

LENISE SILVA CARNEIRO

**EFEITO CITOTÓXICO DO IPRODIONE NO INTESTINO MÉDIO DE
OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C289e Carneiro, Lenise Silva, 1994-
2018 Efeito citotóxico do iprodione no intestino médio de
operárias da abelha *Apis mellifera* / Lenise Silva Carneiro. –
Viçosa, MG, 2018.
vii, 23 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 14-22.

1. Hymenoptera. 2. Abelhas - Toxicologia. 3. Iprodiona
(Fungicida). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

LENISE SILVA CARNEIRO

**EFEITO CITOTÓXICO DO IPRODIONE NO INTESTINO MÉDIO DE
OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de julho de 2018.

Edmilson Amaral de Souza

Aparecida das Dores Teixeira

José Eduardo Serrão
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a memória da minha bisavó Benedita. Sempre sonhou em ver suas filhas se formando professoras, e graças a sua imensa fé o que parecia impossível se realizou. Orgulho-me em ser da terceira geração de educadores da família e agora, mestre. Sua imagem de mulher guerreira foi minha inspiração para nunca desistir mesmo diante das adversidades dessa jornada. A ela meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”. As palavras de Raul Seixas conseguem expressar a certeza que tive ao terminar meu mestrado: não somos NADA sozinhos. Sem o apoio de todas as pessoas que encontrei nessa jornada, não conseguiria finalizá-la com êxito. Seguem meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa por toda estrutura fornecida, é um imenso orgulho ter feito minha graduação e meu mestrado em uma instituição tão renomada.

À população brasileira que através de seus impostos financia a educação pública. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos os professores do Departamento de Biologia Geral por participarem da minha formação acadêmica agregando conhecimentos e ajudando a formar profissionais com excelência.

Ao meu orientador José Eduardo Serrão pelas oportunidades concedidas e pela confiança em mim depositada nesses quatro anos de trabalho juntos. O seu profissionalismo, sua inteligência, reponsabilidade, a maneira como corrige e como ensina são uma grande inspiração.

Aos funcionários da UFV, em especial a secretária Beth por sua boa vontade em nos ajudar. Ao técnico do Apiário “Lulu” por fornecer parte do material utilizado e auxiliar nos experimentos. Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise por todo suporte técnico.

Aos grandes amigos que fiz no Laboratório de Ultraestrutura Celular, pela paciência, conselhos, apoio científico e convivência. Em especial aos “pós-docs” Luis Carlos, Wagner e Luanda que foram imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, em especial meus pais Taíse e Luís Cláudio que nunca mediram esforços para ajudar a realizar meus sonhos. Obrigada por reconhecerem o valor e a importância da educação. Aos meus irmãos Larissa e Túlio pelo carinho. Ao Victor pelo afeto e companheirismo.

Aos meus amigos, principalmente ao meu quarteto preferido da Biologia e nosso mascotinho, foi um privilégio da vida encontrar pessoas como vocês. A querida Escola

Estadual Justiniano Fonseca, diretora, professores, funcionários e alunos, por toda compreensão e incentivo.

Eu poderia escrever algumas páginas sobre tudo que deu errado nesses dois anos de mestrado, mas poderia escrever um livro sobre todos os anjos que Deus encarregou-se de colocar no meu caminho e vocês certamente estariam nele. Minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS.....	6
DISCUSSÃO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
MATERIAL COMPLEMENTAR.....	23

RESUMO

CARNEIRO, LENISE SILVA, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Efeito citotóxico do iprodione no intestino médio de operárias da abelha *Apis mellifera*.** Orientador: José Eduardo Serrão.

A abelha *Apis mellifera* está entre as mais usadas para serviços de polinização e seus produtos como mel, própolis, cera e veneno possuem importância econômica. O Distúrbio do Colapso de Colônias está relacionado com o declínio de abelhas, e é causado por fatores como doenças, pesticidas e problemas de manejo. Os fungicidas são responsáveis pela maior parte do teor de pesticidas nos grãos de pólen e podem atingir as abelhas pela alimentação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do fungicida iprodione nas células digestivas do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera*. O teste de toxicidade para o iprodione foi realizado utilizando operárias recém-emergidas alimentadas com diferentes concentrações do fungicida diluído em sacarose 50% por 72 h sendo a mortalidade avaliada a cada 24 h. Como não houve mortalidade significativa no teste de toxicidade, a microscopia de luz, eletrônica e a expressão do gene de autofagia *atg-1* foram realizadas com abelhas alimentadas com a DL_{50} indicada pelo fabricante por 12 h e 24 h. Houveram danos nas células digestivas como vacuolização citoplasmática, protruções celulares apicais e condensação e fragmentação da cromatina nuclear, características indicativas de apoptose. A ultraestrutura mostrou que os vacúolos eram autofágicos e que algumas células apresentaram necrose. A expressão de *atg-1* foi similar nas abelhas tratadas e controles, o que pode ser explicado pelo fato de ATG-1 estar presente nas fases iniciais da autofagia e a maioria dos vacúolos autofágicos encontrados na ultraestrutura serem maduros. O iprodione atua inibindo a síntese da glutatona, o que culmina na formação de espécies reativas de oxigênio que podem induzir os diferentes tipos de morte celular. Os resultados obtidos indicam a necessidade de atenção no uso do iprodione, uma vez que ele tem possíveis efeitos colaterais para organismos não-alvo, como as abelhas.

ABSTRACT

CARNEIRO, LENISE SILVA, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Cytotoxic effect of iprodione on the midgut of bee workers *Apis mellifera*.** Advisor: José Eduardo Serrão.

The honey bee *Apis mellifera* is an important pollinator and produces honey, propolis, wax and venom, which are economically relevant. The decline of bees population is related to Colony Collapse Disorder, and it is caused by factors such as diseases, use of pesticides and handling problems. Fungicides account for most of the pesticide content in pollen grains and can affect the bees through feeding. The objective of this work was to evaluate the cytotoxic effect of the fungicide iprodione in midgut digestive cells of *A. mellifera* workers. The toxicity test was carried out using newly emerged workers fed with different concentrations of iprodione diluted in 50% sucrose for 72 h, and the mortality evaluated every 24 h. As there was no significant mortality in the toxicity test, light and electron microscopy as well as atg-1 autophagy gene expression were performed on bees fed with iprodione for 12 h and 24 h with the LD50 indicated by the manufacturer. Results showed damages in digestive cells such as cytoplasmic vacuolization and apical cell protrusions in addition to condensation and fragmentation of nuclear chromatin, characteristics indicative of apoptosis. The ultrastructure showed that vacuoles were autophagic and that some cells exhibited necrosis. The expression of atg-1 was similar in treated bees and controls, which may be explained by the fact that ATG-1 is present in the early stages of autophagy and most of the autophagic vacuoles found in the ultrastructure are already mature. Iprodione acts by inhibiting glutathione synthesis, which culminates in the production of reactive oxygen species that can induce different types of cell death. The results indicate the need of caution in the use of iprodione, since it has possible side effects for non-target organisms, such as bees.

1. Introdução

Hymenoptera são insetos importantes em diversos ecossistemas atuando como polinizadores (Ballantyne et al., 2017; Hung et al., 2018), pragas (Farias et al., 2018) e inimigos naturais (Chang et al., 2018). Eles apresentam características interessantes como sociabilidade (Farris, 2016; Kamhi et al., 2017) e comportamentos elaborados de forrageio (Abou-Shaara, 2014).

