DAR promoveu mudanças no metabolismo que podem reduzir a expressão de proteínas e aumentar a sua susceptibilidade a doenças, ataque de parasitas e estresse por outros agrotóxicos.

6. Transcriptoma

O transcriptoma é uma técnica de sequenciamento genético que facilita os estudos de organismos complexos possui grande número de genes e corresponde ao conjunto de mRNA, ou transcritos, expressos em um organismo ou grupo de células em determinado momento; esta técnica permite a obtenção de grande número de informações sobre as proteínas do organismo estudado com menor volume de seqüenciamento (GRIFFITHS et al., 1998).

Uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) é uma coleção de clones contendo regiões transcritas do genoma sendo, por isso, menor que uma biblioteca genômica. O cDNA é um DNA sintetizado no laboratório a partir de um mRNA molde (GRIFFITHS et al., 1998). As sequências nucleotídicas das extremidades de cada um dos cDNAs presentes em uma biblioteca são chamadas de *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Através da determinação de ESTs é possível identificar o conjunto de genes expressos em determinada situação, especialmente para organismos que possuem genomas muito grandes ou que ainda não foram sequenciados (BOUCK; VISION, 2007).

Tal procedimento apresenta inúmeras aplicações biológicas, biotecnológicas, ecológicas e evolutivas e, por essa razão as ESTs constituem um dos tipos mais diverso e abundante de informações disponíveis em bancos de dados.

7. Conceito de Saúde única (One-Health)

O conceito de Saúde Única tem sido discutido desde meados dos anos 2000 e foi adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial de Saúde Animal (World Organisation for Animal Health – OIE) e Organização para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization – FAO), bem como sociedades veterinárias e médicas em todo o mundo (GIBBS, 2014).

A Saúde Única enfatiza a interconectividade da saúde humana, animal e ambiental, observando em particular que a saúde humana depende de um ecossistema saudável e funcional (DESTOUMIEUX-GARZON, 2018). Outros nomes são atribuídos á esse mesmo foco de multidisciplinaridade, como por exemplo 'EcoHealth' e 'Planetary Health' (LERNER and BERG, 2017).

Desta forma, o efeito de agrotóxicos em abelhas está inserido no conceito de Saúde Única, uma vez que a saúde das abelhas está relacionada com a saúde da flora, fauna e seres humanos. A crise enfrentada pelos polinizadores deve ser discutidas no âmbito interdisciplinar da entomologia, investigação social e ecológica sendo importante considerar a perspectiva de saúde, compreensão das relações entre as espécies presentes no ambiente e o contexto em que estão se interrelacionando (DONKERSLEY et al., 2020).

Para perceber a realidade sobre saúde das abelhas é preciso analisar as interferências de fatores à nível da colmeia, dos seres humanos e ainda, da paisagem (Figura 3) (DONKERSLEY et al., 2020).

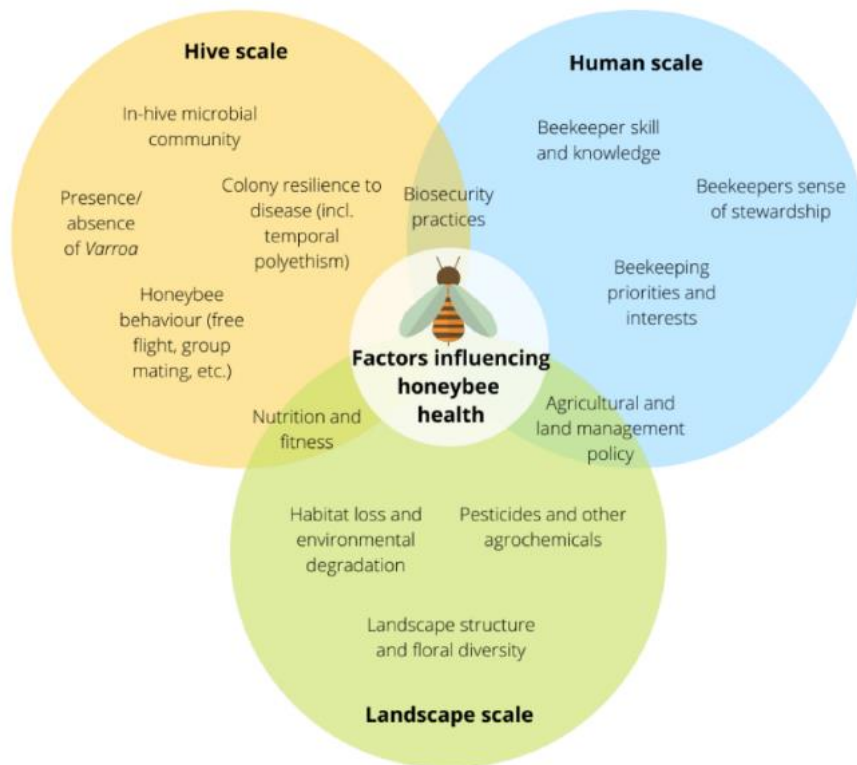


Figura 3 - Fatores que influenciam a saúde das abelhas em escalas diferentes. Os pontos de sobreposição ilustram a necessidade de uma abordagem de Saúde Única para enfrentar os desafios à saúde das abelhas (DONKERSLEY et al., 2020).

Alguns fatores dentro da colmeia que influenciam na saúde das abelhas são: a comunidade microbiana existente, presença de parasitas, comportamento das abelhas e resistência às doenças. A interferência humana está associada a habilidade do apicultor, conhecimento aprofundado sobre a apicultura e o interesse na gestão da produção. Já na interface da paisagem temos os desafios da perda de habitat e degradação ambiental, uso de agrotóxicos e as características da estrutura paisagística e diversidade floral (DONKERSLEY et al., 2020).

Por último, nas sobreposições que podemos observar na figura 3, temos as questões mais delicadas que afetam mais de uma interface, como: práticas de biosegurança no manejo das colmeias o produtos apícolas, política de produção agrícola e de uso e ocupação do solo e a

nutrição das abelhas dependente da flora contida ao redor do apiário (DONKERSLEY et al., 2020).

Considerando a importância econômica e ambiental das abelhas *Apis mellifera* e os prejuízos sofridos quando contaminadas pelo inseticida fipronil; os objetivos do presente trabalho foram verificar se o fipronil provoca alterações na expressão gênica das abelhas campeiras de *Apis mellifera*, identificar os genes alterados, conhecer e analisar a função desses genes e discutir os possíveis prejuízos provocados por essa contaminação para a abelha e a sua colônia.

