

**LENISE SILVA CARNEIRO**

**EFEITOS COLATERAIS DO IMIDACLOPRIDO EM LARVAS E ADULTOS DE  
OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera***

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C289e Carneiro, Lenise Silva, 1994-  
2022 Efeitos colaterais do imidacloprido em larvas e adultos de  
operárias da abelha *Apis mellifera* / Lenise Silva Carneiro. –  
Viçosa, MG, 2022.  
1 tese eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.740>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas. 2. Imidacloprido (Inseticida). 3. Abelhas -  
Larvas. 4. Intestinos. I. Serrão, José Eduardo, 1965-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

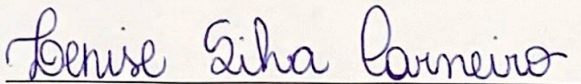
LENISE SILVA CARNEIRO

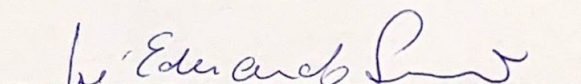
EFEITOS COLATERAIS DO IMIDACLOPRIDO EM LARVAS E ADULTOS DE  
OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de novembro de 2022.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Lenise Silva Carneiro  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
José Eduardo Serrão  
Orientador

*Aos meus pais, irmãos, avós e Clara.*

## AGRADECIMENTOS

Sem o apoio de todas as pessoas que encontrei nessa jornada, não conseguiria finalizá-la com êxito. Seguem meus sinceros agradecimentos.

A Deus.

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. E meus avós pelo afeto e orações.

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

À população brasileira que através de seus impostos financia a educação pública. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de auxílio financeiro a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do Departamento de Biologia Geral por participarem da minha formação acadêmica agregando conhecimentos, especialmente ao meu orientador José Eduardo Serrão pelas oportunidades concedidas e pela confiança em mim depositada nesses quase dez anos de trabalho juntos. O seu profissionalismo, sua inteligência, responsabilidade e a maneira como ensina são uma grande inspiração.

Aos funcionários da UFV, principalmente a secretária Beth por sua boa vontade em nos ajudar. Ao técnico do Apiário Diego 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, convivência e cafezinhos. Vocês foram imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus grupos de amigos (BIO 12, SUB do 200, República Arado Brabo e aqueles que estão há anos na minha vida) foi um privilégio encontrar pessoas como vocês. A querida Escola Estadual Coronel Francisco Gama, diretora, professores, funcionários e alunos, por toda compreensão e incentivo.

Minha eterna gratidão!

*“Eu preciso respeitar minha mente e meu corpo se quiser chegar ao fim dessa jornada”.*

(Rupi Kaur)

## RESUMO

CARNEIRO, Lenise Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Efeitos colaterais do imidacloprido em larvas e adultos de operárias da abelha *Apis mellifera***. Orientador: José Eduardo Serrão.

A abelha *Apis mellifera* tem sido utilizada tanto para polinização quanto para produção de produtos apícolas devido a sua eficácia e ampla disponibilidade. O declínio de populações de abelhas tem sido reportado em vários locais como Europa e Ásia e uma das causas é a exposição a pesticidas. O imidacloprido é um dos inseticidas mais utilizados no mundo, pois possui toxicidade seletiva é neurotóxico e causa hiperexcitação e paralisa. Sendo um inseticida sistêmico e persistente, é capaz de translocar pelos tecidos da planta e atingir as abelhas através da alimentação. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos colaterais do imidacloprido no intestino médio de adultas de *A. mellifera* e intestino médio e corpo gorduroso de larvas de operárias de *A. mellifera*. No capítulo 1, a toxicidade, histopatologia, citotoxicidade e expressão do gene *atg1* relacionado à autofagia foram avaliados no intestino médio de operárias expostas oralmente ao imidacloprido. O epitélio do intestino médio de abelhas tratadas apresentaram a ocorrência de vacúolos citoplasmáticos, espaços intercelulares aumentados, desorganização da borda estriada e picnose nuclear, com índice de lesão de órgãos que aumenta com o tempo de exposição. As células digestivas do intestino médio das abelhas tratadas apresentam saliências apicais, mitocôndrias danificadas e autofagossomos que foram caracterizados por conteúdo com restos de organelas e alta expressão de *atg1*. Essas características indicam a ocorrência de morte celular. No capítulo 2, foram avaliados os efeitos do imidacloprido no intestino médio e corpo gorduroso de larvas através de análises histopatológicas, citoquímicas e expressão de *cdc20* para divisão celular. No intestino médio de larvas tratadas foi observada a desorganização da arquitetura do epitélio, formação de bolhas na superfície, apical, liberação de fragmentos celulares para o lúmen do órgão, perda de borda estriada, condensação nuclear e vacuolização citoplasmática, indicando morte celular. A presença de proteínas foi detectada em todo epitélio intestinal de larvas tratadas e controle, provavelmente são enzimas responsáveis pela digestão. O teste histoquímico para polissacarídeos neutros evidenciou o glicocálice, que se mostrou desorganizado nas abelhas expostas ao inseticida. Os trofócitos, principal célula do corpo gorduroso, não apresentaram alterações morfológicas entre tratamento e controle. Mas o citoplasma das células do tratamento apresentaram gotículas lipídicas significativamente menores e maior quantidade de proteínas provavelmente respostas ao estresse causado pelo

inseticida. A quantidade de carboidratos não variou estatisticamente entre tratamento e controle o que pode estar associado à tolerância a inseticidas. A expressão de *cdc20* não apresentou diferença significativa entre tratamento e controle de nenhum dos órgãos avaliados, indicando que a exposição ao inseticida não induziu divisão celular. Juntos, esses resultados demonstram que o imidacloprido afeta órgãos não alvo da abelha *A. mellifera* reforçando o seu impacto negativo sobre esses importantes polinizadores.

Palavras-chave: Abelha. Corpo gorduroso. Imidacloprido. Intestino médio. Larva.



## ABSTRACT

CARNEIRO, Lenise Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2022. **Collateral effects of imidacloprid on larvae and adults of honey bee *Apis mellifera* workers.** Adviser: José Eduardo Serrão.

The honey bee *Apis mellifera* has been used both for pollination and for the production of bee products due to its efficiency and wide availability. The decline in bee populations has been reported in various locations such as Europe and Asia and one of the causes is exposure to pesticides. Imidacloprid is one of the two most widely used insecticides in the world, because it has selective and neurotoxic toxicity and causes hyperarousal and paralysis. Being a systemic and persistent insecticide, it is capable of translocating covered hairs of the plant and reaching the bees through feeding. In this context, the present study aims to assess the side effects of imidacloprid in the midgut of *A. mellifera* adults and the midgut and fat body of larvae of *A. mellifera* workers. In chapter 1, the toxicity, histopathology, cytotoxicity and expression of the *atg1* gene related to autophagy were evaluated in the midgut of workers orally exposed to imidacloprid. The epithelium of the midgut of treated honey bees will present the occurrence of cytoplasmic vacuoles, increased intercellular spaces, disorganization of the striated border and nuclear pycnose, with an index of organ damage that increases with the time of exposure. The digestive cells of the midgut of the treated honey bees present apical saliences, damaged mitochondria and autophagosomes that are characterized by their content with organelle remains and high expression of *atg1*. These characteristics indicate the occurrence of cell death. In chapter 2, the effects of imidacloprid in the midgut and fat body of larvae were evaluated through histopathological and cytochemical analysis and expression of *cdc20* for cell division. In the midgut of treated larvae, disorganization of the epithelial architecture, formation of balls on the surface, apical, release of cell fragments into the organ lumen, loss of the striated edge, nuclear condensation, and cytoplasmic vacuolization were observed, indicating cell death. The presence of proteins was detected in all intestinal epithelium of treated and control larvae, probably enzymes responsible for digestion. The histochemical test for neutral polysaccharides showed evidence of glycocalyx, which was disorganized in the hair exposed to the insecticide. The trophocytes, the main cell of the fat body, did not present morphological alterations between treatment and control. More of the cytoplasm of the treated cells presented significantly fewer lipid droplets and a greater amount of protein, probably in response to the stress caused by the insecticide. The amount of

carbohydrates did not vary statistically between treatment and control, which could be associated with tolerance to insecticides. The expression of *cdc20* did not show a significant difference between treatment and control of the two tested organs, indicating that exposure to the insecticide did not induce cell division. Together, these results demonstrate that imidacloprid affects organs not even those of *A. mellifera* beetles, reinforcing its negative impact on these important pollinators.

Keywords: Bee. Fat body. Imidacloprid. Midgut. Larvae.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
OBJETIVO .....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
CAPÍTULO 1 .....	21
CAPÍTULO 2 .....	31
1. INTRODUÇÃO .....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3. RESULTADOS .....	38
4. DISCUSSÃO .....	44
5. CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
CONCLUSÕES GERAIS .....	57

## INTRODUÇÃO GERAL

Hymenoptera compreende mais de 150.000 espécies, conhecidas popularmente como abelhas, formigas e vespas (Peters et al., 2017). Inclui duas subordens Symphyta, que engloba os membros mais basais, e Apocrita, que é dividida em dois grupos monofiléticos Parasitica e Aculeata (Rasplus et al., 2010). São insetos econômica e ecologicamente importantes, uma vez que podem atuar como pragas (Della-Lucia et al., 2014), parasitoides (Beckage & Gelaman, 2004) e polinizadores (Khalifa et al., 2021). Na ordem Hymenoptera os machos se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados e as fêmeas de ovos fertilizados (Rasplus et al., 2010). São insetos holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Rembold et al., 1980). A fase larval é um período de alimentação e crescimento (Michelette & Soares, 1993). A transformação da larva em adulto ocorre através da pupa e na fase adulta ocorre a reprodução e disseminação da espécie (Winston, 2003).

A larva das abelhas é ápoda, com tegumento pouco esclerosado e cabeça bem definida. Em *Apis mellifera* a fase larval compreende cinco estágios com quatro mudas. Os órgãos mais desenvolvidos são o intestino, envolvido na ingestão e digestão do alimento e o corpo gorduroso responsável pelas reservas energéticas (Cruz-Landim, 2009). A principal célula do corpo gorduroso são os trofócitos que possuem origem mesodérmica e são responsáveis pelo metabolismo intermediário dos insetos, desintoxicação e excreção, síntese da maior parte das proteínas da hemolinfa, mas durante a fase larval tem como principal função o armazenamento de glicogênio, lipídios e proteínas (Arrese & Soulages, 2010; Li et al., 2019; Skowronek et al., 2021). Dispersos entre os trofócitos são encontrados os enócitos, células de origem ectodérmica, que sintetizam hidrocarbonetos que fazem parte da cutícula (Roma et al., 2010).

O trato digestivo das larvas e insetos adultos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Snodgrass, 1935). O intestino anterior está relacionado com ingestão e passagem de alimento, o médio, com a digestão, absorção de nutrientes, defesa contra micro-organismos e sinalização e o posterior, com excreção e o balanço de água e íons do organismo (Caccia et al., 2019). Possui uma camada única de células com duas camadas musculares. A região anterior e posterior tem origem ectodérmica e são revestidas por cutícula, enquanto o intestino médio tem origem mesodérmica possuindo a matriz peritrófica. A passagem entre o intestino médio e posterior fica obstruída por toda fase larval e só abre no último estágio quando a larva para de se alimentar. O canal alimentar é

remodelado durante a metamorfose, sendo que no intestino anterior ocorre o alongamento do esôfago, formação do papo, e proventrículo (Dobrovski, 1951), no médio o epitélio larval é eliminado e novas células são formadas a partir das células regenerativas (Neves et al., 2003; Martins et al., 2006) e no posterior ocorre aumento de comprimento e formação do íleo e reto (Santos et al., 2009).

Alguns Hymenoptera são eussociais e podem exibir comportamentos complexos (Farris, 2016; Kamhi et al., 2017) e ocorrência das castas operárias e rainhas. Em *A. mellifera*, os machos, denominados zangões, e a rainha apresentam função reprodutiva e as operárias têm atividades que variam conforme a idade, incluindo limpeza da colônia, cuidado com as crias e coleta de alimento. A diferenciação das castas ocorre durante a fase larval através da alimentação e operárias e rainhas apresentam diferentes tamanhos (Michener, 1974).

As operárias adultas que atuam na coleta de alimento, formado por néctar e grãos de pólen contribuem de forma efetiva para a polinização das Angiospermas. O processo de polinização é definido pelo movimento do pólen das anteras masculinas aos estigmas femininos (Sukumaran et al., 2020). Animais polinizadores contribuem para a produção em 87 culturas globais, melhorando a qualidade e quantidade da produção agrícola, com um valor econômico da polinização médio de 153 bilhões de euros (Khalifa et al., 2021). Neste sentido, *A. mellifera* tem sido utilizada para serviços de polinização, pois podem aumentar a produtividade em 96% de culturas agrícolas (Klein et al., 2007; Breeze et al., 2011). Além disso, produzem mel, geleia real, própolis e veneno, substâncias utilizadas na indústria cosmética e farmacêutica (Cornara et al., 2017; Azam et al., 2019).

Apesar de sua importância, as abelhas sofreram declínio em vários locais do mundo (Potts et al., 2010; Van Engelsdorp et al., 2011) e isso tem sido associado a fatores como doenças, perda de hábitat e pesticidas (Goulson et al., 2015). O Brasil é um dos maiores consumidores de inseticidas do mundo e o uso aumentou 152% nos últimos 15 anos (dos Santos et al., 2018). Dentre os inseticidas, os neonicotinoides representam um dos grupos mais utilizados, e o imidacloprido é um de seus representantes (Wintermantel et al., 2020). Ele é modulador competitivo dos receptores de acetilcolina, causando hiperexcitação e morte (Tomizawa & Casida, 2002). É sistêmico podendo ser transportados por todas as partes da planta, protegendo assim contra herbívoros (Simon-Delso et al., 2015) e pode persistir nelas por anos (Krupke et al., 2012). As abelhas podem ser contaminadas pela ingestão do néctar ou pólen (Blacquièrre et al., 2012; Yang et al., 2012) e o trato digestivo é o primeiro órgão a entrar em contato com os pesticidas que contaminam o alimento (Denecke et al., 2018). Além

do intestino médio, outro órgão sujeito a ação de pesticidas é o corpo gorduroso, pois está associado à função de desintoxicação (Assis et al., 2021).

Embora sejam eficientes no controle de pragas agrícolas, os neonicotinoides, como o imidacloprido tem apresentado efeitos colaterais em insetos não alvos como as abelhas, incluindo dano cerebral com consequências na resposta olfativa atividade de forrageio (Peng & Yang, 2016), desorientação para navegação (Yang et al., 2012), memória (Iqbal et al., 2018), aprendizagem visual (Colin et al., 2020), mobilidade (Delkash-Roudsari et al., 2020) e comunicação através da dança (Zhang et al., 2020). Apesar de ser um inseticida neurotóxico, os efeitos do imidacloprido não se limitam ao sistema nervoso, podendo atingir sistemas e órgãos não alvos nos insetos. Ele afeta a imunocompetência pela redução da quantidade de hemócitos, da resposta de encapsulamento, da atividade antimicrobiana da hemolinfa, prejudicando a capacidade de tolerância a doenças e interfere na expressão de genes relacionados à imunidade (Pettis et al., 2012; Brandt et al., 2016; Tesovnik et al., 2019).

As larvas de *A. mellifera* contaminadas com o imidacloprido, não têm a sobrevivência e o peso afetados na concentração máxima de 10 mg L<sup>-1</sup>(Dai et al, 2019), mas apresentam atraso no desenvolvimento, redução no ciclo de vida e alterações na expressão gênica relacionados à resposta imune, desintoxicação e oxidação-redução (Chen et al., 2021). Alguns genes relacionados à imunidade, desenvolvimento, metabolismo de lipídios e carboidratos, apresentam regulação negativa (Gregorc, et al., 2012, Derecka et al., 2013; Wu et al., 2017; Paten et al., 2022). Enquanto os níveis de mRNA para um conjunto de genes que codificam enzimas do citocromo P450, que atuam nos processos de desintoxicação, e Hsp70, relacionadas à redução do estresse celular, são regulados positivamente (Scott et al., 1998; Castro et al., 2013; Derecka et al., 2013). Também foi detectada a redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, que degrada a acetilcolina e encerra a transmissão do impulso nervoso (Delkash-Roudsari et al., 2022).

## OBJETIVO

Este estudo teve o objetivo de verificar se o inseticida neurotóxico imidacloprido tem efeitos colaterais em órgãos não alvos de operárias de abelhas. Para tanto, foram avaliados se a exposição oral aguda ao imidacloprido tem efeitos de toxicidade, histopatologia, citotoxicidade e expressão relativa do gene *atg1* para autofagia no intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera* (Capítulo 1). Também foi avaliado se a exposição oral crônica ao imidacloprido tem efeitos na histopatologia, histoquímica e expressão relativa do gene *cdc20* para divisão celular no corpo gorduroso e intestino médio de larvas de operárias de *A. mellifera* (Capítulo 2).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55:207–25. [10.1146/annurev-ento-112408-085356](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356).
- Assis, J.C., Domingues, C.E.C., Tadei, R., Silva, C.I.S., Lima, H.M.S, Decio, P., Silva-Zacarin, E.C.M., 2022. Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Environmental Pollution* 304, 119140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119140>.
- Azam, N.K., Ahmed, N., Biswas, S., Ara, N., Rahman, M., Hirashima, A., Hasan, N., 2018. A review on bioactivities of honey bee venom. *Annual Research & Review in Biology* 30, 1-13.
- Blacquièrre, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>.
- Breeze, T.D., Bailey, A.P., Balcombe, K.G., Potts, S.G., 2011. Pollination services in the UK: how important are honeybees? *Agric. Ecosyst. Environ.* 142, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.020>.
- Caccia, S, Casartelli, M., Tettamanti, G., 2019. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research* 377, 505–525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>.
- Castro, S.V., Lobo, C.H., de Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2013. Proteínas de choque térmico HSP 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica* 7, 261-271.
- Chen, Y., Tzeng, D.T.W., Yang, E., 2021. Chronic effects of imidacloprid on honey bee worker development—molecular pathway perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11835. <https://doi.org/10.3390/ijms222111835>.
- Colin, T., Plath, J.A., Klein, S., Vine, P., Devaud, J.M., Lihoreau, M., Meikle, W.G., Barron, A.B., 2020. The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 51, 499–509. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00737-6>.