Dentre os Hymenoptera, a abelha *Apis mellifera* está entre as mais utilizadas nos serviços de polinização, devido ao seu fácil manejo e perfil generalista na busca de recursos. Ademais, é uma boa produtora de mel e de outros produtos apícolas (Pires et al., 2016). A geleia real, o própolis, o veneno e a cera, são exemplos de substâncias que podem beneficiar os seres humanos devido as suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e utilização na indústria de cosméticos e maquiagem (Cornara et al., 2017).

O Distúrbio do Colapso de Colônias (Colony Collapse Disorder – CCD) está relacionado com o declínio de abelhas (Dreier et al., 2014; Pires et al., 2016; Klein et al., 2017). As colônias com CCD apresentam um conjunto de características comuns: rápida perda de operárias, excesso de crias, ausência de abelhas mortas dentro ou fora da colmeia, não há invasão imediata da colmeia por pragas como traças ou parasitas e patógenos em quantidades que geram danos econômicos (van Engelsdorp et al., 2009; 2017).

A CCD parece não ter uma causa única, mas sim resultado do efeito sinérgico de várias pressões do mundo moderno como: perda de habitat, parasitas, doenças, pesticidas, dietas monótonas, competição e efeitos do transporte (Goulson et al., 2015) além de problemas de manejo (van Engelsdorp et al., 2009; Henry et al., 2012).

Os pesticidas trazem benefícios econômicos, uma vez que auxiliam no controle de pragas. Entretanto, ao causar danos para as abelhas representam um conflito para a agricultura (Goulson et al., 2015). Dentre os pesticidas, os neonicotinóides tem sido associados com o declínio das abelhas (Fairbrother et al., 2014). Outra classe de tóxicos agrícolas que geram prejuízos a esses insetos são os fungicidas (Jhonson et al., 2010).

Os efeitos de fungicidas sobre as abelhas são diversos. Colônias de *Bombus impatiens* tratadas com clorotalonil produzem menos de um terço de operárias, menor biomassa total de abelhas e rainhas com metade da massa corporal (Bernauer et al., 2015). Esse fungicida também tem efeito sinérgico com o acaricida coumafós causando mortalidade significativa em larvas de *A. mellifera*, e a mistura dele com acaricida

fluvinato aumenta em sete vezes a taxa de risco de mortalidade das abelhas (Zhu et al., 2014). Operárias de *A. mellifera* consomem menos pólen contendo o fungicida pristine, resultando em menor digestão de proteínas, diminuição da concentração de ATP e aumento de infecções virais devido ao enfraquecimento das colônias (De Grandi-Hoffman et al., 2015). Da mesma forma, a exposição ao fungicida propiconazol afeta a construção de ninho em *Bombus terrestris* (Elston et al., 2013).

A mistura dos fungicidas benomyl, captan, iprodione, propiconazol com surfactantes e fertilizantes foliares interferem no comportamento de forrageio e causam desorientação na abelha *Osmia lignaria* (Ladurner et al., 2005; Artz & Pitts-Singer, 2015). O fungicida procloraz aumenta a toxicidade de acaricidas usados no controle de parasitas de *A. mellifera* (Johnson et al., 2013) e determinadas doses desse fungicida causam problemas na termorregulação da colônia (Vandame & Belzunces, 1998).

Larvas de *A. mellifera* alimentadas com captan, iprodione ou ziram não atingem a fase adulta, sendo que as alimentadas com iprodione, quando chegam em pupa apresentam anormalidades (Mussen et al., 2004). Operárias adultas da mesma espécie expostas ao iprodione e iprodione + pristine/ quadris tem sobrevivência reduzida (Fisher et al., 2017).

Fungicidas são aplicados durante a floração das culturas agrícolas (Mullin et al., 2010; David et al., 2016), podem contaminar o néctar e geralmente são responsáveis pela maior parte do teor de pesticidas nos grãos de pólen (Johnson et al., 2010). O iprodione e o vinclozolin, foram encontrados nos grãos de pólen estocados por abelhas (Kubik et al., 1999; Mullin et al., 2010; Yoder et al., 2013), afetando fungos benéficos que protegem este alimento de contaminações microbianas (Menezes et al., 2015). Desta forma esses tóxicos podem afetar as abelhas através da alimentação (Johnson et al., 2010) o que torna importante analisar seus efeitos sobre o trato digestivo destes insetos.

O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Snodgrass, 1935). O intestino anterior está relacionado com armazenamento, o médio, com a digestão e absorção de nutrientes e o posterior, com excreção e o equilíbrio salino do organismo (Chapman, 2013). Em abelhas, o intestino anterior é dividido em faringe, esôfago, papo e proventrículo (Snodgrass, 1956). O proventrículo é a sua região mais especializada, tem a função de transportar e armazenar alimento e se projeta no lúmen do intestino médio formando a válvula cardíaca (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim & Rodrigues, 1967; Serrão & Cruz-

Landim, 1995). A válvula cardíaca marca a separação entre o intestino anterior e médio (Snodgrass, 1956), impedindo o refluxo de alimento (Serrão & Cruz-Landim, 1996; Cruz-Landim, 2008).

O intestino médio é um epitélio simples prismático e possui diferentes tipos de células. No grupo das prismáticas encontramos as células digestivas que são responsáveis pelas funções de secreção e absorção e as que se localizam ao redor da válvula estomodeal, que sintetizam a matriz peritrófica (Cavalcanti & Cruz-Landim, 1999). A matriz peritrófica é formada por proteínas e quitina e tem por função proteger o epitélio do atrito causado pelo alimento (Terra, 2001). No grupo das células basais estão as regenerativas e as endócrinas (Cavalcanti & Cruz-Landim, 1999).

Tóxicos agrícolas como o ácido bórico podem agir nas células digestivas induzindo morte celular no intestino médio de larvas de operárias de *A. mellifera* (Cruz et al. 2010). Apesar da morte celular ser comumente associada a apoptose, existem outros tipos como a necrose e a autofagia (Emanuele et al., 2018). A apoptose e a necrose apresentam características clássicas que podem ser bem caracterizadas através da microscopia de luz (Doonan & Cotter, 2008). A autofagia é importante para a degradação de componentes celulares disfuncionais dentro dos lisossomos, podendo ocorrer em resposta ao estresse metabólico (Moore et al. 2006) sendo a proteína ATG-1 importante na iniciação deste processo (Van Limbergen et al., 2009).

Os estudos citados anteriormente, contribuíram para o conhecimento sobre danos de fungicidas no comportamento e sobrevivência das abelhas. No entanto, não há dados sobre os efeitos como morte celular nos órgãos destes insetos, incluindo o trato digestivo que é uma das principais portas de entrada para moléculas tóxicas contidas no alimento.

O iprodione é um fungicida do grupo das dicarboximidas (Pommer & Lorenz, 1982), de contato e sistêmico é utilizado em culturas como amendoim, cebola, arroz e batata (Kubik et al., 1999; Pohanish, 2015). O mecanismo de ação nos fungos parece estar relacionado com a redução da síntese de DNA e proteínas (Pappas & Fisher, 1979) e inibição da atividade da glutatona na forma reduzida GSH (Dierickx, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de iprodione nas células digestivas do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera*, contribuindo para o manejo desses importantes polinizadores.

