

MATHEUS TUDOR CÂNDIDO SANTOS DE RESENDE

**EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS CAUSADOS PELO INDOXACARBE NO
INTESTINO MÉDIO, CORPO GORDUROSO E CÉREBRO DA ABELHA *Apis
mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

Orientadores: Luis Carlos Martínez
Jamile Fernanda Silva Cossolin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

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

T

R433e
2020

Resende, Matheus Tudor Cândido Santos de, 1991-

Efeitos histopatológicos causados pelo indoxacarbe no intestino médio, corpo gorduroso e cérebro da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / Matheus Tudor Cândido Santos de Resende. – Viçosa, MG, 2020.

57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.38-57.

1. Toxicologia. 2. Polinizadores. 3. Inseticidas.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 571.95


MATHEUS TUDOR CÂNDIDO SANTOS DE RESENDE


**EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS CAUSADOS PELO INDOXACARBE NO
INTESTINO MÉDIO, CORPO GORDUROSO E CÉREBRO DA ABELHA *Apis
mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

APROVADA: 18 de fevereiro de 2020.

Assentimento:


Matheus Tudor Cândido Santos de Resende
Autor


José Eduardo Serrão
Orientador

Dedico a todos os professores deste país, em especial os professores de filosofia e sociologia, tão aviltados neste momento político, embora sejam o esteio da verdadeira emancipação.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa assim como o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e apoio.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo sem a qual este estudo se inviabilizaria.

Aos meus professores pelas reflexões, críticas, sugestões e por contribuírem para minha formação.

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Serrão pela oportunidade, profissionalismo, ensinamentos e paciência - e pelas risadas e bons momentos também. Sobretudo por demonstrar que é possível combinar humanismo com competência.

Ao coorientador Dr. Luiz Carlos Martínez pelas ponderações, sugestões, críticas e boas risadas acompanhadas de um bom café.

À coorientadora Dra. Jamile Fernanda Cossolin pelas contribuições, ensinamentos, apoio e preciosa amizade.

Aos técnicos e todos os funcionários públicos e terceirizados da Universidade Federal de Viçosa que contribuem para a qualidade do ensino e pesquisa participando direta e indiretamente do projeto civilizatório que a educação e a ciência ainda representam ao país.

Aos funcionários, em particular o “Lulu”, e o professor responsável Weyder Santanna do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e sugestões na manutenção e criação de abelhas.

Ao apiário da família Raad, em particular meu amigo Lucas Raad, pela concessão de colônias, ensinamentos, apoio, sugestões e críticas na criação e manutenção de abelhas melíferas, assim como pelos papos e seu humor cáustico.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, momentos de “brainstorming”, divertimentos, amizades e por contribuírem para a criação de um ambiente de trabalho produtivo, mas sobretudo digno. Em especial a “equipe das abelhas”, com André Henrique Oliveira, Mayara Bardaró, Lenise Carneiro e Amanda. E claro, Raissa Santanna, que me introduziu no mundo das abelhas, com sugestões, debates, dúvidas, trabalhos em conjunto, confidências e bons momentos. Obrigado pela amizade, me fez muito bem.

Finalmente, agradeço minha família pelo especial e amoroso apoio, além da paciência. Agradeço também a família Schitini pelo amparo, assim como os meus amigos próximos pelas aventuras, irreverências, conselhos, discussões e auxílios.

“Há metafísica o bastante em não pensar em nada”. (Alberto Caeiro)

Resumo

RESENDE, Matheus Tudor Cândido Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Efeitos histopatológicos causados pelo indoxacarbe no intestino médio, corpo gorduroso e cérebro da abelha *Apis mellifera* (hymenoptera: Apidae).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Luis Carlos Martínez e Jamile Fernanda Silva Cossolin.

A abelha *Apis mellifera* é responsável por serviços críticos para a manutenção dos ecossistemas, principalmente como polinizadora, desempenhando papel na polinização de cultivares comerciais, sendo importante na seguridade alimentar de populações humanas. Devido a seus hábitos de forrageamento, entram em contato com pesticidas que podem desencadear fenótipos deletérios. Tal fato é relevante, uma vez que as populações de abelhas estão em declínio sendo uma das possíveis causas o efeito de inseticidas sobre elas. Este estudo buscou avaliar os efeitos histopatológicos do inseticida indoxacarbe letais e subletais no órgão alvo cérebro e órgãos não-alvos intestino médio e corpo gorduroso. A exposição aguda por 24h com CL₅₀ assim como a exposição crônica por oito dias com CL_{5/100} afetaram a porção posterior do intestino médio com aumento da vacuolização, protusões citoplasmáticas e eliminação celular com presença de fragmentos celulares anucleados e nucleados, alguns com núcleo picnóticos. Na exposição aguda houve ainda desestruturação de algumas células com interrupção de síntese de matriz peritrófica, enquanto na exposição crônica houve interrupção de síntese de matriz. O cérebro de ambos os tratamentos apresentou neurodegeneração em neurópilas, embora somente a somata do corpo cogumelar da exposição crônica foi afetada. O corpo gorduroso do tratamento agudo apresentou alterações decorrentes dos danos tóxicos, embora não tenha sido afetado no trata crônico. Os resultados deste trabalho permitem concluir que, embora o indoxacarbe seja considerado um inseticida seguro para muitos organismos não-alvos, é extremamente tóxico para *Apis mellifera* mesmo em concentração subletal quando exposto cronicamente, por meio de efeitos tóxicos em órgão alvo e órgãos não-alvo. Tais danos podem afetar sua fisiologia e comportamentos, contribuindo para o aumento de mortalidade de abelhas de modo direto e indireto, afetando assim a saúde das colônias contaminadas.

Palavras-chave: Toxicologia. Polinizador. Inseticida

Abstract

RESENDE, Matheus Tudor Cândido Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Histopathological effects caused by indoxacarb in the medium intestine, fatty body and brain of the bee *Apis mellifera* (hymenoptera: Apidae).** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Luis Carlos Martínez and Jamile Fernanda Silva Cossolin.

The bee *Apis mellifera* is responsible for critical services for the maintenance of ecosystems, mainly as a pollinator, playing a role in the pollination of commercial cultivars, being important in the food security of human populations. Due to their foraging habits, they come into contact with pesticides that can trigger harmful phenotypes. This fact is relevant, since bee populations are declining and one of the possible causes is the effect of insecticides on them. This study sought to evaluate the histopathological effects of the lethal and sublethal insecticide indoxacarb on the target organ, brain and non-target organs, medium intestine and fatty body. Acute 24-hour exposure with LC_{50} affected the posterior portion of the midgut with increased vacuolization, cytoplasmic protusions, cell elimination, interruption of matrix synthesis and epithelial disruption in some locations, in addition to causing damage to the fatty body trophic cells by altering lipid inclusions and causing neurodegeneration of neuropiles in the brain. Chronic exposure for eight days with $CL_{5/100}$ caused changes in the posterior portion of the midgut with intensification of vacuolization, cytoplasmic protusions and cell elimination, with interruption of matrix synthesis, while the fatty body did not change and the brain showed neurodegeneration in neuropiles as well as in the mushroom body somata. The results of this work allow us to conclude that, although indoxacarb is considered a safe insecticide for many non-target organisms, it is extremely toxic to *Apis mellifera* even in sublethal concentration when exposed chronically, through toxic effects on target organ and non-target organs. Such damage can affect their physiology and behavior, contributing to the increase in bee mortality in a direct and indirect way, thus affecting the health of the contaminated colonies.

Keywords: Toxicology. Pollinator. Insecticide

Lista de Ilustrações

Figura 1 Intestino médio.....	20
Figura 2 Corpo gorduroso.....	22
Figura 3 Lobo antenal.....	24
Figura 4 Neurópila.....	25
Figura 5 Corpo Cogumelar.....	26
Gráfico 1 Curva de mortalidade.....	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentrações letais.....	18
------------------------------------	----

Lista de Símbolos

® Marca registrada

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3	RESULTADOS.....	18
	3.1 Bioensaio de toxicidade.....	18
	3.2 Intestino Médio.....	19
	3.3 Corpo Gorduroso.....	21
	3.4 Cérebro.....	22
4	DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1- Introdução

Os insetos são os principais responsáveis pela polinização (Giannini et al., 2015), entre os quais as abelhas fornecem serviços de polinização críticos para os ecossistemas naturais (Doeke et al., 2015), um processo fundamental para a variabilidade genética e garantia da reprodução de diversas plantas (Ollerton et al., 2011). Esse serviço ecossistêmico ganha particular relevo por até um terço da alimentação humana ser dependente da polinização que é fornecida pelas abelhas, no qual *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) é a espécie mais utilizada como polinizadora de cultivos comerciais e de diferentes culturas agrícolas (McGregor, 1976; Williams, 1995; Williams, 2002; Johnson, 2010). *A. mellifera* contribui ainda com a apicultura como produtora de mel, cera, própolis, geleia real e veneno (Atkins, 1992; Iwasa, 2004; Pires et al., 2016; Potts et al., 2016), produtos de importância econômica (Danforth, 2007).

O declínio na diversidade e na abundância de polinizadores, em particular de abelhas silvestres e manejadas (Stokstad, 2007; Henry et al., 2012; Lee et al., 2015; Pires, et al., 2016; Seitz et al., 2016) é causa de preocupação. O declínio é global (NRC, 2007) e se verifica nas abelhas melíferas (vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Calderone, 2012; Seitz et al., 2016), onde a partir de 1998 se relatou um aumento da mortalidade em colônias de abelhas na França, Suíça, Itália, dentre outros países (Alix et al., 2008). O declínio das populações de abelhas tem sido relacionado a patógenos virais e fúngicos, parasitas, competição interespecífica, perda e fragmentação de habitats, qualidade do alimento coletado no forrageamento, alterações climáticas e uso frequente de pesticidas (Goulson et al., 2015; Lee et al., 2015). Neste contexto, a Desordem do Colapso de Colônias (CCD) (Dreier et al., 2014; Pires et al., 2016; Klein et al., 2007) foi observada pela primeira vez em 2006 nos Estados Unidos, em áreas de manejo agrícola intensivo, onde foi registrada vultosa perda de colmeias sem causas evidentes (van Engelsdorp et al., 2009). A CCD é caracterizada pelo abandono, por parte das operárias, da colmeia contendo alimentos, rainha, crias operculadas, operárias jovens, e sem a presença de abelhas mortas na proximidade (De Jong, 2009).

A CCD decorre de interações ecológicas negativas compondo uma causação multifatorial (Henry et al., 2012) configurando-a como uma síndrome de estresse (vanEngelsdorp et al., 2009). Suas principais causas são parasitas como varroas, patógenos virais e fúngicos (DeGrandi-Hoffman et al., 2015), declínio da diversidade de pólen assim como sua qualidade (Di Pasquale et al., 2013) e o uso de agrotóxicos (Johnson et al., 2010; Zhu et al., 2015). Em

concomitância, há a hipótese dessas múltiplas causas atuarem não só individualmente mas de modo aditivo, intensificando reciprocamente seus efeitos, como também sinérgico (Nazzi et al 2012, Goulson et al., 2015).

As abelhas forrageiam extensas áreas em busca de recursos como água, néctar e pólen, entrando em contato com agrotóxicos, transportando-os para a colmeia e, em decorrência, contaminando o mel e a cera - características que reforçam a hipótese da relação causal desses produtos com o declínio das populações de abelhas (revisado por Blacquiére et al., 2012; Calatayud-Vernich, 2018). Soma-se a isso a generalizada incidência de pesticidas em ambientes com abelhas, sendo as matrizes apícolas fortemente afetadas (Bogdanov, 2006). Tais fatos configuram as abelhas melíferas como boas bioindicadoras ambientais para defensivos agrícolas uma vez que são expostas por via tópica e, ou, oral; e como organismo modelo em estudos ecotoxicológicos e sobre riscos ambientais.