- 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-Landim, C. 2009. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Unesp.
- Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Bustamante, T.A., Bloomquist, J.R., Ellis, J.D., 2019. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in *vitro*. *Pest Management Science* 75, 29-36. <https://doi.org/10.1002/ps.5124>.
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2020. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204, 111108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>.
- Delkash-Roudsari, S., Goldansaz, S.H. Jahromi, K.T., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2022. Side effects of imidacloprid, ethion, and hexaflumuron on adult and larvae of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 53:17. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00910-z>.
- Della-Lucia, T.M.C, Gandra, L.C., Guedes, R.N.C., 2014. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci* 70, 14–23. DOI 10.1002/ps.3660.
- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., Vontas, J., 2018. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 103, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>.
- Derecka, K., Blythe, M.J., Malla, S., Genereux, D.P., Guffanti, A., Pavan, P., Moles, A., Snart, C., Reyder, T., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Schuster, E., Stöger, R., 2013. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS ONE* 8(7): e68191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068191>.
- Dobrovsky, T.M., 1951. Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honeybee. *Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Mens.* 301, 03-47.
- dos Santos, C.F., Otesbelgeu, A., Blochtein, B., 2018. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: beekeeping growth and insecticide use. *PLoS One* 13, e0200286.
- Farris, S.M., 2016. Insect societies and the social brain. *Current Opinion in Insect Science* 15, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.01.010>.

- 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, 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology* 58, 1042–1049. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>.
- Iqbal, J., Alqarni, A.S., Raweh, H.S.A., 2018. Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on learning and memory formation of indigenous arabian bee (*Apis mellifera jemenitica* Ruttner) adult foragers. *Neotrop. Entomol.* 48, 373–380. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0651-2>.
- Kamhi, J.K., Arganda, S., Moreau, C.S., Traniello, J.F.A., 2017. *Frontiers in Systems Neuroscience* 11, 74. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00074>.
- Khalifa, S.A.M., Elshafiey, E.H., Shetaia, A.A., Abd El-Wahed, A.A., Algethami, A.F., Musharraf, S.G., AlAjmi, M.F., Zhao, C., Masry, S.H.D., Abdel-Daim, M.M., Halabi, M.F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M.A.M., El-Seedi, H.R., 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* 12, 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B* 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7 (e29268). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>.
- Li, S., Yu, X., Feng, Q., 2019. Fat body biology in the last decade. *Annu. Rev. Entomol.* 64:18.1–18.19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>.
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A.O. and Serrão, J.E., 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37, 161-168.
- Michelette, E.R.F., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24, 431-440.
- Michener, C.D., 1974. *The Social Behavior of the Bee: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge.

- Neves, C.A., Gitirana, L.B. and Serrão, J.E., 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, meliponini) worker. *Sociobiology* 41, 443-459.
- Paten, A.M., Colin, T., Choppin, C.W, Court, L.N., Barron, Oakeshott, J.G., Morgan, M. J., 2022. Non-additive gene interactions underpin molecular and phenotypic responses in honey bee larvae exposed to imidacloprid and thymol. *Science of the Total Environment* 814, 152614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152614>.
- Peng, Y., Yang, E., 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 19298. <https://doi.org/10.1038/srep19298>.
- Peters, R.S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., Kozlov, A., Podsiadlowski, L., Petersen, M., Lanfear, R., Diez, P.A., Heraty, J., Kjer, K.M., Klopstein, S., Meier, R., Polidori, C., Schmitt, T., Liu, S., Zhou, X., Wappler, T., Rust, J., Misof, B., Niehui, O., 2017. Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology* 27, 1013-1018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.027>.
- Pettis, J.S., van Engelsdorp, D., Jhonson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1>.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>.
- Rasplus, J., Villemant, C., Paiva, M.R., Delvare, G., Roques, A., 2010. Hymenoptera. *BioRisk* 4, 669–776. doi: 10.3897/biorisk.4.55.
- Rembold, H., Kremer, J., Ulrich, G.M., 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11, 29-38.
- Roma, G.C., Bueno, O.C., Camargo-Mathias, M.I., 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron* 41, 395–401. doi:10.1016/j.micron.2009.12.007.
- Santos, C.G., Neves, C.A., Zanuncio, J.C. and Serrão, J.E., 2009. Postembryonic development of rectal pads in bees (Hymenoptera, Apidae). *The Anatomical Record* 292, 1602-1611.

- Scott, J.G., Liu, N., Wen, Z., 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121, 147–155.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>.
- Skowronek, P., Wójcik, L., Strachecka, A., 2021. Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects* 12, 547. <https://doi.org/10.3390/insects12060547>.
- Snodgrass, R. E., 1935. Principles of insect morphology. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Sukumaran, A., Khanduri, V.P., Sharma, C.M., 2020. Pollinator-mediated self-pollination and reproductive assurance in an isolated tree of *Magnolia grandiflora* L. *Ecological Processes* 9, 45. <https://doi.org/10.1186/s13717-020-00254-5>.
- Tesovnik, T., Zorc, M., Gregorc, A., Rinehart, T., Adamczyk, J., Narat, M., 2019. Immune gene expression in developing honey bees (*Apis mellifera* L.) simultaneously exposed to imidacloprid and varroa destructor in laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 58, 730–739. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1634463>.
- Tomizawa, M., Casida, E.J., 2002. Desnitro-imidacloprid activates the extracellular signalregulated kinase cascade via the nicotinic receptor and intracellular calcium mobilization in N1E–115 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 180–186. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9503>.
- Van Engelsdorp, D., Hayes Jr., J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J., 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. Apic. Res.* 50, 1–10. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.50.1.01>.
- Winston, M.L., 2003. The Biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge.
- Wintermantel, D., Odoux, J.F., Decourtye, A., Henry, M., Allier, F., Bretagnolle, V., 2020. Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Sci. Total Environ.* 704, 135400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135400>.

- Wu, M., Chang, Y., Lu, K., Yang, E., 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 88, 12-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>.
- Yang, E., Chang, H., Wu, W., Chen, Y., 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE* 7 (11), e49472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049472>.
- Zhang, Z.Y., Li, Z., Huang, Q., Yan, W.Y., Zhang, L.Z., Zeng, Z.J., 2020. Honeybees (*Apis mellifera*) modulate dance communication in response to pollution by imidacloprid. *J. Asia Pac. Entomol.* 23, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.03.011>.

## CAPÍTULO 1

### **ACUTE ORAL EXPOSURE TO IMIDACLOPRID INDUCES APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN THE MIDGUT OF HONEY BEE *Apis mellifera* WORKERS**

Science of the Total Environment. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152847

Lenise Silva Carneiro<sup>1</sup>, Luis Carlos Martinez<sup>1</sup>, André Henrique de Oliveira<sup>1</sup>, Jamile  
Fernanda Silva Cossolin<sup>1</sup>, Matheus Tudor Cândido Santos de Resende<sup>1</sup>, Wagner  
Gonzaga Gonçalves<sup>1</sup>, Luanda Medeiros-Santana<sup>2</sup>, José Eduardo Serrão<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa – campus Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, Minas Gerais 38810-00, Brasil



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers



Lenise Silva Carneiro<sup>a</sup>, Luis Carlos Martinez<sup>a</sup>, André Henrique de Oliveira<sup>a</sup>, Jamile Fernanda Silva Cossolin<sup>a</sup>, Matheus Tudor Cândido Santos de Resende<sup>a</sup>, Wagner Gonzanga Gonçalves<sup>a</sup>, Luanda Medeiros-Santana<sup>b</sup>, José Eduardo Serrão<sup>a,\*</sup>

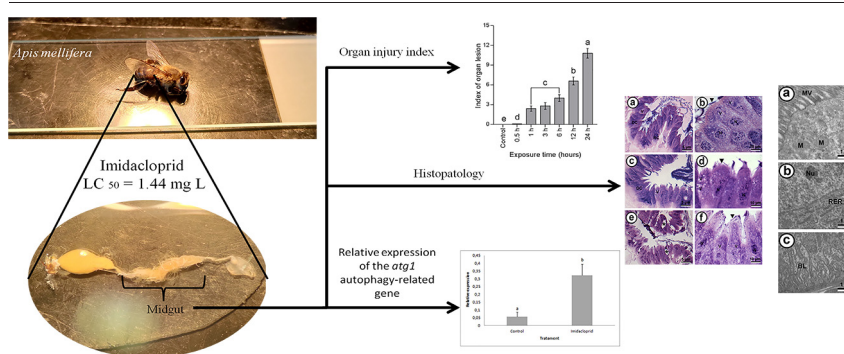
<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa – campus Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, Minas Gerais 38810-00, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Imidacloprid may affect non-target organs of honey *Apis mellifera*.
- The ingestion of this chemical by bees causes ultrastructural changes in midgut.
- Exposure to imidacloprid induces autophagy and apoptosis in the midgut of bees.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 November 2021

Received in revised form 19 December 2021

Accepted 28 December 2021

Available online 5 January 2022

Editor: Henner Hollert

#### Keywords:

Apoptosis

Autophagy

Bee

Imidacloprid

Midgut

### ABSTRACT

The honey bee *Apis mellifera* is an important pollinator that increases the yield and quality of crops. In recent years, honey bee populations have declined in some parts of the world, which has been associated with several causes, including pesticides used in agriculture. Neonicotinoids are neurotoxic insecticides widely used in the world with systemic action mode contaminating nectar and pollen that may be consumed by bees. This study evaluated the side effects of imidacloprid in the midgut of *A. mellifera* after acute oral exposure. Toxicity, histopathology, cytotoxicity, and expression of autophagy-related gene *atg1* were evaluated in honey bee workers orally exposed to imidacloprid. The estimated imidacloprid LC<sub>50</sub> was 1.44 mg L<sup>-1</sup>. The midgut epithelium of bees fed on imidacloprid LC<sub>50</sub> has the occurrence of cytoplasm vacuoles, enlarged intercellular spaces, disorganization of the striated border, and nuclear pyknosis, with an organ injury index that increases with time exposure. The midgut digestive cells of treated bees have apical protrusions, damaged mitochondria, and autophagosomes that were characterized for content with organelle debris and high expression of *atg1*. These features indicate the occurrence of high cell death in the midgut of workers exposed to imidacloprid, which may affect the digestibility the physiology of the insect.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jeserrao@ufv.br](mailto:jeserrao@ufv.br) (J.E. Serrão).

## 1. Introduction

Pollination services are beneficial for crops (Klein et al., 2007) because 87.5% of angiosperms are pollinated by animals (Ollerton et al., 2011), including bees that increase the quality, quantity, and commercial value of crops (Klatt et al., 2014; Stein et al., 2017). Among bees, the honey bee *Apis mellifera* is a wide world used in agriculture to increase crop yields to ca. 96% (Klein et al., 2007; Breeze et al., 2011).

Unfortunately, bee populations have declined (Potts et al., 2010a; Van Engelsdorp et al., 2011) probably due to multiple factors, including loss of natural habitat, environmental degradation, parasites, pathogens, pesticides, climate change, monotonous diets, and inadequate management (Potts et al., 2010b; Van Engelsdorp et al., 2011; Goulson et al., 2015; Grab et al., 2019).

Among the possible stressors associated with declining bee populations, pesticides have been evaluated (Balieira et al., 2018; Castro et al., 2020; Delkash-Roudsari et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2021a) with emphasis on neonicotinoids that, although banned in some regions (Wintermantel et al., 2020), are widely used in the world (Song et al., 2020). These chemicals are efficient in the control of insects with low toxicity to mammals and persistence in the environment (Kundoo et al., 2018; Wintermantel et al., 2020).

Neonicotinoids have a systemic action mode being transported to the whole plant protecting against herbivores (Simon-Delso et al., 2015). These chemicals act in the insect nervous system as competitive modulators of the nicotinic acetylcholine receptor in neurons, causing hyperexcitation, lethargy, paralysis, and death (Tomizawa and Casida, 2002; Simon-Delso et al., 2015; Matsuda et al., 2020).

Although effective in controlling agricultural pests, neonicotinoids such as imidacloprid have side effects on non-target insects such as bees, including brain damage with consequences on the olfactory response, foraging activity (Peng and Yang, 2016), navigation disorientation (Yang et al., 2012; Li et al., 2019), memory (Iqbal et al., 2018), visual learning (Colin et al., 2020), mobility (Delkash-Roudsari et al., 2020), neuronal apoptosis (Wu et al., 2015) and communication through waggle dance (Zhang et al., 2020).

Despite being a neurotoxic insecticide, the effects of imidacloprid are not limited to the nervous system, reaching to non-target organs of the insects. It affects immunocompetence reducing the number of hemocytes, the encapsulation response, the antimicrobial activity, impairing disease resistance, and the expression of immune-related genes (Pettis et al., 2012; Brandt et al., 2016; Tesovnik et al., 2019). Imidacloprid reduces mitochondrial function with ATP depletion (Nicodemo et al., 2014) and alters metabolic rates by decreasing the energy for bees to perform their functions in the colony (Gooley and Gooley, 2020). It also reduces larvae survival and causes a decrease in the size of cells in the hypopharyngeal gland (Tomé et al., 2020).

Imidacloprid persists in plants for years (Krupke et al., 2012) and bees can be contaminated feeding on nectar and pollen (Blacquièrre et al., 2012; Yang et al., 2012) reaching to the midgut, the organ responsible for the digestion and absorption (Cruz-Landim et al., 1996). *A. mellifera* workers exposed to chronic sublethal doses of imidacloprid undergo damage in the digestive cell (Catae et al., 2017). In the field, bees are exposed to the commercial formulation of insecticides, which in addition to the active ingredient include other substances (Mullin et al., 2015). Despite its insecticidal potential for pest control, imidacloprid represents a paradox for agriculture, affecting not only pest, but also beneficial insects such as natural enemies (Martínez et al., 2019) and pollinators (Blacquièrre et al., 2012; Goulson et al., 2015).

The objective was to evaluate whether the acute oral exposure to imidacloprid has toxicity, histopathology, cytotoxic and atg1 gene relative expression effects on the midgut of *A. mellifera* workers, in order to provide new insights on the impact of this pesticide on this important pollinator.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insects

*Apis mellifera* larvae and pupae were collected from brood combs in five colonies at the Central Apiary of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil (20° 45' N 42° 52' W) and transferred to the laboratory where they were kept at  $33 \pm 2$  °C and 70% relative humidity. Newly-emerged (<24 h old) workers were used for the experiments (Williams et al., 2013).

### 2.2. Toxicity test

The insecticide imidacloprid (Evidence® WG, 700 g kg<sup>-1</sup> active ingredient, Bayer, São Paulo, Brazil) was used in the oral acute toxicity test diluted in 1 L of 50% sucrose for the stock solution, adjusting 100 g L<sup>-1</sup> insecticide for the evaluated dilutions. The toxicity of the insecticide was determined by calculating the lethal concentrations LC<sub>25</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>75</sub>, and LC<sub>90</sub> under laboratory conditions following OECD guideline No. 213 (OECD, 1998). Six dilutions of imidacloprid (0.312, 0.625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg L<sup>-1</sup> (w/v)) were adjusted in 1 mL of stock solution. The control was 50% sucrose solution without insecticide. The test was carried out with 30 bees per 250 mL polyethylene cage in triplicate by insecticide dilution and control following the protocols of cages, incubation, and feeding according to Williams et al. (2013). The number of dead insects was evaluated every 24 h for 72 h.

### 2.3. Histopathology

Newly-emerged workers were fed on 50% sucrose solution with LC<sub>50</sub> (Castro et al., 2020; Plata-Rueda et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2021b) imidacloprid estimated in the toxicity test. The food together with the insecticide was offered in two 1.5 mL vials to 30 bees kept in a 250 mL cage (Williams et al., 2013). In the control, the workers were fed with 50% sucrose without insecticide. Five live workers were collected after 30 min, 1, 3, 6, 12, and 24 h of oral exposure to imidacloprid and control. The bees were immobilized at -4 °C for 5 min, the midgut dissected in the presence of 125 mM NaCl, and transferred to the Zamboni's fixative solution (Stefanini et al., 1967) for 4 h at room temperature. Then the midguts were dehydrated in a grade ethanol series (70%, 80%, 90%, and 95%) and embedded in historesin (Leica). Slices 2 µm thickness were stained with hematoxylin (15 min), eosin (30 s), analyzed, and photographed in an Olympus BX60 microscope.

### 2.4. Organ injury index

Ten histopathological sections per midgut of each worker obtained as aforementioned were randomly selected to assess the organ injury index according to Bernet et al. (1999) caused by imidacloprid after oral exposure. Briefly, the sum of all histological changes in the midgut was calculated per bee with the equation  $I_{org} = \sum alt (a \times w)$ , where  $I_{org}$  is the organ injury index,  $\sum alt$  is the sum of the changes,  $a$  is the score value and  $w$  is the importance factor. The scores ( $a$ ) of the changes were classified as i) no occurrence = 0, ii) mild occurrence = 1, iii) moderate occurrence = 2 or iv) severe occurrence = 3. The importance of factors ( $w$ ) were classified as: i) reversible damage (cell fragments released to the gut lumen and/or apocrine secretion) = 1, ii) generally reversible damage (cell cytoplasm vacuolization) = 2, and iii) irreversible damage (nuclear pyknosis and/or damaged regenerative cells) = 3.