2. Material e métodos

2.1. Insetos

Três quadros de larvas e pupas de *A. mellifera* foram retirados de diferentes colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'N; 42°52'E) e mantidos por 24 h a 34, 5 ° C na BOD. Após esse tempo, as abelhas recém-emergidas foram coletadas e utilizadas para os experimentos.

2.2. Teste de toxicidade

O fungicida iprodione (Rovral® SC, 500 g/L de ingrediente ativo FMC, São Paulo, Brasil) foi usado nos testes de toxicidade aguda. Ele foi diluído em 1 L de sacarose 50% como solução estoque, ajustando 100 g/L de inseticida para as concentrações testadas. Seis concentrações de iprodione, além do controle (sacarose 50%), foram ajustadas em 1 mL de solução estoque: 0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125, 0,000625 e 0,0003125 g mL⁻¹ (w/v). Trinta operárias recém-emergidas de *A. mellifera* foram usadas por concentração e o número de insetos mortos foi contado a cada 24 h durante 72 h. As concentrações letais CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e os limites de confiança foram determinados por regressão baseada em concentração probit-mortalidade com o procedimento PROC PROBIT do programa SAS User v. 9.0 para Windows.

2.3. Exposição ao fungicida

As abelhas foram alimentadas por 12 e 24 h com o fungicida iprodione (Rovral® SC, 500 g/L de ingrediente ativo FMC, São Paulo, Brasil) na concentração 2 mg/ Kg (DL₅₀ indicação do fabricante) diluído em sacarose à 50%. Os controles foram alimentados apenas com sacarose à 50% por 12 e 24 h.

2.4. Microscopia de luz

Cinco operárias de cada tempo de alimentação (12 e 24 h) e cinco controles (12 e 24 h) foram anestesiadas a - 5° C, dissecadas em NaCl 125 mM e o intestinos médios, transferidos para o fixador Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 2 h. A seguir as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e incluídas em historesina Leica®.

Secções com 2 µm de espessura foram coradas com hematoxilina (15 min), eosina (30 s), analisadas e fotografadas com microscópio Olympus BX60.

2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Cinco operárias recém-emergidas alimentadas com iprodione e cinco operárias recém-emergidas alimentadas com sacarose 50% por 24 h foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio a 0, 1 M, pH 7, 2 e os intestinos médios foram transferidos para

glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M por 4 h em temperatura ambiente. Depois de lavado duas vezes no tampão, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95 e 98%) e embebidas em resina LR White, seguindo polimerização a 60 °C por 24 h. Seções ultrafinas (80-90 nm) obtidas em ultramicrotomo Sorval MT2-BMT2-B foram contrastadas por 20 minutos com acetato de uranila aquosa a 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 20 minutos. As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

2.5. Análise de expressão por PCR em tempo real (qPCR)

Dez abelhas alimentadas com o fungicida por 24 h e dez abelhas controle tiveram seu intestino médio removido em solução de NaCl 125 mM. O mRNA dos órgãos foi extraído utilizando Trizol® Reagent (Sigma Aldrich) e posteriormente as amostras foram quantificadas e armazenadas a -80°C.

Para a síntese de cDNA, a um tubo estéril foi adicionado 1000 ng de mRNA extraído dos intestinos das operárias, 1 µL de OligoDT primer (0,5 µg/µL) e água livre de nucleases até volume total de 15 µL. Os tubos foram aquecidos por 5 minutos a 70°C, agitados brevemente e colocados no gelo. A cada tubo foi adicionado 5 µL de tampão 10x para a enzima, 1 µL de transcriptase reversa M-MuLV 200U/µL (PROMEGA) e 6 µL de dNTPmix. Os tubos foram incubados a 37 °C por 60 minutos e depois estocados a 20°C.

O PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) foi realizado utilizando-se o kit de quantificação por fluorescência (SYBR® Green) GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) no equipamento Eco Real Time PCR System (Illumina).

A montagem das placas de foram realizadas utilizando-se 100 ng de cDNA, sintetizado com descrito acima e 0,1 µM de cada primer *atg1* (F- AGAGAGGCAGTGAGTCCACC/ R- TATTGGTTGCGAGCGAGGAA) e como referência o *rp-L32* (F- CGTCATATGTTGCCAACTGGT/ R- TTGAGCCACGTTCAACAATGG). Os primers para qPCR foram desenhados a partir do gene *autofagy 1 - atg1* (XM_624947.5) e *rp-L32* (AF441189) (Lourenço et al., 2008), ambos de *A. mellifera* na plataforma do National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e adquiridos da empresa Invitrogen®.

Antes de realizar o qPCR, cada par de primer foi testado para verificar os amplicons dos genes alvos e também para produzir um único pico na curva de Melt (Material complementar).

As reações foram realizadas em triplicata, utilizando 10 µL do kit GoTaq™ qPCR Master Mix, 1, 6 µL de solução de *primers* a 10 µM, 4 µL de cDNA contendo 200 ng de ds cDNA e água ultra-pura para um total de 20 µL. A reação de PCR envolveu desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento e alongamento a 60 °C por 1 minuto, e curva de dissociação a 60-95 °C.

A expressão relativa do *atg1* nas abelhas expostas ao iprodione e controle foi comparada pelo método $2^{-\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Yuan et al., 2006).

3. Resultados

3.1. Teste de toxicidade

O teste de toxicidade não indicou mortalidade significativa entre as abelhas tratadas e abelhas controle ($X^2= 0.53$; $P<0.990$). Diante deste resultado optou-se por expor as abelhas a DL_{50} indicada pelo fabricante para a realização dos experimentos.

3.2. Microscopia de luz

O intestino médio de operárias *A. mellifera*, o epitélio apresentou uma camada única de células digestivas com núcleos esféricos ricos em cromatina descondensada (Fig.1a). A superfície apical exibiu uma borda estriada bem desenvolvida e presença de matriz peritrófica (Fig. 1b). Na região basal há ninhos de células regenerativas (Fig. 1c).

O intestino das operárias alimentadas com a DL_{50} do iprodione por 12 h e 24 h assim como o controle apresentou uma camada única de células digestivas (1d, g). No entanto em imagens de maior aumento é possível notar uma série de alterações no epitélio. As células digestivas mostraram vacuolização citoplasmática (V) (Fig. 1e, f) que aumentou com o tempo de alimentação (Fig. 1h) e protrusões celulares liberadas para o lúmen do órgão (seta) (Fig. 1e, f). O núcleo apresentou condensação e fragmentação da cromatina (Fig.1f, i).

