

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Interação patógeno-abelha-pesticida: a supressão de apoptose pelo patógeno *Nosema ceranae* no intestino médio suceptibiliza o hospedeiro *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na ação tóxica e histopatológica do inseticida ciantraniliprole

Matheus Tudor Cândido Santos de
Resende
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

MATHEUS TUDOR CÂNDIDO SANTOS DE RESENDE

Interação patógeno-abelha-pesticida: a supressão de apoptose pelo patógeno *Nosema ceranae* no intestino médio susceptibiliza o hospedeiro *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na ação tóxica e histopatológica do inseticida ciantraniliprole

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

Orientador: Jose Eduardo Serrao

Coorientador: Jamile F. Silva Cossolin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

R433i
2025

Resende, Matheus Tudor Cândido Santos de, 1991-
Interação patógeno-abelha-pesticida: a supressão de
apoptose pelo patógeno *Nosema ceranae* no intestino médio
suceptibiliza o hospedeiro *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)
na ação tóxica e histopatológica do inseticida ciantraniliprole /
Matheus Tudor Cândido Santos de Resende. – Viçosa, MG,
2025.

1 tese eletrônica (99 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2025.

Referências bibliográficas: f. 75-92.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.302>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Efeito dos fungos entomopatogênicos.
2. Abelhas - Efeito dos inseticidas. 3. Ciantraniliprole
(Inseticida). 4. Histopatologia. I. Serrão, José Eduardo, 1965-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 638.153

MATHEUS TUDOR CÂNDIDO SANTOS DE RESENDE

Interação patógeno-abelha-pesticida: a supressão de apoptose pelo patógeno *Nosema ceranae* no intestino médio suceptibiliza o hospedeiro *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na ação tóxica e histopatológica do inseticida ciantraniliprole

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

APROVADA: 13 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Matheus Tudor Cândido Santos de Resende
Autor

Jose Eduardo Serrao
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 26/05/2025 às 13:16:00 e pelo orientador em 26/05/2025 às 14:45:45. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **Q5LH.91DJ.RYKL** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico a todos os professores (o verdadeiro esteio da emancipação).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, o Departamento de Biologia Geral e o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade, infraestrutura e apoio técnico.

Agradecimento as instituições de fomento. Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa pelas aulas ministradas, apontamentos, ponderações, críticas e reflexões fundamentadas que tanto contribuíram para a minha formação.

Ao meu orientador José Eduardo Serrão pela oportunidade, o compartilhamento de seu conhecimento e experiência, suas críticas e sugestões construtivas, seu profissionalismo, paciência e absolutamente singular humanismo. É digno de nota o quão agradável e instigante é a convivência conjunta em laboratório.

A todo corpo de funcionários públicos e terceirizados da Universidade Federal de Viçosa, cuja diligência é fundamental para a manutenção, a viabilidade e a qualidade do ensino, da pesquisa e da extensão com as quais a universidade se compromete em sua função civilizatória na sociedade.

A todos os colegas de laboratório, presentes e os já formados, pelo apoio profissional e

pelas amizades que contribuem para um ambiente de trabalho enriquecedor, fraterno, colaborativo e valoroso. São todos sensacionais.

Finalmente, agradeço minha família pelo especial e amoroso apoio, além da paciência.

Há uma dialética entre o acaso e ordem. Quer dizer, o poema é a constelação, a constelação é resgatada do acaso. A vida é um enclave de ordem num universo fadado à morte térmica, à entropia.

-Haroldo Campos

RESUMO

RESENDE, Matheus Tudor Cândido Santos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Interação patógeno-abelha-pesticida: a supressão de apoptose pelo patógeno *Nosema ceranae* no intestino médio suceptibiliza o hospedeiro *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na ação tóxica e histopatológica do inseticida ciantraniliprole.** Orientador: Jose Eduardo Serrao. Coorientador: Jamile Fernanda Silva Cossolin.

As populações de abelhas estão ameaçadas por estressores como pesticidas, redução de diversidade de recursos e patógenos. Alguns estressores podem atuar fragilizando as abelhas a ação de outros estressores. Dentre os inseticidas, ciantraniliprole atua em canais de cálcio ligantes de rianodina das células musculares, causando a morte do inseto. O microsporídeo *Nosema ceranae* é patógeno da abelha *Apis mellifera* responsável pela nosemose, sendo parasita intracelular do epitélio do intestino médio, causando danos às células, com capacidade de reduzir a morte celular por apoptose, um mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares. A redução de apoptose por *N. ceranae* pode inviabilizar um dos mecanismos fisiológicos pelos quais as abelhas contrapõem a ação de pesticidas. O objetivo foi testar a hipótese da supressão da apoptose do epitélio do intestino médio das abelhas por *N. ceranae* como mecanismo causal responsável pela fragilização das abelhas a ação do inseticida ciantraniliprole. Especificamente foram avaliadas supressão da apoptose e danos histopatológicos no intestino médio de operárias de *A. mellifera*. Abelhas infectadas por *N. ceranae* tiveram sobrevivência reduzida após a exposição a apenas uma das concentrações subletais testadas de ciantraniliprole. Abelhas infectadas e expostas à concentração subletal deletéria de ciantraniliprole apresentaram menor ativação da via apoptótica na porção anterior do intestino médio que abelhas apenas expostas ao inseticida e maior ativação da via na porção posterior que abelhas apenas infectadas. As porções medial e posterior do intestino médio de abelhas infectadas e expostas ao inseticida em concentração subletal deletéria apresentaram menor ativação da via apoptótica que abelhas apenas expostas ao inseticida. Esses resultados evidenciam que o padrão diferencial de colonização do epitélio intestinal pelo patógeno influencia a capacidade de redução de apoptose e o processo de interação do hospedeiro com o pesticida, onde em regiões de maior colonização o epitélio é incapaz de mitigar, com impactos histopatológicos, comprometendo a fisiologia do órgão. Além disso, a associação deletéria entre patógeno-pesticida é concentração-dependente. As implicações histopatológicas do trabalho indicam tanto que as porções do intestino