Dentre os defensivos agrícolas destacam-se os inseticidas, os quais em quantidades letais afetam os tamanhos das colmeias, uma vez que diminuem as populações totais de abelhas em campo (Brittain & Pots, 2011). Além disso, efeitos subletais causam alterações de curto e longo prazo na morfologia, fisiologia e comportamento (perturbações olfativas, capacidade de aprendizado, memória olfativa, ocorrência de paralisia e desorientação nos indivíduos), com prejuízos nos serviços de polinização, comprometendo a manutenção da colônia (Aliouane et al., 2009, van Egelsdorp & Meixner, 2010; Basu & Chakrabarti, 2015; Stanley et al., 2015). Em decorrência desses impactos negativos, os efeitos subletais provenientes de baixas concentrações, por exposição tanto aguda quanto crônica, estão cada vez mais em foco (vanEgelsdorp e Meixner, 2010; de Castro et al., 2020). Soma-se a isso a incerteza quanto a relevância dos dados de estudos utilizando quantidades superiores a concentrações campo-realistas (Blacquiére, 2012), de modo que investigações aliando efeitos subletais com menores concentrações são prementes e representam mais fielmente situações de campo.

O indoxacarbe é um agrotóxico foliar com propriedade inseticida neurotóxica, sendo o único representante comercial das oxadiazinas, aplicado no controle de amplo espectro de pragas Lepidoptera e Coleoptera, sendo ativo por contato e ingestão (Wing et al., 1998; Wing et al., 2000; Dinter, 2000; Dong, 2007). Esse inseticida é considerado seguro para insetos não-alvos e benéficos (Wing et al., 1998; Dinter, 2000) e utilizado nas culturas de acelga, agrião, algodão, almeirão, ameixa, batata, brócolis, couve, couve-flor, chuchu, jiló, maçã, manga, maxixe, melão, melancia, milheto, milho, mostarda, nectarina, pera, pêssego, pepino, pimentão, quiabo, repolho, rúcula, soja, sorgo, tomate, uva, etc (Avatar®).

O indoxacarbe é o primeiro bloqueador de canais de Na⁺ do tipo pirazolina comercializado (Wing et al., 1998), criado através do aperfeiçoamento da pirazolina quanto à seletividade a organismos não-alvos, a eficácia inseticida e segurança para o meio ambiente (McCann et al., 2001). Consiste em um pró-inseticida que necessita de bioativação por esterase ou amidase resultando na formação do metabólito inseticida *N*-carbocaretoxilado, capaz de se ligar e bloquear os canais de sódio dependente de voltagem das membranas neuronais (Wing et al., 1998; Wing et al., 2000; Dong, 2007). Embora atue sobre canais de sódio como DDT e piretróides, seu modo de atuação é distinto, o que tem justificado seu uso em programas de manejo de resistência de pragas dado o crescente aumento de resistência de muitos insetos com status de praga ao DDT, ao efeito knockdown dos piretróides, entre outros, apresentando menor probabilidade de resistência cruzada (Wing, et al., 2000; Dong, 2007; Lapied et al., 2009, Afzal et al., 2015; 2019).

Por ser neurotóxico a ação primária do indoxacarbe é no sistema nervoso dos insetos. O sistema nervoso central é composto pelo cérebro, cadeia nervosa ventral e o sistema estomogástrico. No cérebro, os corpos celulares dos neurônios situam-se periféricamente constituindo as regiões de somata, algumas recobertas por folhetos gliais, enquanto o interior é ocupado por axônios e dendritos, regiões denominadas de neurópilas, onde são encontrados células gliais esparsas (Chapman, 2013). O cérebro das abelhas é dividido em tritocérebro, protocérebro e deutero cérebro. Suas principais estruturas são os lóbulos antenais, que constituem o deutero cérebro, e o complexo central, os nervos dos ocelos, os lóbulos acessórios laterais, os lóbulos ópticos e os corpos cogumelares, que constituem o protocérebro. Nos corpos cogumelares se encontram a região de somata contendo as células Kenyon e região de neurópila denominada cálice (Cruz-Landim, 2009).

Embora o intestino médio não seja o órgão-alvo da ação primária da maioria dos pesticidas, efeitos adversos já foram relatados em insetos (Fiaz et al., 2018a, 2018b; Martínez et al., 2019; Santos-Junior et al., 2020), inclusive *A. mellifera* (Cruz et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Catae et al., 2018; Carneiro et al., 2019; de Castro et al., 2020). Isso se deve por ser o canal alimentar o primeiro órgão a entrar em contato com inseticidas por via oral que, com exceção daqueles baseados em proteínas de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, precisam atravessar a barreira intestinal para alcançar seus alvos dentro da hemocele - usualmente nos tecidos nervoso ou muscular. O intestino médio em abelhas também é chamado de ventrículo, sendo o principal local de penetração de inseticida por via oral (revisado por Denecke et al., 2018), constituindo-se um órgão não-alvo de indoxacarbe. Dentre suas funções desempenha a digestão e absorção de nutrientes (Caccia, S., 2019),

regeneração celular (Lehane & Billingsley, 2012), defesa contra patógenos (Terra et al., 2001), detoxificação de compostos xenobióticos (Fiaz et al., 2018a, Martínez et al., 2019) sendo esta última função comprovada e importante em *A. mellifera* na detoxificação de agrotóxicos contidos no alimento coletado (Kiljanek et al., 2016).

De modo semelhante, o corpo gorduroso é um órgão não-alvo para neurotóxicos que apresenta capacidade de detoxificação (Gong, & Diao, 2017), e no qual já se verificou efeitos adversos em insetos causados por pesticidas (Almeida, 2014; Cossolin et al., 2019; Dutra, 2019). Ele é um tecido composto por células de origem mesodérmica, os trofócitos, entre os quais se encontram entremeadas células de origem ectodérmica, os enócitos (Cruz Landim, 2009). Desempenha um papel importante na endocrinologia, nutrição e na reprodução dos insetos (Büyükgüzel, et al., 2013; revisado por Li et al., 2019), e possui importante função na detoxificação (Büyükgüzel et al., 2013; Gong & Diao, 2017). Em abelhas possui múltiplas funções sendo a sede central do metabolismo intermediário e reserva de nutrientes, armazenando grande quantidade de lipídeos, carboidratos na forma de glicogênio, proteínas e são responsáveis por sintetizar grande parte das proteínas da hemolinfa (Cruz Landim, 2009; revisado por Arrese & Soulages, 2010; Li et al., 2019).

Distúrbios no intestino médio, no corpo gorduroso e cérebro podem, portanto, levar a importantes alterações letais e subletais na fisiologia e, mesmo, no comportamento das abelhas, afetando a capacidade de forrageamento, assim como de proteger e realizar a manutenção da colônia, afetando sua viabilidade (Blacquiere et al., 2012). Devido a relevância ambiental e econômica das abelhas, é fundamental compreender os efeitos tóxicos dos pesticidas no nível subindividual para fornecer subsídios teóricos para uma compreensão superior das alterações fenotípicas em níveis individual, de colônia e populacional (revisado por Lundin et al., 2015), a fim de melhor elucidar a relação causal entre pesticidas e seus usos com o declínio global de abelhas.

Este estudo objetivou descrever e explicar a toxicidade e os efeitos histológicos agudos e crônicos causados pelo inseticida indoxacarbe no intestino médio, cérebro e corpo gorduroso de operárias da abelha *Apis mellifera*.

2- Material e Métodos

Insetos

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram obtidas no mesmo dia de quadros de cria adquiridos de três colônias em boas condições no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Cada colônia foi criada e manipulada em caixas Langstroth contendo ninho e sobreninho com quadros de crias e quadros com mel, e com rainhas novas com idades semelhantes. As operárias coletadas foram mantidas em gaiola plástica transparente de uso único com 1000 cm³ a 34 °C e 50%-70% de umidade relativa, alimentadas com mel e pólen fermentado, pelo período de três dias anteriores aos experimentos. Apenas abelhas operárias sem amputações, malformações e dificuldades de caminamento foram utilizadas.

Bioensaio de concentração-mortalidade

O inseticida Indoxacarbe (Avatar® EC, 150 g L⁻¹, DuPont do Brasil AS., Alphaville, SP, Brasil) foi diluído em água destilada contendo 50% (m/v) de sacarose. Seis concentrações (2,28; 4,57; 9,15; 18,3; 36,6; 73,2 mg L⁻¹) foram obtidas para avaliar a toxicidade aguda e determinar os pontos toxicológicos relevantes, seguindo a relação concentração–mortalidade e as concentrações letais (CL) com esse inseticida. Solução de sacarose com água destilada 50% (m/v) foi usada no controle. Trinta abelhas foram confinadas em grupos de 10 indivíduos em recipientes de plástico transparente de uso único com 100cm³ e utilizadas por concentração, totalizando três repetições por concentração advindas de colônias distintas. O número de abelhas mortas foi contabilizado por 24 horas após exposição à indoxacarbe. As abelhas foram consideradas mortas constatando-se inexistência de movimento quando repetidamente estimuladas por pinças. Os dados de concentração–mortalidade foram submetidos à análise probit, gerando uma curva concentração–mortalidade (Finney 1964) e analisados com o programa de computador SAS para Windows v. 9.0. (SAS Institute 2002).

Histologia

Um total de 400 operárias foram coletadas, das quais 100 foram submetidas a exposição aguda de 24 h com CL₅₀ e 100 submetidas a exposição crônica por 8 dias com CL₅ diluída 100 vezes, ambas administração *per os* em solução de sacarose com água destilada 50% (m/v), enquanto 100 abelhas foram utilizadas como controle para a exposição aguda e outras 100 para a exposição crônica. Após o período de exposição de cada tratamento, cinco abelhas

vivas foram escolhidas aleatoriamente em cada tratamento e controle, e crioanestesiadas a -5°C por cinco minutos. Em seguida, o intestino médio, o corpo gorduroso parietal e o cérebro foram dissecados em solução salina para insetos ($0,1\text{ M NaCl} + 0,1\text{ M KH}_2\text{PO}_4 + 0,1\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$), ato contínuo, transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 48 h à 5°C . As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio $0,1\text{ M pH } 7,2$ (PBS), desidratadas em série crescente de etanol (70, 80, 90, 95 e 99%) e embebidas em historesina Leica (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Alemanha). A seguir, seções com $3\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram obtidas, coradas com hematoxilina e eosina, sendo analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão).

3- Resultados

Bioensaio de concentração-mortalidade

O modelo de concentração–mortalidade utilizado foi adequado ($P > 0,05$), confirmando a toxicidade de indoxacarbe para *A. mellifera* e permitindo estimar os parâmetros toxicológicos (Tabela 1; Figura 1). A mortalidade no grupo controle foi menor que 5%.

Tabela 1. Concentrações letais do indoxacarbe sobre *Apis mellifera* após 24 horas de exposição obtidas da análise probit (g.l. = 5, inclinação \pm EP = 2,448 \pm 0.59, intercepto = 2,712).

No. de insetos	Concentração letal	Concentração estimada (mg L ⁻¹)	95% Intervalos confidenciais (mg L ⁻¹)	χ^2 (Valor P)
30	CL ₂₅	3.25	2.81-3.59	
30	CL ₅₀	4.12	3.76-4.49	6.4296
30	CL ₇₅	5.22	4.79-5.88	(0.26)
30	CL ₉₀	6.62	5.89-7.99	

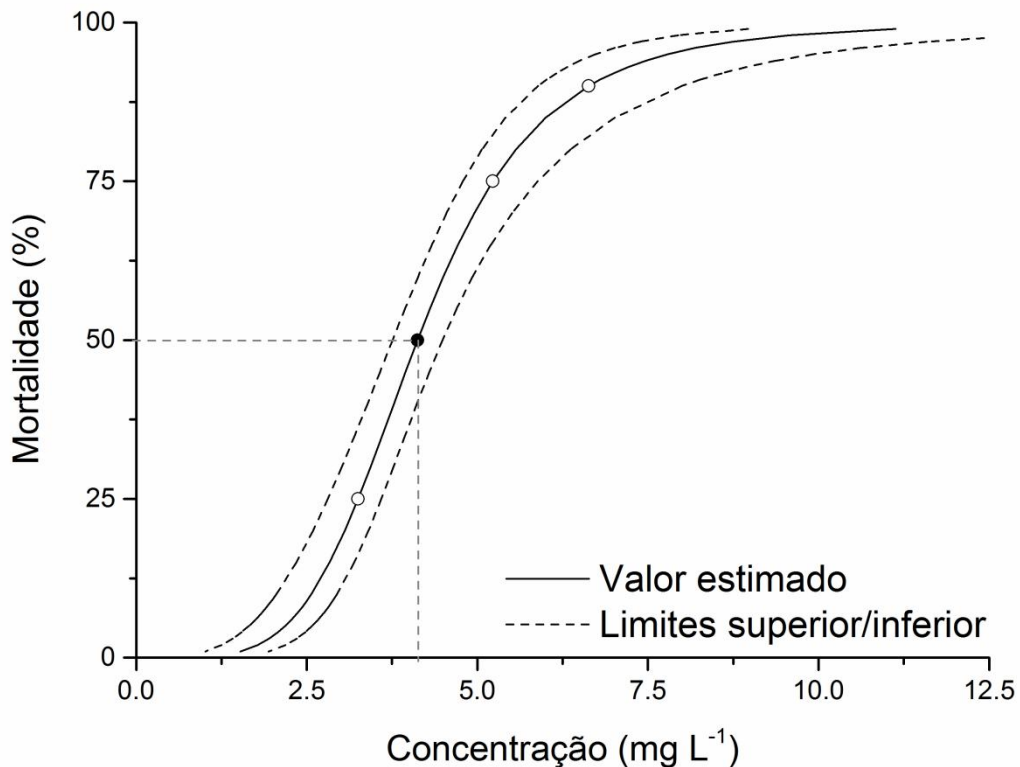


Gráfico 1. Curva de mortalidade de *Apis mellifera* causada por indoxacarbe para diferentes concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀) ($\chi^2 = 6.4296$; g.l. = 5; $P > 0.2666$). Ponto preto representa a concentração CL₅₀ e pontos brancos representam CL₂₅, CL₇₅ e CL₉₀. Linhas pontilhadas denotam intervalos de confiança de 95 %.