### 2.5. Cytotoxicity

Five workers exposed by ingestion to imidacloprid (LC<sub>50</sub>) and five workers in the control group fed for 24 h were dissected in 0.1 M sodium cacodylate buffer with 0.2 M sucrose, pH 7.2. Next, the midguts were transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer with



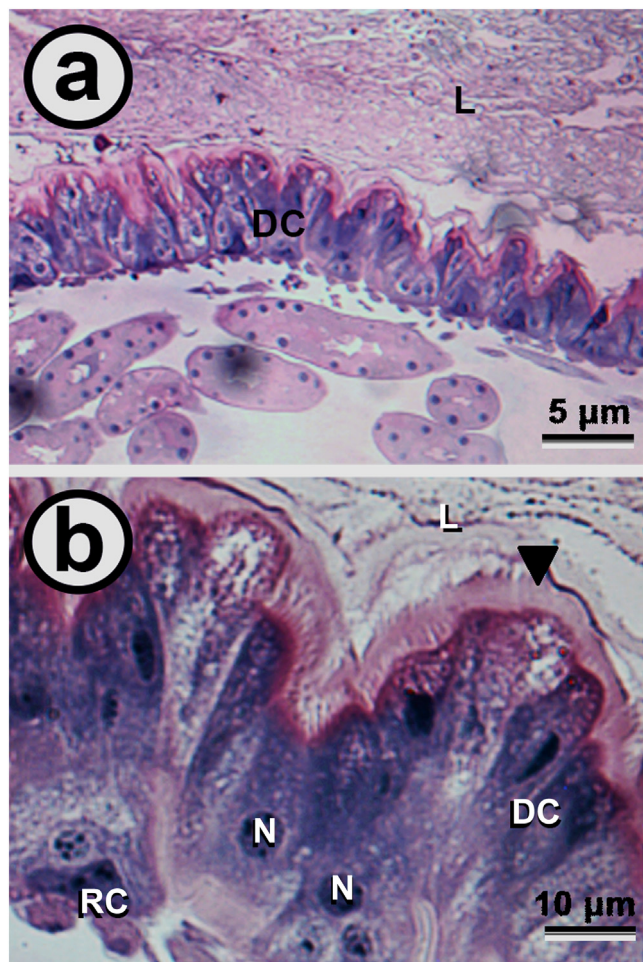
0.2 M sucrose for 4 h at room temperature. After washing twice in the buffer, the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, dehydrated in graded ethanol series (70%, 80%, 90%, 95%, and 99%), and embedded in resin LR White, following polymerization at 60 °C for 24 h. Ultrathin sections (80–90 nm) obtained in a Sorval MT2-BMT2-B ultramicrotome were stained with 1% aqueous uranyl acetate for 10 min and lead citrate (Reynolds, 1963) for 3 min. The samples were analyzed and photographed in a Zeiss EM 109 transmission electron microscope.

## 2.6. *Atg1* gene expression

To verify the occurrence of autophagy in the midgut cells, the expression of the *atg1* gene (accession number XM\_624947.5) was evaluated in 10 workers exposed to LC<sub>50</sub> imidacloprid for 24 h and the control group with 10 workers fed only with 50% sucrose. These bees were dissected in 125 mM NaCl, the midguts were removed and transferred to TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) for RNA extraction, following the manufacturer's instructions. Each midgut was placed in 250 µL TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), macerated with autoclaved pistils, completing the volume to 500 µL, and incubated for 20 min at room temperature. The samples were centrifuged at 12,000 ×g for 10 min at 4 °C and the supernatant was transferred to new tubes with 100 µL of chloroform and incubated at room temperature for 10 min with mild inversions. The samples were then centrifuged at 12,000 ×g for 15 min at 4 °C and the aqueous phase was collected and transferred to 250 µL of isopropanol and gently stirred for 10 min. Next, the samples were centrifuged at 12,000 ×g for 10 min at 4 °C and the isopropanol was discarded and the RNA pellet was washed with 500 µL of 75% ethanol and centrifuged at 12,000 ×g for 5 min at 4 °C. The ethanol was carefully removed and the washing procedure was repeated once more. The pellet was dried at room temperature overnight with the tubes opened, suspended in 20 µL of nuclease-free water (Promega®), and stored at –80 °C until use. The amount of RNA in each sample was quantified in a NanoDrop® Lite spectrophotometer (Thermo Scientific) at 260 nm. All RNA samples were treated with the Turbo DNA-free kit (Turbo DNase treatment and Removal Reagents), from Ambion (Life Technologies) before cDNA synthesis.

For cDNA synthesis, M-MuLV 200 U µL<sup>-1</sup> (Promega) was used with 1000 ng extracted RNA, 1 µL of Oligo (dT) primer (0.5 µg µL<sup>-1</sup>) and nuclease-free water, heated to 70 °C for 5 min, stirred and placed on ice. Five microliters of 10 × buffer, 1 µL of 200 U µL<sup>-1</sup> M-MuLV reverse transcriptase (Promega), and 6 µL of 10 mM dNTP mix were added to each tube and incubated at 37 °C for 60 min.

The Real-time PCR (qPCR) was performed using the fluorescence quantification kit (SYBR® Green) GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®) on the Eco Real Time PCR System (Illumina®). The samples made about 100 ng cDNA and 0.1 µM of each *atg1* primer (F-AGAGAGGCAGTGAGTCCACC/R-TATTGGTTGCGAGCGAGGAA) (Santos et al., 2015) and the reference gene (endogenous control) *rpL32* (accession number AF441189) (F-CGTCATATGTTGCCAACTGGT/R-TTGAGCCACACTCAACAATGG) (Lourenço et al., 2008). Reactions included initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing and elongation at 60 °C for 1 min, and dissociation at 60–95 °C and the melting curve rated from 55 °C to 95 °C. Relative expression of *atg1* levels were compared with



**Fig. 1.** Light micrographs of midgut epithelium of *Apis mellifera* fed on sucrose solution (control). [a] General aspect showing columnar digestive cells (DC) and lumen (L). [b] Higher magnification of the epithelium showing well-developed apical striated border (arrowhead), digestive cells (DC) with nucleus (N) rich in dec condensed chromatin, and regenerative cells (RC) in the basal portion.

the endogenous control gene by the  $2^{-\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001; Yuan et al., 2006).

## 2.7. Statistic

Lethal concentrations (LC<sub>25</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>75</sub>, and LC<sub>90</sub>) and confidence limits were determined by Probit analysis with the concentration-mortality curve using the PROC PROBIT procedure of the SAS User v program. 9.0 for Windows (SAS Institute, 2002). Data on midgut injury indices were submitted to analysis of variance and the means compared with Tukey test (HSD) at 5% of significance level using SAS user v9.0 (SAS Institute, 2002). The relative expression of the *atg1* gene in control and imidacloprid treatment was compared by *t*-test at a 5% significance level using Graph pad5.

**Table 1**

Lethal concentrations of imidacloprid to *Apis mellifera* after 72 h of oral exposure, obtained from Probit analysis (df = 5, intercept = 3687). Chi-square values ( $\chi^2$ ) demonstrate adequate curve fit for  $P > 0.05$ .

N° of insects	Lethal concentration	Estimated concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Confidential limits 95% (mg L <sup>-1</sup> )	Slop ± EP	$\chi^2$ (P)
90	CL <sub>25</sub>	0.74	0.61–0.86	2.33 ± 0.16	3.43 (0.48)
90	CL <sub>50</sub>	1.44	1.26–1.64		
90	CL <sub>75</sub>	2.79	2.42–3.21		
90	CL <sub>90</sub>	5.08	4.20–6.45		

### 3. Results

#### 3.1. Toxicity test

The estimated imidacloprid  $LC_{50}$  was  $1.44 \text{ mg L}^{-1}$  with 95% confidential limits of  $1.26\text{--}1.64 \text{ mg L}^{-1}$ . The mortality in the control was less than 1% and the data had a good fit to the Probit model ( $\chi^2 = 3.43 P > 0.05$ ) (Table 1).

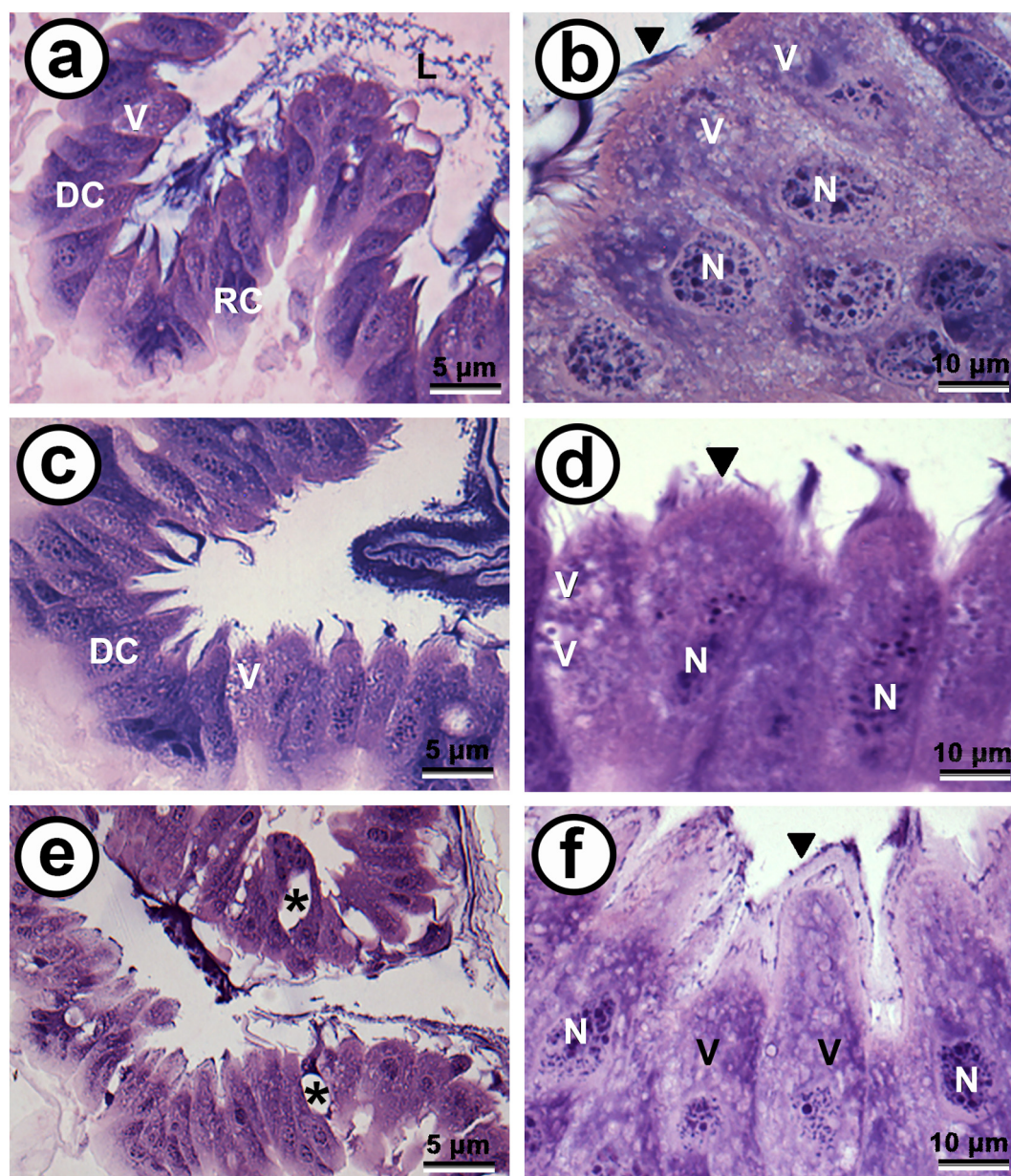
#### 3.2. Histopathology

In the control, the midgut epithelium of *A. mellifera* was formed by a single layer of digestive cells (Fig. 1a) with a well-developed apical striated border and spherical nucleus with the predominance of decondensed chromatin (Fig. 1b). In the basal portion of the epithelium, there were scattered nests of regenerative cells (Fig. 1b).

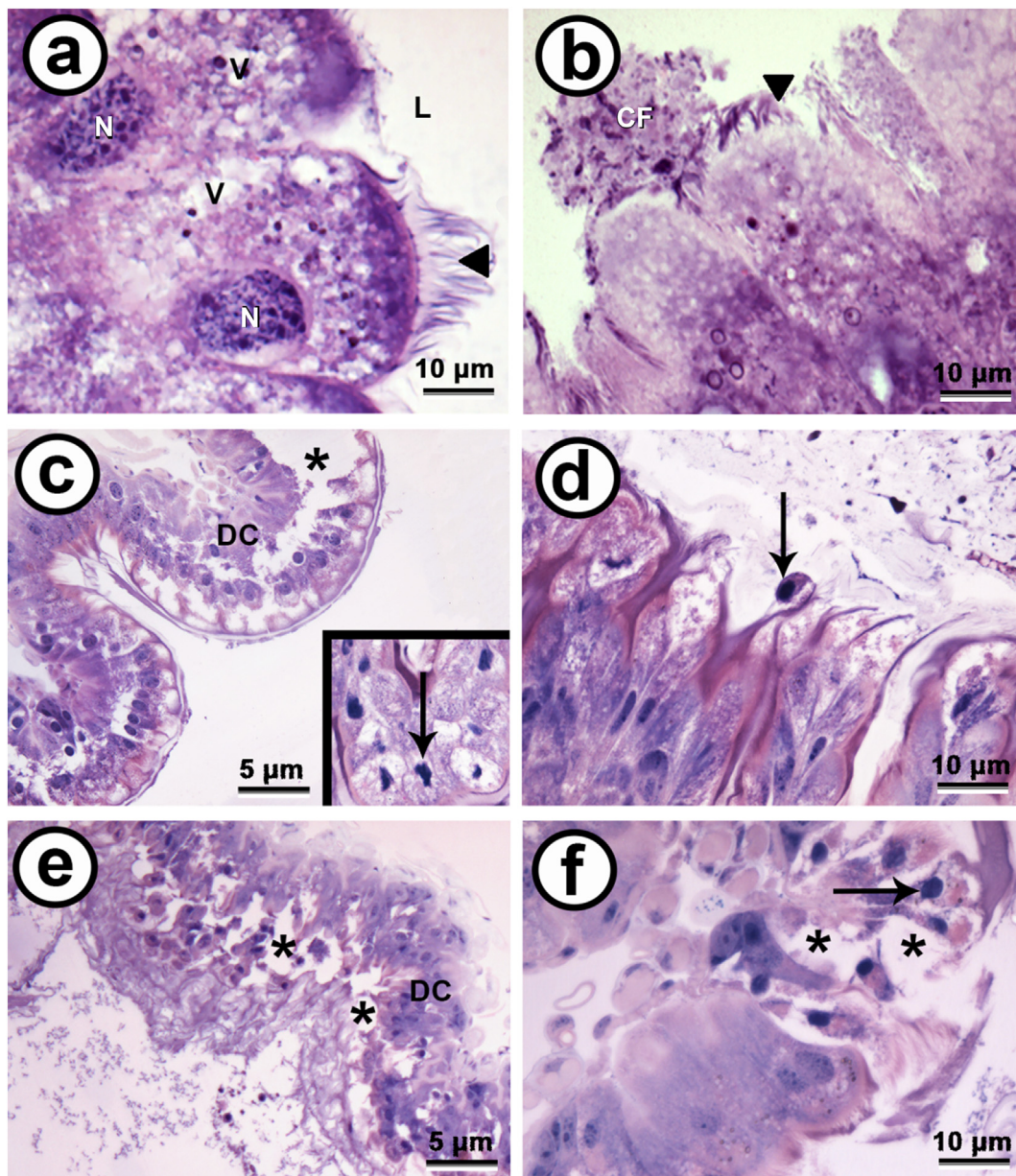
The midgut epithelium of bees fed with imidacloprid showed histopathological damage. After 30 min and 1 h of exposure, the presence of cytoplasmic vacuoles is observed, which increased in quantity with the time of exposure (Figs. 2a–f, 3a). After 3 h of exposure to imidacloprid, the midgut showed disorganization of the epithelial architecture with increased intercellular spaces (Figs. 2e, 3c, e) and disorganization of the striated edge (Fig. 2f). After 6 h it is possible to notice the presence of cell fragments (Fig. 3b). After 12 h and 24 h of imidacloprid  $LC_{50}$  feeding, digestive cell nuclei showed evident pyknosis and a drastic change in epithelial architecture with enlarged intercellular spaces (Fig. 3d, e, f).

#### 3.3. Midgut injury index

Midgut digestive cells of *A. mellifera* workers orally exposed to  $LC_{50}$  imidacloprid had an organ injury index that increased with the exposure



**Fig. 2.** Light micrographs of midgut epithelium of *Apis mellifera* workers fed on imidacloprid for 30 min (a, b), 1 h (c, d), and 3 h (e, f). [a] General aspect showing epithelium with columnar digestive cells (DC), lumen (L), and nested regenerative cells (RC). Note cytoplasmic vacuoles (V). [b] Apical portion of the epithelium showing a striated border (arrowhead), nucleus (N), and cytoplasmic vacuoles (V). [c] General aspect showing cytoplasmic vacuoles (V) in the digestive cells (DC). [d] Apical portion of the epithelium showing the striated border (arrowhead), nucleus (N), and a great number of cytoplasmic vacuoles (V). [e] Midgut epithelium showing changes in the epithelial architecture with enlarged intercellular spaces cells (asterisk). [f] Apical portion of the midgut epithelium showing a striated border (arrowhead), nucleus (N), and enlarged cytoplasmic vacuoles (V).