médio precisam ser consideradas quanto que alguns parâmetros histopatológicos como a vacuolização citoplasmática são responsivas ao efeito de ambos os estressores associados, enquanto a fragmentação celular não. O índice de lesão se mostrou uma métrica eficiente para avaliar o estresse do órgão, porém seu significado é dependente da interpretação de cada um dos parâmetros utilizados em seu cálculo. Em conclusão, *N. ceranae* tem potencial de fragilizar as abelhas a ação do ciantraniliprole, tornando esse patógeno de abelhas chave em contextos de múltiplos estressores nos quais as abelhas podem se encontrar inseridas.

Palavras-chave: Microsporídeo; Intestino médio; Caspase-3; Histopatologia; Associação patógeno-pesticida.

ABSTRACT

RESENDE, Matheus Tudor Cândido Santos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Pathogen-bee-pesticide interaction: suppression of apoptosis by the pathogen *Nosema ceranae* in the midgut susceptibilizes the host *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to the toxic and histopathological action of the insecticide cyantraniliprole.** Adviser: Jose Eduardo Serrao. Co-adviser: Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Bee populations are threatened by stressors, including pesticides, reduced resource diversity, and pathogens. Some stressors may weaken bees to the action of others. Among insecticides, cyantraniliprole acts on ryanodine-binding calcium channels in muscle cells, causing the death of the insect. The microsporidium *Nosema ceranae* is a pathogen of the honeybee *Apis mellifera* responsible for nosemosis, being an intracellular parasite of the midgut epithelium, causing damage to cells, with the ability to reduce cell death by apoptosis, a defense mechanism against intracellular pathogens. The reduction of apoptosis by *N. ceranae* may render unviable one of the physiological mechanisms by which bees have to mitigate the action of pesticides. The objective was to test the hypothesis that the apoptosis suppression in the midgut epithelium of host bees by *N. ceranae* is a causal mechanism responsible for increase the honeybee susceptibility to the insecticide cyantraniliprole. More specifically, the apoptosis suppression and the histopathology in the midgut of the bees were evaluated. Bees infected with *N. ceranae* present reduced survival after exposure to only one of the tested sublethal concentrations of cyantraniliprole. Bees both infected and exposed to a deleterious sublethal concentration of cyantraniliprole have activation of the apoptotic pathway in the anterior midgut portion than bees only exposed to the insecticide and higher apoptosis activation in the posterior midgut than bees only infected. The medial and posterior midgut portions of bees infected and exposed to the insecticide at a deleterious sublethal concentration present lower apoptosis than bees only exposed to the insecticide. These results reveal that the differential pattern of colonization of the midgut epithelium by *N. ceranae* influences the ability to reduce apoptosis and the host interaction process with the insecticide, where in regions of high pathogen colonization the midgut is unable to mitigate its effects, with histopathological impacts, compromising the physiology of the organ. In addition, the deleterious association between pathogen and pesticide is concentration-dependent. The histopathological implications of the study indicate that the midgut portions need to be considered and that some histopathological parameters such as cytoplasmic vacuolization are

responsive to the effect of both associated stressors, while cellular fragmentation is not. The lesion index proved to be an efficient metric for assessing organ stress, but its significance depends on the interpretation of each of the parameters used in its calculation. Therefore, *N. ceranae* has the potential to weaken honeybees to the action of cyantraniliprole, making this pathogen key in contexts of multiple stressors in which bees may find themselves.

Keywords: Microsporidium; Midgut; Caspase-3; Histopathology; Pathogen-pesticide association

Sumário

1-INTRODUÇÃO	12
2- MATERIAL E MÉTODOS	22
3- RESULTADOS	30
3.1-Bioensaio de concentração-mortalidade	30
3.2- Bioensaio de sobrevivência em exposição crônica	30
3.3- Detecção de apoptose no intestino médio	31
3.3.1-Intestino médio total	31
3.3.2-Porções do Intestino médio	32
3.3.3-Intestino médio comparando porções em cada tratamento	40
3.4- Histopatologia	41
3.4.1- Vacuolização	41
3.4.1.1- Intestino médio total	41
3.4.1.2- Porções do intestino médio	42
3.4.2- Fragmentação celular	44
3.4.2.1- Intestino médio total	44
3.4.2.2- Porções do intestino médio	45
3.4.3- Eliminação celular	48
3.4.3.1- Intestino médio total	48
3.4.3.2- Porções do intestino médio	51
3.4.4- Índice de lesão	53
3.4.4.1- Intestino médio total	53
3.4.4.2- Porções do intestino médio	54
4- DISCUSSÃO	57
5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6- REFERÊNCIAS	75
7- ANEXO A	93
8- ANEXO B	94

1. Introdução

As abelhas são responsáveis por fornecer serviços de polinização críticos para os ecossistemas naturais, sendo agentes fundamentais na conservação dos ecossistemas e suas biodiversidades, dado que o declínio de polinizadores afeta negativamente a qualidade dos ecossistemas (Kearns e Inouye, 1997, Ollerton et al., 2011, Giannini et al., 2015, Doeke et al., 2015). Esses serviços são fundamentais para a flora, sendo responsáveis pela reprodução de diversas espécies, nas quais em torno de 75% (Ricketts et al., 2008) a 87,5% (Ollerton et al., 2011) das angiospermas são dependentes de polinizadores. A relevância das abelhas se estende para ecossistemas agrícolas, uma vez que *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) é a espécie mais utilizada na polinização de cultivares comerciais, sendo responsável por até um terço da alimentação humana dependente de polinização (McGregor, 1976; Williams, 1995; Williams, 2002; Johson, 2010). Além disso, essa abelha contribui com produtos de importância econômica como mel, cera, própolis, geleia real e apitoxinas por meio do setor apícola (Atkins, 1992; Danforth, 2007, Wolff, L. F., & Gomes, J. C. C., 2015; Pires et al., 2016; Potts et al., 2016; Ismail, M. M., & Ismail, W. I. W. 2018, Vapa-Tankosic, J. et al, 2020), indicando sua importância ecológica, econômica e social.