A presente pesquisa resultou no capítulo II, artigo intitulado “**FIPRONIL EM DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE AFETA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS *Apis mellifera* L.**”, o qual será submetido ao periódico “Apidologie”, conforme as suas regras de publicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Regularização de produtos e serviços, Monografias de agrotóxicos autorizadas, F F43 – Fipronil, 2020.

AIZEN, M.A., HARDER, L.D. The global stock of domesticated honeybees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, v.19, n.11, p.915-918, 2009.

ÁLVAREZ, F.P.; SERRANO, J.M.F. O sexo no mundo das abelhas. *Vida apícola*, p. 18- 24, 2010.

AL-WAILI, N., AL-GHAMDI, A., ANSARI, M.J., AL-ATTAL, Y., SALOM, K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures', *International Journal of Medical Sciences*, v. 9, no. 9, pp. 793- 800, 2012.

BELSKY, J., JOSHI, N.K. Impact of biotic and abiotic stressors on managed and feral bees. *Insects* 10, 233, 2019.

BERENBAUM, M.R., LIAO, L.H. Honey bees and environmental stress: toxicologic pathology of a superorganism. *Toxicol. Pathol.*, 2019.

BERNADOU, A., DÉMARES, F., COURET-FAUVEL, T., SANDOZ, J.C., GAUTHIER, M. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 55, 1099–1106, 2009.

BENUSZAK, J.; LAURENT, M.; CHAUZAT, M-P. The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: room for improvement in research. *Science of the Total Environment*, v. 587-588, n. 5, p. 423-438. 2017.

BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F.L.W. Hygienic behavior in honey bees

(Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. *Journal of Economic Entomology*, v. 106, n. 6, p. 2280-2285, 2013.

BLOOMQUIST JR. Toxicology, mode of action, and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106 (2): 301-314. 1993.

BLOOMQUIST, J.R. Insecticides: chemistries and characteristics. Flórida: [s.n.], 2015.

BOMFIM, I.G.A; OLIVEIRA, M.O; FREITAS, B.M. Curso Técnico em Apicultura: Biologia das abelhas. Fundação Universidade Estadual do Ceará - Funece Universidade Estadual do Ceará – UECE MEDIOTEC. 2017.

BONMATIN, J.M., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D.P., KRUPKE, C., LIESS, M., LONG, E., MARZARO, M., MITCHELL, E.A., NOOME, D.A., SIMON-DELISO, N., TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67, 2015.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol. Ecol.*, v. 16, n.5, p. 907-924, mar. 2007.

CARANTÓN, O.A.M. Dinâmica reprodutiva e influência das áreas de congregação de zangões na africanização de *Apis mellifera* (APIDAE: APINI) no Brasil. 2006, 69 p. Tese (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CARPES T.S.; PRADO A.; MORENO M.A.I.; MOURÃO B.G.; ALENCAR M.S.; MASSON L.M. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. *Quim. Nova*, 31(7), 1660-1664, 2008.

CASTILHOS, D. Desaparecimento e morte de abelhas no Brasil, registrados no aplicativo Bee

Alert. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2018.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA/SENAR. Trabalho e dedicação garantem qualidade do mel brasileiro, 2021.

CRUZ, A.S., SILVA-ZACARIN, E.C.M., BUENO, O.C., MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. Cell Biol. Toxicol. 26, 165–176, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9126-x>.

CRUZ-LANDIM, C. Glândulas exócrinas presentes nos adultos das abelhas sociais. Naturalia, São Paulo, n. esp., 79-84, 1992.

CRUZ-LANDIM, C. Polimorfismo na ocorrência de glândulas exócrinas nas abelhas (Hymenoptera, Apoidea). In: Anais do Encontro de Abelhas, 1, Ribeirão Preto, 118, 1994.

DA SILVA CRUZ, A., DA SILVA-ZACARIN, E., BUENO, O.C., MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae Morphological alterations in the midgut of *A. Mellifera*. Cell Biol Toxicol, 26:165–176, 2010.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., GENECQUE, E., LE MENACH, K., BUDZINSKI, H., CLUZEAU, S., PHAM-DELÈGUE, M.H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. Archives of environmental contamination and toxicology, v. 48, n. 2, p. 242-250, 2005.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., AUPINEL, P., BRUN, F., BAGNIS, C., FOURRIER, J., GAUTHI, M. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. Ecotoxicology, 20: 429-437, 2011.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; DEJONG, E.W. CHAMBERS, M.L., HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *Journal of Economic Entomology*. v.108, p. 2518-28, 2015.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World*, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

DE MORAES, R.F. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Institute of Applied Economic Research (ipea), Brasília, 2019.

DENECKE, S., SWERS, L., DOURIS, V., VONTAS, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 103, 22–35, 2018.

DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, p. 81–106, 2007.

DE SOUZA, D.A.; GRAMACHO, K.P.; CASTAGNINO, G.L.B. Produtividade de mel e comportamento defensivo como índices de melhoramento genético de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.13, n.2, p.550-557, 2012.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOETSCH, G.; BOISSIER, J.; DARRIET, F.; DUBOZ, P.; FRITSCH, C.; GIRAUDOUX, P.; LE ROUX, F.; MORAND, S.; PAILLARD, C.; PONTIER, D.; SUEUR, C.; VOITURON, Y. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* 2018.

DINIZ, N.M. Estudo dos processos de enxameagem e de abandono de colônias de abelhas africanizadas em zonas rurais e urbanas. Dissertação de mestrado, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 130p. 1990.

DOMINGOS, H. G. T.; GONÇALVES, L. S. Thermoregulation in bees with emphasis on *Apis mellifera*. Acta Veterinaria Brasilica, Rio Grande do Norte. Editora da Universidade Federal Rural do Semi-Arido - EdUFERSA. v.8, n.3, p.151-154, 2014.<http://dx.doi.org/10.21708/avb.2014.8.3.3491>.

DONKERSLEY, P.; ELSNER-ADAMS, E.; MADERSON, S. A One-Health Model for Reversing Honeybee (*Apis mellifera* L.) Decline. Vet. Sci. 2020, 7, 119, 2020.

DOS SANTOS, C.F., OTESBELGEU, A., BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: beekeeping growth and insecticide use. PLoS One 13, e0200286, 2018.

DOWSON, R.J. An introduction to the principles of neurophysiology. Pesticide Science, v.8, n.6, p. 651-660, 1977.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, Sistemas de Produção: Produção de Mel. Embrapa Meio-Norte. ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica Jul/2003. Atividades Econômicas Criações Abelhas Manejo Produtivo, 2003.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Data - Production. Disponível em: faostat.fao.org., 2020.

FRANCOY, T.M. Variabilidade genético-morfológica em populações neotropicais de *Apis mellifera*. 2007.