**Fig. 3.** Light micrographs of midgut epithelium of *Apis mellifera* workers fed on imidacloprid for 6 h (a, b), 12 h (c, d), and 24 h (e, f). [a] Apical portion of the epithelium showing disorganization of the striated border (arrowhead), lumen (L), nuclei (N), and increased size cytoplasmic vacuoles (V) of digestive cells. [b] Apical portion of the epithelium showing disorganization of the striated border (arrowhead) and cell fragments (CF) released to the lumen. [c] Disorganized digestive epithelium evidenced by large intercellular spaces (asterisk) between the digestive cells (DC), cells with pyknotic nuclei (arrow). [d] Apical portion of the epithelium showing pyknotic nucleus (arrow). [e] Disorganized epithelium with intercellular spaces (asterisk) between the digestive cells (DC). [f] Digestive epithelium showing enlarged intercellular spaces between cells (asterisk) and pyknotic nucleus (arrow).

time ( $F_{5,4} = 32.62$ ,  $P < 0.001$ ). With 1 h of exposure to the neonicotinoid, the injury index was higher than for bees fed for 30 min but it was similar until 6 h of exposure (Fig. 4). At 12 h of exposure, the midgut injury index increased to 6.6 and reached the maximum degree (10.8) after 24 h of exposure (Fig. 4).

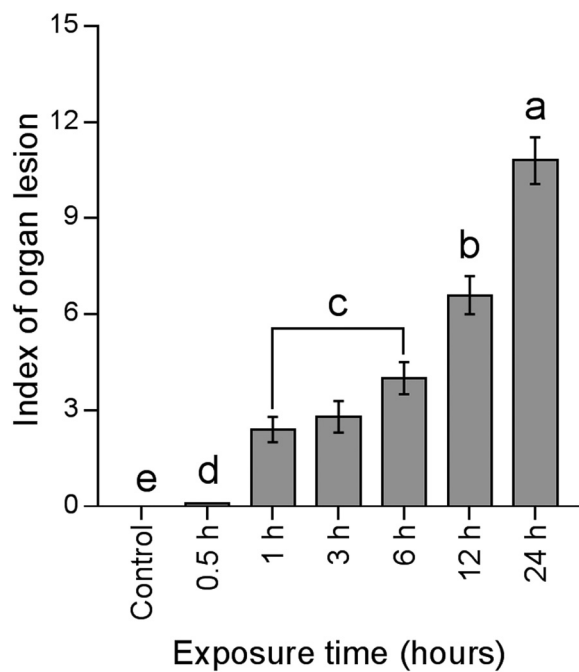
### 3.4. Cytotoxicity

The digestive cells of the midgut of the control group bees showed the apical surface with organized microvilli, the cytoplasm was rich in mitochondria (Fig. 5a), rough endoplasmic reticulum (Fig. 5b), and basal region with plasma membrane infoldings forming basal labyrinth with narrow extracellular spaces (Fig. 5c). The nucleus was rich in decondensed chromatin and well-developed nucleolus (Fig. 5b).

Bees fed on  $LC_{50}$  imidacloprid showed digestive cells with disorganized microvilli characterized by poor parallel arrangement (Fig. 6a), dilated mitochondria with reduced cristae (Fig. 6a), the occurrence of autophagosomes (Fig. 6b, e), vacuoles (Fig. 6d, f) and cytoplasm protrusions with electron-lucent cytoplasm with few organelles (Fig. 6c), but in some cases rich in autophagosomes filled with organelle debris (Fig. 6e).

### 3.5. Expression of the *atg1* gene

The ultrastructural analyzes of the digestive cells showed the presence of autophagic vacuoles, which were proved by the higher expression of *atg1* mRNA ( $t = 15.3$ ,  $P < 0.001$ ) in the midgut of bees exposed to the insecticide in comparison with control ones (Fig. 7).



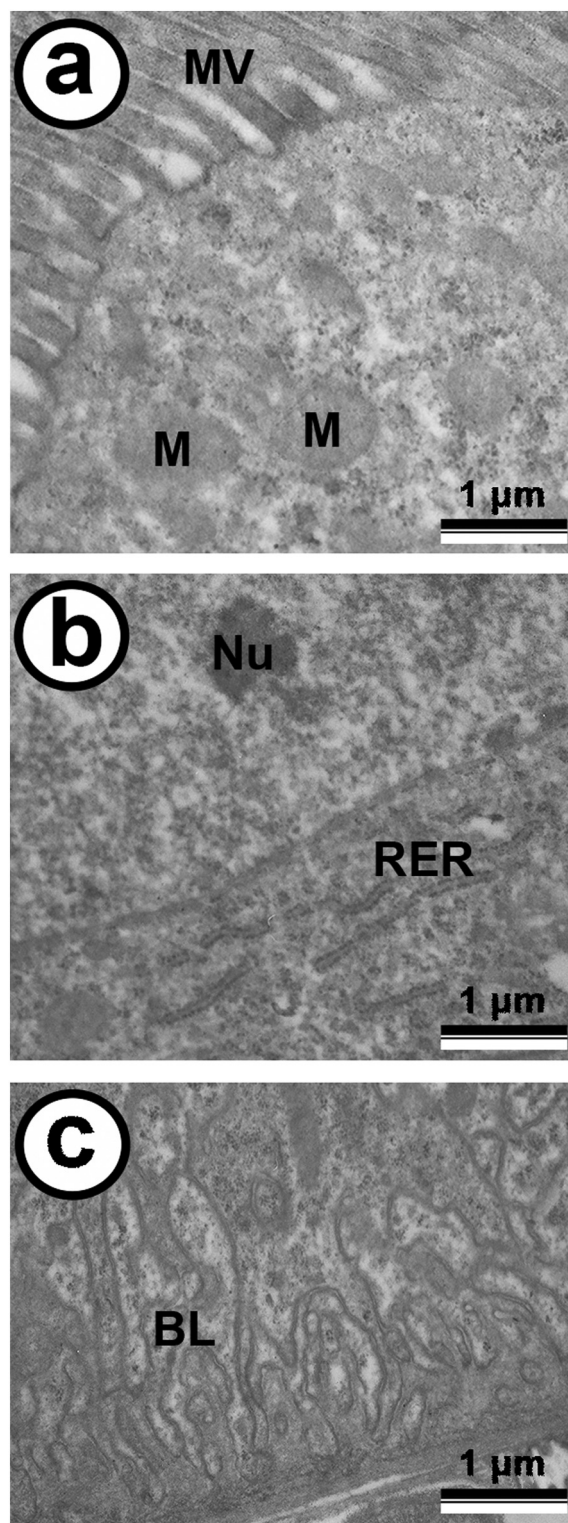
**Fig. 4.** Organ injury index (mean  $\pm$  ep) of the midgut of *Apis mellifera* workers exposed to LC<sub>50</sub> (1.44 mg L<sup>-1</sup>) imidacloprid for 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h and control. Different letters indicate differences between treatments by the Tukey-HSD test at 5% of significance level.

#### 4. Discussion

The oral LC<sub>50</sub> value (1.44 mg L<sup>-1</sup>) of imidacloprid estimated here for *A. mellifera* is similar for the same bee (1.46 mg L<sup>-1</sup>) by Catae et al. (2017). However, the stingless bee *Scaptotrigona postica* workers exposed to imidacloprid (active ingredient) have an oral LC<sub>50</sub> (42.5 mg L<sup>-1</sup>) (Soares et al., 2015) ca. 40-folds higher, indicating that *A. mellifera* may be more susceptible to this insecticide than that stingless bee, although the insecticides used have different compositions. Here, the commercial formulation of imidacloprid was used for the toxicity test for a more realistic scenario that occurs in the field because the commercial formulations include mixtures of active ingredients, inert and adjuvants to increase the penetration and propagation of the active ingredient (Mullin et al., 2015). Neonicotinoids are persistent in soil and water and have a systemic action mode that may contaminate nectar and pollen with the estimated LC50 (Matsuda et al., 2020) obtained here.

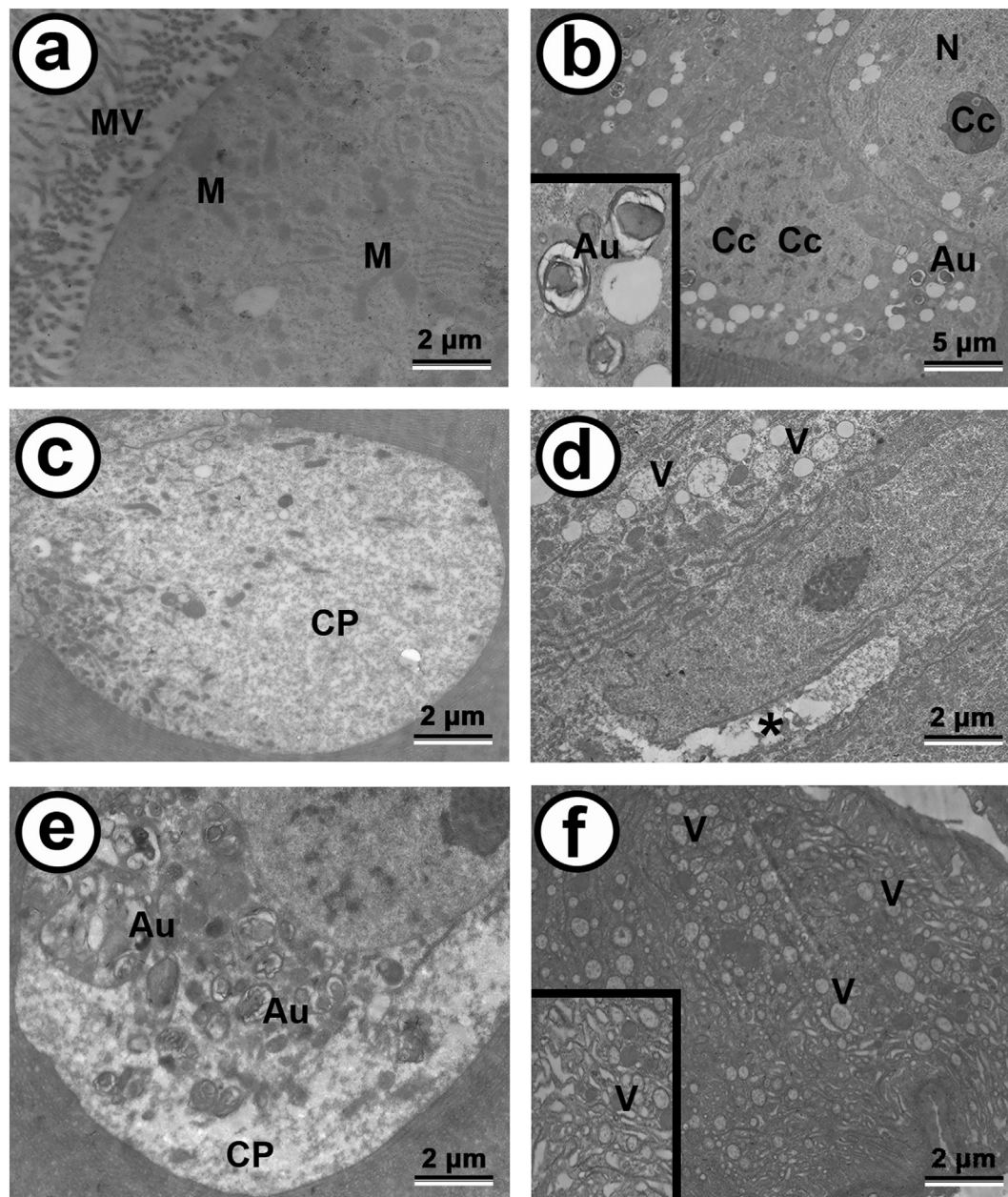
Histopathological analyzes of the midgut of *A. mellifera* workers orally exposed to imidacloprid show the epithelium with cytoplasm vacuoles, which were characterized as autophagic vacuoles with transmission electron microscopy due to the organelles debris as well as for the high expression level of the *atg1* gene. Autophagy has a cytoprotective function and in cases of stress, it can improve cell survival (Moreau et al., 2010; Emanuele et al., 2018), since damaged organelles are degraded contributing to the biomolecules turnover and cell homeostasis (Moreau et al., 2010; Wirawan et al., 2012). Thus, the autophagy observed here may indicate a response of *A. mellifera* midgut digestive cells to reduce the damage caused by exposure to imidacloprid.

Conversely, the midgut digestive cells of *A. mellifera* workers exposed to imidacloprid have some morphological features of apoptosis, such as enlargement of intercellular spaces, apical protrusions, and microvilli disorganization. These changes have been reported as a result of cytoskeleton phosphorylation by effector caspases (Häcker, 2000; Taatjes et al., 2008). The disruption of the cell-cell adhesion complexes may explain the enlargement of the intercellular space (Ndozangue-Touriguine et al., 2008) here observed. The cell cortex and microvilli are maintained by the actin cytoskeleton (Terra et al., 2006; Salbreux et al., 2012) which, when



**Fig. 5.** Transmission electron micrographs of digestive cells from the midgut of *Apis mellifera* control workers. [a] Apical region showing well-developed microvilli (MV) and apical cytoplasm rich in mitochondrial (M). [b] Perinuclear cytoplasm with the rough endoplasmic reticulum (RER) and nucleus with nucleolus (Nu). [c] Basal region showing plasma membrane infoldings forming basal labyrinth (BL).

disorganized by the action of caspases, results in the loss of cell shape with the formation of apical protrusions like those here observed. The microvilli increase the cell surface, contributing to the digestion, absorption, and ions transport, and in some bees, they can increase 230 folds the absorption surface (Serrão and da Cruz-Landim, 1995; Terra et al., 2006).



**Fig. 6.** Transmission electron micrographs of midgut digestive cells of *Apis mellifera* workers fed on Imidacloprid. [a] Apical region showing disorganized microvilli (MV) and mitochondria (M) with few cristae. [b] Perinuclear region showing and autophagosomes (Au) and the nucleus (N) with condensed chromatin clumps (Cc) [c] Apical cytoplasm protrusion (CP) with few organelles. [d] Perinuclear region of the cell with cytoplasm degeneration (\*) and intense vacuolization (V). [e] Apical cytoplasmic protrusion (CP) rich in autophagosomes (Au). [f] Basal cell region with intense vacuolization (V).

Therefore, the disorganization of microvilli caused by imidacloprid may be harmful to nutrient absorption in the midgut of *A. mellifera*.

The digestive cells of bees fed on LC<sub>50</sub> imidacloprid have apoptotic features such as nuclear pyknosis characterized by highly condensed chromatin and crescent-shaped nucleus, which has been found in cell death due to caspases action (Häcker, 2000) that activate the endonuclease DFF40 responsible for DNA fragmentation and chromatin condensation (Liu et al., 1998; Widlak, 2000). The nuclear mechanical stability and chromatin anchorage depend on the nuclear lamina, formed by lamina-type intermediate filaments (Goldman et al., 2002) and caspases cleave this cytoskeleton protein resulting in chromatin condensation and apoptosis (Goldman et al., 2002; Ndozangue-Touriguine et al., 2008). Thus, the presence of pyknotic nuclei may indicates that apoptosis probably is occurring in the midgut digestive cells of *A. mellifera* exposed to imidacloprid.

Other cell damages found in the digestive cells of honey bee workers fed on imidacloprid are dilated mitochondria and reduced cristae, which may be additional evidence of apoptosis triggered by the intrinsic pathway. In this case, changes in the outer mitochondrial membrane result in loss of membrane potential and release of pro-apoptotic components for caspases activation (González-Polo et al., 2005; Elmore, 2007; Emanuele et al., 2018), which may explain the mitochondrial alterations found in this study.

After 30 min of feeding on imidacloprid, damage to the midgut digestive cells of bees occurs, and the organ injury index reaches to maximum after 24 h. From 30 min to 6 h after exposure to the neonicotinoid, there are reversible damage (cells fragmentation) and normally reversible damage (vacuolization) in mean and moderate degrees, but from 12 h of oral exposure to imidacloprid, there is the serious occurrence of reversible and usually reversible damage and moderate occurrence of irreversible damage (nuclear pyknosis). In cells undergoing apoptosis, about 2 h after the

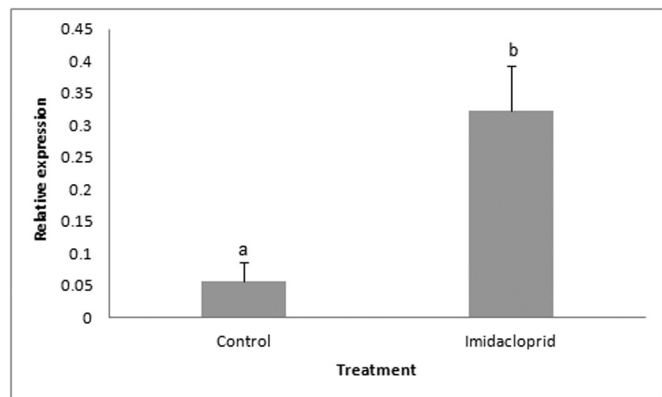


Fig. 7. Relative expression (mean  $\pm$  SD) of the *atg1* autophagy-related gene in the midgut of *Apis mellifera* workers fed on 50% sucrose (control) and imidacloprid for 24 h. Different letters indicate differences between treatments by the *t*-test.

induction of this cell death event, caspase-3 is activated, and after 14 h occurs nuclear chromatin condensation (Rodríguez and Schaper, 2005). Thus, the data obtained here show that in the early periods of exposure to imidacloprid, the apoptosis pathway is not yet activated, and the presence of reversible damage such as cytoplasm vacuolization is indicative of autophagy as a primary cell response. Probably, with prolonged exposure to the insecticide, the severity of damage increases, resulting in cell death.

The high expression level of mRNA for the *atg1* autophagy-related gene occurs in the midgut of *A. mellifera* fed on imidacloprid. The serine/threonine kinase ATG1 plays an important role in the autophagy regulation, recruiting other proteins for phagophore formation (Chan and Tooze, 2009). Increased *atg1* expression has been reported to induce high levels of autophagy followed by cell death (Scott et al., 2007), indicating that high autophagy degree found in digestive cells of *A. mellifera* workers exposed to imidacloprid may result in apoptotic cell death.