O atual declínio das populações e da diversidade de polinizadores é causa de preocupação, ocorrendo em abelhas tanto manejadas quanto silvestres (Stokstad, 2007; Henry et al., 2012; Lee et al., 2015; Pires, et al., 2016; Seitz et al., 2016), incluindo abelhas melíferas (Seitz et al., 2022). Os fatores responsáveis pelo declínio são de natureza ecológica como competição interespecífica, qualidade do alimento coletado no forrageio, perda e fragmentação de habitats, alterações climáticas, patógenos, assim como o uso frequente de pesticidas na atividade agrícola (Goulson et al., 2015; Lee et al., 2015). Um fenômeno contíguo é a Desordem do Colapso de Colônias (CCD), inicialmente observado em 2006 nos Estados Unidos em regiões de manejo agrícola intensivo, caracterizado pelo abandono das colmeias contendo a rainha, crias e alimento pelas operárias e, portanto, sendo responsável por perdas massivas de colônias sem causa evidente e sem presença de abelhas mortas (van Engelsdorp et al., 2009; Pires et al., 2016).

O CCD possui causa multifatorial (Henry et al., 2012), configurando-se como uma síndrome de estresse (vanEngelsdorp et al 2009) em decorrência de múltiplas

interações ecológicas negativas, como parasitismo pelos ácaros *Varroa* spp., infecção por patógenos (DeGrandi-Hoffman et al., 2015), declínio da diversidade e qualidade de pólen (Di Pasquale et al., 2013) e contato com pesticidas (Johnson et al., 2010; Zhu et al., 2015). Esses fatores estressantes podem atuar individualmente ou em concomitância, com ação aditiva ou sinérgica, o que intensificaria reciprocamente seus efeitos, contribuindo para o estabelecimento da CCD, a redução da sobrevivência, o aumento de mortalidade e declínio das populações de abelhas (Nazzi et al 2012; Henry et al., 2012; Pettis, et al., 2012; Lee et al., 2015, Goulson, et al. 2015; Doublet et al, 2015; Sánchez-Bayo, et al. 2016; Grassl, Julia, et al. 2018; T O’Neal et al., 2018; Meeus et al., 2018; Harwood & Dolezal, 2020).

As abelhas estão expostas a diversos pesticidas aplicados próximos a seus locais de nidificação ou a matrizes apícolas (Bogdanov, 2006) como também, em decorrência de seus hábitos de forragear amplas áreas buscando recursos como néctar, pólen e água, entrando em contato com pesticidas e transportando-os para a colmeia onde contaminam as demais abelhas, as crias, mel e cera. O comportamento das abelhas reforça, portanto, a hipótese da relação causal dos pesticidas com o declínio das populações de abelhas e CCD (revisado por Blacquiere et al., 2012; Calatayud-Vernich, 2018).

A agricultura intensiva é dependente do uso de pesticidas, uma vez que a prática ampla da monocultura torna os campos de cultivo particularmente susceptíveis a pragas e doenças (Sattle, 2007). Além disso, contaminações por pesticidas foram reportadas em diversas localidades onde não foram diretamente aplicados, incluindo águas superficiais, pluviais, fluviais e subterrâneas (Ritter et al., 1990; Sankhla et al., 2018), e até mesmo em regiões atmosféricas distantes de campos agrícolas (Espallardo et al., 2012; Galon et al., 2021; Mayer et al., 2024).

Dentre os pesticidas, os inseticidas são amplamente usados, e quando utilizados em quantidades letais afetam as colônias, dado que causam redução das populações totais de abelhas em campo (Johnson et al., 2010; Zhu et al., 2015; Seitz et al., 2022). Os efeitos subletais também causam impacto gerando alterações de curto e longo prazo na morfologia, fisiologia e comportamento das abelhas por meio de perturbações olfativas, capacidade de aprendizado, memória, paralisia, redução da sobrevivência e desorientação, fenômenos que comprometem os serviços de polinização e manutenção da colônia (Basu & Chakrabarti et al., 2019). Outros efeitos verificados são aumento de estresse oxidativo (Di Noi et al., 2021) e aumento da

susceptibilidade a patógenos com redução de imunocompetência (Desneux et al., 2007, Brandt et al., 2016, Tarek et al., 2018). Os efeitos subletais decorrentes de baixas concentrações de pesticidas por exposição aguda e crônica estão recebendo cada vez mais foco dos pesquisadores (vanEgelsdorp e Meixner, 2010; de Castro et al., 2020), uma vez que estudos utilizando quantidades não campo-realistas, geram incerteza sobre a relevância de seus dados (Blacquiere, 2012), de modo que estudos com concentrações campo-realistas em exposições crônicas são cada vez mais prementes.