Histologia

Intestino Médio

Os intestinos médios de operárias de *A. mellifera* do grupo controle caracterizam-se por um epitélio de revestimento simples com células digestivas colunares dotadas de núcleo esferoide e borda estriada apical bem desenvolvida. Próximo ao ápice das células digestivas ocorrem diversas camadas de matriz peritrófica no lúmen, enquanto abaixo da base celular ocorreram células musculares adjacentes ao epitélio (Fig. 1 A-B). Ninhos de células regenerativas foram observadas na base do epitélio contendo células que se caracterizam pelo pequeno tamanho, núcleo esférico e ausência de contato com o lúmen

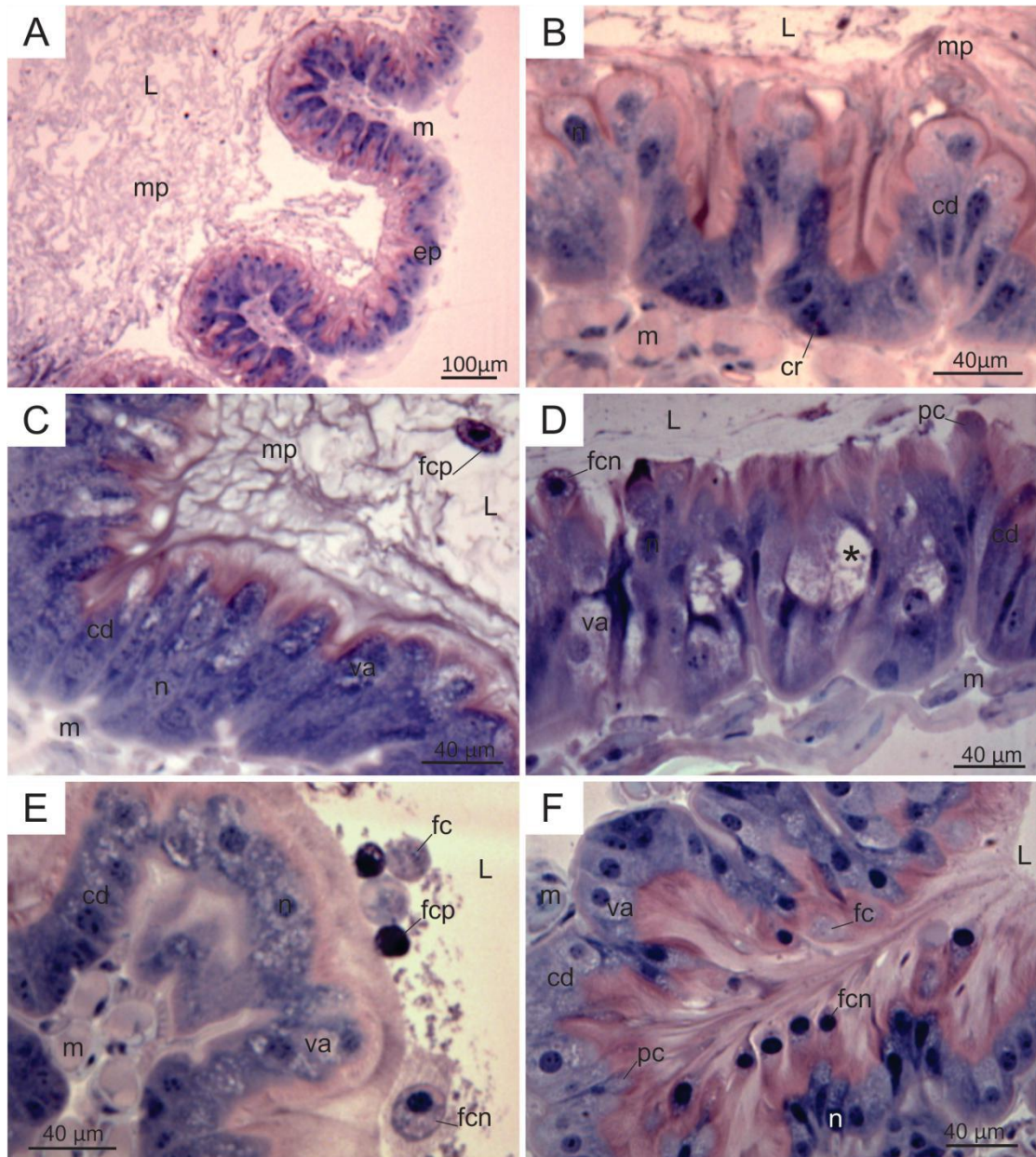


Figura 1. Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera*. A-B: grupo controle. A) Porção posterior mostrando o epitélio (ep), camadas da matriz peritrófica (mp) no lúmen (L) e camadas musculares (m). B) É possível notar o epitélio mostrando células digestivas (cd) e ninho de células regenerativas (cr). C-D: tratamento agudo com CL₅₀ de indoxacarbe. C) células digestivas (cd) com aumento de vacúolos (va), fragmento celular com núcleo picnótico (fcp) liberado no lúmen (L) contendo camadas de matriz peritrófica (mp). D) Epitélio com forte vacuolização (va) e desarranjo celular (*), ocorrência de protusões apicais (pc) e presença no lúmen de fragmentos celulares com núcleo (fcn); notar ausência de matriz peritrófica. E-F: tratamento crônico com CL_{5/100} de indoxacarbe. E) Epitélio com fragmentos celulares nucleados (fcn) e anucleados (fc) no lúmen (L) sem matriz peritrófica e citoplasma com vacúolos (va). F) Epitélio com protusões citoplasmáticas, células digestivas (cd) com vacuolização citoplasmática(va) e com muitos fragmentos celulares nucleados (fcn) e anucleados (fc) no lúmen (L).

do órgão (Fig. 1 B). Não houve diferenças relevantes entre os controles dos testes de exposição aguda e crônica.

As operárias de tratadas com exposição aguda a CL_{50} (4, 12 $mg L^{-1}$) de Indoxacarbe mostram o epitélio do intestino médio com aumento na vacuolização citoplasmática (Fig. 1 C-D), algumas regiões com desarranjo citoplasmático e epitelial (Fig. 1 D), protusões citoplasmáticas apicais (Fig. 1 D), aumento da eliminação de fragmentos celulares (Fig. 1 C-D) com alguns fragmentos celulares contendo núcleo picnótico (Fig. 1 C), regiões com síntese de matriz peritrófica (Fig. 1 C) e outras com ausência dessa matriz (Fig. 1 D).

No tratamento crônico com $CL_{5/100}$ (0,0218 $mg L^{-1}$), os intestinos médios das operárias apresentaram maior vacuolização (Fig. 1 E-F) e protusões citoplasmáticas com aumento da eliminação de fragmentos celulares (Fig. 1 E-F). Alguns fragmentos celulares apresentaram núcleo, sendo alguns picnóticos (Fig. 1 E).

Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso parietal de *A. mellifera* do grupo controle do tratamento de 24h apresentou histologia normal() com aspecto de cordão filamentososo com trofócitos com forma irregular contendo grandes e pequenas inclusões lipídicas esféricas e núcleo amebóide volumoso com cromatina descondensada e vários nucléolos (Fig. 2A). Alguns enócitos com citoplasma homogêneo e núcleo esférico ocorreram associados ao corpo gorduroso (Fig. 2A). No controle do tratamento de oito dias os trofócitos apresentaram poucas inclusões lipídicas pequenas e enócitos com citoplasma homogêneo e núcleo esférico (Fig. 2C).

No tratamento com exposição aguda a CL_{50} (4,12 $mg L^{-1}$) de indoxacarbe, as células do corpo gorduroso apresentaram citoplasma desorganizado contendo inclusões lipídicas com formas irregulares e maiores em relação ao controle (Fig. 2B). Nas operárias de *A. mellifera* submetidas ao tratamento crônico com $CL_{5/100}$ (0,0218 $mg L^{-1}$), os trofócitos apresentaram poucas inclusões lipídicas pequenas e regulares (Fig. 2D), não havendo diferença com o controle crônico (Fig. 2C).

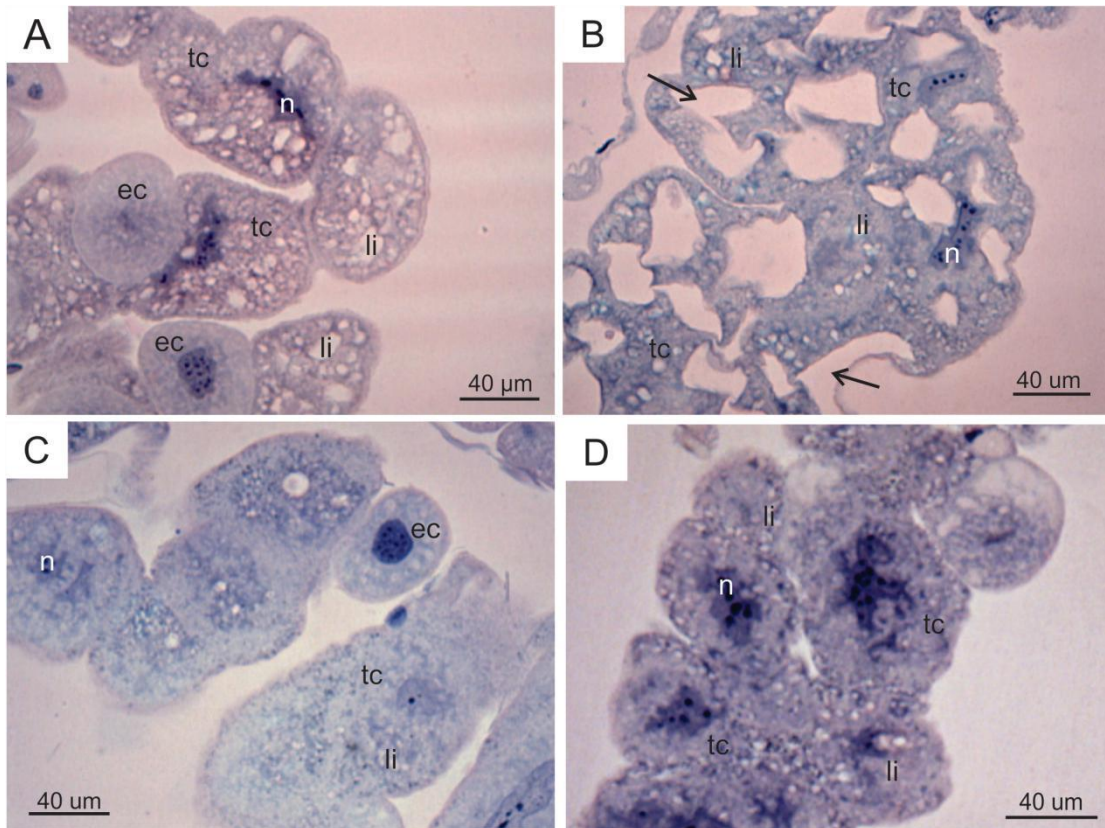


Figura 2. Fotomicrografias do corpo gorduroso parietal de *Apis mellifera*. A: grupo controle do tratamento agudo de 24h. B: tratamento agudo com CL₅₀ de indoxacarbe. C: grupo controle do tratamento crônico de oito dias. D: tratamento crônico com CL_{5/100} de indoxacarbe. A) filamento de trofócitos (tc) e enócitos (ec) entremeados. Os trofócitos contendo inclusões lipídicas regulares (li) e núcleo amebóide(n), e os enócitos com citoplasma homogêneo e núcleo esférico. B) trofócitos com inclusões lipídicas, com algumas irregularidades e maiores (seta). C) filamento de enócitos (ec) e trofócitos (tc) com pequenas inclusões lipídicas(li) regulares e núcleo amebóide (n). D) filamento de trofócitos (tc) com pequenas inclusões lipídicas (li) e núcleo amebóide (n).