Our results indicate that midgut digestive cells of *A. mellifera* orally exposed to imidacloprid undergo autophagic and apoptotic cell death. Noteworthy, these processes may coexist (Nikoletopoulou et al., 2013) and are controlled by BCL-2 family proteins and transcription factor P53 (Kasprowska-Liśkiewicz, 2017). Apoptosis and autophagy are responses to stress and the accumulation of autophagic vacuoles may precede cell death by apoptosis (González-Polo et al., 2005) and, although low levels of autophagy contribute to cell homeostasis (Nikoletopoulou et al., 2013), it can induce apoptosis in long-term stress (Kasprowska-Liśkiewicz, 2017).

## 5. Conclusion

The results obtained here indicate that the commercial formulation of imidacloprid, ingested by *A. mellifera*, has a cytotoxic effect on the midgut causing cell death and compromising the function of this non-target organ of the insecticide with a potential negative effect on the survival of that important pollinator.

## CRedit authorship contribution statement

**Lenise Silva Carneiro:** Conceptualization, Investigation, Validation, Writing - Original Draft. **Luis Carlos Martinez:** Methodology, Validation, Formal Analysis. **André Henrique de Oliveira:** Investigation, Validation. **Jamile Fernanda Silva Cossolin:** Investigation, Validation. **Matheus Tudor Cândido Santos de Resende:** Investigation, Validation. **Wagner Gonzanga Gonçalves:** Investigation, Validation. **Luanda Medeiros Santana:** Validation, Formal Analysis. **José Eduardo Serrão:** Conceptualization, Investigation, Validation, Writing - Review & Editing, Funding acquisition.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Nucleus of Microscopy and Microanalysis of the Universidade Federal de Viçosa for technical assistance. This research was supported by Brazilian research agencies CAPES (code 001), CNPq (303467/2018-5), and FAPEMIG (02367-18).

## References

- Balieira, K.V.B., Mazzo, M., Bizerra, P.F.V., Guimaraes, A.R.J.S., Nicodemo, D., Ermioniatingatto, F., 2018. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie* 49, 562–572. <https://doi.org/10.1007/s13592-01805831>.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>.
- Blacquièrre, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>.
- Breeze, T.D., Bailey, A.P., Balcombe, K.G., Potts, S.G., 2011. Pollination services in the UK: how important are honeybees? *Agric. Ecosyst. Environ.* 142, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.020>.
- Castro, M.B.A., Martínez, L.C., Cossolin, J.F.S., Serrão, R.S., Serrão, J.E., 2020. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248, 126075. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>.
- Catae, A.F., Roat, T.C., Pratavieira, M., Menegasso, A.R.S., Palma, M.S., Malaspina, O., 2017. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology* 27, 109–121. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>.
- Chan, E.Y., Tooze, S.A., 2009. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy* 5, 758–765. <https://doi.org/10.4161/auto.8709>.
- Colin, T., Plath, J.A., Klein, S., Vine, P., Devaud, J.M., Lihoreau, M., Meikle, W.G., Barron, A.B., 2020. The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 51, 499–509. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00737-6>.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J.E., Silva-De-Moraes, R.L.M., 1996. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios* 88, 95–104.
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2020. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204, 111108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- 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. *Rend. Lincei Sci. Fisiche Nat.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0704-9>.
- Farder-Gomes, C.F., Fernandes, K.M., Bernardes, R.C., Bastos, D.S.S., Martins, G.F., Serrão, J.E., 2021a. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* friese (Hymenoptera: Apidae). *Sci. Total Environ.* 774, 145679. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>.
- Farder-Gomes, C.F., Saravanan, M., Martinez, L.C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2021b. Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. *Toxin Rev.* 1–10. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>.
- Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K., Spann, T.P., 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16, 533–547. <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.960502>.
- González-Polo, R., Boya, P., Pauleau, A., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E., Pierron, G., Saftig, P., Kroemer, G., 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci.* 118, 3091–3102. <https://doi.org/10.1242/jcs.02447>.
- Gooley, Z.C., Gooley, A.C., 2020. Exposure to field-realistic concentrations of imidacloprid at different ambient temperatures disrupts non-flight metabolic rate in honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Bull. Insectology* 73, 161–170.
- 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, 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

- Grab, H., Branstetter, M.G., Amon, N., Urban-Mead, K.R., Park, M.G., Gibbs, J., Blitzer, E.J., Poveda, K., Loeb, G., Danforth, B.N., 2019. Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363, 282–284. <https://doi.org/10.1126/science.aat6016>.
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>.
- Iqbal, J., Alqarni, A.S., Raweh, H.S.A., 2018. Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on learning and memory formation of indigenous arabian bee (*Apis mellifera jemenitica* Ruttner) adult foragers. *Neotrop. Entomol.* 48, 373–380. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0651-2>.
- Kasprowska-Liśkiewicz, D., 2017. The cell on the edge of life and death: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 71, 825–841. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.4672>.
- Klatt, B.K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., Tschamtké, T., 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proc. R. Soc. B* 281, 20132440. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2440>.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschamtké, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B* 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7 (e29268), 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>.
- Kundoo, A.A., Dar, S.A., Mushtaq, M., Zaffar, B., Dar, M.S., Gul, S., Ali, M.T., Gulzar, S., 2018. Role of neonicotinoids in insect pest management: a review. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 333–339.
- Li, Z., Yu, T., Chen, Y., Heerman, M., He, J., Huang, J., Nie, H., Su, S., 2019. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 156, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.001>.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X., 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8461–8466. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8461>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta</sup> C(T) method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1051/apido:2008015>.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W.G., Freire, A.F.P.A., Zanuncio, J.C., Bozdoğan, H., Serrão, J.E., 2019. Toxicity and cytotoxicity of the insecticide imidacloprid in the migrant of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.124>.
- Matsuda, K., Ihara, M., Satelle, D.B., 2020. Neonicotinoid insecticides: molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 60, 241–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021747>.
- Moreau, K., Luo, S., Rubinsztein, D.C., 2010. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2009.12.002>.
- Mullin, A., Chen, J., Fine, J.D., Frazier, M.T., Frazier, J.L., 2015. The formulation makes the honey bee poison. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.026>.
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., Bréard, J., 2008. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.016>.
- Nicodemo, D., Maioli, M.A., Medeiros, H.C.D., Guelfi, M., Balieira, K.V.B., Jong, D., Mingatto, F., 2014. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2070–2075. <https://doi.org/10.1002/etc.2655>.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. *Test No. 213 Section 2*.
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>.
- Peng, Y., Yang, E., 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 19298. <https://doi.org/10.1038/srep19298>.
- Pettis, J.S., van Engelsdorp, D., Jhonson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen nosema. *Naturwissenschaften* 99, 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1>.
- Plata-Rueda, A., Menezes, C.H.M., Cunha, W.S., Alvarenga, T.M., Barbosa, B.F., Zanuncio, J.C., Martínez, L.C., Serrão, J.E., 2020. Side-effects caused by chlorpyrifos in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere* 259, 127530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127530>.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010a. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010b. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.
- Reynolds, E.S., 1963. Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.
- Rodríguez, M., Schaper, J., 2005. Apoptosis: measurement and technical issues. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.11.002>.
- Salbreux, G., Charras, G., Paluch, E., 2012. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.001>.
- Santos, D.E., Azevedo, D.O., Campos, L.A.O., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2015. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma* 252, 619–627. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0707-z>.
- SAS Institute, 2002. *The SAS System for Windows, Release 9.0*. SAS Institute, Cary, N.C.
- Scott, R.C., Juhász, G., Neufeld, T.P., 2007. Direct induction of autophagy by atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* 17, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.053>.
- Serrão, J.E., da Cruz-Landim, C., 1995. The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera, apidae, Meliponinae). *Cytobios* 83, 229–236.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kretzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.K., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>.
- Soares, H.M., Jacob, C.R.O., Carvalho, S.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 675–680. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1488-6>.
- Song, S., Zhang, T., Huang, Y., Zhang, B., Yuankai, G., Yuan, H., Huang, X., Bai, X., Kannan, K., 2020. Urinary metabolites of neonicotinoid insecticides: levels and recommendations for future biomonitoring studies in China. *Environ. Sci. Technol.* 54, 8210–8220. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c1227>.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.
- Stein, K., Coulibaly, D., Stenchly, K., Goetze, D., Poremski, S., Lindner, A., Souleymane, K., Linsenmair, E.K., 2017. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17970-2>.
- Taatjes, D.J., Sobel, B.E., Budd, R.C., 2008. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 129, 33–43. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0356-9>.
- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C., 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Acad. Bras. Cienc.* 78, 255–269.
- Tesovnik, T., Zorc, M., Gregorc, A., Rinehart, T., Adamczyk, J., Narat, M., 2019. Immune gene expression in developing honey bees (*Apis mellifera* L.) simultaneously exposed to imidacloprid and varroa destructor in laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 58, 730–739. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1634463>.
- Tomé, H.V.V., Schmehl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S.M., Ravaiano, S.V., Guedes, R.N.C., Martins, G.F., Ellis, J.D., 2020. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environ. Pollut.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113420>.
- Tomizawa, M., Casida, E.J., 2002. Desnitro-imidacloprid activates the extracellular signal-regulated kinase cascade via the nicotinic receptor and intracellular calcium mobilization in N1E-115 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 180–186. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9503>.
- Van Engelsdorp, D., Hayes Jr., J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J., 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. Apic. Res.* 50, 1–10. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.50.1.01>.
- Widlak, P., 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1037–1044. <https://doi.org/10.1016/j.abp.2000.3957>.
- Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D.P., Medrzycki, P., Murray, T.E., Natsopoulou, M.E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R.J., Pernal, S.F., Shuttler, D., Tanner, G., van der Steen, J.J.M., Brodschneider, R., 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 52, 1–36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>.
- Wintermantel, D., Odoux, J.F., Decourtye, A., Henry, M., Allier, F., Bretagnolle, V., 2020. Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Sci. Total Environ.* 704, 135400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135400>.
- Wirawan, E., Berghe, T.V., Lippens, S., Agostinis, P., Vandenabeele, P., 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 22, 43–61. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.152>.
- Wu, Y., Zhou, T., Wang, Q., Dai, P., Xu, S., Jia, H., Wang, X., 2015. Programmed cell death in the honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) worker brain induced by imidacloprid. *J. Econ. Entomol.* 108, 1486–1494. <https://doi.org/10.1093/jeetov/146>.
- Yang, E., Chang, H., Wu, W., Chen, Y., 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE* 7 (11), e49472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049472>.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., Stewart Jr., C.N., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>.
- Zhang, Z.Y., Li, Z., Huang, Q., Yan, W.Y., Zhang, L.Z., Zeng, Z.J., 2020. Honeybees (*Apis mellifera*) modulate dance communication in response to pollution by imidacloprid. *J. Asia Pac. Entomol.* 23, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.03.011>.

## CAPÍTULO 2

### **EFEITO DA EXPOSIÇÃO ORAL AO IMIDACLOPRIDO NO INTESTINO MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE OPERÁRIAS DE *Apis mellifera***

Lenise Silva Carneiro<sup>1</sup>, Matheus Tudor Cândido Santos de Resende<sup>1</sup>, Débora Linhares Lino de Souza<sup>1</sup>, Amanda Martins da Cruz Souza<sup>1</sup>, João Victor de Oliveira Motta<sup>1</sup>, Pedro Henrique Ambrósio Nere<sup>1</sup>, Diego dos Santos Souza<sup>2</sup>, André Henrique de Oliveira<sup>1</sup>, Carolina Gonçalves Santos<sup>1</sup>, José Eduardo Serrão<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil



## RESUMO

A abelha *Apis mellifera* é muito importante nos serviços de polinização devido à alta produtividade e perfil generalista na busca de recursos florais. Tem sido reportada uma diminuição na riqueza de espécies de abelhas e isso pode estar relacionado a fatores como a exposição a pesticidas. O imidacloprido é um dos inseticidas mais utilizados no mundo. É neurotóxico, solúvel em água e sistêmico podendo se translocar facilmente por todos os tecidos da planta e dessa forma atingir as abelhas através da alimentação. O objetivo foi avaliar se a exposição ao imidacloprido tem efeitos colaterais no corpo gorduroso e intestino médio de larvas de operárias de *A. mellifera*. No intestino médio de larvas tratadas foram observadas alterações como perda de borda estriada, condensação nuclear e vacuolização citoplasmática, indicando morte celular. A presença de proteínas foi detectada em todo epitélio do tratamento e controle, provavelmente enzimas responsáveis pela digestão. O teste histoquímico para polissacarídeos neutros evidenciou o glicocálice, que mostrou-se desorganizado nas abelhas do tratamento. Os trofócitos não apresentaram alterações morfológicas entre tratamento e controle. Mas o citoplasma dos trofócitos do tratamento mostraram gotículas lipídicas significativamente menores e maior quantidade de proteínas, provavelmente respostas ao estresse causado pelo inseticida. A quantidade de carboidratos não variou entre tratamento e controle o que pode estar associado à resistência a inseticidas. A expressão de *cdc20* não apresentou diferença significativa entre tratamento e controle de nenhum dos órgãos avaliados, indicando que a exposição ao inseticida não induziu divisão celular. Esses resultados demonstram que o imidacloprido afeta órgãos não alvo da abelha *A. mellifera* reforçando o seu impacto negativo sobre esses importantes polinizadores.

## 1. INTRODUÇÃO

Animais polinizadores contribuem para a produção em 87 culturas globais, melhorando a qualidade e quantidade da produção agrícola, com um valor econômico da polinização médio de 153 bilhões de euros (Khalifa et al., 2021). A abelha *Apis mellifera* tem sido utilizada tanto para polinização quanto para produção de mel devido a sua eficácia, ampla disponibilidade e perfil generalista na busca de recursos florais (Valido et al., 2019). Elas também produzem geleia real e veneno com propriedades antivirais, antibacterianos, fungicidas e, compostos de interesse medicinal utilizados em pesquisas com doenças como Parkinson, Alzheimer e artrite (Azam et al., 2019, Bogdanov, 2015, Wehbe et al., 2019).

As abelhas são insetos holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Rembold et al., 1980). A fase larval é um período de alimentação e crescimento e apresenta cinco instares (L1, L2, L3, L4 e L5) (Michelette & Soares, 1993). A transformação da larva em adulto ocorre através da pupa. Alguns tecidos larvais são degenerados e grande parte do corpo é remodelada a partir dos discos imaginais ou de células indiferenciadas (Gilbert & Frieden, 1981). No fim da metamorfose, o adulto recém-formado destrói o opérculo, sai do alvéolo e finaliza seu desenvolvimento (Winston, 2003).

Análises nos registros mundiais indicam uma diminuição na riqueza de espécies de abelhas, sendo que em relação a 1990, 25% menos espécies foram relatadas em 2016 (Zattara & Aizen, 2021). O declínio de populações de *A. mellifera* foi identificado na Europa, Ásia e EUA (Potts et al., 2010, Theisen-Jones & Bienefeld, 2016, Van Engelsdorp et al., 2011) e as causas são diversas, como deficiências nutricionais, manejo inadequado, parasitas, patógenos, mudanças climáticas, perda de habitat e pesticidas (Goulson et al., 2015, Smith et al., 2013).

Dentre os pesticidas, os neonicotinoides são os inseticidas mais utilizados no mundo, representando 25% do mercado global. Apresentam toxicidade seletiva, são eficazes em baixas concentrações, solúveis em água e podem ser aplicados de diversas maneiras (Alsafran et al., 2022, Simon-Delso et al., 2015). Atuam como moduladores competitivos dos receptores nicotínicos de acetilcolina no sistema nervoso causando hiperexcitação e paralisia (Simon-Delso et al., 2015, Sparks et al., 2020).

O imidacloprido foi o primeiro neonicotinoide registrado e ainda é o mais utilizado, com atividade sistêmica e de contato, podendo ser usado em várias de culturas agrícolas (Sheets, 2010). Apesar de seu benefício econômico para a agricultura, esse inseticida está sendo associado aos impactos em polinizadores, como as abelhas (Goulson, 2013).

Em operárias adultas de *A. mellifera* expostas a esse inseticida foram relatados efeitos colaterais como redução da imunocompetência (Brandt et al., 2016), diminuição da viabilidade espermática (Chaimanee et al., 2016), danos em células cerebrais (Catae et al., 2017) e indução de apoptose e autofagia em células do intestino médio (Carneiro et al., 2022).

Os pesticidas também podem causar efeitos para larvas de *A. mellifera*. O inseticida tiametoxan gerou atraso no desenvolvimento, larvas com duplicação do tegumento, redução do tamanho corporal além de condensação de células cerebrais e morte celular precoce nos lobos ópticos (Tavares et al., 2015; Grillone et al., 2017). O piriproxifeno causou atraso na diferenciação muscular (Fernandez et al., 2012) e o acaricida flumetrina induziu mortalidade significativa, estresse oxidativo e aumento da oxidação lipídica nas larvas (Qi et al., 2020).

As larvas de *A. mellifera* contaminadas com o imidacloprido, não têm a sobrevivência e o peso afetados (Dai et al., 2019). No entanto, apresentam atraso no desenvolvimento, redução no ciclo de vida e alterações na expressão gênica relacionados à resposta imune, desintoxicação e oxidação-redução (Chen et al., 2021). Alguns genes relacionados à imunidade, desenvolvimento, metabolismo de lipídios e carboidratos, apresentam regulação negativa enquanto os níveis de RNA para um conjunto de genes que codificam enzimas do citocromo P450 e Hsp70 são regulados positivamente (Gregorc, et al., 2012, Derecka et al., 2013; Wu et al., 2017; Paten et al., 2022). Também foi detectada a redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, que degrada a acetilcolina e encerra a transmissão do impulso nervoso (Delkash-Roudsari et al., 2022).