A despeito das causas de declínio das abelhas não terem sido inequivocamente estabelecidas, o uso em larga escala de pesticidas tem sido implicado como um dos principais contribuintes (Hienry et al. 2012; Fairbrother et al., 2014, Woodcock et al., 2016). Dentre os pesticidas, uma nova classe de inseticidas foi proposta para um controle eficiente de pragas, a das diamidas antranílicas ou antranilamidas (Lahm et. al., 2005). Dentre as diamidas antranílicas, a ciantraniliprole, é sistêmico e com eficiência para controle de *Bemisia tabaci*, *Anticarsia gemmatalis* e *Leucoptera coffeella*, importantes pragas das culturas da soja e do café, ambas polinizadas por abelhas melíferas. Esses compostos possuem como alvo primário o receptor de rianodina dos canais de cálcio, abrindo-os como um novo alvo para desenvolvimento de inseticidas, o que é fundamental para a ampliação da rotação de inseticidas no controle de resistência no manejo integrado de pragas (Lahm et. al., 2005).

Os canais de cálcio possuem particular importância na fisiologia da contração muscular, havendo os canais de cálcio dependente de voltagem e os canais de cálcio com receptor de rianodina (Lahm et. al., 2005). Os canais de cálcio dependentes de voltagem regulam a entrada de cálcio na célula pela membrana plasmática, e os canais de cálcio com receptor de rianodina regulam a passagem de cálcio interno do lúmen de organelas para o citosol, portanto presentes no retículo sarcoplasmático de células musculares (Cordoba et al., 2006). Por consequência, células musculares são consideradas o alvo primário, pois os canais no retículo sarcoplasmático são um dos alvos onde as diamidas antranílicas se ligam e liberam descontroladamente os íons de cálcio desregulando a homeostase (Lahm et. al., 2005; Cordoba et al., 2006). A sintomatologia em insetos inclui interrupção da alimentação, paralisia e morte (Lahm et. al., 2005).

Embora os canais de cálcio sejam elementos centrais na contração muscular, a homeostase do cálcio participa de múltiplas funções celulares essenciais (Lahm et. al.,

2005), e sua atuação se estende por diversos tipos e funções celulares (Patel et al., 2010; Stiber et al., 2011; Morio et al., 2021; Malci et al., 2022). Nesse sentido, apresenta papel na sinalização celular (Patel et al., 2010) ou mesmo nas funções neuronais (Malci et al., 2022) com sua desregulação implicada em neurodegeneração (Lim et al., 2021). Além disso, canais de cálcio com receptores de rianodina estão presentes em outras organelas além do retículo endoplasmático, como mitocôndrias, outro importante compartimento de armazenamento do cálcio nas células (Lim et al., 2021; Morio et al., 2021; Rosenberg, 2022). As características morfológicas das mitocôndrias e suas distribuições e co-localizações com retículo endoplasmático estão relacionadas a homeostase do cálcio celular (Sánchez-Vázquez et al., 2022). A quebra da homeostase de cálcio desregula diversos outros eletrólitos intracelulares, como o cloro, devido as interrelações entre os gradientes eletroquímicos e suas influências celulares mútuas, principalmente em contexto de lesão celular (Buja et al., 1998). Assim, há evidências que o modo de ação das diamidas antranílicas é, embora um alvo molecular muito específico, amplo, devido às múltiplas funcionalidades em diversos tipos celulares desse mesmo alvo, diferentemente do que ocorre em alvos de inseticidas neonicotinóides (Lundin et al., 2015; Nauen et al., 2019), por exemplo. Portanto, reduzir o alvo primário ao músculo ou células musculares pode representar um recorte teórico precário e uma interpretação superficial das evidências disponíveis desse grupo de inseticidas. De fato, efeitos citotóxicos devido a diamidas antranílica clorantraniliprole foram evidenciados em órgãos e tecidos considerados como não-alvos como o epitélio do intestino médio em *Anticarsia gematalis* (Castro e Castro et al., 2021).

Danos em órgãos não-alvos, como intestino médio são preocupantes, uma vez que esse participa, além da digestão e absorção, do sistema de detoxificação das abelhas (Smaghe et al., 2001; Gong & Diao, 2017). Esse sistema é importante para a metabolização de compostos tóxicos endógenos e exógenos (Gong & Diao, 2017), com a ação de famílias de enzimas carboxilesterases (COEs) e monooxigenases do citocromo P450 (P450s) atuando na fase I, e glutathione transferase (GSTs) na fase tanto I quanto fase II, além da contribuição central do túbulo de Malpighi na fase III. Estudos apontam as famílias das enzimas P450, COE ou GST na biotransformação de pesticidas (Johnson et al. 2010, 2015; Feyereisen, 2012; Gong & Diao, 2017; Lu et al, 2021). Entretanto, embora o sistema de 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).

O intestino médio, ou mesêntero, é parte do sistema digestório junto com os intestinos anterior (estomodeu) e posterior (proctodeu), apresentando como funções, além da detoxificação (Smagghe et al., 2001; Gong & Diao, 2017), a digestão e absorção de nutrientes (Caccia et al., 2019). Para tanto, produz enzimas digestivas e possui microvilosidades em seu epitélio para aumento da área de superfície absorptiva (Cruz Landim, 2009; Caccia et al. 2019). Diferentemente dos intestinos anteriores e posteriores, é de origem endodérmica, não apresentando íntima quitinosa, em contrapartida apresenta a matriz peritrófica, formada por uma rede de quitina associada a proteínas, gerando compartimentalização funcional da digestão no lúmen em espaço endoperitrófico e ectoperitrófico (Hegedus et al., 2019; Liu et al., 2019), além de atuar como mecanismo de defesa para patógenos cuja infecção se dá por via oral, como o microsporídeo *Nosema ceranae* (Oliveira et al., 2023). Embora não exista significativa distinção morfológica ao longo do intestino médio, existem suficientes evidências metabólicas, bioquímicas e ultraestruturais a nível epitelial de ser parcialmente regionalizado no desempenho de suas funções, apresentando assim uma porção ou região anterior, medial e posterior. Isso significa que absorção, secreção e digestão é algo observado em todo o seu epitélio, mas alguns fenômenos celulares e histológicos ocorrem mais intensamente em uma ou mais dessas porções do intestino médio (da Cruz Landim, 2009).