Cérebro

No cérebro, as operárias submetidas às exposições aguda e crônica de Indoxacarbe mostraram alterações em relação ao controle no nos lobos antenais (deuterocérebro) e nos corpos cogumelares do plano médio e em região de neurópila dos planos anteriores (protocérebro).

Os lobos antenais do grupo controle apresentaram a região de somata com corpos celulares dos neurônios com núcleo esférico com cromatina descondensada e nucléolo evidente, e algumas lacunas intercelulares (Fig. 3 A). A região de neurópila foi homogênea com algumas lacunas e células da glia (Fig. 3 A,B). Nas operárias submetidas ao tratamento agudo com a CL₅₀ de Indoxacarbe, a neurópila teve aumento na quantidade de lacunas, mas com a região de somata sem alterações em relação ao controle (Fig. 3 C-D). Os lobos antenais das operárias expostas cronicamente a CL_{5/100} de Indoxacarbe apresentou aumento na

quantidade e no tamanho das lacunas na região de neurópila em relação ao controle (Fig. 3 E-F).

As regiões de neurópila dos planos anteriores do protocérebro apresentam alterações dos tratamentos em relação aos controles, de modo que se optou por apresentar a neurópila do lobo acessório lateral adjacente ao pedúnculo dos corpos cogumelares como referência para localização e para representar o estado geral da região e seus vários planos anteriores. Essas neurópilas do grupo controle apresentaram algumas lacunas e células da glia (Fig. 4 A). Tanto as neurópilas do tratamento agudo (CL₅₀) quanto as do crônico (CL_{5/100}) apresentaram grande aumento na quantidade e na extensão das lacunas(Fig. 4 B-C).

Os corpos cogumelares do grupo controle apresentaram a região de somata contendo os corpos celulares das células Kenyon com núcleo esférico e poucos nucléolos, dividindo-se em duas subpopulações, a saber, as células compactas e as células não compactas internas; e a região de cálice, uma neurópila contendo lacunas e células da glia (Fig. 5 A). Os corpos cogumelares das abelhas tratadas com Indoxacarbe apresentaram intensificação das lacunas na região do cálice (Fig.5 B-C) na exposição aguda, enquanto no tratamento crônico ocorreram regiões de desestruturação da somata (Fig. 5 C).

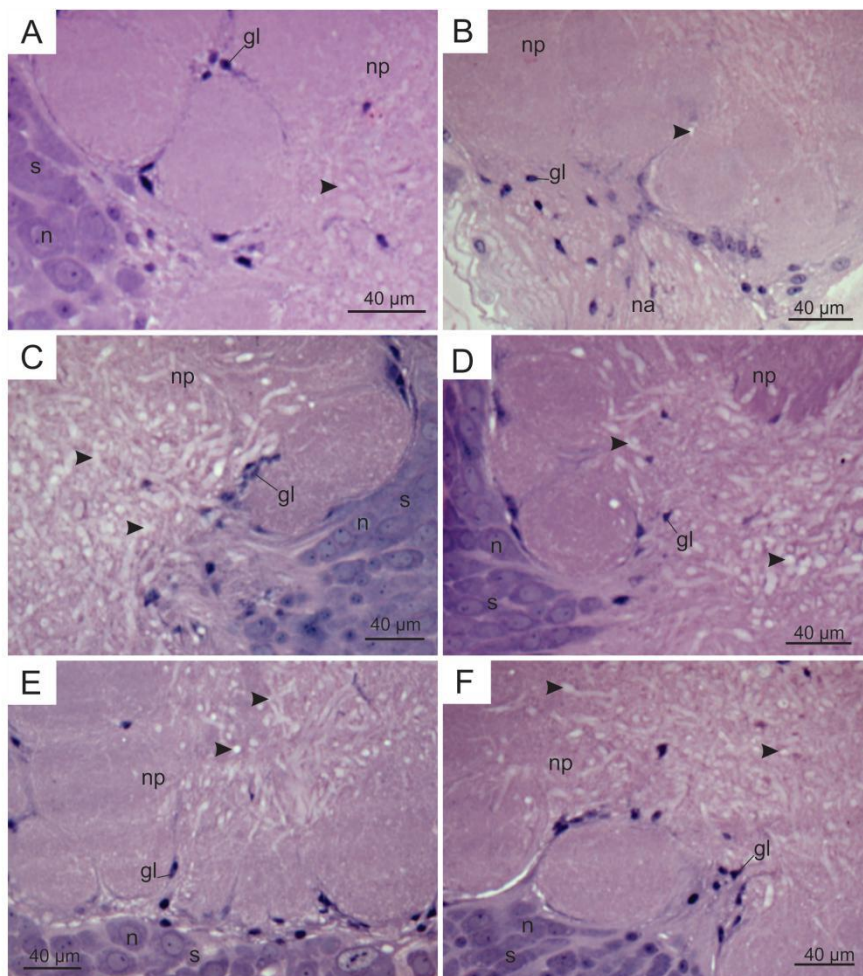


Figura 3. Fotomicrografias do plano médio do lobo antenal de *Apis mellifera*. A-B: grupo controle. Notar região de neurópila(np) e região de somata(S). Presença de lacunas(cabeça de seta) e células gliais(gl). Em B há porção do nervo antenal (na). C-D: tratamento agudo de indoxacarbe, com lacunas e alguns agrupamentos gliais. E-F: tratamento crônico com lacunas, células gliais e em F com agrupamentos gliais. n: núcleo.

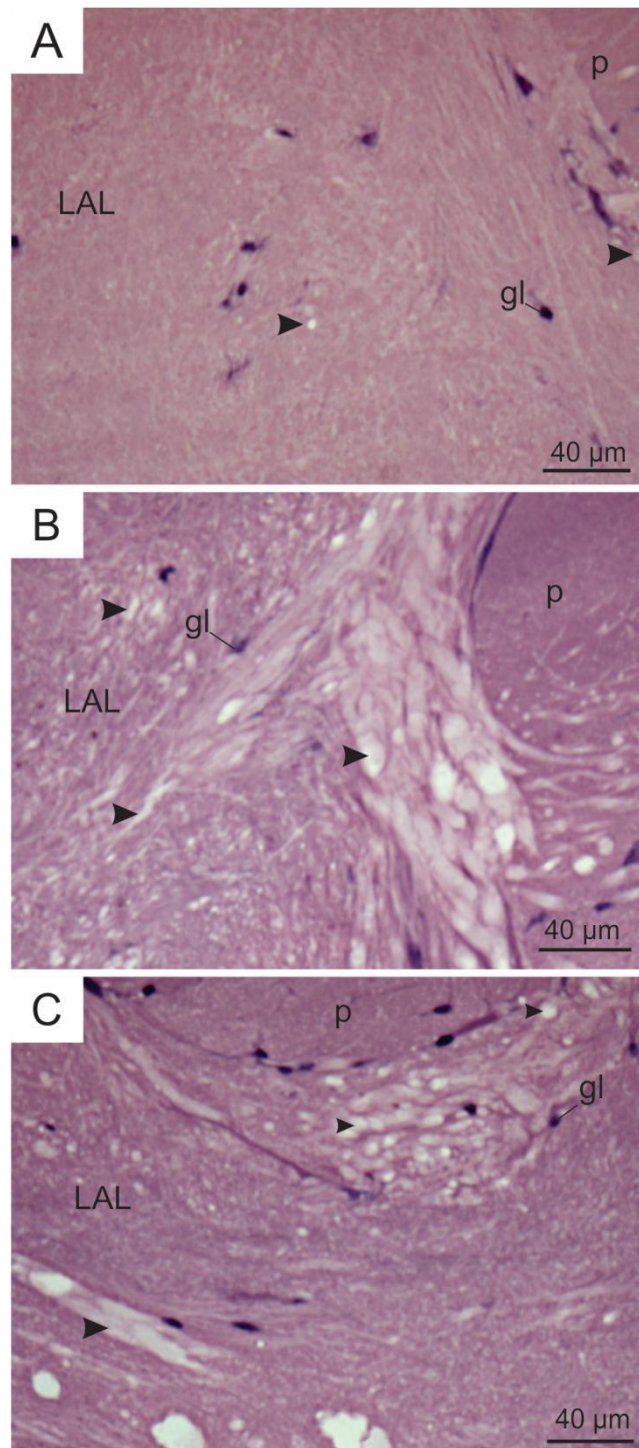


Figura 4. Fotomicrografias do plano anterior do lobo acessório lateral de *Apis mellifera*. A: grupo controle. B: tratamento agudo com CL₅₀ de indoxacarbe. C: tratamento crônico com CL_{5/100} de indoxacarbe. A) Controle com algumas lacunas (cabeça de seta) e células gliais (gl). B) Tratamento agudo com lacunas aumentadas (cabeça de seta) e células gliais (gl). C) Tratamento crônico com lacunas aumentadas (cabeça de seta) e células gliais (gl). Notar o pedúnculo dos corpos cogumelares (p). Lobo acessório lateral(LAL).

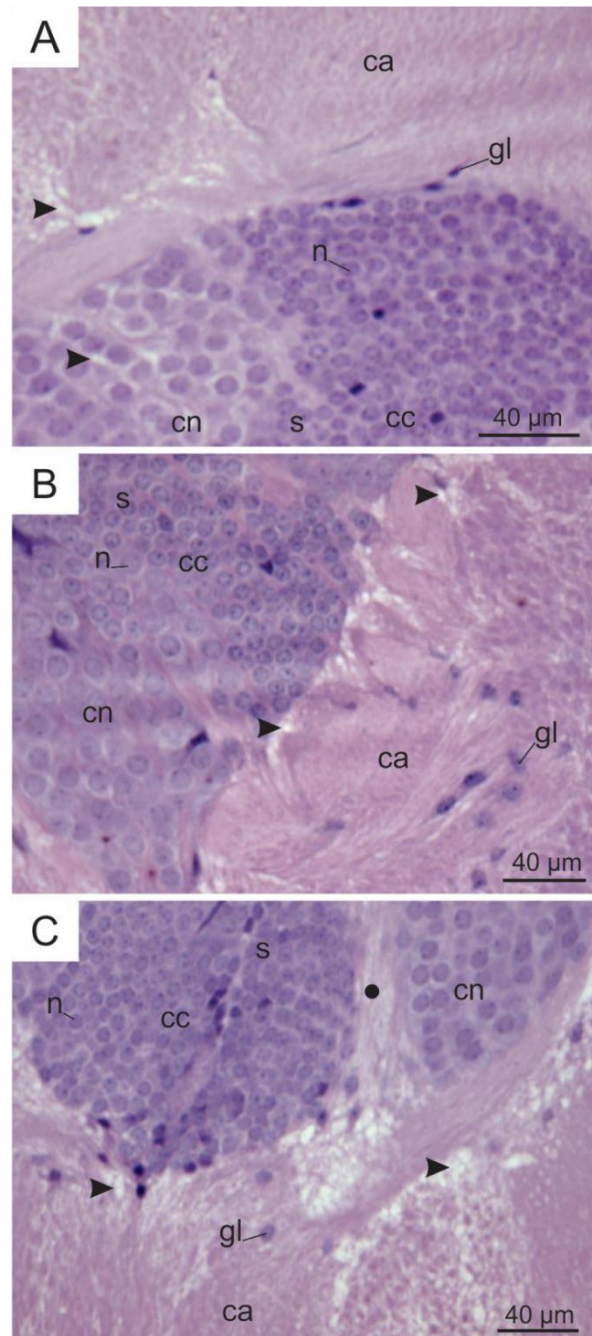


Figura 5. Fotomicrografias do plano médio dos corpos cogumelares de *Apis mellifera*. A: grupo controle. B: tratamento agudo com CL₅₀ de indoxacarbe. C: tratamento crônico com CL_{5/100} de indoxacarbe. A) grupo controle com somata(S) e cálice(ca). Somata contém região de células compactas(cc) com núcleo(n) mais condensado e esférico e região de células não compactas internas(cn) com núcleo(n) descondensado. O cálice(ca) com células gliais(gl) de núcleo condensado. Notar presença de algumas lacunas (cabeça de seta). B) tratamento com CL₅₀ contendo na somata(S) região com células compactas(cc) e células não compactas internas(cn). O cálice(ca) apresenta lacunas(cabeça de seta) e células gliais com núcleo descondensado. C) tratamento com CL_{5/100} com somata(S) contendo região de células compactas(cc) e região de células não compactas internas(cn), além de região de desestruturação da somata(círculo preto). O cálice(ca) apresenta lacunas(cabeça de setas) e células gliais(gl) com núcleo descondensado.