O imidacloprido persiste no solo, na água e na planta por anos (Krupke et al., 2012, Alsafran et al., 2022), sendo identificado em amostras de pólen (Chauzat et al., 2006, Mullin et al., 2010, Codling et al., 2018), podendo contaminar as abelhas através da alimentação (Blacquièrre et al., 2012) atingindo o intestino médio (Carneiro et al., 2022) e o corpo gorduroso (Assis et al., 2022).

O intestino médio é formado por um epitélio simples com células digestivas colunares responsáveis pela síntese de enzimas digestivas, absorção de nutrientes (Serrão & Cruz-Landim, 1996; Carneiro et al., 2019) e componentes da matriz peritrófica (Marques-Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2015). Além desse tipo, há células endócrinas que produzem hormônios (Neves et al., 2003), e ninhos de células regenerativas responsáveis pela reposição das células que morrem (Cavalcanti & Cruz-Landim, 1999; Martins et al., 2006; Fernandes et al., 2010). As células do intestino médio sofrem intenso desgaste devido as suas funções metabólicas, interagir com bactérias residentes e agir como uma barreira para compostos tóxicos e patógenos (Caccia et al., 2019).

O corpo gorduroso é um órgão multifuncional atuando no metabolismo energético, imunidade inata, desintoxicação, síntese de vitelogenina e controle da muda e metamorfose (Arrese & Soulages, 2010; Li et al., 2019; Skowronek et al., 2021). Nas abelhas ele é formado basicamente pelos trofócitos que são responsáveis pelo armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas e pelas demais funções do tecido. Além dos trofócitos também ocorrem enócitos dispersos que atuam na síntese de componentes da cutícula (Roma et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição oral crônica ao imidacloprido tem efeitos na histopatologia, histoquímica e expressão relativa do gene *cdc20* para divisão celular no corpo gorduroso e intestino médio de larvas de operárias de *A. mellifera* contribuindo com novos dados sobre o impacto do inseticida no desenvolvimento do polinizador.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Insetos

Larvas de *A. mellifera* foram coletadas de quadros de crias de cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O) e transferidos para o laboratório onde foram mantidos a  $33 \pm 2$  °C e 70% de umidade relativa.

### 2.2. Exposição ao inseticida

Para avaliar o efeito do inseticida nas larvas foram realizados três bioensaios com 576 larvas de *A. mellifera* sendo 288 para controle e 288 para tratamento com imidacloprido (Evidence® WG, 700 g kg<sup>-1</sup> ingrediente ativo, Bayer, São Paulo, Brasil). Larvas de 1° instar foram coletadas e transferidas para células de cria artificiais em polietileno com 9 mm de diâmetro e 8 mm de altura, contendo com 20 µL de dieta (50% p/p de uma solução de açúcar (D-frutose, D-glicose e extrato de levedura) e 50% p/p de geleia real (Aupinel et al., 2005). As células de cria foram acomodadas em placa de cultivo celular de 48 poços, transferidas para dessecador contendo um pedaço de algodão com solução esterilizante (15% p/v glicerol e cloreto de metilbenzetonio a 0,2% p/v) e mantidas a  $34 \pm 1$  °C e  $95 \pm 5\%$  de umidade. Do terceiro ao sexto dia de cada bioensaio as larvas controle foram alimentadas com a dieta e o tratamento com a dieta contendo 20,5 ng/g de imidacloprido com as proporções de dieta descritas por Tadei et al. (2020). A concentração do imidacloprido utilizada (20,5 ng/g) foi com base no resíduo encontrado em grãos de pólen (Mullin et al., 2010). De acordo com a fórmula da quantidade de pólen consumida na fase larval de Rortais et al., 2015 a concentração esperada para atingir as larvas através da alimentação foi de 0,7 ng/mL.

### 2.3. Histopatologia

Após o sexto dia de exposição, cinco larvas do controle e cinco do tratamento foram coletadas. As extremidades do corpo foram cortadas e as larvas transferidas para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 20 min em cada concentração. As amostras foram embebidas em historesina (Leica). Cortes de 3  $\mu$ m de espessura foram coradas com hematoxilina (15 min), eosina (30 s), analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX60. Essas amostras também foram utilizados para a quantificação de gotas lipídicas nos trofócitos do corpo gorduroso.

#### 2.4. *Histoquímica*

Algumas secções histológicas foram submetidas aos testes histoquímicos descritos a seguir, analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX 60.

##### 2.4.1. *Detecção de Proteínas*

As amostras foram incubadas em mercúrio bromofenol (100 mL de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bomofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio) por 2 h e 15 min. Em seguida foram lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas e analisadas.

##### 2.4.2. *Detecção de Polissacarídeos neutros e glicoconjugados*

As amostras foram colocadas em ácido periódico 0,4% por 30 min, lavadas rapidamente em água destilada e transferidas para reativo de Schiff (Lillie, 1965) por 1 h no escuro. Por fim, lavadas em água corrente por 30 min, montadas e analisadas.

#### 2.5. *Quantificação de proteínas, polissacarídeos e lipídios no corpo gorduroso*

Para quantificar as quantidades de proteínas, polissacarídeos e lipídios as amostras submetidas aos testes histoquímicos acima, foi utilizado o programa de computador GIMP 2.10 (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc., Washington, PA, USA) que permite, após selecionar cores, convertê-las em tons de cinza para transformá-las em densidade de pixels (Solomon, 2009). As imagens digitalizadas foram capturadas usando uma objetiva de 40x, abertura numérica 0,75 e mesmos parâmetros de iluminação. Dois campos de observação contendo corpo gorduroso foram selecionados aleatoriamente para cada larva (n = 5), totalizando 10 imagens do tratamento e 10 do controle (Soares et al., 2016). Para análise do tamanho das gotículas de lipídios, 20 gotículas nas células do corpo gorduroso do tratamento e 20 do controle foram selecionadas e o diâmetro ou eixo maior foi medido (Fujii et al., 2022) utilizando o programa de computador Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

#### 2.6. *Expressão do gene cdc20*

Para verificar a ocorrência de divisão celular nas células do corpo gorduroso e intestino médio das larvas, a expressão do gene *cdc20* (codifica proteína para saída da mitose) foi avaliada em nove larvas expostas ao imidacloprido e nove do grupo controle. Essas abelhas foram dissecadas em solução fisiológica para insetos, o corpo gorduroso e os intestinos médios foram removidos e transferidos para TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) para extração de mRNA, seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra foi macerada em 250 µL TRI Reagent com pistilos autoclavados. O volume foi completado para 500 µL, e incubado por 5 min em temperatura ambiente. Em cada amostra foram adicionados 100 µL de clorofórmio, agitadas vigorosamente por 15 s e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 ×g por 15 min a 4°C e a fase aquosa, contendo RNA, foi coletada e transferida para 250 µL de isopropanol gelado e incubadas overnight no a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 ×g por 20 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado de RNA foi lavado duas vezes com 50 µL de etanol 75% e centrifugado a 13.000 ×g por 10 min a 4°C. O precipitado foi seco em placa aquecedora a 50 °C com os tubos abertos, seguindo-se adição de 20 µL de água livre de nuclease e a quantidade de RNA em cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro BioDrop® µLite a 260 nm e armazenadas a -80 °C até a síntese de cDNA.

Antes da síntese cDNA as amostras de RNA foram tratadas com DNase pela adição de 1 µL de tampão DNase (Jena Bioscience), 0,5 µL de DNase I, 2 µg de RNA e 10 µL de H<sub>2</sub>O e incubadas a 37°C por 10 min. Em seguida foi adicionado 1 µL de EDTA (Promega) e incubadas a 65 °C por 10 min. Para dar sequência a síntese de cDNA foi acrescentado 0,5 µL de Oligo (dT) e incubação a 70 °C por 5 min. A seguir foram acrescentados 4 µL de script RT buffer, 1 µL de DTT, 1 µL de dNTPmix, 0,5 µL de inibidor de RNase e 0,5 µL enzima script 3.0 RT (Cellco). As amostras foram incubadas a 42 °C por 10min, 55 °C por 60 min e 70 °C por 10 min.

Antes de avaliar o nível de expressão do gene *cdc20* foi realizado um teste de concentração de primer (Primer Concentration Optimization Protocol – Merck - <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technicaldocuments/protocol/genomics/qpcr/primer-concentration-optimization>) e as concentrações definidas foram de 0,6 µM da sequência F (GTGGAGGTGGTAGCTGAC) e 0,8 µM da R (TGTGCATATCCATGGCCTGA). O gene de controle endógeno actina (*Genbank*: mRNA AB023025.1) foi utilizado na concentração 0,3 µM. Cada reação de PCR continha cerca de 100 ng de cDNA, os primers F e R nas concentrações indicadas anteriormente com volume total de 15 µL. As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas usando a técnica de fluorescência com enzima do Kit

molecular SARS-CoV-2 (EDx) (Bio-Manguinhos®) e SYBRGreen (Ultrascience®) no Rotor-Gene Q® (Qiagen®) seguindo as seguintes condições: 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos a 95°C por 30 s e 60°C por 1 min. A expressão relativa dos níveis de *cdc20* foi comparada com o gene de controle endógeno pelo método  $2^{-\Delta Ct}$  (Yuan et al., 2006).

### 2.7. Estatística

A quantidade de proteínas, polissacarídeos, lipídios (diâmetro das gotículas lipídicas) do corpo gorduroso entre tratamento com imidacloprido e controle foram comparados usando Graph pad5 e a expressão relativa comparada entre tratamento e controle, para cada órgão, usando o software R. Em ambos os casos foi realizado teste t a um nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS

### *Intestino médio*

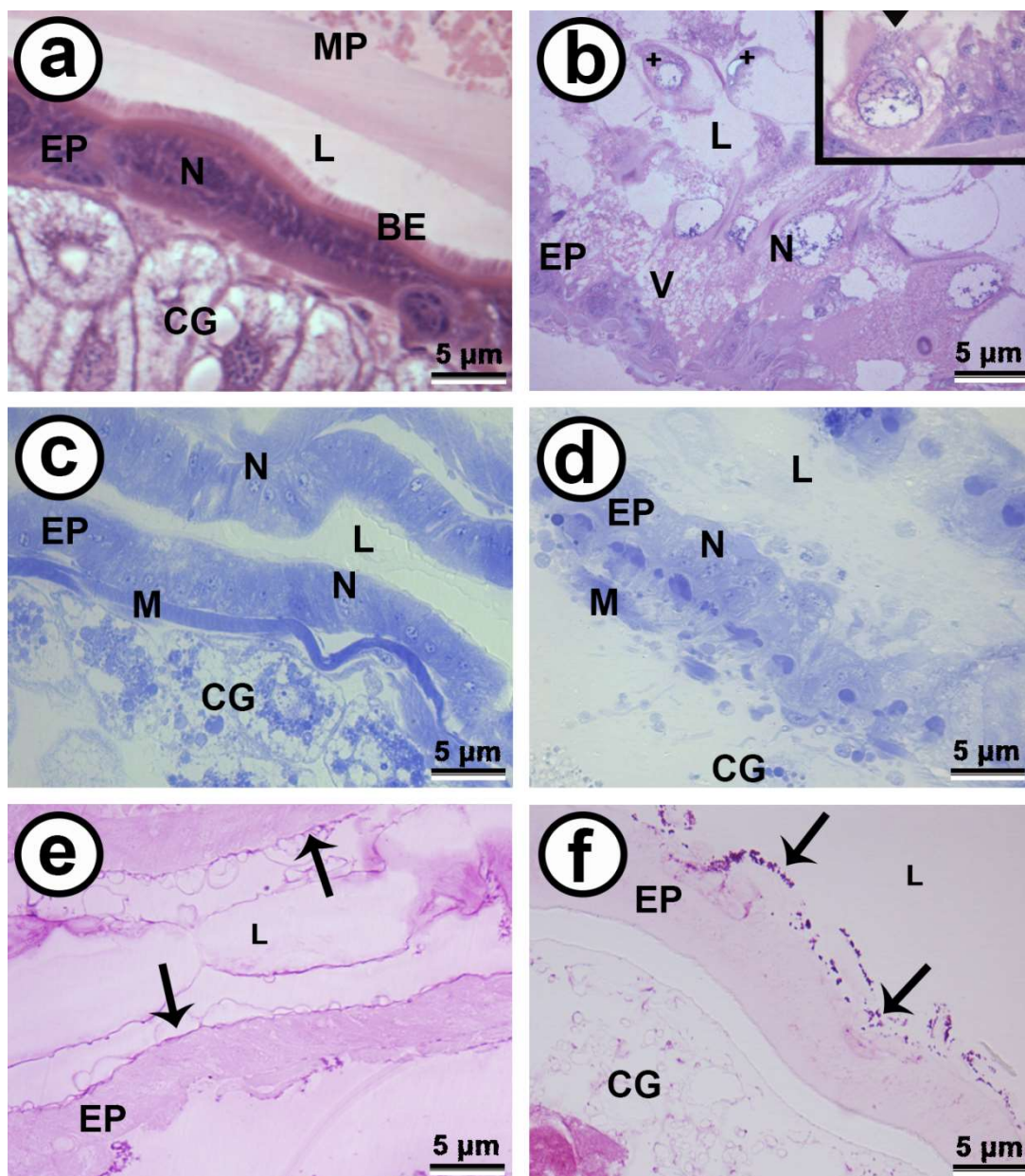
O epitélio do intestino médio das larvas de operárias de *A. mellifera* é formado por uma camada única de células com borda estriada apical desenvolvida e núcleos esféricos com predomínio de cromatina descondensada. (Figura 1A).

Em larvas que foram expostas a alimentação contaminada com imidacloprido ocorreu desorganização da arquitetura do epitélio, formação de bolhas na superfície, apical, liberação de fragmentos celulares para o lúmen do órgão, perda de borda estriada, condensação nuclear e vacuolização citoplasmática (Figura 1B).

O teste com mercúrio de bromofenol revelou a ocorrência de proteínas de forma uniforme por todo o epitélio do intestino médio de larvas do controle e do tratamento (Figura 1C e 1D).

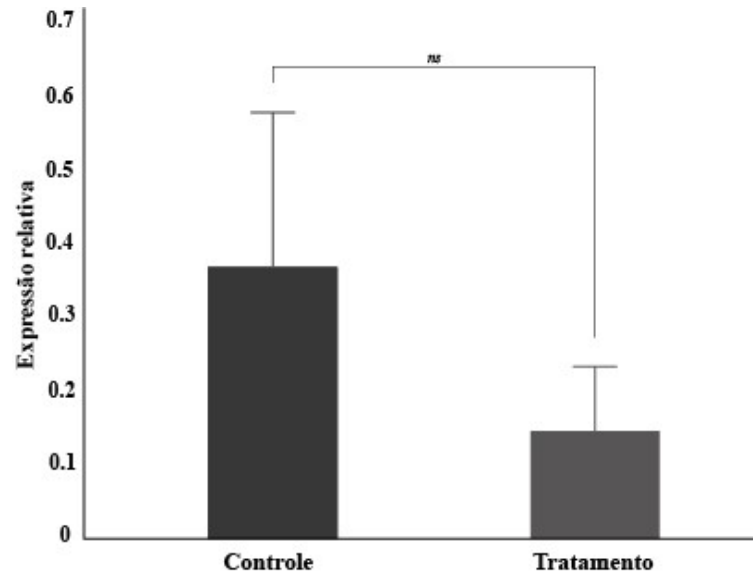
O teste de PAS evidenciou forte reação na borda estriada do epitélio do intestino do controle (Figura 1E), enquanto nas larvas expostas ao imidacloprido, as reações apicais foram pontuações irregulares evidenciando a desorganização da superfície epitelial (Figura 1F).

Não houve diferença na expressão do gene *cdc20* no intestino médio das larvas expostas ao inseticida e o controle ( $t_2 = 0.68$ ,  $p = 0,5586$ ) (Figura 2).



**Figura 1.** Micrografias de luz do intestino de larvas de *Apis mellifera*. **[a]** Epitélio do intestino médio (EP) com borda estriada evidente e organizada (BE). Corpo gorduroso (CG), Lúmen (L), Matriz Peritrófica (MP) e Núcleo (N). **[b]** Intestino de larvas tratadas com imidacloprido. Epitélio (EP) desorganizado com células se desprendendo (+), vacuolização citoplasmática (V) e núcleo (N). Inserção de imagem mostrando célula com alta vacuolização citoplasmática e núcleo condensado (ponta de seta). **[c]** Epitélio (EP) do intestino de larvas controle e tratadas **[d]** com mercúrio de bromofenol. Todas as regiões marcadas em azul indicam a presença de proteínas. Corpo Gorduroso (CG), Lúmen (L), Músculo (M) e Núcleo (N). **[e]** Epitélio (EP) do intestino de larvas controle e tratadas **[f]** com PAS. O núcleo é sinalizado por N e as marcações em rosa indicam a presença de polissacarídeos (seta fina). Corpo Gorduroso (CG) e Núcleo (N).





**Figura 2.** Expressão relativa (média  $\pm$  SD) do gene *cdc20* no intestino médio de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste-t ( $p > 0,05$ ).

#### *Corpo Gorduroso*

O corpo gorduroso das larvas de *A. mellifera* é formado por trofócitos ricos em gotas lipídicas bem desenvolvidas ocupando a maior parte do citoplasma (Figura 3A). Além dos trofócitos, alguns enócitos ocorrem no órgão, sendo células de contorno definido, podendo ser irregulares, com citoplasma acidófilo e o núcleo bem desenvolvido com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Figura 3A).