Efeitos tóxicos foram verificados no intestino médio como órgão não-alvo, uma vez que é o primeiro e principal órgão a entrar em contato com pesticidas por via oral, dado que estes precisam atravessar a barreira intestinal para alcançar seus respectivos alvos – frequentemente tecido neural (revisado por Denecke et al., 2018). A penetração do pesticida através do epitélio pode se dar por via paracelular, ou seja, entre as células, e por via transcelular, isto é, intracelularmente às células do epitélio, em particular as células digestivas (Denecke et al., 2018). Assim, células do intestino médio com núcleo picnótico, indicativo de eliminação celular, e intensificação da vacuolização celular, já foram reportadas (Oliveira et al., 2024), sendo importantes indicadores celulares de citotoxicidade (Malaspina & Zacarin, 2006). Evidências de respostas histopatológicas decorrentes de agentes citoestressores ocorrerem somente ou mais intensamente em uma porção específica do intestino médio já foram verificadas, como o maior número de protusões citoplasmáticas e liberação de

fragmentos celulares na porção epitelial posterior (de Castro et al., 2020). Além disso, danos ultraestruturais decorrentes de pesticidas já foram verificados, como alterações do labirinto basal (Serra et al., 2021), degeneração de retículo endoplasmático e desgaste de organelas, processos vinculados à autofagia (Rost-Roszkowka, 2008; Gomez-Virgilio et al., 2022). Alterações ultraestruturais específicas, também já foram verificadas regionalmente no intestino médio, como lesões mitocondriais em células digestivas apenas da porção posterior (de Castro et al., 2020). O conjunto de danos dessa natureza podem eliciar morte celular programada apoptótica, e o que alguns autores consideram como morte celular autofágica (Liu & Levine, 2015).

A apoptose no intestino médio dos insetos possui diversas funções tanto no desenvolvimento (Hakim et al, 2010), como na manutenção do tecido (Elmore, 2007; Martin-Hernandez et al., 2017). Neste aspecto, a apoptose é fundamental na eliminação e descarte de células senescentes em decorrência do estresse por suas atividades metabólicas intrínsecas no que é considerado como regeneração homeostática do tecido (Kurze et al, 2018). Soma-se a isso o importante desempenho na eliminação de células em decorrência de estressores exógenos, como agressores mecânicos, patógenos e moléculas tóxicas (Hakim et al, 2010; Liu & Levine, 2015; Farder-Gomes et al, 2021).

Patógenos intracelulares infectam as células, que podem ativar o programa de morte celular obliterando tanto a célula comprometida quanto os microrganismos infectantes internos antes do término de seu ciclo e multiplicação, a fim de descartá-los para o lúmen do intestino (Hakim et al, 2010; Demarco et al., 2020). A morte celular é relevante não só na defesa contra patógenos, mas em contextos toxicológicos, onde o tecido possui três níveis de defesa. Cada nível possui uma preponderância funcional, sendo mais requisitado quando o nível anterior teve sua eficácia suplantada. Estes níveis de defesa são compostos por mecanismos alostáticos, sendo o primeiro o sistema de detoxificação e o sistema antioxidante, o segundo nível composto pelo sistema autofágico, e o terceiro nível constitui os programas de morte celular (Moore et al., 2008a, 2008b). Células em contato com tóxicos ou toxinos, como pesticidas e fitoquímicos deletérios, usualmente utilizam o sistema de detoxificação para metabolizar e eliminá-los, entretanto dependendo da toxicidade e, ou, quantidade, pode ter esse primeiro sistema de defesa suplantada (Moore et al., 2008a, 2008b; Martínez et al., 2018; Santos-Junior et al., 2019). Neste cenário, a célula apresenta característica citotóxicas, com danos ultraestruturais que podem, se

acumulados em diversas células, repercutir em danos estruturais no tecido que comprometem a homeostase tecidual (Martínez et al., 2018; Santos-Junior et al., 2019). Assim, o sistema celular autofágico apresenta preponderância funcional para a reciclagem de macromoléculas, estruturas supramoleculares e organelas danificadas (Moore et al., 2008a, 2008b; Morishita & Mizushima, 2019). Todavia, na falha desse sistema e o comprometimento celular, a apoptose é acionada como último mecanismo de defesa, a fim de descartar as células comprometidas resguardando a capacidade funcional do tecido (Elmore, 2007; Moore et al., 2008a, 2008b; Hakim et al., 2010; Morishita & Mizushima, 2019; Bertherloot et al., 2021). Esse processo atua não só na manutenção das funções do epitélio, pois também representa um importante processo de defesa contra tóxicos, uma vez que participa da eliminação desses agentes tóxicos ao eliminar as células contaminadas, intoxicadas e inviáveis, contribuindo para o retorno da homeostase do tecido (Elmore, 2007; Moore et al., 2008a, 2008b; Morishita & Mizushima, 2019; Bertherloot et al., 2021).

A redução de imunocompetência das abelhas é outro ponto preocupante (Tarek et al., 2018), uma vez que os patógenos estão entre as hipóteses para explicar a redução das populações de abelhas, principalmente pela associação com os pesticidas, susceptibilizando-as aos efeitos tóxicos nas abelhas. Diversos patógenos infectam as abelhas e estão relacionados ao seu declínio, e suas interações com pesticidas tem sido elencadas como uma forte hipótese explicativa do declínio destes insetos (Tarek et al., 2018). Dentre os vários patógenos que infectam abelhas, o microrganismo unicelular *Nosema ceranae* é de emergência global (Klee et al., 2007; Grupe II & Quandt, 2020; Marín-García et al., 2022), uma vez que pode acarretar na nosebose, alterações comportamentais e de voo, redução de sobrevivência, causa de estresse oxidativo e citotoxicidade (Keeling, 2009; Fries, 2010; Dussaubat et al., 2012; Goblirsch et al., 2013). Esse patógeno pertence ao grupo monofilético Microsporidia, que por muito tempo foi considerado um Protista, mas atualmente é pertencente ao reino monofilético Fungi (Capella-Gutierrez et al., 2012), tendo sido reclassificada por meio de filogenia molecular no gênero *Vairimorpha* (Tokarev et al., 2020), todavia no presente trabalho será tratada por *Nosema* como é tradição na literatura especializada, procedimento declarado por outros autores (Grupe II & Quandt, 2020).