4- Discussão

Os resultados obtidos mostram que o indoxacarbe é tóxico e apresenta letalidade para abelhas *A. mellifera*. Tal fato é preocupante, uma vez que já foi identificado em *A. mellifera*, “beebread” e cera contaminadas com resíduos de indoxacarbe, confirmando a ocorrência de exposição e contaminação das abelhas (Kasiotis et al., 2014; Simon-Delso et al., 2014), sendo as concentrações em abelhas a melhor medida de exposição e biodisponibilidade de pesticidas para contaminação (Chauzat, 2011; Blacquiere et al., 2012). Essas contaminações podem gerar letalidades primárias e secundárias, uma vez que abelhas realizam trofalaxia, o que coloca em risco a saúde das colônias (Rortais et al., 2005; Cruz-Landim, 2009; Buczkowski et al., 2008). As concentrações letais medianas (CL₅₀) para as populações de abelhas podem ser inferiores a apresentadas neste estudo devido à possibilidade dessas abelhas terem tempos de exposição superiores a 24h. De modo semelhante, a CL₅₀ e inclinações de curva concentração-mortalidade para as populações podem variar em decorrência da idade, clima, fatores de estresse, colônia, variação genética e subespécie. Concentrações letais diferentes tem sido reportadas entre *A. mellifera* africanizadas, *A. mellifera scutellata*, *A. mellifera mellifera* com outros inseticidas (Suchail et al., 2000, 2001; Guez et al., 2003; Rinkevich et al., 2015), assim como tem se encontrado variações na absorção e acumulação em uma mesma população que se acredita serem causadas, pelo menos em parte, pelo processo de trofalaxia ou o estado nutricional (Nauen et al., 2001). A letalidade proporcionada pelo indoxacarbe é particularmente preocupante, uma vez que a baixa densidade das populações das colmeias ocasionam efeito Allee deletério e comprometem a viabilidade da colmeia, enquanto concentrações subletais podem somar a outros fatores de estresse para configurar síndromes de estresse, atuando conjuntamente e de modo deletério ao efeito Allee na CCD (vanEngelsdorp et al 2009; Henry et al., 2012; Goulson et al., 2015; Dennis & Kemp, 2016; Booton et al., 2017).

Embora existam estudos quanto a toxicidade de indoxacarbe em *A. mellifera* (Heylen et al., 2011), este é o primeiro a investigar a histopatologia de seus danos agudos letais e crônicos subletais em órgão alvo (cérebro) e no intestino médio e corpo gorduroso como órgãos não-alvos. Nos intestinos médios de *A. mellifera* a histologia das regiões anterior e mediana foi semelhante entre os grupos controle e tratados, enquanto as células digestivas da porção posterior tratadas com exposição aguda CL₅₀ e crônica CL_{5/100} apresentaram sintomas decorrentes da ação do pesticida como intensa vacuolização, interferência na síntese de matriz peritrófica, núcleo picnótico e intensificação das protusões citoplasmáticas e eliminação

celular, enquanto no tratamento agudo ainda ocorre grave desarranjo epitelial. Esses resultados foram encontrados provavelmente devido à presença de esterase não específica nos lisossomos primários localizados apicalmente nas células digestivas do intestino médio (Jimenez & Gilliam, 1990), pois esterase é uma das classes de enzimas fundamentais para a bioativação do pro-inseticida indoxacarbe em *N*-carbocaretoxilado (Wing et al., 1998; 2000; Dong, 2007).

As abelhas são dotadas de um sistema de detoxificação no metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos (Feyereisen 2005 , 2012), onde as principais super famílias de enzimas que atuam na detoxificação de toxinas são carboxilesterases (COEs) (fase I), glutathione transferase (GSTs) (fase I ou II) e monooxigenases do citocromo P450 (P450s) (fase I) (Feyereisen, 2005; Xu et al. 2013). Diversos estudos apontam a atuação das famílias das enzimas P450, COE ou GST na detoxificação/biotransformação de pesticidas (Feyereisen, 1999; Claudianos et al. 2006; Johnson et al. 2006; Li et al., 2006; Mao et al. 2011; Meech et al., 2012; Xu et al. 2013; Gong & Diao, 2017). Todavia, já foi reportado que os processos de detoxificação podem não ser capazes de impedir toxicidade de pesticidas em alguns órgãos de insetos (Martínez et al., 2018; Santos-Junior et al., 2019). De fato, isso tem sido sugerido também em *A. mellifera* a fim de explicar danos histopatológicos e citotóxicos em diversos órgãos, incluindo o intestino médio (Oliveira et al., 2014; Catae et al, 2018; Carneiro et al., 2019). Assim, é provável que o balanço entre absorção, bioativação e desintoxicação não tenha gerado danos histopatológicos detectáveis pela microscopia de luz utilizado neste estudo, tanto na porção anterior quanto na média do ventrículo, embora tenha ocorrido danos severos na porção posterior. Resultado semelhante foi encontrado na exposição de *A. mellifera* ao piretróide lambda-cialotrina, com sintomas de toxicidade apenas na região posterior do ventrículo (de Castro et al., 2020). A maior capacidade de absorção dessa porção do órgão (Jimenez & Gilliam, 1990) pode ter gerado um desbalanço na quantidade de indoxacarbe absorvido, bioativado e detoxificado de modo que o sistema de biotransformação não foi capaz de compensar totalmente. Isso sugere que, embora se desconheça ainda o exato mecanismo de transporte do indoxacarbe e *N*-carbocaretoxilado pelo epitélio intestinal para alcançar a hemocele, podendo ocorrer via paracelular e via intracelular por meio de proteínas transportadoras e, ou, difusão transcelular (Denecke et al., 2018), pelo menos parte do pesticida passa por via intracelular entrando em contato com esterases para ser bioativado e exercer sua toxicidade nas células digestivas.

O aumento das protusões citoplasmáticas e eliminação celular tanto no tratamento agudo quanto no crônico com indoxacarbe, provavelmente representa um mecanismo de eliminação

de elementos desgastados quanto a fragmentos celulares anucleados. Já os fragmentos celulares nucleados indicam descarte de células na qual a morte celular programada foi desencadeada pelos danos decorrentes da ação do pesticida ao atingirem níveis críticos. A eliminação celular, também chamada de derrame celular (Hakim et al., 2010), é um processo natural, mais frequente na porção anterior do intestino médio (Cruz-Landim et al., 1996b), pelo qual as células digestivas desgastadas são eliminadas para a luz do órgão, onde a pressão decorrente da diferenciação pelas células regenerativas é um fator de contribuição e explica o processo de reposição da célula digestiva perdida, respondendo dinamicamente ao processo digestivo e de desgaste celular nos insetos (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996). A gradual eliminação da parte apical celular por meio de fragmentos celulares, alguns com núcleo, também tem sido associada com a morte celular programada (Jimenez & Gilliam, 1989).

Os fragmentos celulares com núcleo picnótico são indicativos que a eliminação celular por desgaste pode ser desencadeada por eventos celulares envolvendo danos distintos decorrentes do tóxico, uma vez que nem todos os fragmentos nucleados apresentaram condensação da cromatina, sendo a picnose de núcleos um fenótipo irreversível descrito em órgãos em degeneração nos himenópteros (Gregorc & Bowen 1996; Cruz-Landim & Cavalcante 2003; Silva-Zacarin et al. 2007; Cruz et al., 2010). O núcleo picnótico também relaciona a eliminação celular com a morte celular programada através da caracterização usual da condensação de cromatina no processo de apoptose (Kerr et al. 1972; Hiramane, 1997; Donan & Cotter, 2008; Cooper et al., 2009). Para alguns autores, a eliminação celular em abelhas constitui-se propriamente uma apoptose, denominando os fragmentos celulares de corpos apoptóticos (Jimenez & Gilliam, 1990) como também é defendido em mosquito *Culex pipiens* (Vaidyanathan & Scott, 2006). Todavia, outros autores consideram esse um processo à parte, assim, junto à apoptose e a morte celular autofágica, constituiria um conjunto de modos de morte celular programada pela qual o intestino médio de insetos elimina as células desgastadas ou mesmo infectadas de modo dinâmico e controlado por endócrinos e parácrinos (Hakim et al., 2010). Embora exista discordância quanto à interpretação de a eliminação celular ser ou não apoptose, não há divergência quanto à sua natureza como uma morte celular programada, segundo os critérios sugeridos pelo Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular - Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death (2005; 2009). É provável que os núcleos picnóticos tenham se condensado previamente à eliminação devido à irreversibilidade dos danos celulares, porém não foram observadas células digestivas com núcleos picnóticos evidentes, possivelmente em

decorrência de suas rápidas eliminações. A intensificação do número de protusões citoplasmáticas e da eliminação celular pode ainda representar um mecanismo histológico de desintoxicação por meio da eliminação do tóxico carregado com as porções citoplasmáticas para o lúmen (Malaspina & Zacarin, 2006; Oliveria et al., 2009; Oliveira, et al., 2014, Martínez et al., 2018; Santos-Junior et al., 2019). Estudos com fragmentos celulares em abelhas adultas indicam presença de fosfatase ácida apontando alto conteúdo lisossômico em fragmentos celulares (Cruz-Landim et al., 1996), o que sugere possível participação em processos autofágicos citoplasmáticos ou restos resultantes de tais processos pretéritos, o que está em acordo com a eliminação de porções celulares desgastadas. Entretanto, investigações de fragmentos celulares anucleados não indicaram evidências na ultraestrutura de autofagia (Cruz-Landim et al., 1996), o que pode ser explicado pela inexistência de pesquisas ultraestruturais focadas nos fragmentos celulares em abelhas e outros insetos que foram tratados com pesticidas.

Eliminação celular no intestino médio de *A. mellifera* ocorre quando elas são expostas a pesticidas como os neurotóxicos de ação excitatória fenil-pirazol fipronil (Cruz et al., 2010) e neonicotinóide thiametoxan (Oliveira et al., 2014), assim como pelo inseticida inorgânico ácido bórico cujo o modo de ação ainda é pouco conhecido (Cruz et al., 2010); todos por exposição *per os*, não havendo um padrão causal quanto ao mecanismo de ação, uma vez que apresentam toxicodinâmica distinta. Esse fenômeno histopatológico decorrente da ação de tóxico não é restrito a *A. mellifera*, tendo sido observado em hemíptera *Podisus nigrispinus* (Martínez et al., 2018), díptera *Aedes aegypti*, *Anopheles albitalarsis*, *Culex quinquefasciatus* (Oliveria et al., 2009) e lepidoptera *Spodoptera frugiperda* (Roel et al., 2010).

A intensificação da vacuolização citoplasmática como resposta celular no intestino médio tem sido relatada em diversos insetos como resposta à exposição aos pesticidas carbaril, paration, DDT (Topozada A. et al., 1968), óleo de nim (Roel et al., 2010), esquamocina (Fiaz et al., 2018a), tebufenozide (Fiaz et al., 2018b), permetrina (Martínez et al., 2018), imidaclopride (Martínez et al., 2019) e espinosade (Santos-Junior et al., 2020), assim como foi observado em outros órgãos não alvos em insetos (Sree & Padmaja, 2008; Sharaby, 2013; Veeran, 2017; Santos-Junior et al. 2019). Em *A. mellifera*, a intensificação da vacuolização já foi relatada no intestino médio em resposta aos inseticidas fenil-pirazol fipronil (Cruz et al., 2010), neonicotinóides thiametoxan (Oliveira et al., 2014), imidaclopride (Catae et al., 2018), o ácido bórico (Cruz et al., 2010), o fungicida iprodione (Carneiro et al., 2019), e poluentes organofosforados (El-Saad et al., 2017), além de ocorrer em outros órgãos (Almeida Rossi et al., 2013a; Lopes et al., 2017).