FREE, J.B. A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo: E.P.U, 79 p, 1980.

FREITAS, B.M., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., MEDINA, L.M., DEM.P. KLEINERT, A., GALETTO, L., NATES-PARRA, G., QUEZADA-EUAN, J.J.G. Diversity, threats and

conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*. 40, 332–346, 2009.

FREITAS, D.G.F.; KHAN, A.S.; SILVA, L.M.R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 42, n. 1, p. 171-188, 2004.

FUNARI, S.R.C., ORSI, R.O., ROCHA, H.C., SFORCIN, J.M., FUNARI, A.R.M. Influência da fumaça e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no comportamento defensivo de abelhas africanizadas e suas híbridas européias (*Apis mellifera* L.). *B. Industr.anim., N. Odessa*, v.61, n.2, p.121-125, 2004.

GALLO, D. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: Ed. Ceres. 2002.

GARCIA-AMOEDO, L.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geleia real. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 4, p.676-679, 21 nov. 2002.

GIBBS, E.P.J. The evolution of one health: A decade of progress and challenges for the future. *Vet. Rec.* 2014.

GODINHO, M.J. *Investigação apícola em números*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. 2016.

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, 2015.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. *Introdução à genética*. 6 ed. Tradução de P.A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p., 1998.

GRÜTER, C.; LEADBEATER, E. Insights from insects about adaptive social information use.

Trends in ecology & evolution, v. 29, n. 3, p. 177-184, 2014.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro, 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., GONÇALVEZ, L.S., FRANCOY, T.M., NUNES-SILVA, P. O Desaparecimento das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS – IBAMA, 2017.

KASHIWAQUI, M.M., GUERREIRO, J.C. Inseticidas antagonistas do GABA: Potencialidades e riscos para o manejo integrado de pragas. Journal of Agronomic Sciences, 4: 186-200, 2015.

KERR, W.E., BUENO, D. Natural crossing between *Apis mellifera adansonii* and *Apis mellifera ligustica*. Evolution, v. 24, n. 1, p. 145-148, 1970. KERR, W.E. The history of the introduction of African bees in Brazil. South African Bee Journal, v. 39, p. 3-5, 1967.

KEVAN, P.G. Texture sensitivity in the life of the honeybees, pp. 96-101. In: Neurobiology and behavior of honeybees (MENZEL R., MERCER A., Eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1987.

KLEIN, A.M., VAISSIE'RE, B.E., CANE, J.H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S.A., KREMEN, C., TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. B, v. 274, p. 303-313, 2007.

LERNER, H.; BERG, C. A comparison of three holistic approaches to health: One health,

ecohealth, and planetary health. Front. Vet. Sci. 2017.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellífera* (Hymenoptera: apidae) em Piracicaba, estado de São Paulo. Ciência Rural, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MILESKI, J.P.F. Produção e Caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*. 2016.

MORETTO, G. Defense of Africanized bee workers against the mite *Varroa jacobsoni* in Southern Brazil. American Bee Journal, 137: 746–747, 1997.

MUÑOZ-CAPPONI, E.A.; SILVA-AGUAYO, G.; RODRÍGUEZ-MACIEL, J.C.; RONDANELLI-REYES, M.J. Sublethal exposure to fipronil affects the morphology and development of honey bees, *Apis mellífera*. Bulletin of Insectology 71 (1): 121-130, 2018.

NICODEMO, D., MAIOLI, M.A., MEDEIROS, H.C.D., GUELF, M., BALIEIRA, K.V.B., JONG, D.de, MINGATTO, F.E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. Environmental Toxicology and chemistry, 2014.

NOCELLI, R.C.F., ROAT, T.C., ZACARIN, E.C.M. DAS., MALASPINA, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. Semana dos Polinizadores, v. 3, 2012.

NOGUEIRA, C.M.P. Estudo do polén apícola comercial. Tese de mestrado, Escola Superior Agrária de Bragança, 2012.

OLINTO, F.A.; SILVEIRA, D.C.; LIMA, D.C.; MARACAJÁ, P.B. Comportamento higiênico em colmeias de *Apis mellífera* L. africanizadas no Sertão da Paraíba. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, Pombal, v.10, n.3, p.08-12, 2015.

PAGE JR, R.E.; PENG, C.Y.S. Aging and development in social insects with emphasis on the

honey bee, *Apis mellifera* L. Exp. Gerontol., v. 36, n. 4, p. 695-711, 2001.

PAN. Plano de Ação. In Centro de Competência da Apicultura e Biodiversidade, pp. 1–26, 2018.

PEREIRA, A.M.; CHAUD-NETTO, J. Africanized honeybees: biological characteristics, urban nesting behavior and accidents caused in Brazilian cities (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology, v. 46, n. 3, p. 535-550, 2005.

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.

PIRES, C.S.S., PEREIRA, F.D.M., LOPES, M.T.D.R., NOCELLI, R.C.F., MALASPINA, O., PETTIS, J.S., TEIXEIRA, E.W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? Pesq. agropec. Bras, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.

POTTS, S.G. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe? J. Apic. Res., 49, pp. 15-22, 2010.

POTTS, S.G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T.; AIZEN, M.A.; BIESMEIJER, J.C.; BREEZE, T.D.; DICKS, L.V.; GARIBALDI, L.A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A.J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Nature, 540: 220-229, 2016.

RAMOS, M.J; CARVALHO, C.N. Estudo Morfológico e Biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. Rev. Científica Eletrônica de Engenharia Florestal, 2007.

RANGEL, M.A. A História do Setor de Apicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas / UFRRJ), 41p. 2006.

RHODES, J.W. Quality of commercially reared queen and drone honey bees (*Apis mellifera* L.) in eastern Australia. 2011,217f. Tese (Doutorado em Filosofia) - University of Western Sydney, New South Wales, 2011.

SABBAG, O.J.; NICODEMO, D. Viabilidade econômica para produção de mel em propriedade familiar. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v.41, n.1, p.94-101, 2011.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - a risk assessment. PLoS One, v.9, n.4, p.e94482, 2014.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of pesticides on honey bees. In: E. D. Chambo (Ed.) Beekeeping and bee conservation - Advances in research. Rijeka: In Tech, p.77-97. 2016.

SANDROCK, C., TANADINI, M., TANADINI, L.G., FAUSER-MISLIN, A., NEUMANN, P. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. Plos One 9, 1–13, 2014.

SANTOS, A., ZANETTI, R., SANTOS, J.C., BIAGIOTTI, G., EVANGELISTA, A.L., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. Persistence of fipronil residues in *Eucalyptus* seedlings and its concentration in the insecticide solution after treatment in the nursery. Environ. Monit. Assess. 188, 314, 2016.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas da Bahia – Sebrae Salvador, 2009.