Originalmente a nosebose era atribuída a espécie *Nosema apis*, entretanto investigações em *Apis ceranae* identificaram uma nova espécie, *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996), capaz de infectar *Apis mellifera* (Martín-Hernández et al., 2018;

Marín-Garcia et al., 2020). Apesar de infecções em *A. mellifera* tenham sido originalmente detectadas no sec. XXI como infecção natural (Higes et al, 2006) e induzida laboratorialmente (Higes et al, 2007), amostras históricas analisadas posteriormente identificaram abelhas infectadas a partir da década de 70 (Martín-Hernández et al, 2018). Conquanto ambas as espécies, *N. apis* e *N. ceranae*, causem a mesma doença, implicaram na classificação de dois subtipos da doença, a nosemose tipo A e a nosemose tipo C, respectivamente (Martín-Hernández et al, 2018), uma vez que o tipo A é considerada oportunista por ocorrer somente em colônias enfraquecidas, além de outras diferenças clínicas (Martín-Hernández et al, 2018; Marín-Garcia et al., 2020). Embora *N. ceranae* apresente maior multiplicação que *N. apis* em culturas de células (Gisder et al, 2017), essa distinção não é considerada relevante *in vivo* a ponto de explicar os maiores danos causados pelo tipo C, uma vez que possuem virulência e causam mortalidade semelhantes em seus hospedeiros (Forsgren & Fries, 2010). Infecções concomitantes são relatadas no leste asiático (Marín-Garcia et al., 2020), sendo *N. ceranae* o agente infeccioso considerado predominante em *A. mellifera* globalmente, mas em regiões como o norte da Europa, *N. apis* ainda permanece prevalente. *Nosema neumanii* é outro microsporídeo descoberto recentemente em Uganda, porém não há quadro clínico e sintomatologia associada, portanto ainda não se considera causador de nosemose (Martín-Hernández et al, 2018).

A transmissão de *Nosema* spp. entre as abelhas é por via fecal-oral, trofalaxia, allogrooming (autolimpeza) e contato com fômites em água, mel, geleia real e pólen (Marín-Garcia et al., 2020). Trata-se de simbiote parasita intracelular obrigatório, infectante do epitélio do intestino médio (Keeling, 2009), sendo amplamente encontrada em abelhas adultas, embora possam infectar larvas (Eiri et al., 2015; BenVau & Nieh, 2017). No lúmen do intestino médio, os esporos evertem uma estrutura chamada filamento polar pela qual introduzem seu esporoplasma nas células digestivas, manipulando o metabolismo do hospedeiro de onde obtém recursos energéticos (Keeling, 2009). No epitélio do intestino médio, apresentam preferência pela porção posterior do órgão, não sendo normalmente encontradas na porção anterior, e restringindo a infecção às células digestivas, não ocorrendo nas células regenerativas (Panek et al., 2018). No curso da infecção, ocorrem outras alterações na fisiologia do hospedeiro como manipulação de níveis de vitelogenina e hormônio juvenil, supressão da imunocompetência e alteração de produção de feromônios (Fries,

2010; Paris et al., 2018). A alteração dos títulos de vitelogenina e hormônio juvenil bem como de feromônios são responsáveis por regular e avançar as abelhas nutrizas para as funções seguintes dentro da divisão de trabalho por polietismo etário dentro da colmeia (Marín-García et al., 2020), e a redução de imunocompetência representa uma adaptação a fim de driblar a imunidade do hospedeiro (Kurze et al., 2015; Tarek et al., 2018).

Um mecanismo de imunidade que é comprometido pelo patógeno, é a redução de apoptose no intestino médio, principalmente na porção posterior, uma vez que a apoptose é um dos mecanismos de defesa da imunidade inata de *A. mellifera* a patógenos intestinais. Acredita-se assim, que a redução da apoptose é uma das principais estratégias de *N. ceranae* para estabelecer uma infecção bem sucedida (Higes et al., 2013; Kurze et al., 2015; Sinpoo et al., 2018; Paris et al., 2018; Kurze et al., 2018), pois supressão de apoptose também ocorre em células de cultura de *Bombyx mori* infectadas por *Nosema bombicis* (He et al., 2015). De fato, linhagens de *A. mellifera* produzidas e que são tolerantes a *N. ceranae* não apresentam redução de apoptose nas células do intestino médio (Kurze et al., 2015; Kurze et al., 2018), evidenciando a centralidade da manipulação de apoptose por parte do microsporídio para o sucesso da infecção intracelular. Tal descoberta é de alta relevância, uma vez que a apoptose contribui para a detoxificação e homeostase do tecido (Elmore, 2007; Moore, 2008; Morishita & Mizushima, 2019; Bertherloot et al., 2021). Portanto a supressão de apoptose por *N. ceranae* encerra potencial de fragilizar as abelhas ou mesmo amplificar o efeito de pesticidas por via oral. Entretanto, isso não está totalmente claro uma vez que o estímulo a apoptose pelos próprios pesticidas (Moore, 2008; Liu et al., 2017; Carneiro et al., 2023; Sun, 2024) pode ser superior à supressão exercida pelo microsporídio.