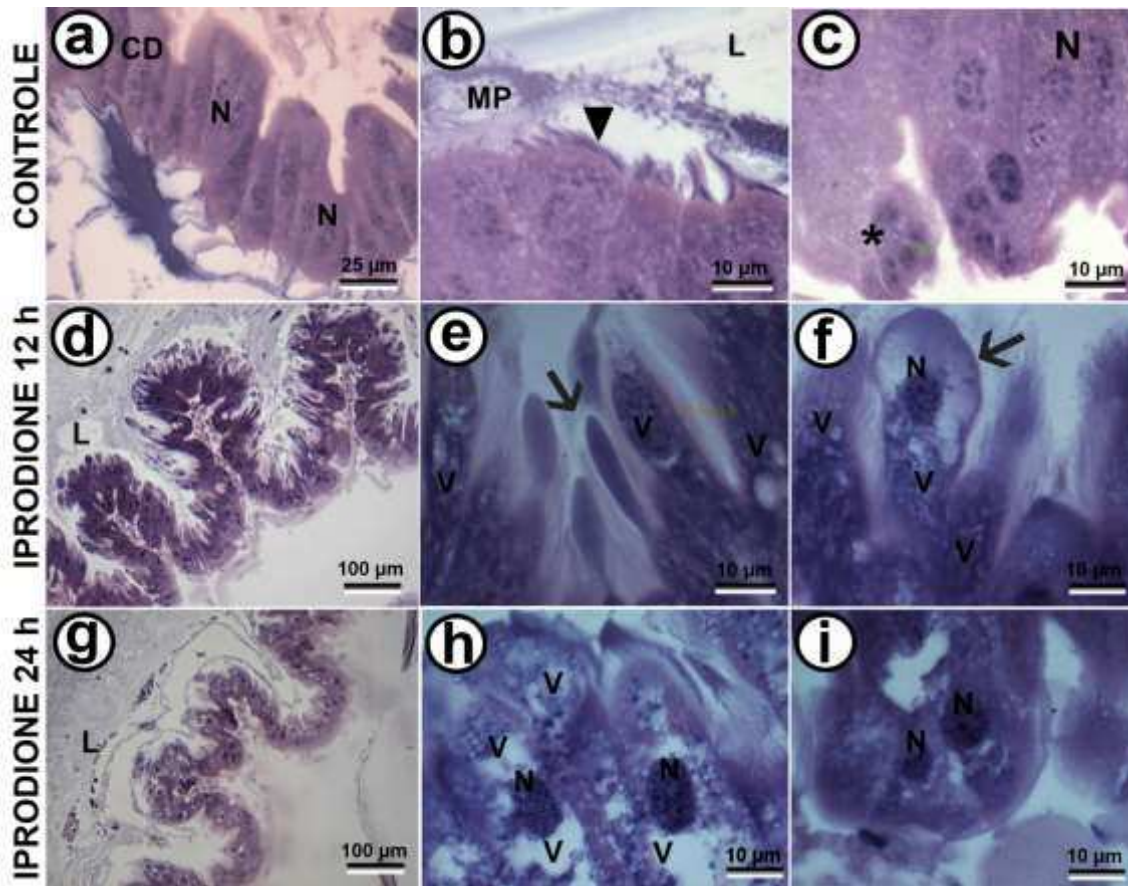


Fig. 1 Micrografia de luz do epitélio do intestino médio de *Apis mellifera*. [a] vista geral do epitélio da abelha controle mostrando célula digestivas colunares (CD) com núcleos com cromatina descondensada (N). [b] Superfície apical das células digestivas da abelha controle mostrando borda estriada bem desenvolvida (ponta de seta) e matriz peritrófica (MP) no lúmen (L). [c] Porção basal do epitélio mostrando ninhos de células regenerativas (*) e núcleos de células digestivas (N). [d] Vista geral do epitélio da abelha alimentada com iprodione por 12 horas mostrando o lúmen (L). [e] Superfície apical do epitélio com protusões das células digestivas com citoplasma homogêneo (seta). Note citoplasma com vacúolos (V). [f] Detalhe de protrusão contendo núcleo (N) da célula digestiva e vacúolos (V). [g] Vista geral do epitélio da abelha alimentada com iprodione por 24 horas mostrando o lúmen (L). [h] Células digestivas mostrando citoplasma desorganizado (seta), núcleo (N) com grumos de cromatina condensada e aumento da vacuolização citoplasmática (V). [i] Porção basal das células digestivas mostrando núcleo (N) com cromatina condensada.

3.3. Ultraestrutura

Nas operárias de *A. mellifera* não expostas ao iprodione, a superfície apical das células digestivas mostraram muitas microvilosidades longas (Fig. 2a). Ocorreu o predomínio de cromatina descondensada no núcleo e no citoplasma perinuclear houve ocorrência de mitocôndrias alongadas e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 2a, b, c). Na região basal da célula ocorreram invaginações da membrana plasmática, formando o labirinto basal bem desenvolvido (Fig. 2c).

-As células digestivas do intestino médio de operárias de *A. mellifera* alimentadas com a DL₅₀ de iprodione por 24 h mostraram a presença de vacúolos autofágicos (Fig. 3a, b/ Fig. 4a, b) no citoplasma e núcleo com cromatina condensada (Fig. 4b). Foi identificada célula apresentando rompimento da membrana plasmática com liberação do conteúdo para o lúmen do intestino médio (Fig. 4c).

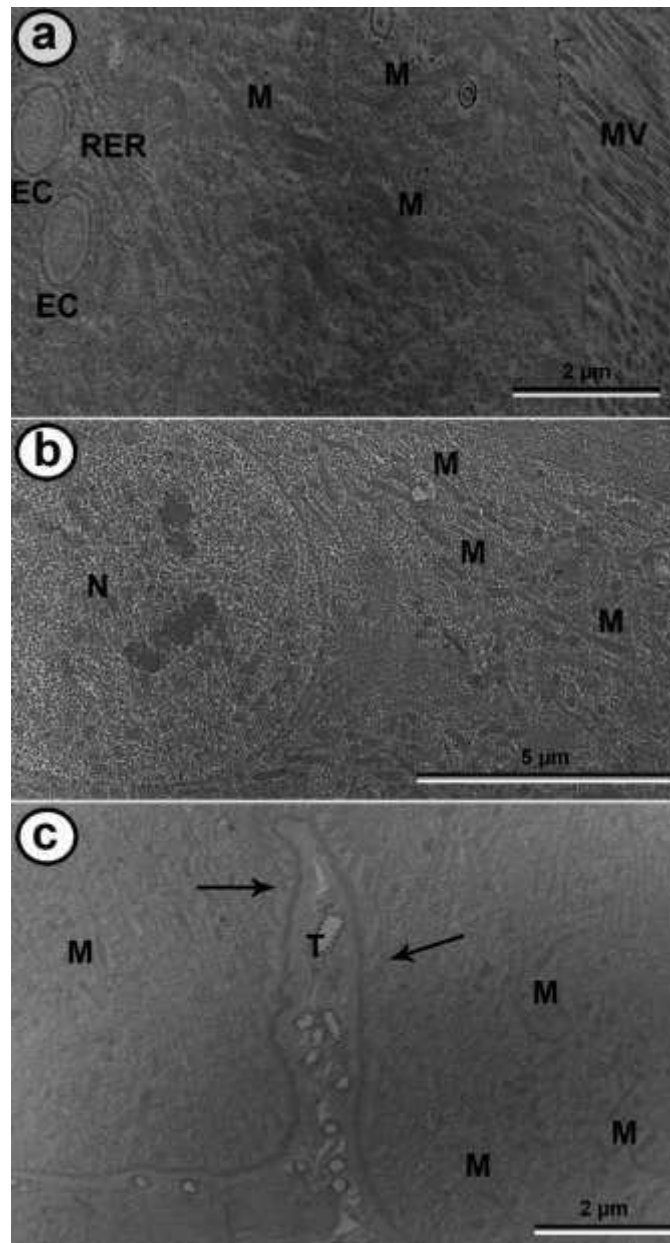


Fig. 2 Micrografias eletrônicas de transmissão de células digestivas do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* controle. [a] Região apical mostrando microvilosidades (MV) bem desenvolvidas e citoplasma rico em mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) e alguns esferocristais (EC). [b] Região mediana mostrando núcleo (N) com cromatina descondensada e citoplasma rico em mitocôndrias (M). [c] Região basal mostrando citoplasma com mitocôndrias (M) associadas com invaginações da membrana plasmática (setas finas). T – traqueias.