SHARMA, A., KUMAR, V., SHAHZAD, B., TANVEER, M., SIDHU, G.P.S., HANDA, N., KOHLI, S.K., YADAV, P., BALI, A.S., PARIHAR, R.D., DAR, O.I., SINGH, K., JASROTIA, S., BAKSHI, P., RAMAKRISHNAN, M., KUMAR, S., BHARDWAJ, R., THUKRAL, A.K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Appl. Sci. 1, 1446, 2019.

SHEPPARD, W.S., RINDERER, T.E., MAZZOLI, J.A., STELZER, J.A., SHIMANUKI, H. Gene flow between African and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature*, v. 349, p. 782–784, 1991a.

SHEPPARD, W.S., SOARES, A.E.E., DE JONG, D., SHIMANUKI, H. Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie*, v. 22, 643-652, 1991b. doi: 10.1051/apido:19910607

SIMON-DELISO, N., MARTIN, G.S., BRUNEAU, E., MINSART, L.A., MOURET, C., HAUSTIER, L. Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2014.

SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L., BONMATIN, J., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D., KRUPKE, C., LIESS, M., LONG, E., MCFIELD, M., MINEAU, P., MITCHELL, E., MORRISSEY, C., NOOME, D., PISA, L., SETTELE, J., STARK, J., TAPPARO, A., VAN DYCK, H., VAN PRAAGH, J., VAN DER SLUIJS, J., WHITEHORN, P., WIERNERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34, 2015.

SOUZA SÁ, M.; SILVA, L.G.S.; CAVALCANTE, M.C., OLIVEIRA, P.A. Forrageamento e comunicação em abelhas *Apis mellifera* L. na caatinga do Brasil. III Congresso internacional de ciências agrárias – COINTER – PDVAGRO, 2018.

SPIVAK, M., MADER, E., VAUGHAN, M., JR., N.H.E. The plight of the bees. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 1, p. 34–38, jan. 2011.

STABENTHEINER, A.; KOVAC, H.; BRODSCHNEIDER, R. Honeybee colony thermoregulation–regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on

age, location and thermal stress. PloS One, Public Library of Science, v. 5, n. 1, p. e8967, 2010.

STANDIFER, L.N.; MCCAUGHEY, W.F.; DIXON, S.E.; GILLIAM, M.; LOPER, G.M. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. *Apidologie* 11, 163–171. 1980.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. *Science*, v. 316, p. 970–973, 2007.

STRAUB, L., VILLAMAR-BOUZA, L., BRUCKNER, S., CHANTAWANNAKUL, P., GAUTHIER, L., KHONGPHINITBUNJONG, K., RETSCHNIG, G., TROXLER, A., VIDONDO, B., NEUMANN, P., WILLIAMS, G.R. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc. R. Soc. B* 283: 20160506, 2016.

SUWANNAPONG, G., BENBOW, M., NIEH, J. Biology of Thai honey bees: natural history and threats, pp. 1-98. In: *Bees: biology, threats and colonies* (FLORIO R. M., Ed.). Nova Science Publishers, New York, USA. 2011.

TADEI, R., DOMINGUES, C.E.C., MALAQUIAS, J.B., CAMILO, E.V., MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E.C.M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, v. 9, e3277, 2019.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158-69, 2017.

TINGLE, C.C.D., ROTHER, J.A., DEWHURST, C.F., LAUER, S., KING, W.J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 176:1–66, 2003.

TOMLIN, C.D.S. The pesticide manual. British Crop Production Council. 12:413–415, 2000.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Calculation and evaluation of sediment

effect concentrations for the amphipod *Hyaella azteca* and the midge *Chironomus riparius*. EPA 905- R96-008, Chicago, IL, 1996.

VEZETEU, T.V., BOBIȘ, O., MORITZ, R.F.A., BUTTSTEDT, A. Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *Microbiologyopen* 6, 1–7, 2017.

WILLIAMS, G.R., TROXLER, A., RETSCHNIG, G., ROTH, K., YANEZ, O., SHUTLER, D., NEUMANN, P., GAUTHIER, L. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports*, 2015.

WINSTON, M.L. The biology and management of Africanized honey bees. *Annual Review of Entomology*, v. 37, n. 1, p. 173-193, 1992.

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 honeybees and wild bees. *Science*, v.356, n.6345, p.1393-1395, 2017.

WU-SMART, J., SPIVAK, M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, 2016.

ZALUSKI, R. Efeito do inseticida fipronil em abelhas africanizadas e na expressão de gene relacionado ao sistema imunológico, 2014.

ZALUSKI, R., KADRI, S.M., ALONSO, D.P., ROBOLLA, P.E.M., ORSI, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 34, No. 5, pp. 1062–1069, 2015.

ZALUSKI, R. Efeito de dose subletal de fipronil e piraclostrobina, isoladas ou associação, na

morfologia de glândulas e proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* L. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 155 p. 2017.

ZALUSKI, R., JUSTULIN, L. A.JR., ORSI, R.O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). Sci. Rep. 7, 15217, 2017.

ZALUSKI, R., BITTARELLO, A.C., VIEIRA, J.C.S., BRAGA, C.P., PADILHA, P.M., FERNANDES, M.S., BOVI, T.S., ORSI, R.O. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides, 2020.

CAPÍTULO II

FIPRONIL EM DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE AFETA A EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS *Apis mellifera* L.

No presente estudo, analisaram-se as alterações na expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* na fase de campeiras expostas á dose ambientalmente relevante do agrotóxico fipronil. Para isso, abelhas operárias com 21 dias de idade, previamente marcadas na região do tórax, foram coletadas de suas respectivas colmeias, mantidas em jejum por 3 horas sendo, em seguida, expostas ao alimento contaminado ou não com fipronil na concentração 2,5 ppb/abelha. Após uma e quatro horas de exposição, 15 abelhas de cada tratamento foram encaminhadas para a análise do transcriptoma. Observou-se efeito na expressão gênica após quatro horas de exposição com redução na expressão de 11 genes, sendo relacionados com o sistema digestório das abelhas os genes: endoglucanase E-4, transcription activator MSS11, inositol monophosphatase 2 - transcript variant X1, ATP-binding cassette sub-family G member 5 e cuticular protein 28; relacionados com a composição do exoesqueleto: cuticular protein 28; relacionados com transporte de vitamina E e sistema antioxidante: alpha-tocopherol e relacionado com o ritmo circadiano e o relógio biológico endógeno das abelhas: circadian clock-controlled protein. Os resultados indicam que o inseticida fipronil provoca alterações na expressão de genes os quais podem acarretar modificações fisiológicas, morfológicas, no metabolismo, comportamento de abelhas *Apis mellifera* com consequente declínio da colônia.