O processo de morte celular programada apoptótico pode ser dependente ou independente de caspase, que são zimogênios (as procaspases) com propriedade proteolítica (caspases clivadas e dimerizadas) quando ativadas (Lockchin e Zackeri, 2004; Madeo et al., 2009; Bertherloot et al., 2021; Sun, 2024). A apoptose suprimida por *N. ceranae* em abelhas é dependente de caspase (Higes et al., 2013) e acredita-se que da via intrínseca (Martin-Hernandez et al., 2017).

As caspases são funcionalmente distinguidas entre caspases iniciadoras à montante das caspases efetoras, onde estas são ativadas por aquelas (Sun, 2024). A via de sinalização de apoptose dependente de caspase é funcionalmente distinguida em

uma porção reguladora à montante e uma porção efetora à jusante. A porção reguladora recebe os estímulos, os integra e processa, seguindo para a porção efetora, onde há execução de apoptose propriamente dita (Sun, 2024). Canonicamente a apoptose possui duas vias de ativação, a via extrínseca, onde sinais extracelulares atuam em receptores na superfície celular, e a via intrínseca ou via mitocondrial, onde sinalizações intracelulares por dano celular iniciam a via e desdobram-se no aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas, principalmente o citocromo c, no citosol (Arancibia et al., 2021; Sun, 2024). Ambas as vias desembocam nas caspases iniciadoras, que são recrutadas para plataformas de sinalização multiproteicas, e em uma cascata proteolítica ativam as caspases efetoras, executoras da apoptose como a caspase-3 (Sun, 2024).

A importância da apoptose na regeneração tecidual homeostática, sua função na regulação da homeostase, seja na reversão tecidual de danos por estresse oxidativo, bem como combate a diversos patógenos intracelulares, regulação da autofagia, sua atuação como mecanismo de resposta a pesticidas e mecanismo celular de detoxificação do tecido, torna relevante a sua supressão por *N. ceranae*. Esse fenômeno é mais grave no contexto de risco que as abelhas *A. mellifera* enfrentam, dado a exposição a pesticidas, quando não todos esses fatores somados. Por representar um dos mecanismos centrais na manutenção da homeostase tecidual do intestino médio e demais órgãos, sua supressão ou redução fragiliza os tecidos, órgãos e organismos. Qualifica-se, portanto, como potencial mecanismo subjacentes ao fenômeno da CCD, possivelmente mediando a relação patógeno e pesticidas de diversas classes e modos de ação. Essa mediação pode ser responsável por tornar susceptível abelhas a pesticidas, ou aumentar a susceptibilidade, magnificando alterações letais e subletais em nível celular, tecidual e fisiológico, fragilizando as abelhas diante de outros múltiplos estressores bióticos e abióticos presentes em habitats atuais, configurando uma síndrome de estresse.

Devido à importância ecológica, econômica e social das abelhas melíferas e o declínio populacional das abelhas polinizadoras, tem se tornado premente compreender os fatores e impactos que os pesticidas e suas relações com patógenos podem exercer sobre elas. A possibilidade do efeito deletério pela associação patógeno-pesticida e sua complexa rede de relações fisiológicas ainda é amplamente desconhecida, de modo que investigar o mecanismo de apoptose das células intestinais das abelhas e sua supressão por *N. ceranae*, é um importante passo para

compreender como esse patógeno pode fragilizar as abelhas aos pesticidas, contribuindo para a compreensão de como esse fenômeno pode estar relacionado com a síndrome de estresse que acomete abelhas.

Este estudo tem como objetivo investigar se o patógeno *N. ceranae* fragiliza *A. mellifera* a ação subletal do inseticida ciantraniliprole, avaliando a hipótese da supressão da apoptose do epitélio do intestino médio das abelhas hospedeiras como um mecanismo causal de mediação responsável pela fragilização das abelhas ao pesticida.

2. Material e Métodos

2.1. Insetos

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram obtidas de quadros de crias de cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). As colônias foram criadas e manipuladas em caixas Langstroth de ninho e sobreninho, totalizando por colônia 20 quadros padrão com favos contendo mel operculado e não operculado, pólen, ovos, crias em estágios larval e pupal, com rainhas fisiogástricas jovens e de idade aproximada entre as colmeias. Os quadros foram avaliados quanto a qualidade da cera e idade das crias em estágio de pupas em alvéolos operculados, e transferidos em estufa incubadora BOD a 34,5 °C e 60-70% de umidade relativa para a emergência das abelhas adultas após 24h (Williams et al., 2013).

As operárias adultas recém emergidas foram coletadas em gaiolas plásticas ventiladas transparentes, mantidas a 30 °C em 60-70% de umidade relativa e total ausência de luz, condições em que os experimentos foram realizados para mimetizar o ambiente interno da colônia (Fries et al., 2013; Williams et al., 2013). A alimentação foi com solução de sacarose 50% (m/v) e água destilada, assim como pólen coletado das corbículas das operárias (Williams et al., 2013). Os experimentos de inoculação de *N. ceranae* foram realizados com abelhas de 2 dias de idade adotando protocolo Standard methods for Nosema research (Fries et al., 2013), enquanto os toxicológicos foram conduzidos em abelhas de três dias de idade seguindo padronização sugerida pelas diretrizes do teste nº 213 da OECD (1998). Abelhas com malformações, amputações e alterações de caminhamento e coloração não foram utilizadas. Por fim, foi realizada amostragem aleatória de 50 abelhas entre as operárias recém emergidas para analisar a possível presença de *N. ceranae* para verificar ausência de infecção prévia das abelhas utilizadas. O pólen fornecido para as abelhas foi armazenado em

congelador em frasco vedado para eliminar a infectividade e viabilidade de possíveis esporos (Fries et al., 2013).