A quase ubiquidade da vacuolização na histopatologia de órgãos afetados por tóxicos, sejam órgãos-alvos ou não, torna a vacuolização um importante candidato à marcador celular de citotoxicidade (Malaspina & Zacarin, 2006). Isso se deve às funções que vacúolos podem assumir, pois apesar de serem estruturas comuns das células digestivas em intestino médio de abelhas (Cruz-Landim, 2009), podem se intensificar em células com processos autofágicos durante reciclagem e reorganização citoplasmática e de proteínas, assim como renovação de organelas celulares (Debnath et al., 2005; Alberts et al., 2014). Insetos expostos a agentes estressores tem degeneração de retículo endoplasmático e aumento da vacuolização, demonstrando vínculo entre autofagia e renovação de organelas desgastadas e estresse fisiológico e químico (Clarke, 1990; Lockshin and Zakeri, 2004; Rost-Roszkowka et al., 2008; Aki et al., 2012). O aumento de autofagia citoplasmática, dependendo do nível de dano, pode ativar respostas celulares como apoptose, morte autofágica e necrose (Levine & Yan, 2005; Tettamanti et al., 2007; Hakim et al., 2010; Liu & Levine, 2015), com a forte vacuolização gerando danos à membrana celular, desencadeando necrose (Rost-Roszkowka et al., 2008). Assim, a extrema intensificação da vacuolização decorrente da elevada concentração letal da exposição aguda ao indoxacarbe, portanto, pode ser o elo causal entre o agente estressor e a degeneração epitelial observada em algumas regiões com células intensamente vacuolizadas. A intensa vacuolização com progressão para morte celular é um fenômeno já relatado em *A. mellifera* expostas a iprodione (Carneiro et al., 2019), não sendo um fenômeno atípico, uma vez que a degeneração epitelial por pesticidas ocorre em outros insetos (Fiaz et al., 2018b; Martínez et al., 2018). A vacuolização também se relaciona a processos de desintoxificação, uma vez que em invertebrados é comum a precipitação de tóxicos em grânulos intracelulares para a eliminação do tóxico no lúmen intestinal (Chapman, 2013; Dutra, et al., 2019), sendo também um mecanismo celular de detoxificação.

A interrupção da produção de matriz peritrófica observada em algumas regiões do tratamento agudo possivelmente decorre da inviabilização da síntese devido ao expressivo dano nas células digestivas responsáveis por sua síntese (revisado por Terra, 2001), enquanto a exposição crônica, embora com concentração subletal, interrompeu a produção de matriz peritrófica ao longo do ventrículo. Ação de tóxicos alterando diretamente a matriz peritrófica ou inibindo síntese de quitina fundamantal para a matriz já foi verificado em insetos (Gusmão et al., 2002; Adel, 2012). A matriz peritrófica em *A. mellifera* é do tipo I (Teixeira et al., 2015) e atua como barreira de proteção entre o conteúdo do lúmen e o epitélio do intestino médio de agentes mecânicos, patogênicos, toxinas e tóxicos (Kuraishi et al., 2011; Fiandra et al., 2009; Walski et al., 2014; Silva et al., 2016; Denecke et al., 2018). Alguns autores

sugerem que parasitas e patógenos são os causadores diretos da CCD, sendo os pesticidas, inseticidas em particular, agentes indiretos na rede causal por estabelecerem um contexto de síndrome de estresse, pre-requisito para que as causas diretas da CCD gerem o colapso das colônias (Sanchez-Bayo et al., 2016). Essa hipótese torna o indoxacarbe um importante candidato estressor de abelhas; assim, a interrupção de síntese pode tornar o intestino mais susceptível a injúrias físicas e químicas, além de tornar as abelhas mais predispostas a infecções por patógenos por via oral, em um efeito de retroalimentação positiva no estresse ao órgão. Por fim, a matriz peritrófica é responsável por compartimentalizar estrutural e funcionalmente o lúmen estabelecendo o espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, em uma divisão importante na digestão dos alimentos (Terra, 2001; Hegedus, 2009), de modo que o indoxacarbe afeta gravemente a digestão alimentar mesmo em concentrações subletais. Junto à interrupção de síntese de matriz peritrófica, os efeitos histopatológicos causados pelo indoxacarbe podem afetar a absorção de nutrientes e digestão de *A. mellifera* uma vez que são células responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, assim como realizam parte da digestão no interior da célula (Cruz-Landim, 2009; Caccia, 2019).

Os efeitos tóxicos no corpo gorduroso da abelha submetida à exposição aguda indicam que é um órgão não alvo susceptível a ação do pesticida indoxacarbe. Ação de pesticidas em corpo gorduroso ocorre em díptera *Culex quinquefasciatus* (Alves et al., 2010), lepidoptera *Anticarsia gemmatalis* (Almeida, 2014), *Spodoptera exigua* e *Spodoptera frugiperda* (Dutra, 2019) e hemíptera *Euchistus heros* (Cossolin et al., 2019); todos como órgão não alvo. Embora o corpo gorduroso seja de grande relevância, *A. mellifera* carece de estudos que avaliem os efeitos histológicos e citotóxicos de pesticidas nesse órgão, sendo este estudo o primeiro a avaliar os efeitos histopatológicos de pesticida neste órgão.

O aumento das inclusões lipídicas no corpo gorduroso das abelhas expostas ao indoxacarbe possivelmente ocorre devido a danos a estruturas responsáveis por sua arquitetura, uma vez que estão heterogêneas, ocorrendo coalescência das inclusões. Resultado semelhante ocorre em *Spodoptera exigua* exposta a carbaril, com irregularidade e heterogeneidade das inclusões lipídicas, assim como ocorrência de fusão das inclusões lipídicas (Adamki 2007). Danos no corpo gorduroso podem ter sérias consequências para a fisiologia das abelhas afetando suas funções no metabolismo intermediário e energético, sua regulação endócrina, síntese de hemolinfa e reduzindo sua capacidade de detoxificação, fragilizando as abelhas (Li et al., 2019). Os efeitos adversos do indoxacarbe podem não atuar isoladamente no corpo gorduroso, mas se somarem aos danos provocados pelo parasitismo da varrose. O ectoparasita *Varroa destructor* é um dos principais responsáveis por perdas de

colônias na apicultura europeia, é vetor de patógenos e causa sérios danos às abelhas ao se alimentar do corpo gorduroso (Ramsey et al., 2019). Muitas patologias podem ser atribuídas aos danos ocorridos no corpo gorduroso em decorrência da varrose, com redução da função imunológica, tolerância a pesticidas e sobrevivência (Glinski & Jarosz, 1984; Drescher & Schneider, 1987; Bowen-Walker & Gunn, 2001; Yang et al., 2005; Yang & Cox-Foster, 2007; Rosenkranz et al., 2010; Annoscia et al., 2012; Ramsey et al., 2019), portanto, tais efeitos podem ser intensificados aditivamente pela toxicidade do indoxacarbe.

Como o corpo gorduroso é um importante centro de detoxificação, não é inesperado a ausência de danos visíveis no tratamento crônico das abelhas por ser uma concentração subletal. Assim, possivelmente o sistema de detoxificação foi capaz de impedir sintomas de citotoxicidade. Esse fenômeno foi observado em insetos onde o corpo gorduroso era órgão não alvo, com a presença ou não de danos em diferentes níveis a depender do tipo de pesticida empregado, concentração e tempo de exposição (Adamki, 2007; Alves et al., 2010). Isso indica que o corpo gorduroso do tratamento crônico pode ter sofrido danos causados pelo indoxacarbe não apreciados pela metodologia deste estudo, dado que é um pesticida capaz de afetar esse órgão.

Outra possibilidade é decorrente não da concentração de tóxico, mas pela diferença de metabolismo e de atividade das enzimas do sistema de detoxificação entre as diferentes idades fisiológicas das abelhas. *Apis mellifera* com maiores idades possuem sistema de detoxificação mais eficaz em relação àquelas recém emergidas, apresentando tanto CL_{50} quanto inclinações de curva concentração-mortalidade significativamente distintas para um mesmo pesticida (Gilbert & Wilkinson, 1974; Smirle & Winston, 1988; Rinkevich et al, 2015), o que pode ter sido particularmente relevante para o corpo gorduroso uma vez que é um órgão que sofre grande modificação ao longo do desenvolvimento da fase adulta (Cruz-Landim, 2009; Arrese, & Soulages, 2010; Li et al., 2019).

A distinção presente entre o controle de 24h e o controle da exposição crônica por oito dias se deve a diferenças na idade fisiológica das abelhas, pois as abelhas que não são recém emergidas apresentam menores inclusões lipídicas e conteúdo lipídico à medida que envelhecem, como resultado das distintas funções que esse órgão exerce em diferentes estágios de vida dos insetos (Anand & Lorenz 2008; Cruz-Landim, 2009; Arrese, & Soulages, 2010; Li et al., 2019).

A presença de alterações no cérebro de *A. mellifera* expostas ao indoxacarbe é evidência da toxicidade desse inseticida e um resultado esperado, uma vez que o indoxacarbe bioativado é um neurotóxico. A intensificação das lacunas no cérebro demonstra que o indoxacarbe

apresenta capacidade de dano neurodegenerativo, sendo esse tipo de toxicidade previamente relatado em operárias de *A. mellifera* expostas a outros inseticidas neurotóxicos (Tavares et al., 2015; Catae et al 2018). Ao contrário do presente trabalho, investigações com pesticidas identificaram maior quantidade de células Kenyon com núcleo picnótico sugerindo morte celular programada na região de somata dos corpos cogumelares nas abelhas *Scaptotrigona postica* (Jacob et al., 2014) e *A. mellifera* (Almeida Rossi et al., 2013b; Oliveira et al., 2014) expostas a pesticidas. De modo semelhante, foi relatado sobreposição de apoptose e autofagia em região de somata no cérebro de *A. mellifera* sob tratamento com imidaclopride (Wuet al., 2015), indicando que esses dois eventos de morte programada podem explicar processos neurodegenerativos, todavia em nenhum desses estudos com morte celular programada foi apontada intensificação das lacunas nas regiões de neurópilas, provavelmente devido ao tempo de exposição.

Embora seja esperado o aumento de lacunas após processos de mortes celulares (Cao et al., 2013), é inesperado que o surgimento e expansão das lacunas sejam o primeiro ou único fenótipo de desintegração do tecido neural, o que pode significar que há mais de uma forma de neurodegeneração em cérebro de abelhas expostas a pesticidas. A degeneração Walleriana é caracterizada pela degeneração do axônio de um neurônio sem afetar o corpo celular imediatamente; um processo ativo, autorregulável e iniciado pelos neurônios, sendo ocasionada por lesões traumáticas, axotomia e injúrias tóxicas (Raff et al., 2002; Ehlers, 2004; Luo & O'Leary 2005; Kroemer et al., 2005, 2009; Maor-Nof, et al., 2013), acarretando a perda de axônios e sinapses; estando na cadeia causal de muitas degenerações neurais (Coleman & Freeman, 2010). Esse processo de neurodegeneração foi verificado em *Drosophila melanogaster* (MacDonald et al., 2006; Ayaz et al., 2008; Coleman & Freeman, 2010) assim como já se verificou degeneração axonal causada por agrotóxicos (James et al. 1980; Ergün et al., 2009). Assim, a intensificação de lacunas observadas em neurópilas de abelhas expostas a indoxacarbe apresenta as características atribuídas pelo Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular(2005; 2009) à degeneração Walleriana. Resultado semelhante foi encontrado em *A. mellifera* expostas ao neurotóxico lambda-cialotrina, com intensificação das lacunas indicando degeneração axonal e ausência de sintomas histopatológicos de morte celular nas somatas, embora os dados ultraestruturais indiquem danos tóxicos nos corpos celulares (de Castro et al., 2020).