Palavras-chave: Agrotóxico, Expressão gênica, Transcriptoma.

FIPRONIL AT FIELD-RELEVANT DOSES AFFECTS GENIC EXPRESSION IN BEES *Apis mellifera* L.

In the present study, we analyzed the changes in gene expression of *Apis mellifera* bees during the forager phase exposed to an environmentally relevant dose of the pesticide fipronil. For this, 21-day-old worker bees, previously marked in the thorax region, were collected from their beehives, fasted for 3 hours and then exposed to food contaminated or not with fipronil at a concentration of 2.5 ppb/bee. After one and four hours of exposure, 15 bees from each treatment were referred for transcriptome analysis. Was observed reduction in the expression of 11 genes, after four hours of exposure, related to the digestive system of bees: endoglucanase E-4, transcription activator MSS11, inositol monophosphatase 2 - transcript variant X1, ATP-binding cassette, G subfamily, member 5 and cuticular protein 28; related to an exoskeleton composition: cuticular protein 28; related to vitamin E transport and antioxidant system: alpha-tocopherol and related to circadian rhythm and the endogenous biological clock of bees: protein controlled by the circadian clock. The results indicate that the insecticide fipronil causes changes in the expression of genes which can lead to physiological, morphological changes, metabolism and behavior in *Apis mellifera* bees with consequent colony decline.

Keywords: Agrotoxic, Gene expression, Transcriptome.

1. Introdução

As abelhas *Apis mellifera* possuem importância econômica e ambiental, por meio da produção dos produtos apícolas (Freitas; Khan; Silva, 2004) e dos serviços de polinização de plantas silvestres e culturas agrícolas, contribuindo com a biodiversidade e favorecendo a produção de alimentos (Potts et al., 2016). Entretanto, as abelhas vêm sofrendo o impacto de fatores bióticos e abióticos típicos de cada região, atuantes dentro e fora das colmeias (Moretto, 1997), comprometendo a produção de mel, acompanhada do enfraquecimento das colônias.

A causa deste impacto ainda não está bem definida, mas alguns fatores estressores são apontados como contribuintes; entre eles estão a fragmentação das matas nativas, o uso indiscriminado dos agrotóxicos, as mudanças climáticas, cultivos de plantas transgênicas, são alguns fatores apontados como prejudiciais à sobrevivência das abelhas (Potts, 2010). No entanto, acredita-se que a combinação de mais de um fator causa a sobrecarga de estresse sobre as colônias contribuindo para a diminuição das populações de abelhas no mundo (Goulson et al., 2015).

As abelhas são sensíveis à contaminação por agrotóxicos, principalmente á inseticidas neurotóxicos como o fipronil, que atuam diretamente no sistema nervoso central, afetando o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e o canal de cloro (Hainzl & Casida, 1996), resultando em atividade neural excessiva, tremores, paralisia e morte dos insetos (Narahashi et al., 2010). O fipronil pode ser letal para as abelhas em longo prazo por meio da exposição por ingestão de vestígios residuais encontrados no néctar e pólen de culturas tratadas, devido à sua capacidade de gerar toxicidade ao longo do tempo, conhecida como “time-reinforced toxicity (TRT)” (Holdera et al., 2018). Por isso, os estudos com as doses ambientalmente relevantes dos agrotóxicos são importantes, porque são doses subletais, residuais, encontradas no campo pelas abelhas campeiras, através da coleta de pólen, néctar,

água, resina ou também, gotas de gutação de culturas tratadas (Bonmatin et al., 2015).

A exposição das abelhas ao fipronil afeta o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas e mandibulares (Zaluski et al., 2017), prejudica a aprendizagem e desempenho da memória (Bernadou et al., 2009), assim como na atividade motora das abelhas (Zaluski et al., 2015). Este agrotóxico promove também alterações no intestino médio, desorganização do epitélio, danos mitocondriais e ruptura da matriz peritrofica (uma matriz extracelular que protege o epitélio do intestino médio), podendo afetar a absorção e digestão de nutrientes (Cruz et al., 2010).

De acordo com Decourtye et al. (2011), as abelhas expostas ao fipronil reduzem o número de viagens de forrageamento, significativamente em 10,3% em média, porque as asas menores podem limitar a capacidade de voo e consequentemente reduzir a probabilidade de encontrar alimento. As abelhas nutrízes expostas ao fipronil apresentaram mudanças em seu metabolismo relacionadas à biossíntese, síntese de proteínas envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono e dos aminoácidos, transcrição/tradução, ligação/desdobramento de proteínas, sistema antioxidante, sistema olfativo, aprendizagem e memória (Zaluski et al., 2020). Doses subletais de fipronil ocasionam desenvolvimento anormal das antenas e asas, e menor tamanho corporal dos novos indivíduos (Muñoz-Capponi et al., 2018).

Uma forma de observar a extensão dos danos provocados pelo fipronil nas abelhas são técnicas de sequenciamento genético como o transcriptoma, que permite a obtenção de informações sobre as alterações na expressão gênica em um organismo ou grupo de células em um determinado momento (Griffiths et al., 1998) sem interferências externas.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram verificar se o fipronil provoca alterações na expressão gênica das abelhas campeiras de *Apis mellifera* por meio da análise de transcriptoma, identificar os genes alterados, conhecer e analisar a função desses genes e discutir os possíveis prejuízos provocados por essa contaminação para a abelha e sua colônia.

Material e métodos

O experimento foi realizado na Área de Produção em 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).

Foram utilizadas três colônias de abelhas *Apis mellifera* alojadas em núcleos, padronizados quanto ao número de quadros contendo favos de cria e de 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 da marca posca. Após, os quadros foram retirados do tecido filó e reintroduzidos em suas colônias de origem juntamente com as abelhas marcadas (Roat et al., 2014). Após vinte e um dias, 120 abelhas marcadas foram capturadas e distribuídas em placas de Petri (perfuradas para garantir a ventilação) e mantidas em jejum por um período de três horas a fim de garantir o consumo do alimento oferecido (Zaluski, et al. 2014). Em seguida, 1,0 mL de mel diluído em água na proporção de 1:1 foi fornecido, contendo ou não o fipronil na dose de 2,5 ppb, ambientalmente relevante (DAR) (Zaluski et al., 2020). Os tratamentos foram feitos em triplicata, com 10 abelhas cada repetição.