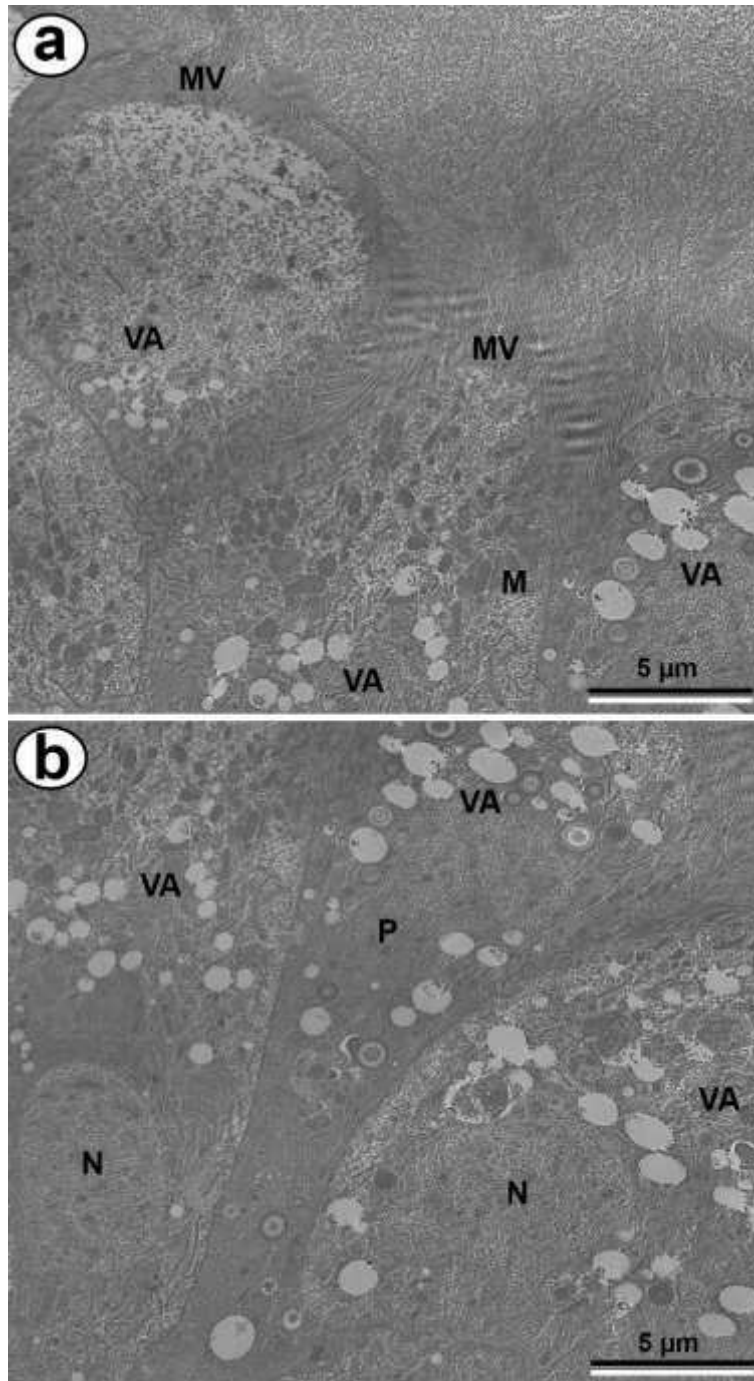


Fig. 3 Micrografias eletrônicas de transmissão de células digestivas do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com o fungicida por 24 h. [a] Região apical mostrando microvilosidades (MV), citoplasma rico em vacúolos autofágicos (VA) e algumas mitocôndrias (M). [b] Desorganização citoplasmática evidente através de protusões (P) e grande presença de vacúolos autofágicos (VA). N – núcleo.

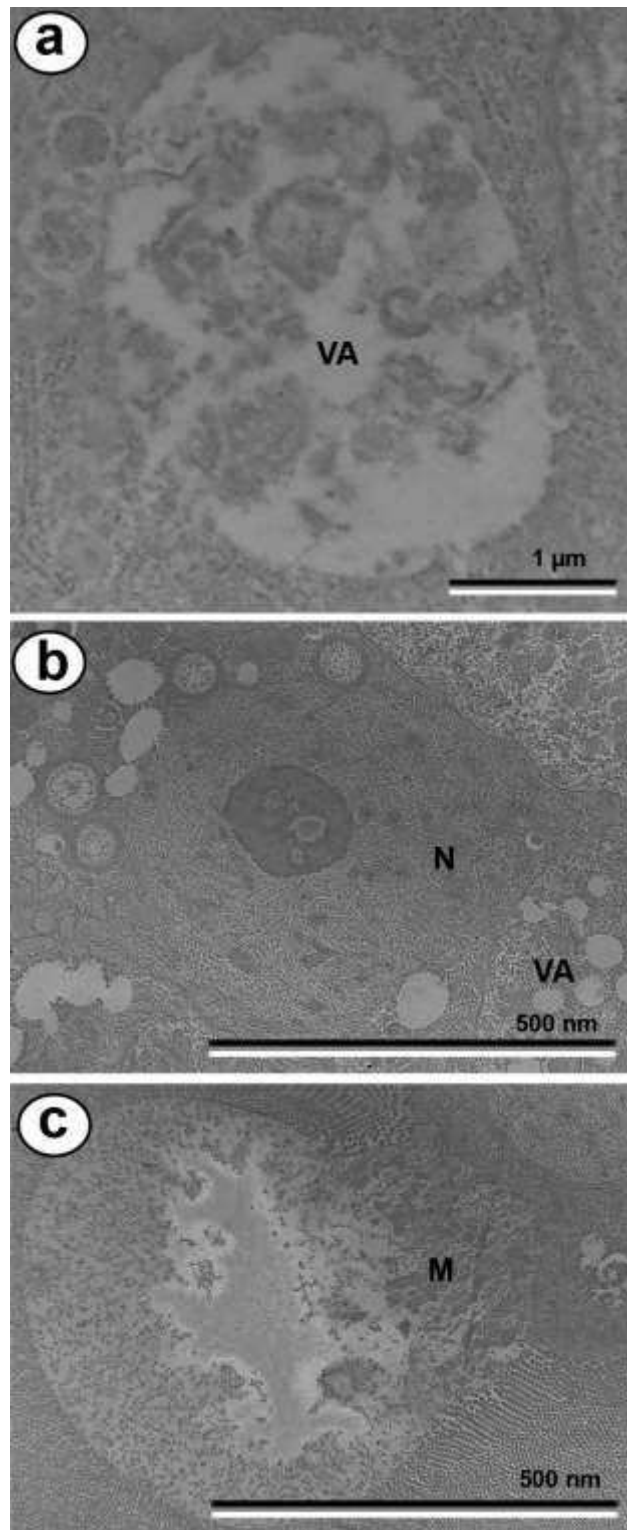


Fig. 4 Detalhes de micrografias eletrônicas de transmissão de células digestivas do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com o fungicida por 24 h. [a] Vacúolo autofágico (VA). [b] Núcleo (N) com cromatina condensada com vacúolos autofágicos (VA) ao redor. [c] Célula com membrana rompida expulsando o conteúdo citoplasmático. M – mitocôndria.