A relação entre degeneração axonal e glia explicaria também os agrupamentos de células gliais eventualmente observados nas neurópilas dos lobos antenais dos tratamentos com indoxacarbe. As células gliais respondem a uma grande gama de injúrias neurais, processo

denominado gliose reativa, pelo qual a glia altera sua expressão gênica, atividade e morfologia, mediando processos pós-injúria de depuração à fim de evitar o aumento da neurotoxicidade local (Freeman et al. 2003; MacDonald et al., 2006; Kato et al., 2009), fenômeno já estudado em lobos antenais e corpos cogumelares de *D. melanogaster* (MacDonald et al., 2006; Hakim et al., 2014). De modo semelhante, as células gliais de núcleo aumentado e cromatina descondensada observadas no cálice dos corpos cogumelares de abelhas expostas ao tratamento agudo de indoxacarbe podem estar em situação de gliose reativa devido à neurodegeneração. A relação entre degeneração Walleriana e gliose reativa já foi extensamente estudada em *D. melanogaster*, onde as glias da neurópila são recrutadas para a depuração e participam da ativação da via de sinalização Draper importante na degeneração axonal regulada (Broadie, 2004; Logan, et al., 2007; Doherty, et al., 2009; revisado por Kurant, 2010).

A desestruturação da somata dos corpos cogumelares de abelhas expostas ao tratamento crônico com indoxacarbe pode ser resultado de processos de morte celular decorrentes da degeneração axonal. As células Kenyon não exibem citotoxicidade, todavia essa extensa região de desestruturação na somata com ausência de corpos celulares é um fenótipo histopatológico. Possivelmente houve morte celular apenas das células Kenyon que sofreram degeneração axonal dado a contínua exposição ao neurotóxico, uma vez que a perda de axônios acarreta a posterior e lenta morte do neurônio (Ayaz et al., 2008). Este estudo sugere que a exposição crônica por indoxacarbe se mostra particularmente perigosa. Pois a degeneração axonal decorrente de injúrias agudas é susceptível de recuperação em insetos por meio da regeneração axonal, porém em insetos adultos ainda não se verificou neuroblastos para reposição das células Kenyon eliminadas, podendo gerar danos subletais permanentes (Ayaz, et al., 2008; Siegrist et al., 2010; Fernández-Hernández et al., 2013).

A centralidade das neurópilas nos efeitos neurotóxicos do metabólito bioativo do indoxacarbe (*N*-carbocaretoxilado) demonstrados se deve à sua ação como bloqueador de canal de Na^+ dependente de voltagem. i.e., não é um neurotóxico sináptico como os neonicotinóides, pois é de ação axonal (Wing et al., 2000; Dong 2007; Lapied et al., 2009). Os canais de Na^+ da fase despolarizante são bloqueados pelo *N*-carbocaretoxilado bloqueando a amplitude da corrente de Na^+ para dentro do axônio, não possuindo efeito nos canais de Ca^{2+} (Lapied et al., 2009), sendo essas características toxodinâmicas de *N*-carbocaretoxilado particularmente importantes em degeneração axonal. Estudos com *D. melanogaster* envolvendo degeneração Walleriana demonstraram que influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem, ocasionado por variabilidades de potencial elétrico da membrana

devido aos canais de Na^+ e K^+ , é um elemento de sinalização precípua da degeneração (Mishra et al., 2013). Estes autores concluem que correntes de Na^+ e K^+ regulam a degeneração por meio do controle do influxo de Ca^{2+} , de modo que em *D. melanogaster* mutantes para aumento da atividade dos canais de Na^+ dependente de voltagem, a degeneração Walleriana é retardada. Essas conclusões se alinham com a toxodinâmica conhecida do metabólito bioativo de indoxacarbe, que bloqueia os canais de Na^+ dependentes de voltagem.

5- Conclusão

A letalidade de indoxacarbe indica que este pesticida pode contribuir para o declínio global das populações de *A. mellifera* ocasionando prejuízos ecológicos e econômicos. A letalidade por exposição aguda é decorrente da ação primária no cérebro, assim como de danos tóxicos no intestino médio e corpo gorduroso. Concentrações subletais em exposição crônica causaram danos subletais no cérebro e intestino, indicando que resíduos de indoxacarbe podem prejudicar a saúde das abelhas e das colmeias, podendo afetar seus comportamentos e susceptibilidade a patógenos, possivelmente contribuindo para o estabelecimento de CCD. Este estudo fornece subsídios teóricos para uma compreensão superior da ação de pesticidas em abelhas e permite concluir que o manejo integrado de pragas deve levar em maior consideração as populações de *A. mellifera* nas aplicações de indoxacarbe assim como o seu potencial de contaminação residual, adotando princípios de precaução mais rigorosos.

Referências

- Adamski, Z. (2007). Exposure to carbaryl leads to ultrastructural changes and alters activity of antioxidant enzymes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebrate Biology*, 126(2), 191-201.
- Adel, M. M. (2012). Lufenuron impair the chitin synthesis and development of *Spodoptera littoralis* Bosid (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Sci. Res*, 8(5), 27-66.
- Afzal, M.B.S., Shad, S.A., Basoalto, E., Ejaz, M. & Serrão, J.E. (2015). Characterization of indoxacarb resistance in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, stability and fitness cost. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18, 779-785.
- Afzal, M.B.S., Shad, S.A., Ejaz, M. & Serrão, J.E. (2019) Laboratory selection, cross-resistance, and estimations of realized heritability of indoxacarb resistance in *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae). *Pest Management Science*, 76, 161-168.
- Aki, T., Nara, A., & Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell biology and toxicology*, 28(3), 125-131.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., et al, (2014). *Molecular Biology of the Cell*, 6 ed. Garland Science, New York.
- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., & Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(1), 113-122.
- Almeida Rossi, C., Roat, T. C., Tavares, D. A., Cintra-Socolowski, P., & Malaspina, O. (2013). Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Microscopy research and technique*, 76(5), 552-558.

- Almeida Rossi, C., Roat, T. C., Tavares, D. A., Cintra-Socolowski, P., & Malaspina, O. (2013). Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *65*(2), 234-243.
- Almeida, G. D., Zanuncio, J. C., Senthil-Nathan, S., Pratissoli, D., Polanczyk, R. A., Azevedo, D. O., & Serrão, J. E. (2014). Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebrate Survival Journal*, *11*(1), 79-86.
- Alves, S. N., Serrão, J. E., & Melo, A. L. (2010). Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*, *41*(6), 592-597.
- Anand AN, Lorenz MW(2008). Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol.* 2008;54:1404–12.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, *55*, 207-225.
- Atkins, E. L. (1992). Injury to honey bees by poisoning. *The Hive and the Honey Bee, Rev. Dadant and Sons, Hamilton, IL.*
- Avatar®. DuPont do Brasil S.A. - São Paulo, SP. Bula de agrotóxico. Disponível:https://www.dupont.com.br/content/dam/dupont/products-and-services/crop-protection/documents/pt_br/Avatar_Bula.pdf
- Ayaz, D., Leyssen, M., Koch, M., Yan, J., Srahna, M., Sheeba, V., & Hassan, B. A. (2008). Axonal injury and regeneration in the adult brain of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, *28*(23), 6010-6021.
- Broadie, K. (2004). Axon pruning: an active role for glial cells. *Current biology*, *14*(8), R302-R304.

- Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, *21*(4), 973-992.
- Booton, R. D., Iwasa, Y., Marshall, J. A., & Childs, D. Z. (2017). Stress-mediated Allee effects can cause the sudden collapse of honey bee colonies. *Journal of theoretical biology*, *420*, 213-219.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, *37*(1), 1-18.
- Brittain, C.; Potts, S.G. (2011). The potential impacts of insecticides on the lifehistory traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, *12*, 321–331.
- Buczowski, G., Scherer, C. W., & Bennett, G. W. (2008). Horizontal transfer of bait in the German cockroach: indoxacarb causes secondary and tertiary mortality. *Journal of economic entomology*, *101*(3), 894-901.
- Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., & Adamski, Z. (2013). Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell biology and toxicology*, *29*(2), 117-129.
- Caccia, S., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2019). The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and tissue research*, 1-21.
- Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., & Serrão, J. E. (2019). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 109991.
- Cao, Y., Chtarbanova, S., Petersen, A.J. and Ganetzky, B.(2013) Dnr1 mutations cause neurodegeneration in *Drosophila* by activating the innate immune response in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*: E1752-E1760.

- Catae, A. F., Roat, T. C., Pratavieira, M., da Silva Menegasso, A. R., Palma, M. S., & Malaspina, O. (2018). Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology*, *27*(2), 109-121.
- Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simó E, Picó Y (2016) Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *Methods X*3:452–458.
- Chapman RF. (2013). *The insects: structure and function*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; p. 38–89.
- Chakrabarti, P., Rana, S., Sarkar, S., Smith, B., & Basu, P. (2015). Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*, *46*(1), 107-129.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology*, *181*(3), 195-213.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., ... & Faucon, J. P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(1), 103-111.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R. M., Biswas, S., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., ... & Oakeshott, J. G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology*, *15*(5), 615-636.
- Coleman, M. P., & Freeman, M. R. (2010). Wallerian degeneration, wlds, and nmnat. *Annual review of neuroscience*, *33*, 245-267.
- Cooper, D. M., Granville, D. J., & Lowenberger, C. (2009). The insect caspases. *Apoptosis*, *14*(3), 247-256.

- Cossolin, J. F., Pereira, M. J., Martínez, L. C., Turchen, L. M., Fiaz, M., Bozdoğan, H., & Serrão, J. E. (2019). Cytotoxicity of *Piper aduncum* (Piperaceae) essential oil in brown stink bug *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology*, *28*(7), 763-770.
- Cruz, A. D. S., Elaine, C., Da Silva-zacarin, M., Bueno, O. C., & Malaspina, O. (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biology and Toxicology*, *26*(2), 165.
- Cruz-Landim, C. D. (2009). Abelhas: morfologia e função de sistemas.
- Cruz-Landim, C., & Cavalcante, V. M. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological science*, *20*(9), 1099-1107.
- Cruz-Landim, C., & Costa-Leonardo, A. M. (1996). Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *91*(1), 129-130.
- CruzLandim, C., Serrao, J. E., & SilvaDeMoraes, R. L. M. (1996). Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios*, 95-104.
- de Castro, M. B. A., Martinez, L. C., Cossolin, J. F. S., Serra, 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*, 126075.
- Danforth, B. (2007). Bees. *Current biology*, *17*(5), R156-R161.
- Debnath, J., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death?. *Autophagy*, *1*(2), 66-74.
- Dennis, B., & Kemp, W. P. (2016). How hives collapse: Allee effects, ecological resilience, and the honey bee. *PloS one*, *11*(2).
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., ... & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, *8*(8).

- Dinter, A., & Wiles, J. A. (2000). Safety of the new DuPont insecticide, Indoxacarb" to beneficial arthropods: an overview. *IOBC WPRS BULLETIN*, 23(9), 149-156.
- De Jong D., da Silva E.J., Kevan P.G., Atkinson J.L. (2009) Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen, *J. Apic. Res.* 48, 34–37.
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., & Pham-Delègue, M. H. (2004). Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 78(2),83-92.
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176.
- 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.
- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), 17.
- Doeke, M. A., Frazier, M., & Grozinger, C. M. (2015). Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 185-193.
- Doherty, J., Logan, M. A., Taşdemir, Ö. E., & Freeman, M. R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *Journal of Neuroscience*, 29(15), 4768-4781.
- Doonan, F., & Cotter, T. G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 44(3), 200-204.
- Dreier, S., Redhead, J. W., Warren, I. A., Bourke, A. F. G., Heard, M. S., Jordan, W. C., Sumner, S., Wang, J., Carvell, C. (2014). Fine scale spatial genetic structure of common and

declining bumble bees across an agricultural landscape. *Molecular Ecology* 23: 3384–3395.
doi: 10.1111/mec.12823

Dutra, K. A., Wanderley Teixeira, V., Cruz, G. S., Silva, C. T. S., D' Assunção, C. G., Ferreira, C. G. M.,...& Navarro, D. M. A. F.(2019). Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(7), 498-513.

Ehlers, M. D. (2004). Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin–proteasome system. *Trends in neurosciences*, 27(1), 3-6.

El-Saad, A. M. A., Kheirallah, D. A., & El-Samad, L. M. (2017). Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira Governorate, Egypt. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 3181-3193.

Ergün, S. S., Öztürk, K., Su, Ö., Gürsoy, E. B., Uğurad, I., & Yüksel, G. (2009). Delayed neuropathy due to organophosphate insecticide injection in an attempt to commit suicide. *Hand*, 4(1), 84-87.

Fernández-Hernández, I., Rhiner, C., & Moreno, E. (2013). Adult neurogenesis in *Drosophila*. *Cell reports*, 3(6), 1857-1865.

Feyereisen, R. (2005). Insect cytochrome P450 In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SG, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science–Biochemistry and Molecular Biology*.