Os cochos, contendo o alimento, foram pesados antes e depois do consumo, afim de certificar-se que as abelhas se alimentaram em todos os grupos experimentais.

Após 1 hora e 4 horas, 15 abelhas de cada tratamento foram anestesiadas por baixa temperatura, acondicionadas em tubos falcon devidamente identificados e levadas em caixa de isopor com gelo, para o laboratório do IBTEC – Instituto de Biotecnologia da UNESP – Câmpus de Botucatu, para a realização da análise de transcriptoma.

No laboratório, as abelhas foram divididas em 05 amostras para cada grupo experimental. Elas foram decaptadas e as cabeças foram maceradas para exposição do material cerebral. O RNA total foi extraído dos pools cerebrais de abelhas campeiras *A. mellifera* (03 cérebros por pool) usando o protocolo de reagente TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) Chomczynski P. As concentrações de RNA foram quantificadas em cada amostra usando um fluorômetro Qubit™ 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). As bibliotecas de cDNA foram construídas com 200 ng de RNA total usando o Kit de Preparação de Biblioteca de RNA Específico para Fios SureSelect (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos das bibliotecas foram sequenciados usando uma plataforma Illumina Nextseq (Illumina, San Diego, EUA).

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

Não houve diferença significativa no consumo do alimento entre o tratamento controle e contaminado, tanto para uma hora ($39,9 \pm 5,1$ e $32,7 \pm 17,8$ $\mu\text{L}/\text{abelha}$, respectivamente) e quatro horas ($47,0 \pm 7,7$ e $51,4 \pm 30,2$ $\mu\text{L}/\text{abelha}$, respectivamente) (teste T, $P > 0,05$), indicando que o fipronil não promoveu efeito repelente.

Genes diferencialmente expressos

Após o desafio das abelhas com a DAR do fipronil por quatro horas, 11 genes foram diferencialmente expressos (Tabela 1), com redução na expressão gênica no grupo fipronil quando comparado ao controle.

Tabela 1 – Genes diferencialmente expressos

Número de acesso NCBI	Locus do gene	Nome do gene	Função gerais dos genes	Direção da regulação
XM_006562253.3	LOC551765	uncharacterized	Não caracterizado	Downregulated
XM_396791.5	LOC413346	Endoglucanase E-4	Associado ao processo de degradação da celulose	Downregulated
XM_006566389.3	LOC408361	Alpha-tocopherol transfer protein-like, transcript variant X3	Transportador da vitamina E e sistema antioxidante	Downregulated
XM_006564945.3	LOC724293	Yellow-x1	Composição da geleia real, coloração da cutícula, sinalização neural, maturação reprodutiva e diferenciação de castas	Downregulated
XM_016913213.2	LOC107964762	Transcription activator MSS11	Ativa a degradação do amido	Downregulated
XM_003249082.4	LOC100578929	uncharacterized	Não caracterizado	Downregulated
NM_001270830.1	GeneID_412202	Cuticular protein 28	Constituição da cutícula e exoesqueleto, sistema imune inato	Downregulated
XM_392398.7	LOC408868	Inositol monophosphatase 2, transcript variant X1	Transporte e metabolismo de carboidratos, íons inorgânicos e nucleotídeos	Downregulated
XM_006557673.3	LOC102656070	uncharacterized	Não caracterizado	Downregulated
XM_397283.7	LOC413844	ATP-binding cassette sub-family G member 5	Codifica proteína transportadora transmembrana e síntese de ATPases	Downregulated
XM_001122696.5	LOC726981	Circadian clock-controlled protein	Rítmo circadiano, estímulos endógenos, maturação reprodutiva, transporte do hormônio juvenil	Downregulated

Dentre estes genes, o endoglucanase E-4 (LOC413346), transcription activator MSS11 (LOC107964762), inositol monophosphatase 2 - transcript variant X1 (LOC408868), ATP-binding cassette sub-family G member 5 (LOC413844) e cuticular protein 28 (GeneID_412202) estão relacionados com o sistema digestório das abelhas.

A redução da codificação da enzima endoglucanase E-4 que realizam a quebra na parte interna da fibra de celulose (Jordan et al., 2012) e da proteína codificada pelo gene inositol monophosphatase 2 - transcript variant X1 (*IMPA1*) com as funções de transporte e metabolismo de carboidratos, íons inorgânicos e nucleotídeos (OrthoDB, 2021), podem acarretar na redução da síntese de trifosfato de adenosina (ATP), causando o enfraquecimento do indivíduo e falta de energia para realização da locomoção, voo, forrageamento e as múltiplas tarefas executadas pelas abelhas operárias. A diminuição da síntese de ATP também compromete o funcionamento do sistema de detoxicação que envolve elevado gasto energético nos insetos (Kliot & Ghanim, 2012).

O gene transcription activator MSS11 é um ativador da degradação do amido, e a sua baixa expressão pode estar associada a interferência do fipronil na produção da enzima α -amilase nas glândulas hipofaríngeas das abelhas, que tem a função de digerir o amido (Pamplona, 1989), provocando carência de carboidratos no organismo da abelha.

Já o gene ATP-binding cassette sub-family G member 5 (*ABCG5*) também está relacionado com o ATP; porém atua como transportador, codificando proteína transportadora da superfamília dos transportadores de cassete ATP (família ABC) (Jones, et al., 2004), que podem ser proteínas transmembrana ou a enzima ATPases que hidrolisam o ATP fornecendo energia para a translocação de substratos através das membranas (Davidson, et al., 2008); assim, a baixa expressão deste gene poderia prejudicar a função das proteínas transportadoras,

prejudicando a translocação transmembrana fluídos e nutrientes.

A expressão reduzida do gene cuticular protein 28 (CPR28) pode comprometer o trato digestório das abelhas, uma vez que as paredes deste sistema são constituídas pela cutícula (Reynolds e Samuels, 1996).

O intestino médio de abelhas *Apis mellifera* contaminadas por fipronil apresenta a desorganização do epitélio, danos mitocondriais e ruptura da matriz peritrófica (Cruz et al., 2010) podendo afetar a digestão e absorção de nutrientes. O fipronil também pode causar alterações no intestino médio das larvas das abelhas operárias, causando lesões necróticas em células digestivas e vacuolização citoplasmática (Silva-Cruz et al., 2010). Segundo Nicodemo et al. (2014), o fipronil e o imidacloprido afetam negativamente a bioenergética mitocondrial da cabeça e tórax de abelhas; assim induzem aumento da permeabilidade da membrana interna da mitocôndria levando à morte necrótica de células (Proskuryakov et al., 2002).