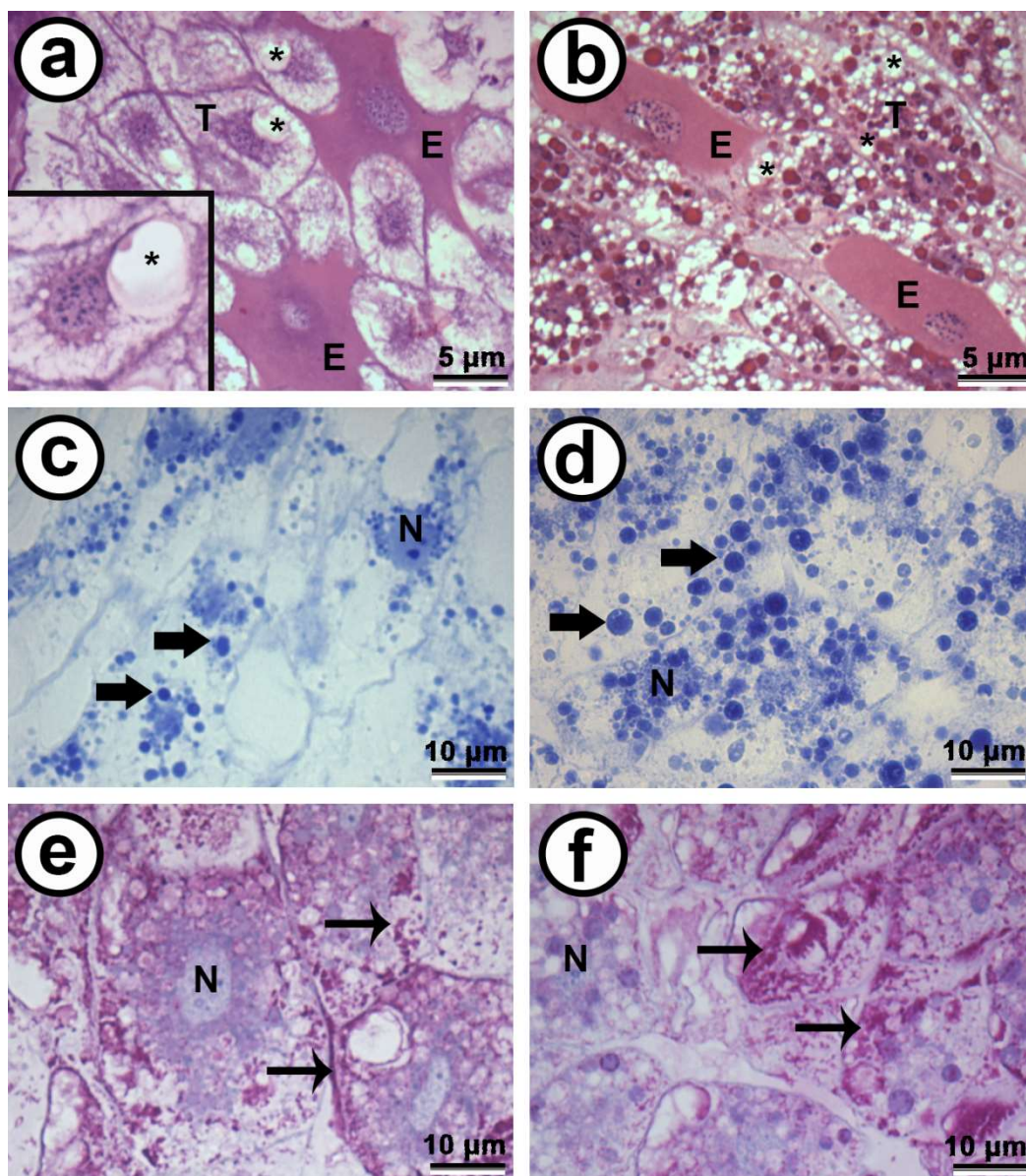
Os enócitos não exibiram alterações na morfologia nas larvas alimentadas com imidacloprido (Figura 3B).

Não houve diferença significativa na quantidade total de lipídios do controle e tratamento ( $t_8=1.76$ ,  $p=0,1162$ ) (Figura 4). As gotículas lipídicas dos trofócitos de abelhas controle apresentaram localização periférica enquanto as do tratamento estão dispersas por todo citoplasma e apresentam menor diâmetro ( $t_8=11.01$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 5).

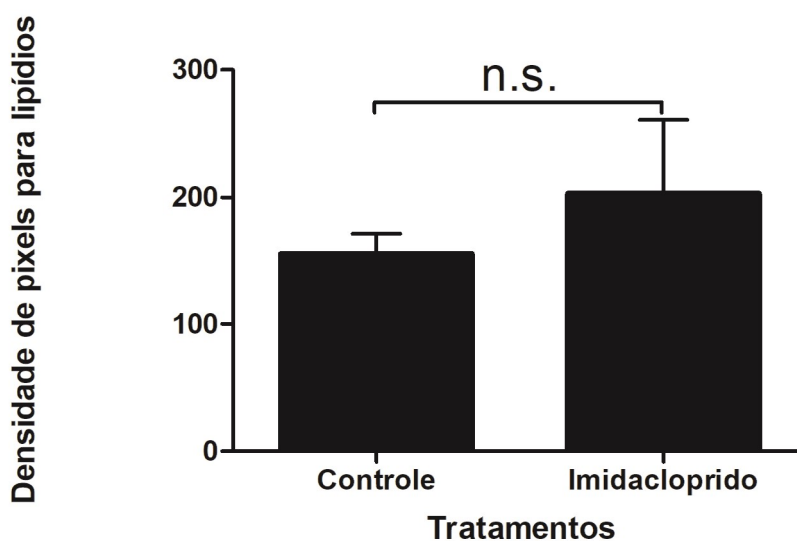
O mercúrio de bromofenol evidenciou a ocorrência de grânulos de proteína no citoplasma dos trofócitos (Figura 3C e 3D), os quais ocorreram em maior quantidade no corpo gorduroso do tratamento do que no controle ( $t_8=5.62$ ,  $p<0,0005$ ) (Figura 6).

O PAS evidenciou ocorrência de depósitos de polissacarídeos nos grânulos presentes no citoplasma dos trofócitos (Figura 3E e 3F), os quais foram similares em quantidade no tratamento e o controle ( $t_8=1.31$ ,  $p=0,2247$ ) (Figura 7).

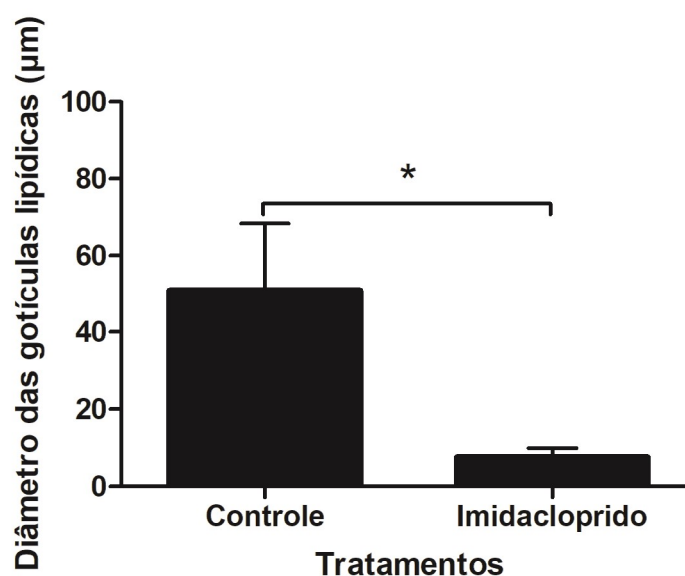
Não houve diferença significativa na expressão do gene *cdc20* no corpo gorduroso das larvas expostas ao inseticida e o controle ( $t_2=1.81$ ,  $p=0,2082$ ) (Figura 8).



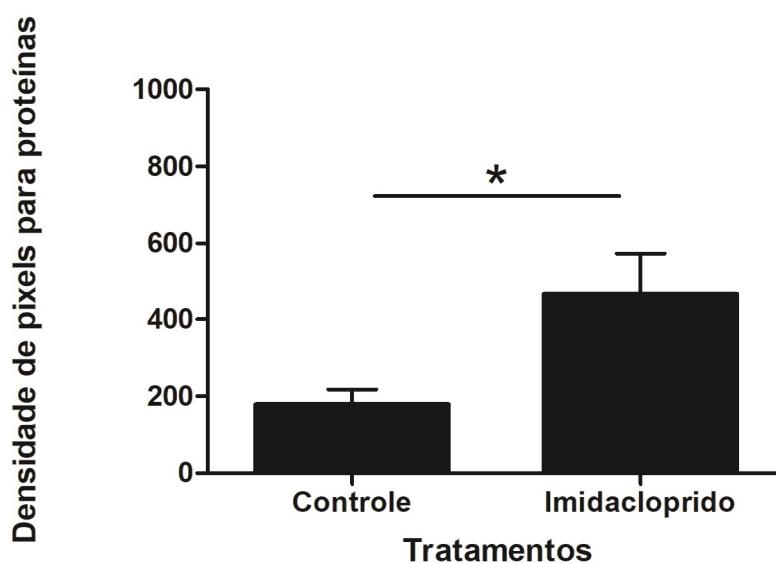
**Figura 3.** Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera*. **[a]** Corpo gorduroso das larvas do controle mostrando os enócitos (E), trofócitos (T) com grandes gotas lipídicas no citoplasma (\*). **[b]** Tecido de larvas tratadas com imidacloprido. Enócitos (E), trofócitos e gotículas lipídicas com menor diâmetro em relação ao controle (\*). **[c]** Corpo gorduroso de larvas controle e tratadas **[d]** com mercúrio de bromofenol. O núcleo é sinalizado por (N) e as marcações em azul indicam a presença de proteínas (seta grossa). **[e]** Corpo gorduroso de larvas controle e tratadas **[f]** com PAS. O núcleo é sinalizado por N e as marcações em rosa indicam a presença de polissacarídeos (seta fina).



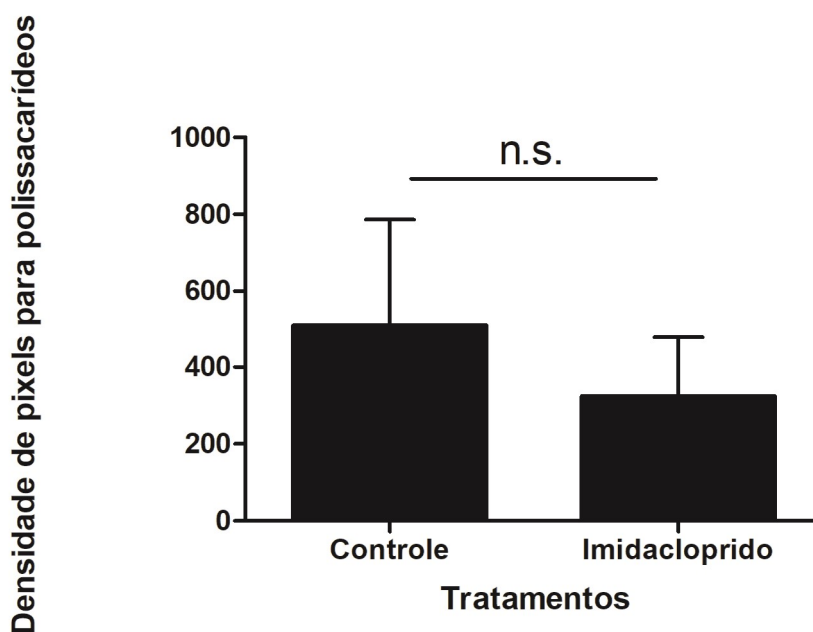
**Figura 4.** Densidade de pixels para lipídios (média  $\pm$  SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste-t ( $p > 0,05$ ).



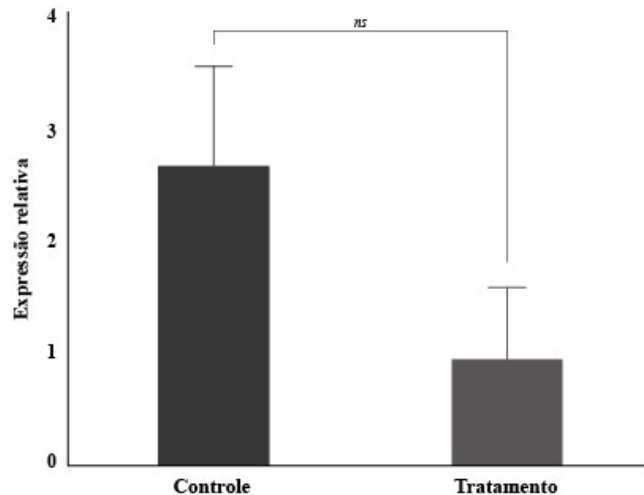
**Figura 5.** Diâmetro das gotículas lipídicas (média  $\pm$  SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste-t ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Densidade de pixels para proteínas (média  $\pm$  SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste-t ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Densidade de pixels para polissacarídeos neutros e glicoconjugados (média  $\pm$  SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste-t ( $p > 0,05$ ).



**Figura 8.** Expressão relativa (média  $\pm$  SD) do gene *cdc20* no corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* controle e tratadas com imidacloprido. Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste-t ( $p > 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

As análises histopatológicas do intestino médio de larvas de *A. mellifera* alimentadas por seis dias com dieta contaminada com imidacloprido revelam alterações em relação ao controle, incluindo desorganização da arquitetura do epitélio, formação de bolhas na superfície, liberação de fragmentos celulares, perda de borda estriada, condensação nuclear e vacuolização citoplasmática. Danos intestinais semelhantes foram descritos para abelhas adultas expostas a outros inseticidas (Castro et al., 2020; Farde-Gomes et al., 2021), fungicidas (Carneiro et al., 2020) e acaricidas (Serra et al., 2021).

As alterações histopatológicas aqui observadas podem ser indicativas de morte celular por apoptose (Häcker, 2000). Durante o processo de apoptose uma cascata de caspases é ativada, sendo os elementos do citoesqueleto um de seus alvos. O primeiro passo das células em apoptose é se desprender da matriz extracelular e contrair, e para que isso ocorra é necessário desmontar os complexos de adesão através da reorganização da actina (Ndozangue-Touriguine et al., 2008; Alberts et al., 2015), o que pode explicar a desorganização da arquitetura do epitélio do intestino médio e a perda da borda estriada das larvas expostas ao imidacloprido. Além disso, reorganização da actina juntamente com a fosforilação da miosina leva a formação das bolhas na superfície celular e a posterior liberação dos corpos apoptóticos (Ndozangue-Touriguine et al., 2008), semelhantes aos fragmentos celulares liberados no lúmen do intestino médio das larvas expostas ao inseticida, aqui observados.

O envelope nuclear é uma estrutura mantida pelos filamentos intermediários (Alberts et al., 2015). As proteínas dos filamentos são moduladas na apoptose e as caspases são

capazes de entrar no núcleo e desestruturar as lamínas (Ndozangue-Touriguine et al., 2008), o que explica as alterações nucleares. Os microtúbulos são responsáveis pela organização do conteúdo intracelular e pelo tráfego de vesículas (Alberts et al., 2015) eles são despolimerizados no início da fase de execução da apoptose (Ndozangue-Touriguine et al., 2008) e contribuem para a fragmentação do complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Aki et al., 2012) que é caracterizada pelo aumento da vacuolização citoplasmática. O principal efeito dessas alterações no epitélio intestinal seria a redução na capacidade de absorção de nutrientes.

A reação positiva para mercúrio bromofenol em todo epitélio intestinal das larvas controle e as tratadas com imidacloprido indicam ampla distribuição de proteínas nesses órgãos. O intestino médio tem função de digestão e absorção de nutrientes (Cruz-Landim et al. 1996), com as células digestivas apresentando retículo endoplasmático rugoso desenvolvido a alta atividade secretora sendo responsável pela produção de todas as enzimas digestivas, exceto uma derivada do pólen ingerido (Schumaker et al., 1993; Terra & Ferreira 1994; Da Lage et al., 2018), também são responsáveis pela secreção de proteínas da matriz peritrófica (Marques-Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2015). Assim, a distribuição homogênea de proteínas no epitélio pode estar associada à síntese dessas proteínas pelas células digestivas, que parecem não serem afetadas pelo imidacloprido.

O teste de PAS utilizado para evidenciar polissacarídeos, exibe forte reação na borda estriada do intestino médio das larvas controle, indicando alta quantidade de glicoproteínas nessa região. A superfície apical das células digestivas apresenta microvilosidades que aumentam a superfície de absorção do epitélio (Serrão & Cruz-Landim, 1996; Terra et al., 2006), as quais apresentam glicocálice formado por glicoproteínas e glicolípídios (Terra et al., 2019), o que explica a afinidade da região ao teste de PAS. Suas principais funções são proteção contra choques químicos e compartimentalização de enzimas envolvidas na digestão terminal de açúcar e proteínas (Lehane & Billingsley, 2012; Terra et al., 2019). No entanto, as alterações verificadas na histopatologia indicam que o glicocálice não foi uma barreira efetiva contra os danos químicos causados pelo imidacloprido, evidenciado por regiões negativas ao teste de PAS. Isso indica que o que o imidacloprido também causa desorganização do glicocálice na borda estriada do intestino médio das larvas.

Não há diferença na expressão de mRNA para o gene *cdc20* entre as larvas controle e aquelas tratadas com imidacloprido. No ciclo celular, um dos principais reguladores da transição metáfase e anáfase é o complexo promotor da anáfase (APC/C) que tem como alvo a separação das cromátides-irmãs. A ativação do APC/C requer a ligação da proteína *cdc20*,

que tem a síntese aumentada quando a célula se aproxima da mitose (Alberts et al., 2015). Como não foi identificado aumento na transcrição de *cdc20* pode indicar que as células não estão em processo de divisão dividindo para reparar o epitélio danificado. As larvas aqui utilizadas estão no último instar e após ocorrer a muda para pupa o intestino é destruído e produzido novamente na fase de pupa (Dobrovsky, 1951; Neves et al., 2003; Martins et al., 2006) não sendo necessária uma renovação celular. No entanto, os excessos de danos aqui observados podem ter prejudicado a digestibilidade da larva nos estágios anteriores.