Feyereisen, R. (2012). Insect CYP genes and P450 enzymes. In *Insect molecular biology and biochemistry* (pp. 236-316). Academic Press.

Fiandra, L., Casartelli, M., Cermenati, G., Burlini, N., & Giordana, B. (2009). The intestinal barrier in lepidopteran larvae: permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. *Journal of insect physiology*, 55(1), 10-18.

- Fiaz, M., Martínez, L.C., Costa, M. da S., Cossolin, J.F.S., Plata-Rueda, A., et al., (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156, 1–8.
- Fiaz, M., Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W.G., Shareef, M., et al., (2018). Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Chemosphere* 212, 337–345.
- Finney, D. J. (1964). A statistical treatment of the sigmoid response curve. *Probit analysis*, 25.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E., & Doe, C. Q. (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron*, 38(4), 567-580.
- Giannini, T. C., Boff, S., Cordeiro, G. D., Cartolano, E. A., Veiga, A. K., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Saraiva, A. M. (2015). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209-223.
- Gilbert, M. D., & Wilkinson, C. F. (1974). Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 4(1), 56-66.
- Gong, Y., & Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*, 26(1), 1-12.
- 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(6229).
- Gregorc, A., & Bowen, I. D. (2000). Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biology International*, 24(5), 319-324.
- Guez, D., Belzunces, L. P., & Maleszka, R. (2003). Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors

differentially expressed during adult development. *Pharmacology Biochemistry and behavior*, 75(1), 217-222.

Gusmão, D. S., Páscoa, V., Mathias, L., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R., & Lemos, F. J. A. (2002). Derris (*Lonchocarpus*) urucu (*Leguminosae*) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3), 371-375.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology*, 55, 593-608.

Hakim, Y., Yaniv, S. P., & Schuldiner, O. (2014). Astrocytes play a key role in *Drosophila* mushroom body axon pruning. *PLoS One*, 9(1).

Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.

Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology*, 54, 285-302.

Heylen, K., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R., & Billen, J. (2011). The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 42(1), 103-116.

Hiramine, C. (1997). Definition and morphological features of apoptosis. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 45(5), 459-469.

Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop protection*, 23(5), 371-378.

- Jacob, C. R., Soares, H. M., Nocelli, R. C., & Malaspina, O. (2015). Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest management science*, *71*(1), 114-122.
- James, L. F., Hartley, W. J., Williams, M. C., & Van, K. K. (1980). Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitro-bearing *Astragalus* or their toxins. *American journal of veterinary research*, *41*(3), 377-382.
- Jimenez, D. R., & Gilliam, M. (1989). Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin activity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, *20*(4), 287-303.
- Jimenez, D. R., & Gilliam, M. (1990). Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell and Tissue Research*, *261*(3), 431-443.
- Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of economic entomology*, *99*(4), 1046-1050.
- Johnson, R. (2010). *Honey bee colony collapse disorder* (pp. 7-5700). Washington: Congressional Research Service.
- Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*, *485*, 633-642.
- Kato, K., Awasaki, T., & Ito, K. (2009). Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. *Development*, *136*(1), 51-59.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Gaweł, M., et al., (2016). Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A* *1435*, 100–114.

- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschamntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* 274, 303–313.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... & Piacentini, M. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*, 12(12), 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E.H., ... & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16(1), 3-11.
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15966-15971.
- Kurant, E. (2011). Keeping the CNS clear: glial phagocytic functions in *Drosophila*. *Glia*, 59(9), 1304-1311.
- Lapied, B., Grolleau, F., & Sattelle, D. B. (2001). Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *British journal of pharmacology*, 132(2), 587-595.
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., ... & Pettis, J. (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292-305.
- Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2679-2688.
- 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. *Annual review of entomology*, *64*, 315-333.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, *52*, 231-253.
- Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *22*(3), 367-376.
- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *36*(12), 2405-2419.
- Logan, M. A., & Freeman, M. R. (2007). The scoop on the fly brain: glial engulfment functions in *Drosophila*. *Neuron glia biology*, *3*(1), 63-74.
- Lopes, M. P., Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Gonçalves, W. G., Miranda, F. R., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2018). Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest management science*, *74*(6), 1311-1318.
- Luo, L., & O'Leary, D. D. (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, *28*, 127-156.
- Lundin, O., Rundlöf, M., Smith, H. G., Fries, I., & Bommarco, R. (2015). Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS one*, *10*(8).
- Malaspina, O., & Zacarin, E. C. M. D. S. (2006). Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Braz. j. morphol. sci*, 303-309.
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(31), 12657-12662.

- Maor-Nof, M., & Yaron, A. (2013). Neurite pruning and neuronal cell death: spatial regulation of shared destruction programs. *Current opinion in neurobiology*, 23(6), 990-996.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Neves, G. da S., Gonçalves, W.G., Zanuncio, J.C., Bozdoğan, H., Serrão, J.E., (2018). Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 212, 629–637.
- 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 midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 167, 69-75.
- MacDonald, J. M., Beach, M. G., Porpiglia, E., Sheehan, A. E., Watts, R. J., & Freeman, M. R. (2006). The *Drosophila* cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron*, 50(6), 869-881.
- McCann, S. F., Annis, G. D., Shapiro, R., Piotrowski, D. W., Lahm, G. P., Long, J. K., ... & Reeves, B. M. (2001). The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(2), 153-164.
- McGregor, S. E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (Vol. 496). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Meech, R., Miners, J. O., Lewis, B. C., & Mackenzie, P. I. (2012). The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & therapeutics*, 134(2), 200-218.
- Miranda, J. E., Navickiene, H. M. D., Nogueira-Couto, R. H., De Bortoli, S. A., Kato, M. J., da Silva Bolzani, V., & Furlan, M. (2003). Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie*, 34(4), 409-415.

- Mishra, B., Carson, R., Hume, R. I., & Collins, C. A. (2013). Sodium and potassium currents influence Wallerian degeneration of injured *Drosophila* axons. *Journal of Neuroscience*, *33*(48), 18728-18739.
- Morais, C. R., Travençolo, B. A. N., Carvalho, S. M., Beletti, M. E., Santos, V. S. V., Campos, C. F., ... & Spanó, M. A. (2018). Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). *Chemosphere*, *206*, 632-642.
- [NRC] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007. Status of pollinators in North America. National Academies Press, Washington, DC
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., & Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *57*(7), 577-586.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., et al., (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens* *8*(6), 1-16.
- Oliveira, R. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., & Malaspina, O. (2014). Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental toxicology*, *29*(10), 1122-1133.
- Oliveira, C. D., Tadei, W. P., & Abdalla, F. C. (2009). Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalarsis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide?. *Neotropical entomology*, *38*(5), 624-631.
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, *120*(3), 321-326.

- Palmer, M. J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G. A., & Connolly, C. N. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature communications*, 4(1), 1-8.
- Pires, C. S. S. (2016) Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.51, p.422-442.
- Raff, M. C., Whitmore, A. V., & Finn, J. T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*, 296(5569), 868-871.
- Rinkevich, F. D., Margotta, J. W., Pittman, J. M., Danka, R. G., Tarver, M. R., Ottea, J. A., & Healy, K. B. (2015). Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS One*, 10(10).
- Roat, T. C., dos Santos-Pinto, J. R. A., Dos Santos, L. D., Santos, K. S., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2014). Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology*, 23(9), 1659-1670.
- Roel, A. R., Dourado, D. M., Matias, R., Porto, K. R., Bednaski, A. V., & Costa, R. B. D. (2010). The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 54(3), 505-510.
- 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(1), 71-83.
- Rost-Roszkowska, M. M. (2008). Degeneration of the midgut epithelium in *Allacma fusca* L. (insecta, Collembola, Symphypleona): apoptosis and necrosis. *Zoological science*, 25(7), 753-759.

- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment international*, *89*, 7-11.
- Santos-Junior, V.C. dos, Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Bozdoğan, H., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., (2019). Exposure to spinosad induces histopathological and cytotoxic effects on the salivary complex of the non-target predator *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* *225*, 688–695.
- Santos-Junior, V.C. dos, Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F.L., Tavares, W. de S., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., (2020). Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* *238*, 124585.
- Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., ... & Delaplane, K. S. vanEngelsdorp D.(2016). A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, *54*(4), 1-12.
- Serrao, J. E., & da Cruz-Landim, C. (1995). The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *CYTOBIOS-CAMBRIDGE-*, *229-236*.
- Serrao, J. E., & Cruz-Landim, D. (1996). A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*, 1-6.
- Serrão, J. E., & da Cruz-Landim, C. (2000). Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *Journal of Apicultural Research*, *39*(1-2), 9-17.
- Sharaby, A. M., EL-Hawary, F. M., & Moawad, S. S. (2013). Zinc Sulfate as a growth disruptor for *Spodoptera littoralis* with reference to histological changes in larval endocrine glands. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, *5*(3), 67-74.

- Siegrist, S. E., Haque, N. S., Chen, C. H., Hay, B. A., & Hariharan, I. K. (2010). Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Current Biology*, *20*(7), 643-648.
- Silva, F. W., Araujo, L. S., Azevedo, D. O., Serrão, J. E., & Elliot, S. L. (2016). Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiological Entomology*, *41*(2), 121-126.
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., Minsart, L. A., Mouret, C., & Hautier, L. (2014). Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PloS one*, *9*(7).
- Smirle, M. J., & Winston, M. L. (1988). Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Canadian Journal of Zoology*, *66*(9), 1938-1942.
- Sree, K. S., & Padmaja, V. (2008). Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura*(Fab.) larvae. *Toxicon*, *51*(7), 1140-1150.
- Stokstad, E., (2007). The case of the empty hives. *Science* *316*, 970–972.
- Stefanini, M., De Martino, C. E. S. A. R. E., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, *216*(5111), 173-174.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *19*(7), 1901-1905.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *20*(11), 2482-2486.

- 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.
- Teixeira, A.D., Marques-Araújo, S., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2015). Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron*, *68*, 91-97.
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *47*(2), 47-61.
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., ... & De Eguileor, M. (2007). Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell and tissue research*, *330*(2), 345-359.
- Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One*, *7*(6).
- Topozada, A., Salama, A. E., Eldefrawi, M. E., & Zeid, M. (1968). Histopathological effects of insecticides on the midgut of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Annals of the Entomological Society of America*, *61*(5), 1326-1334.
- Vaidyanathan, R., & Scott, T. W. (2006). Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. *Apoptosis*, *11*(9), 1643.
- VanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., ... & Underwood, R. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, *4*(8), e6481-e6481.

- Van Egelsdorp, D.; Maixner M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.103, p.80-95.
- Veeran, S., Shu, B., Cui, G., Fu, S., & Zhong, G. (2017). Curcumin induces autophagic cell death in *Spodoptera frugiperda* cells. *Pesticide biochemistry and physiology*, 139, 79-86.
- Xu, J., Strange, J. P., Welker, D. L., & James, R. R. (2013). Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii*(Hymenoptera: Apidae). *BMC genomics*, 14(1), 874.
- Zacarin, E. C. (2007). Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy*, 3(5), 516-518.
- Zhou, T., Zhou, W., Wang, Q., Dai, P. L., Liu, F., Zhang, Y. L., & Sun, J. H. (2011). Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 100(1), 35-40.
- Zhu, Y.C., Adamczyk, J., Rinderer, T., Yao, J., Danka, R.G., Luttrell, R., Gore, J., (2015). Spray toxicity and risk potential of 42 commonly used formulations of row crop pesticides to adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 108, 2640–2647.
- Walski, T., Van Damme, E. J., & Smagghe, G. (2014). Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. *Journal of insect physiology*, 70, 94-101.
- Williams, C. S. (1995). Conserving Europe's bees: why all the buzz?. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(8), 309-310.
- Williams, I. H. (2002). Insect pollination and crop production: a European perspective. *Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature. Ministry of Environment, Brasilia*, 59-65.

Wing, K. D., Schnee, M. E., Sacher, M., & Connair, M. (1998). A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 37(1), 91-103.

Wing, K. D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M., & Schnee, M. (2000). Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Protection*, 19(8-10), 537-545.

Wu, Y. Y., Zhou, T., Wang, Q., Dai, P. L., Xu, S. F., Jia, H. R., & Wang, X. (2015). Programmed cell death in the honey bee (*Apis mellifera*)(Hymenoptera: Apidae) worker brain induced by imidacloprid. *Journal of economic entomology*, 108(4), 1486-1494.