A cutícula exerce também papel importante na redução da perda de água, fenômeno também relacionado à presença de cera na epicutícula (Pedrini et al., 2007). Além disso, a proteína CPR28 constitui a cutícula que faz parte do exoesqueleto (Wang e Ligoxygakis, 2006), a primeira linha de defesa de insetos criando uma barreira física e química (cera antimicrobiana) capaz de impedir ou retardar a entrada de patógenos (fungos, bactérias, vírus e protozoários) e parasitas no organismo (Bulet et al., 1999). Assim, um possível desestruturação na composição da cutícula pode deixar as abelhas mais expostas e vulneráveis á parasitas, como o *Varroa destructor* e doenças como a Cria de Giz (*Ascosphaera apis*) (Gallo et al., 2002; Kavanagh e Reeves, 2004).

O gene alpha-tocopherol transfer protein-like - transcript variant X3 (LOC408361) codifica a proteína alfa-tocoferol (α -TTP) que é o transportador da vitamina E no organismo. A baixa expressão deste gene poderia provocar a deficiência de vitamina E nas abelhas, que está

associada à infertilidade e envelhecimento precoce (Marques et al, 2016). O α -tocoferol (Vitamina E) está entre as defesas antioxidantes não enzimáticas no organismo das abelhas, assim como o ácido ascórbico (Vitamina C), ácido lipóico, carotenóides e flavonóides (Valko et al., 2007). Estes compostos são importantes a nível intracelular, uma vez que a sua presença aumenta a resistência das membranas e impede que estas sejam danificadas através da neutralização de radicais livres (Bogdanov, 2011).

A abelha *Apis mellifera* é um excelente modelo em cronobiologia porque seu relógio circadiano é envolvido em comportamentos complexos como a memória, orientação da bússola solar e comunicação por meio da dança (Bloch, 2009, 2010); desta forma, o ritmo circadiano está intimamente associado à divisão de trabalho que organiza a complexa sociedade das abelhas. Nas campeiras exibe fortes ritmos circadianos que são ativos durante o dia e adormecem durante a noite, de acordo com os estímulos diurnos de néctar floral e disponibilidade de pólen; já na fase de nutrízes que cuidam das crias 24 horas por dia e não saem da colônia, as abelhas não exibem ritmo circadiano claro e ativo (Bloch, 2009, 2010), por isso elas tem o pleno funcionamento do seu sistema cognitivo e capacidade de encontrar fontes de alimento e voltar para a colônia recrutar outras campeiras para realizarem o forrageamento.

Desta forma, a expressão gênica do genes relacionados com o ritmo circadiano das abelhas, como o gene circadian clock-controlled protein (LOC726981) ou gene do período (*PER*), é importante para o trabalho eficiente das abelhas campeiras que abastece a colônia com néctar, pólen, água e resina. Este gene está participa do ritmo biológico do indivíduo (Shemesh et al., 2007; Shemesh et al., 2010); e quando ele é nulo ou tem a sua expressão reduzida pela ação do fipronil, por exemplo, as abelhas se tornam aperiódicas, desequilibradas, sem ritmo nas suas ações e com irregularidade no seu comportamento (Konopka e Benzer, 1971).

O gene circadiano também está relacionado com a codificação de proteína de ligação

(JHBP) que transporta o hormônio juvenil (JH) do local de sua síntese, glândula *corpora allata*, para os tecidos-alvo (Wisniewski et al., 1987), protegendo as moléculas de JH da hidrólise por esterases não específicas presentes na hemolinfa (Goodman et al., 1985). O JH regula a embriogênese (Gilbert et al., 2000) e o desenvolvimento larval (Kochman & Wieczorek, 1994). Sendo assim, a baixa expressão do gene circadian clock-controlled protein pode acarretar na ausência do hormônio juvenil e conseqüentemente, prejudicar a formação de embriões e formação de novos indivíduos para a colônia.

Estes sete genes discutidos anteriormente afetam as abelhas campeiras que foram o alvo de análise do presente trabalho; contudo modificações nas expressões gênicas destes genes também pode prejudicar outras fases da vida das operárias, assim como a rainha e os zangões.

Os genes identificados LOC551765, LOC100578929 e LOC102656070 foram downregulated para as abelhas expostas ao fipronil, porém não foram discutidos porque ainda não foram estudados e identificados, sugerindo futuros estudos de suas funções em abelha *Apis mellifera*.

Conclusão

A exposição das abelhas *Apis mellifera* ao inseticida fipronil diminui a expressão de genes relacionados com o bem-estar, saúde e sobrevivências das abelhas, visto que pode comprometer o desenvolvimento e a manutenção das colônias podendo afetar a nutrição das abelhas e a síntese de proteínas importantes para a constituição e funcionamento do organismo aumentando a sua susceptibilidade á doenças, parasitas e outros fatores estressores.

Referências

- Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J.C., Gauthier, M. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 55, 1099–1106, 2009.
- Bloch, G. Plasticity in the circadian clock and the temporal organization of insect societies. In *Organization of Insect Societies: From Genome to Sociocomplexity*, Gadau J, Fewell J, and Wilson EO, eds, pp 402-431. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2009.
- Bloch, G. The social clock of the honeybee. *J Biol Rhythms* 25:307-317, 2010.
- Bogdanov, S. Books of Honey, physical properties of honey. *Bee Product Science*, Zhejiang, 6-7, 2011.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67, 2015.
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.; Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, v.23, p.329-344, 1999.
- Cruz, A.S., Silva-Zacarin, E.C.M., Bueno, O.C., Malaspina, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 165–176, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9126-x>.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 317–364, 2008.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourier, J., GAuthi, M. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides.

Ecotoxicology, 20: 429-437, 2011.

Freitas, D.G.F.; Khan, A.S.; Silva, L.M.R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 42, n. 1, p. 171-188, 2004.

Gallo, D., Nakano, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba, 2002.

Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30, 617–644, 2000.

Goodman, W.G., Carlson, R.O., Nelson, K.L. Analysis of larval and pupal development in the tobacco hornworm (Lepidoptera: Sphingidae), *Manduca sexta*. Ann Entomol SOC Am 78:70-80, 1985.

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, 2015.

Griffiths, A.J.F.; Miller, J.H.; Suzuki, D.T.; Lewontin, R.C.; Gelbart, W.M. Introdução à genetic. 6 ed. Tradução de P.A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p., 1998.

Hainzl, D., Casida, J. E. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Agricultural Sciences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 12764–12767, 1996.

Holdera, P.J.; Jonesb, A.; Tylera, C.R.; Cresswella, J.E. Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. Edited by Bruce D. Hammock, University of California, Davis, CA, vol. 115, no. 51, 13033–13038, 2018.