As análises histopatológicas do corpo gorduroso de larvas de *A. mellifera* demonstram que esse órgão é composto de células de origem mesodérmica, os trofócitos e às vezes contêm células ectodérmicas, os enócitos (Oliveira & Cruz-Landim, 2003). Os resultados não revelam alterações nos enócitos das larvas tratadas com imidacloprido em relação ao controle. Essas células são responsáveis pela síntese de lipídios, proteínas e hidrocarbonetos da cutícula do tegumento (Arrese & Soulages et al., 2010). Assis et al. (2022), reportaram modificações nos enócitos da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* expostas ao imidacloprido como aumento de vacuolização citoplasmática e compactação e fragmentação do núcleo. Isso sugere que os enócitos de larvas de *A. mellifera* podem ser mais resistentes à ação deste inseticida.

Nos trofócitos das larvas controle, as gotículas lipídicas são de localização periférica e maiores que aquelas das larvas expostas ao imidacloprido que são dispersas por todo citoplasma, indicando uma possível mobilização dessas reservas energéticas. O imidacloprido induz o estresse oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *A. mellifera* (He et al. 2021), o que pode ser neutralizado com a formação de peróxidos lipídicos (Qi et al, 2020; Lima & Abdalla, 2021). Neste processo a oxidação excessiva de fosfolipídios de membrana altera sua montagem, composição, estrutura e dinâmica (Gaschler & Stockwell, 2017) Logo, a mobilização lipídica observada pode estar associada a uma resposta de estresse oxidativo causada pelo inseticida. Entretanto não pode ser descartada também que a mobilização dos lipídeos nas larvas tratadas seja para produção de energia envolvida em mecanismos de desintoxicação, uma vez que a perturbação das gotículas lipídicas é importante para iniciar um processo lipolítico (Arrese & Soulages, 2010).

A quantidade de grânulos de proteínas presentes no citoplasma dos trofócitos foi maior nas células de larvas tratadas com inseticida do que nas do controle. O corpo gorduroso além de armazenar proteínas é o principal local onde enzimas de desintoxicação são produzidas (Li et al., 2019). Abelhas expostas ao imidacloprido apresentam maiores níveis de RNA para um conjunto de genes que codificam as enzimas P450 (Derecka et al., 2013) que

são uma importante via de desintoxicação a xenobióticos nesses insetos (Berembaum & Johnson, 2015). Assim, o aumento de grânulos proteicos no citoplasma dos trofócitos de larvas tratadas com imidacloprido pode representar um aumento na produção de enzimas desintoxicantes que serão posteriormente liberadas na hemolinfa.

A quantidade de polissacarídeos presente nos trofócitos de larvas não difere entre tratamento e controle indicando que a exposição ao imidacloprido não altera as reservas de carboidratos. O carboidrato de reserva dos insetos é o glicogênio, no entanto a maior parte da glicose consumida com a dieta alimentar é convertida em lipídios (Arrese & Soulages, 2010). Guedes et al. (2006) verificaram que populações de besouros *Sitophilus zeamais* resistentes a inseticidas tem maior quantidade de glicogênio nos trofócitos que aqueles susceptíveis, proporcionando maior capacidade de mobilização energética para suprir os mecanismos de resistência. Assim, seria esperado que as larvas de *A. mellifera* expostas ao imidacloprido, apresentassem menores quantidades de reservas de carboidratos, porém isso não ocorre porque como a maior parte dos açúcares são convertidos em lipídios de armazenamento (Arrese & Soulages, 2010) estes últimos parecem ser mobilizado primeiro que os polissacarídeos para os mecanismos desintoxicação, como observado pela redução das reservas de lipídio nos trofócitos das larvas expostas ao imidacloprido. Como as larvas aqui analisadas estavam próximas da muda para pupa, parece plausível sugerir, que mesmo com exposição crônica à concentração realística de imidacloprido encontrada nos grãos de pólen, o corpo gorduroso apresenta um tamponamento que assegura algumas reservas para a conclusão da metamorfose. Tadei et al. (2020) observaram que a exposição ao fungicida piraclostrobina na fase larval não afetou a sobrevivência das abelhas em nenhum estágio de desenvolvimento. No entanto, causou alteração na morfologia do epitélio do intestino médio e aumentou os danos quando combinada a exposição ao patógeno *Nosema ceranae*. Logo, a exposição de larvas a agrotóxicos merece atenção e estudo uma vez que pode comprometer as funções fisiológicas do adulto.

Assim como nas células do intestino, não houve diferença significativa na expressão de mRNA para o gene *cdc20* no corpo gorduroso entre as larvas controle e aquelas tratadas com imidacloprido. As imagens histológicas não demonstraram danos irreversíveis, como núcleo picnótico (Grella et al., 2019) nas células dos trofócitos e nem indícios de morte celular. Dessa, forma pode não ter havido necessidade ou estímulo para que as células entrassem em divisão.



## 5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo sobre os efeitos colaterais do imidacloprido em larvas de *A. mellifera*. No geral aos resultados mostram que a exposição oral crônica de larvas da abelha a concentrações realísticas do inseticida apresentam danos no intestino médio, reforçando os efeitos negativos do imidacloprido para *A. mellifera*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aki, T., Nara, A., Uemura, K., 2012. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biol. Toxicol.* 28, 125–131. <https://doi.org/10.1007/s10565-012-9212-3>.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular biology of the cell*. WW Norton & Company, 2015.
- Alsafran, M., Rizwan, M., Usman, K., Saleem, M.H. Jabri, H.A., 2022. Neonicotinoid insecticides in the environment: A critical review of their distribution, transport, fate, and toxic effects *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10:108485. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108485>.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55:207–25. [10.1146/annurev-ento-112408-085356](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356).
- Assis, J.C., Domingues, C.E.C., Tadei, R., Silva, C.I.S., Lima, H.M.S, Decio, P., Silva-Zacarin, E.C.M., 2022. Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Environmental Pollution* 304, 119140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119140>.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J.N., Michaud, B., Odoux, J.F., PhamDelegue, M.H., 2005. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull. Insectol.* 58, 107-111.
- Azam, N.K., Ahmed, N., Biswas, S., Ara, N., Rahman, M., Hirashima, A., Hasan, N., 2018. A review on bioactivities of honey bee venom. *Annual Research & Review in Biology* 30, 1-13.
- Berenbaum, M.R., Johnson, R.M., 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10, 51–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>.

- Blacqui re, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.
- Bogdanov, S., 2011. Stefan. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids* 3, 8-19.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>.
- Caccia, S, Casartelli, M., Tettamanti, G., 2019. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research* 377, 505–525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>
- Carneiro, L.S., Teixeira, S.A.M.V., Gonçalves, W.G., Fernandes, K.M., Zanuncio, J.C., Serrao, J.E., 2019. Histochemistry, immunohistochemistry and cytochemistry of the anterior midgut region of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Micron* 113, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.06.017>.
- Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Medeiros-Santana, L., Serrão, J.E., 2020. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>.
- Carneiro, L.S., Martinez, L.C., Oliveira, A.H., Cossolin, J.F.S, Resende, M.T.C.S, Gonçalves, W.G., Medeiros-Santana, L., Serrão, J.E., 2022. Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment* 815, 152847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>.
- Castro, M.B.A., Martinez, L.C., Cossolin, J.F.S., Serra, R.S.S., Serrão, J.E., 2020. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248, 126075. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>.
- Catae, A.F., Roat, T.C., Pratavieira, M., Menegasso, A.R.S., Palma, M.S., Malaspina, O., 2017. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology* 27,109–121.<https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>.

- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., Pettis, J.S., 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology* 89, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.004>.
- Chauzat, M., Faucon, J., Martel, A., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology* 99, 253-262. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.2.253>.
- Chen, Y., Tzeng, D.T.W., Yang, E., 2021. Chronic effects of imidacloprid on honey bee worker development—molecular pathway perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11835. <https://doi.org/10.3390/ijms222111835>.
- Codling, G., Al Naggar, Y., Giesy, J.P., Robertson, A.J., 2018. Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. *Ecotoxicology* 27, 122–131. DOI 10.1007/s10646-017-1876-2.
- Cruz-Landim, C., Serrao, J.E., Silva-De-Moraes, R.L.M., 1996. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios* 88, 95–104.
- Da Lage, J., 2018. The amylases of insects. *International journal of insect science* 10, 1179543318804783. <https://doi.org/10.1177/1179543318804783>.
- Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Bustamante, T.A., Bloomquist, J.R., Ellis, J.D., 2019. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared *in vitro*. *Pest Management Science* 75, 29-36. <https://doi.org/10.1002/ps.5124>.
- Delkash-Roudsari, S., Goldansaz, S.H. Jahromi, K.T., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2022. Side effects of imidacloprid, ethion, and hexaflumuron on adult and larvae of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 53:17. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00910-z>.
- Derecka, K., Blythe, M.J., Malla, S., Genereux, D.P., Guffanti, A., Pavan, P., Moles, A., Snart, C., Reyder, T., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Schuster, E., Stöger, R., 2013. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS ONE* 8(7): e68191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068191>.

- Dobrovsky , T.M., 1951. Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honey-  
bee. *Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Mens.* 301, 03-47.
- Farder-Gomes, C.F., Fernandes, K.M., Bernardes, R.C., Bastos, D.S.S., Martins, G.F., Serrão,  
J.E., 2021. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs  
epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese  
(Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment* 774, 145679.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>.
- <sup>a</sup>  
Fernandes, K.M., Araujo, V.A., Serrão, J.E., Martins, G.F., Campos, L.A.O., Neves, C.A.,  
2010. Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of  
*Melipona quadrifasciata anthioides* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 56, 489-  
505.
- Fernandez, F.C., Cruz-Landim, C., Malaspina, O., Influence of the insecticide pyriproxyfen  
on the flight muscle differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae).  
*Microscopy Research and Technique* 75, 844–848.
- Fujii, T., Kodama, S., Ishikawa, Y., Yamamoto, M., Sakurai, T., Fonagy, A., 2022. Lipid  
droplets in the pheromone glands of bombycids: Effects of larval diet  
on their size and pheromone titer. *Journal of Insect Physiology* 142, 104440.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104440>.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and  
Biophysical Research Communications* 482, 419-425.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
- Gilbert, L. I., Frieden, E. 1981. *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*.  
Plenum Press, New York and London.
- Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid  
insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50, 977–987. doi: 10.1111/1365-  
2664.12111.
- 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,  
1255957.<https://doi.org/10.1126/science.1255957>.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis  
mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal  
of Insect Physiology* 58, 1042–1049.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>.

- Grella, T.C., Soares-Lima, H.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2019. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere* 236: 124255.
- Grillone, G., Laurino, D., Manino, A., Porporato, M., 2017. Toxicity of thiametoxam on in vitro reared honey bee brood. *Apidologie* 48, 635–643. DOI: 10.1007/s13592-017-0506-6.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30–38. DOI: 10.1111/j.1365-3032.2005.00479.x.
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>.
- He, B., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Qing, Q., Duan, J., Xu., J., Dang, X., Zhou, Z., Li, Z., 2021. Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 228, 112709. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112709>.
- Khalifa, S.A.M., Elshafiey, E.H., Shetaia, A.A., Abd El-Wahed, A.A., Algethami, A.F., Musharraf, S.G., AlAjmi, M.F., Zhao, C., Masry, S.H.D., Abdel-Daim, M.M., Halabi, M.F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M.A.M., El-Seedi, H.R., 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* 12, 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7 (e29268). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>.
- Lehane, M., Billingsley, P. (Eds.). 2012. *Biology of the insect midgut*. Springer Science & Business Media.
- Li, S., Yu, X., Feng, Q., 2019. Fat body biology in the last decade. *Annu. Rev. Entomol.* 64:18.1–18.19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>.
- Lillie, R. D., 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*; 3rd Ed. McGrawHill Book Co., New York.
- Lima, E.S, Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37, 294-303.
- Marques-Silva S., Serrão, J.E., Mezêncio, J.M.S., 2005. Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of

- secretory sites. *Acta histochemica* 107, 23-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.10.003>.
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A.O., Serrão, J.E., 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37, 161-168
- Michelette, E.R.F., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24, 431-440.
- 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(3): e9754.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>.
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., Bréard, J., 2008. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.016>.
- Neves, C.A., Gitirana, L.B., Serrao, J.E., 2003. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Braz J Biol.* 63, 683-690.
- Oliveira, V.P., Cruz-Landim, C., 2003. Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências* 11, 195-205.
- Paten, A.M., Colin, T., Choppin, C.W, Court, L.N., Barron, Oakeshott, J.G., Morgan, M. J., 2022. Non-additive gene interactions underpin molecular and phenotypic responses in honey bee larvae exposed to imidacloprid and thymol. *Science of the Total Environment* 814, 152614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152614>.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49,15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>.
- Qi, S., Niu, X., Wang, D.H., Wang, C., Zhu, L., Xue, X., Zhang, Z., Wu, L., 2020. Flumethrin at sublethal concentrations induces stresses in adult honey bees (*Apis mellifera* L.). *Science of the Total Environment* 700, 134500.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134500>.
- Rembold, H., Kremer, J., Ulrich, G.M., 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11, 29-38.

- Roma, G.C., Bueno, O.C., Camargo-Mathias, M.I., 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron* 41, 395–401. doi:10.1016/j.micron.2009.12.007.
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71e83. <https://doi.org/10.1051/apido:2004071>.
- Schumaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T., Terra, W.R., 1993. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie* 24, 3-17. <https://doi.org/10.1051/apido:19930101>.
- Serra, R.S., Cossolin, J.F.S, Resende, M.T.C.S., 2021. Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 270, 129439. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129439>.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., 1996. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 88, 161–171.
- Sheets, Larry P. "Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide." Hayes' handbook of pesticide toxicology. Academic Press, 2010. 2055-2064.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci.Pollut. Res.* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>.
- Skowronek, P., Wójcik, L., Strachecka, A., 2021. Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects* 12, 547. <https://doi.org/10.3390/insects12060547>
- Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrel, C.M., Mendiola, L., Daszak, P., 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth* 10, 434–445. DOI: 10.1007/s10393-013-0870-2.

- Soares, E.E., Stávale, L.M., Mendonça, M.C.P., Coope, A., Cruz-Höfling, M.A., 2016. Age-related modulations of AQP4 and Caveolin-1 in the hippocampus predispose the toxic effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1462. doi:10.3390/ijms17111462.
- Solomon, R.W., 2009. Free and open source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology* 192, W330-W334. DOI:10.2214/AJR.08.2190.
- Sparks, T.C., Crossthwaite, A.J., Nauenc, R., Banba, S., Cordova, D., Earley, F., Ebbinghaus-Kintscher, U., Fujioka, S., Hirao, A., Karmon, D., Kennedy, R., Nakao, T., Popham, H.J.R., Salgado, V., Watson, G.B., Wedel, B.J., Wessels, F.J., 2020. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification - a tool for resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 167: 104587. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104587>.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.
- Tadei, R., Menezes-Oliveira, V.B., Silva-Zacarin, E.C.M., 2020. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. *Environmental Pollution* 267, 115622. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115622>.
- Tavares, D.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Silva-Zacarin, E.C.M., Malaspina, O., 2015. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 135, 370–378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.090>.
- Teixeira, A.D., Marques-Araujo S., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2015. Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron* 68, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.09.009>.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1-62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4).



- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C., 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 255–269. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000200007>.
- Terra, W.R., Barroso, I.G., Dias, R.O., Ferreira, C., 2019. Molecular physiology of insect midgut. In: *Advances in insect physiology*. Academic Press, 2019. p. 117-163.
- Theisen-Jones, H., Bienefeld, K., 2016. The asian honey bee (*Apis cerana*) is significantly in decline. *Bee World* 93, 90-97. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.2017.1284973>.
- Valido, A., Rodríguez-Rodríguez, M.C., Pedro Jordano, P., 2019. Honeybees disrupt the structure and functionality of plant-pollinator networks. *Scientific Reports* 9:4711. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41271-5>.
- Van Engelsdorp, D., Hayes Jr., J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J., 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. Apic. Res.* 50, 1–10. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.50.1.01>.
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J., Ziad Fajloun, Z., 2019. Bee venom: overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules* 24, 2997. doi:10.3390/molecules24162997.
- Winston, M.L., 2003. *The Biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- Wu, M., Chang, Y., Lu, K., Yang, E., 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 88, 12-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., Stewart Jr., C.N., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinf.* 7, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>.
- Zattara, E.E., Aizen, M.A., 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>.

## CONCLUSÕES GERAIS

A ingestão de imidacloprido por operárias adultas de *A. mellifera* causou alterações na morfologia do intestino médio. As análises de microscopia e biologia molecular demonstram que o inseticida induziu apoptose e autofagia nas células digestivas. Um epitélio intestinal degradado pode significar prejuízo para os processos de digestão e absorção dos alimentos e consequentemente alterações na fisiologia e sobrevivência do indivíduo. A exposição crônica de larvas ao imidacloprido também indicou alterações típicas de apoptose nas células digestivas além de alterações na alocação de reservas no corpo gorduroso. Esses resultados corroboram com trabalhos de expressão gênica que observaram alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, por exemplo. As reservas do corpo gorduroso são importantes para o desenvolvimento e essas mudanças podem comprometer o esse processo. Alguns trabalhos mostram que as larvas são mais tolerantes que os adultos ao imidacloprido. Este fato pode estar associado ao sistema nervoso da larva ser menos desenvolvido e consequentemente menos afetado pelo inseticida. No entanto, é preciso reforçar que a larva possui o corpo gorduroso em maior quantidade que o adulto, e isso contribui para os processos de desintoxicação e consequentemente auxilia na sobrevivência. O conjunto de resultados reforça o efeito negativo do imidacloprido para as abelhas e sugerimos atenção no seu uso.