3.4. qPCR

Embora as análises ultraestruturais tenham mostrado aumento na ocorrência de vacúolos autofágicos nas células digestivas do intestino médio de operárias de *A. mellifera* alimentadas com iprodione durante 24 h, não houve diferença na expressão do *atg-1* entre as abelhas expostas ao fungicida e aquelas controle (Figura 5).

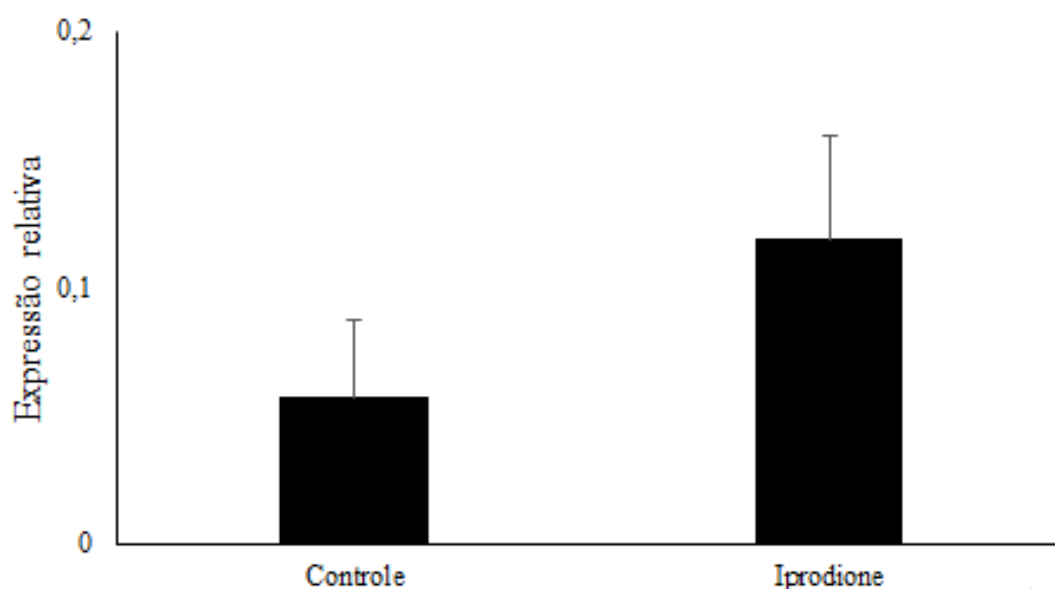


Figura 5. Expressão (média \pm dp) do gene *atg-1* no intestino médio de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com iprodione e controle.

4. Discussão

Os testes toxicológicos mostram que o iprodione não causa mortalidade significativa, na dosagem testada neste trabalho, em operárias de *A. mellifera*. Fisher et al. (2017) identificou que apenas tratamento com o dobro da dose de campo recomendada de iprodione, e misturas deste com quadris ou pristine, diminuem de forma significativa a sobrevivência das abelhas.

Apesar de não ter ocorrido mortalidade nas abelhas alimentadas com iprodione, a partir de 12 h de alimentação houveram danos nas células digestivas do intestino médio como condensação da cromatina, sua fragmentação e emissão de protruções citoplasmáticas, características similares àquelas descritas para células em apoptose (Bortner et al, 1995; Cooper et al., 2009), sendo esse processo importante para a homeostase e desenvolvimento dos tecidos (Emanuele et al., 2018).

O aumento de vacuolização no citoplasma causado pelo iprodione pode ter origem da degeneração do retículo endoplasmático como observado em outros insetos expostos a agentes estressores (Rost-Roszkowka et al., 2008; Aki et al., 2012). As protrusões citoplasmáticas liberadas para o lúmen do intestino médio podem ser consequência de modificações no citoesqueleto que tem sido reportadas para a formação dos corpos apoptóticos liberados por células em processo de morte (Doonan & Cotter, 2007). Além disso, a condensação da cromatina nuclear indica possível degradação das lâminas nucleares e ativação de DNases que culminam com a morte da células (Bortner et al., 1995; Häcker et al., 2000; Doonan & Cotter, 2007; Taatjes, et al., 2007).

Apesar da histopatologia da microscopia de luz indicar possível morte de células digestivas por apoptose nas abelhas alimentadas com iprodione, as análises ultraestruturais mostram que parte dos vacúolos correspondem a vacúolos autofágicos. A autofagia é considerada um dos tipos de morte celular e também é um mecanismo de sobrevivência (Liu & Levine, 2015), sendo importante na degradação e reciclagem de proteínas e organelas celulares (Debnath et al., 2005).

Em algumas células ocorreram a condensação da cromatina e rompimento da membrana plasmática com liberação do conteúdo para o lúmen, características típicas da morte celular necrótica (Taatjes et al., 2007). Quando o citoplasma apresenta aumento em estruturas autofágicas, apoptose e/ou necrose é ativada (Levine & Yan, 2005; Tettamanti et al., 2007). Assim, dois tipos de morte celular foram observadas nas células digestivas de *A. mellifera* alimentadas com iprodione, autofagia e necrose. Nas primeiras 12 horas, enquanto o estressor ainda está em baixas concentrações, a autofagia é ativada, mas com o acúmulo do fungicida por 24 horas, autofagia inicia a necrose. Um mecanismo semelhante ocorre no epitélio do intestino médio de *Epilachna cf. nylanderi* (Coleoptera: Coccinellidae) como resposta à toxicidade por metal (Rost-Roszkowska et al., 2008) e em *Isohypsibius granulifer* (Tardigrada) quando infectado com microscoporídeo (Rost-Roszkowska et al., 2013).

Embora a ultraestrutura celular mostre a presença de autofagia nas células digestivas de operárias de *A. mellifera* alimentadas com iprodione, os testes moleculares indicam que não há aumento na expressão do *atg-1*. A ATG-1 é uma quinase chave na regulação da autofagia, importante nas fases iniciais da formação do pré-autofagossomo (fagóforo) contribuindo no recrutamento de outras ATGs (Chan & Tooze, 2009; Van Limbergen et al., 2009). A autofagia possui três fases: indução, alongamento e maturação (Emanuele et al., 2018), sendo a ATG-1 responsável pelas fases iniciais do processo e como nas células

digestivas aqui estudadas já havia vacúolos autofágicos maduros, isso pode explicar a quantidade similar de mRNA para ATG-1 entre abelhas expostas ao iprodione e o controle.

As células do intestino médio dos insetos possuem enzimas como a caboxilesterase, a glutationa-s-transferase, e o citocromo P450, que auxiliam no processo de detoxificação celular (Enayati et al., 2005; Feyereisen, 2006; Jackson et al., 2013), mas elas parecem não ser suficientes para evitar danos pelo iprodione, nas células digestivas do intestino médio de operárias de *A. mellifera*.