Jones, J.C.; Myerscough, M.R.; Graham, S.; Oldroyd, B.P. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. Science, v. 305, n. 5682, p. 402-404, 2004.

Jordan, D.B.; Bowman, M.J.; Braker, J.D.; Dien, B.S.; Hector, R.E.; Lee, C.C.; Mertens, J.A.; Wagschal K. Plant cell walls to ethanol. *Biochem. J.* 442, 241– 252, 2012.

Kavanagh, K., Reeves, E.P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenecity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 101-112, 2004.

Kliot, A., Ghanim, M. Fitness costs associated with insecticide resistance, *Pest Manag. Sci.* 68, 1431–1437, 2012.

Kochman, M., Wieczorek, E. In: Konopinska, D. (Ed.), *Insects: Chemical Physiological and Environmental Aspects*. University of Wrocław Press, Wrocław, 1994.

Konopka, R. and Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 68, 2112-2116, 1971.

Marques, A., Nunes, F. A Alimentação das Abelhas: A Importância de ter todos os nutrientes, *O Apicultor*, 2016.

Moretto, G. Defense of Africanized bee workers against the mite *Varroa jacobsoni* in Southern Brazil. *American Bee Journal*, 137: 746–747, 1997.

Muñoz-Capponi, E.A.; Silva-Aguayo, G.; Rodríguez-Maciel, J.C.; Rondanelli-Reyes, M.J. Sublethal exposure to fipronil affects the morphology and development of honey bees, *Apis mellífera*. *Bulletin of Insectology* 71 (1): 121-130, 2018.

Narahashi, T. Neurophysiological effects of insecticides. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, capítulo 31, 2010.

Nicodemo, D., Maioli, M.A., Medeiros, H.C.D., Guelfi, M., Balieira, K.V.B., Jong, D.de, Mingatto, F.E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environmental Toxicology and chemistry*, 2014.

OrthDB. Catálogo de genes ortográficos codificadores de proteínas entre vertebrados, artrópodes, fungos, plantas e bactérias. Universidade de Genebra - Faculdade de medicina, 2021. <https://www.orthodb.org/>

Pamplona, B.C. Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas. 13p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

Pedrini N., Rosana C., Juárez M.P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem and Physiol.*; 146: 124-137, 2007.

Potts, S.G. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe? *J. Apic. Res.*, 49, pp. 15-22, 2010.

Potts, S.G.; Imperatriz-Fonseca, V.; Ngo, H.T.; Aizen, M.A.; Biesmeijer, J.C.; Breeze, T.D.; Dicks, L.V.; Garibaldi, L.A.; Hill, R.; Settele, J.; Vanbergen, A.J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540: 220-229, 2016.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 283:1–16, 2002.

Reynolds, S.E., Samuels, R.I. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect Physiol.*; 26: 157-232, 1996.

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., 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*, 2014. DOI 10.1007/s10646-014-1305-8.

Shemesh, Y., Cohen, M., and Bloch, G. Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees. *FASEB J* 21: 2304-2311, 2007.

Shemesh, Y., Eban-Rothschild, A., Cohen, M., and Bloch, G. Molecular dynamics and

social regulation of context-dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee. *J Neurosci* 30:12517-12525, 2010.

Silva-Cruz, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Bueno, O.C., Malaspina, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biol Toxicol* 26:165–176. 2010.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84, 2007.

Wang, L., Ligoxygakis, P. Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology* 211, 251-261, 2006.

Wisniewski J. R., Muszynska-Pytel M., Grzelak K., Kochman M. Biosynthesis and degradation of juvenile hormone in *corpora allata* and imaginal wing discs of *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem.* 17, 249–254, 1987.

Zaluski, R. Efeito do inseticida fipronil em abelhas africanizadas e na expressão de gene relacionado ao sistema imunológico, 2014.

Zaluski, R., Kadri, S.M., Alonso, D.P., Robolla, P.E.M., Orsi, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 34, No. 5, pp. 1062–1069, 2015.

Zaluski, R., Justulin, L.A.JR., Orsi, R.O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 7, 15217, 2017.

Zaluski, R., Bittarello, A.C., Vieira, J.C.S., Braga, C.P., Padilha, P.M., Fernandes, M.S., Bovi, T.S., Orsi, R.O. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides, 2020.

CAPÍTULO III

Implicações

As abelhas são organismos importantes para a manutenção da flora e fauna silvestre, assim como para os seres humanos por meio dos serviços de polinização de cultura agrícolas que produzem recursos alimentares. Como fonte de renda, a apicultura é uma excelente atividade, com diversidade de produtos e formas de comercialização. No entanto, nos últimos anos tornou-se ariscado para o apicultor a coexistência de apiários e áreas agrícolas tratadas com agrotóxicos; por isso trabalhos como este são importantes para revelar as consequências da contaminação de abelha por inseticidas neurotóxicos.

O presente trabalho pode contribuir com a pesquisa científica e com a sociedade evidenciando que o fipronil provoca severos danos nas abelhas acarretando consequências irreversíveis no seu organismo e, conseqüentemente, no funcionamento de toda a colônia, demonstrando que essa contaminação acarreta mudanças na expressão gênica da *Apis mellifera*.

Analisando os genes com expressão diminuída, relacionando com a vida das abelhas campeiras pode-se alertar aos apicultores, que possuem seus apiários próximo de áreas como culturas agrícolas, que as colônias contaminadas com fipronil podem apresentar: diminuição do ritmo de trabalho das operárias dentro e fora da colmeia, diminuição do número de campeiras, diminuição da quantidade de mel e pólen armazenados.

Por estes motivos recomenda-se vistorias periódicas e observação atenta e das suas colônias nos seguintes aspectos:

- se o ritmo de trabalho das operárias dentro da colmeia se mantém normal ou se as abelhas apresentam letargia ou mudanças de comportamento;
- se a quantidade de alimento estocado está diminuindo com o passar dos meses;

- se a quantidade de abelhas campeiras saindo para o forrageamento permanece constante ou aproximadamente igual com o passar do tempo;

Caso o apicultor observar alguns destes sintomas sugere-se mudar o apiário para outro local, longe de áreas agrícolas, na tentativa de recuperação da colônia.

O presente trabalho também pode trazer informações motivadoras para a realização de trabalhos futuros; acreditando que de todos os genes resultantes das análises deste estudo, o gene circadian clock-controlled protein é aquele que, quando alterada sua expressão, pode mostrar mais sinais/sintomas de contaminação por doses subletais de agrotóxicos encontradas no campo; esse gene pode ser mais investigado no sentido de usá-lo como gene sentinela da contaminação do fipronil e de outros agrotóxicos nas colônias de abelhas *Apis mellifera*.