O modo de ação do fungicida iprodione parece estar associado com a inibição da atividade da glutationa-s-transferase (Dierickx, 2004). Baixos níveis dessa enzima estão relacionados com a produção de espécies reativas de oxigênio (Yamada, et al., 2006), que causam danos a componentes celulares, podendo induzir a autofagia (Moore, et al. 2006) e necrose (Sakon et al., 2003), como encontrado nas abelhas aqui estudadas além de apoptose (Simon et al., 2000; Redza-Dutordoir et al., 2016).

Os resultados mostraram que embora o iprodione não tenha causado mortalidade nas operárias de *A. mellifera*, ocorreram danos no intestino médio que poderiam prejudicar a fisiologia do órgão e uma deficiência na digestão e absorção de nutrientes podendo acarretar problemas de imunidade nos insetos (Alaux et al., 2010; De Grandi-Hoffman & Chen, 2015). Há ainda evidências de uma associação distinta entre autofagia e necrose nas células digestivas desta abelha, contrariando a associação corrente de apoptose-necrose.

No geral, os resultados aqui obtidos indicam a necessidade de atenção no uso do fungicida iprodione, uma vez que ele tem possíveis efeitos colaterais para organismos não-alvo, como as abelhas polinizadores.

5. Referências Bibliográficas

- Abou-Shaara, H. F. (2014). The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Veterinari Medicina* 59: 1–10.
- Aki, T., Nara, A., Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology Toxicology* 28: 125–131. doi: 10.1007/s10565-012-9212-3
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6: 562-565. doi: 10.1098/rsbl.2009.0986
- Artz, D. R., Pitts-Singer, T. L. (2015). Nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLoS One* 10: e0135688. doi:10.1371/journal.pone.0135688

- Ballantyne, G., Baldock, K. C. R., Rendell, L., Willmer, P. G. (2017). Pollinator importance networks illustrate the crucial value of bees in a highly speciose plant community. *Scientific Reports* 7: 8389. doi:10.1038/s41598-017-08798-x
- Bernauer, O. M., Gaines-Day, H. R., Steffan, S. A. (2015). Colonies of bumble bees (*Bombus impatiens*) produce fewer workers, less bee biomass, and have smaller mother queens following fungicide exposure. *Insects* 6: 478-488. doi:10.3390/insects6020478
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E., Cidlowski, J. A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis *Trends in Cell biology* 5: 21-26. doi: [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)88932-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)88932-1)
- Campbell, J. B., Nath, R., Gadau, J., Fox, T., DeGrandi-Hoffman, G., Harrison, J. F. (2016). The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of Insect Physiology* 86: 11–16. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.003>
- Cavalcante, V.M., Cruz-Landim, C. (1999). Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-40.
- Chan, E. Y., Tooze, S. A. (2009). Evolution of Atg1 function and regulation, *Autophagy* 5: 758-765. doi: 10.4161/auto.8709
- Chang, J., Zhao, J., Tian, X. (2018). *In silico* prediction of neuropeptides in Hymenoptera parasitoid wasps. *PLoS One* 13: e0193561. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193561>
- Chapman, R.F. (2013). *The Insects. Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge
- Cooper, D. M., Granville, D. J., Lowenberger, C. (2009). The insect caspases. *Apoptosis* 14: 247–256. doi:10.1007/s10495-009-0322-1
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology* 8: 1-20. doi: 10.3389/fphar.2017.00412
- Cruz, A. D. S., Silva-Zacarin, E. C. M. D., Bueno, O. C., Malaspina, O. (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biol Toxicol* 26: 165–176. doi 10.1007/s10565-009-9126-x
- Cruz-Landim, C, Rodrigues, L. (1967). Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of the adult Apinae. *J. Apic. Res.* 6: 17-28.

- David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Rotheray, E. L., Hill, E. M., Goulson, D. (2016). Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment International*. 88: 169–178. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>
- De Grandi-Hoffman, G., Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10: 170-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- De Grandi-Hoffman, G., Chen, Y., Dejong, E. W., Chambers, M. L., Hidalgo, G. (2015). Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *Journal of Economic Entomology* 108: 2518–2528. doi: 10.1093/jee/fov251
- Dierickx, P. J. (2004). Cytotoxicity of the dicarboximide fungicides, vinclozolin and iprodione, in rat hepatoma-derived Fa32 cells. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 32: 369-73.
- Doonan, F., Cotter, T. G. (2007). Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44: 200–204. doi:10.1016/j.ymeth.2007.11.006
- Dreier, S., Redhead, J. W., Warren, I. A., Bourke, A. F. G., Heard, M. S., Jordan, W. C., Sumner, S., Wang, J., Carvell, C. (2014). Fine scale spatial genetic structure of common and declining bumble bees across an agricultural landscape. *Molecular Ecology* 23: 3384–3395. doi: 10.1111/mec.12823
- Elston, C., Thompson, H. M., Walters, K. F. A. (2013). Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. *Apidologie* 44: 563–574. doi: 10.1007/s13592-013-0206-9
- Emanuele, S., Oddo, E., D’Anneo, A., Notaro, A., Calvaruso, G., Lauricella, M., Giuliano, M. (2018). Routes to cell death in animal and plant kingdoms: from classic apoptosis to alternative ways to die—a review. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 1-13. doi: <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0704-9>
- Enayati, A. A., Ranson, H., Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8. doi: 10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x

- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 719-731. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.2527>
- Farias, P. R. S., Harada, A. Y., Filgueiras, C. C., Lima, B. G., Sales, T. M., Silva, A. G., Souza, B. H. S. (2018). Mapping *Azteca barbifex* Forel (Hymenoptera: Formicidae) dispersal in georeferenced orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) orchard in the Eastern Amazon, Brazil. *Insectes Sociaux* 65: 345-350. doi: 10.1007/s00040-018-0610-2
- Farris, S. M. (2016). Insect societies and the social brain. *Curr Opin Insect Science* 15: 1-8. doi: 10.1016/j.cois.2016.01.010
- Feyereisen, R. (2006). Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions* 34: 1252–1255. doi: 10.1042/BST0341252
- Fisher, A., Coleman, C., Hoffmann, C., Fritz, B., Rangel, J. 2017. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. *Journal of Economic Entomology* 110: 802-808. doi: 10.1093/jee/tox031
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1-9. doi: 10.1126/science.1255957
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research* 301: 5–17. doi:10.1007/s004410000193
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350. doi: 10.1126/science.1215039
- Hung, K-L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of Royal Society London B.* 285: 20172140. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Jackson, C. J., Liu, J. W., Carr, P. D., Younus, F., Coppin, C., Meirelles, T., Lethier, M., Pandey, G., Ollis, D. L., Russell, R. J., Weik, M., Oakeshott, J. G. (2013). Structure and function of an insect α -carboxylesterase (α Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110: 10177-10182. doi: <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.1304097110>

- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41: 312–331. doi: 10.1051/apido/2010018
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., Ellis, M. D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8: e54092. doi:10.1371/journal.pone.0054092
- Kamhi, J. F., Arganda, S., Moreau, C.S., Traniello, J. F. A. (2017). Origins of aminergic regulation of behavior in complex insect social systems. *Frontiers in System Neuroscience* 11: 74. doi: 10.3389/fnsys.2017.00074
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J. M., Barron, A. B., Lihoreau, M. (2017). Why bees are so vulnerable to environmental stressors. *Cell Press* 32: 268-278. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.12.009>
- Kubik M., Nowacki J., Pidek A., Warakomska Z., Michalczyk L., Goszczynski W. (1999). Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie* 30: 521–532. doi: <https://doi.org/10.1051/apido:19990607>
- Ladurner, E., Bosch, J., Kemp, W. P., Maini, S. (2005). Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie* 36: 449–460. doi: : 10.1051/apido:2005032
- Levine, B., Yuan, J.Y. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *Journal of Clinical Investigation* 115: 2679-2688. doi:10.1172/jc126390
- Liu, Y., Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation* 22: 367–376. doi:10.1038/cdd.2014.143
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lourenço, A. P., Mackert, A., Cristino, A. S., Simões, Z. L. P. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372–385. doi:: 10.1051/apido:2008015
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., Timmermans, J. P., Bult, H., De Meyer, G. Y. (2013). Immunohistochemical analysis of macroautophagy: recommendations and limitations. *Autophagy* 9: 386–402. doi: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.22968>

- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Marsaioli, A. J., Zampieri, D., Fontoura, I. C., Luchessi, A. D., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). A brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology* 25: 2851–2855. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.028>
- Moore, M. N., Allen, J. I., Somerfield, P. J. (2006). Autophagy: Role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*. 62: S420–S425. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.055
- Mukhopadhyay, S. Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., Bhutia, B. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis* 19:555–566. doi: 10.1007/s10495-014-0967-2
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one* 5: e9754. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- Mussen, E. C., Lopez, J. E., Peng, C. Y. S. (2004). Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 33: 1151-1154. doi: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1151>
- Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Noceli, R.C.F., Malaspina, O., Petis, J.S., Teixeira, E.W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51: 422-442. doi: 10.1590/S0100-204X2016000500003
- Pappas, A. C., Fisher, D. J. (1979). A Comparison of the Mechanisms of Action of Vinclozolin, Procymidone, Iprodione and Prochloraza against *Botrytis cinerea*. *Pestic. Sci.* 10: 239-246.
- Pohanish, R.P. (2015). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*. William Andrew, Norwich
- Pommer, E. H., Lorenz, G. (1982). Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. To dicarboximide fungicides — literature review. *Crop Protection* 1: 221-230. doi: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(82\)90044-8](https://doi.org/10.1016/0261-2194(82)90044-8)
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863: 2977–2992. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

- Ribas, V., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.(2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology* 5: 1-19. doi: 10.3389/fphar.2014.00151
- Rost-Roszkowska, M., Poprawa, I., Kaczmarek, L. (2013) Autophagy as the cell survival in response to a microsporidian infection of the midgut epithelium of *Isohypsibius granulifer granulifer* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Acta Zoologica* 94: 273-279. doi:10.1111/j.1463-6395.2011.00552.x.
- Rost-Roszkowska, M. M., Poprawa, I., Klag, J., Migula, P., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W. (2008). Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna cf. nylanderii* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. *Canadian Journal of Zoology* 86: 1179-1188. doi: <https://doi.org/10.1139/Z08-096>
- Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J. H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., Nakano, H. (2003). NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *The EMBO Journal* 22: 3898-3909. doi: 10.1093/emboj/cdg379
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C. (1995). Gut structures in adult workers of necrophorus neotropical stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Entomol. Gen.* 19, 261–265.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C. (1996). A specialized midgut region in stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Biocell* 20, 227–234.
- Simon, H. –U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415–418.
- Snodgrass, R. E., (1935). *Principles of insect morphology*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Snodgrass, R. E. (1956). *Anatomy of honeybee*. Comstock Publishing Ass, Ithaca.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174.
- Taatjes, D. H., Sobel, B. E., Budd, R. C. (2007). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry Cell Biology* 129: 33–43. doi:10.1007/s00418-007-0356-9
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 47–61. doi.org/10.1002/arch.1036

- Tettamanti G, Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M.L., Pennacchio, F., Eguileor, M. (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation re responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissues Research* 330: 345-359. doi: 10.1007/s00441-007-0449-8
- Thompson, H., Wilkins, S. (2003). Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology* 56: 131-134.
- Vandame, R., Belzunces, L. P. (1998). Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neuroscience Letters* 251: 57–60. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00494-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00494-7)
- Van Limbergen, J., Stevens, C., Nimmo, E. R., Wilson, D. C., Satsangi, J. (2009). Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunology* 2: 315–330. doi:10.1038/mi.2009.20
- van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Coxfooster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4: e6481. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- van Engelsdorp, D., Traynor, K. S., Andree, M., . Lichtenberg, E. M., Chen, Y., Saegerman, C., Cox-Foster, D. L. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS One* 12: e0179535. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179535>
- Wu, H., Wang, M.C., Bohmann, D. (2009). JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of development* 126: 624–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.06.1082>
- Yamada, H., Arai, T., Endo, N., Yamashita, K., Fukuda, K., Sasada, M., Uchiyama, T. (2006). LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sciences* 78: 926-933. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.106>
- Yoder, J. A., Jajack, A. J., Rosselot, A. E., Smith, T. J., Yerke, M. C., Sammataro, D. (2013). 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 A* 76: 587-600. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2013.798846>

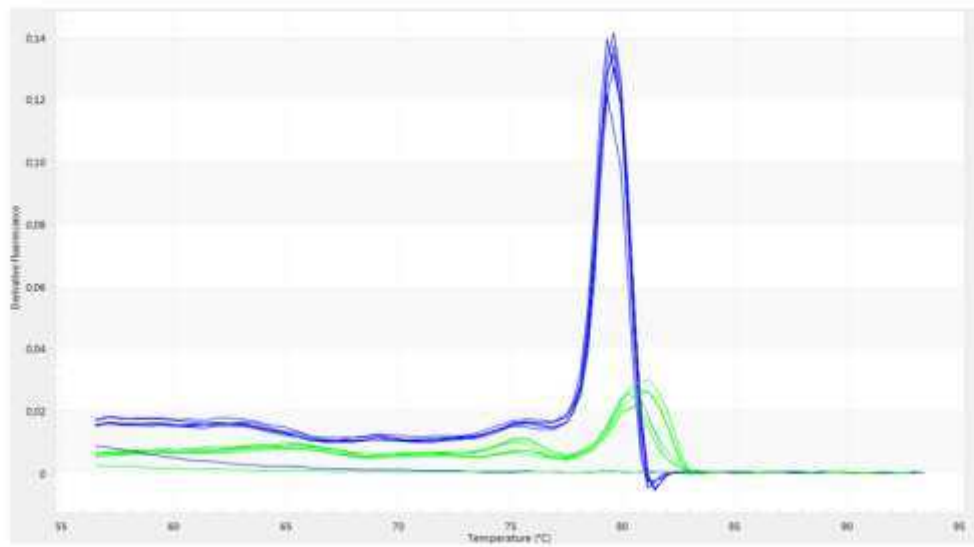
- Yuan, J., Reed, A. Chen, F., Stewart Jr, C.N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85. doi: 10.1186/1471-2105-7-85
- Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C.A., Frazier, J.L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One* 9: e77547. doi:10.1371/journal.pone.0077547

6. Material Complementar

Study Name: Nano Study
Instrument: Eco™ Real-Time PCR system
ROX Normalization: Disabled

Study Type: Relative Quantification
Software: EcoStudy v5.0.4090

Derivative Melt



illumina®