2.2. Bioensaio de concentração-mortalidade

O inseticida ciantraniliprole (100g.L⁻¹, Benevia®) foi diluído em água destilada contendo 50% (m/v) de sacarose. A seguir, procedeu-se com a feitura da concentração da calda de campo recomendada na bula contra *Bemisia tabaci* para a cultura da soja por aplicação aérea [50L ha⁻¹ de calda com dose de 1250 mL .ha⁻¹; 2500 ppm de ingrediente ativo (i.a.)] e, a partir dela, realizou-se as diluições seriadas com fator 2 para a condução do experimento piloto de 24h a fim de encontrar a faixa de concentração entre 90% e 10% de mortalidade, aproximadamente (Abbott, 1925). A partir dessa faixa de concentração se estabeleceu uma série de diluição com 10 concentrações com fator de diluição 2 (1,25 mg/L; 0,62 mg/L; 0,31mg/L; 0,15mg/L; 0,078mg/L; 0,039mg/L; 0,019mg/L; 0,009mg/L; 0,004mg/L) e o controle para correção de mortalidade (Abbott, 1925), a fim de avaliar a toxicidade aguda por 24h, permitindo assim determinar os pontos toxicológicos relevante do inseticida. Não foi observado mortalidade superior a 10% dos controles em tempos superiores a 24h até 96h (OECD, 1998).

Para o experimento, abelhas foram confinadas em grupos de 10 indivíduos em gaiolas de plástico transparentes de uso único com 250 cm³ (Williams et al., 2013). Cada grupo de abelha foi submetido a jejum de 2h, seguido de alimentação com uma das 10 concentrações do inseticida em solução de 50% de sacarose para exposição *per os ad libitum* por 4h (OECD, 1998). Experimento contou com cinco repetições, cada uma advinda de uma colônia distinta. O controle foi realizado com alimentação com solução de sacarose com água destilada 50%. O número de abelhas mortas foi contabilizado por 24h após exposição ao pesticida, sendo a morte estabelecida pela inexistência de movimento após repetidamente estimuladas por pinças.

2.3. Extração, purificação, contagem e análise de viabilidade para inoculação de *Nosema*

Esporos frescos de *N. ceranae* foram obtidos de 45 operárias campeiras de três colônias, maceradas em 1 mL/abelha de água destilada e o material então filtrado. Para obter uma suspensão purificada, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 5 min por três vezes. Em cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado homogeneizado. Após a última ressuspensão em 20 mL de água, alíquotas foram analisadas para quantificação do número de esporos em câmara de Neubauer. A

seguir foi preparada uma suspensão de esporos frescos viáveis com concentração de 10000 esporos/ μ L de solução de sacarose 50% em água destilada, segundo protocolo Standard methods for Nosema research (Fries et al., 2013).

A viabilidade foi testada por teste de coloração fluorescente, o que permite avaliação antes do uso. Alíquotas de esporos foram incubadas com iodeto de propídio (PI) a 1mg/mL por 30 min e posteriormente com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 2 mg/mL, por 30 min a 25°C (adaptado de Fries et al., 2013; McGowan et al., 2016).

Para inoculação de uma dose de 50000 esporos maduros frescos e viáveis por abelha nas operárias (Kurze et al., 2018), a administração individual foi feita por meio de micropipeta, fornecendo 5 μ L da suspensão de esporos com 10000 esporos/ μ L. As abelhas foram mantidas em gaiolas individuais de 1,5 cm³ e jejum de 2h; após a administração mantidas separadas por 20 min, a fim de evitar trofalaxia e, então, transferidas para as gaiolas (Fries et al., 2013).

2.4. Bioensaio de sobrevivência à exposição crônica

Estabelecidas as concentrações letais foi realizada a análise de sobrevivência por 8 dias (192h) para avaliar a exposição crônica do pesticida ciantraniliprole e a ação concomitante sobre a abelha entre esse pesticida e o patógeno *N. ceranae* ao longo do intercurso da infecção.

O número de abelhas mortas por gaiola foi registrado a cada 12h após o início do experimento. Um total de sete tratamentos e o controle foram analisados: Cl_{50/10}, Cl_{50/100}, Cl_{50/1000}, Cl_{50/10}+*Nosema*, Cl_{50/100}+*Nosema*, Cl_{50/1000}+*Nosema*, apenas com inoculação com *Nosema* e o controle com solução de sacarose 50%. Todos os tratamentos foram preparados com soluções de sacarose 50% e administrados *per os ad libitum* a partir do terceiro dia de idade por oito dias, sendo que o tratamento com *N. ceranae* recebeu solução de sacarose 50% *ad libitum*, assim como o controle. A inoculação do patógeno seguiu o modelo indicado neste estudo (seção 4.4): inóculo individual *per os* com 50000 esporos maduros frescos viáveis em 5 μ L de solução de sacarose 50%, totalizando 50 abelhas inoculadas individualmente para o tratamento somente com *Nosema* e 150 abelhas para avaliar o efeito *Nosema* e pesticida em três concentrações acima descritas. Cada tratamento e o controle contaram com cinco potes de 250 cm³ com 10 abelhas cada, totalizando 400 abelhas. Para segregar o momento da inoculação do início da exposição ao pesticida a fim de reduzir interferências diretas entre ambos, a inoculação foi realizada em abelhas recém emergidas com dois dias, e o início da exposição ao pesticida após 24h da inoculação,

o que completa três dias mantendo a padronização adotada para estudos toxicológicos. Esse procedimento foi necessário, pois inocular abelhas conjuntamente com a solução de pesticida, preparando uma única suspensão, poderia afetar a viabilidade dos esporos, além de exigir alimentação coletiva dos esporos aumentando sobremaneira o erro amostral (Fries et al., 2013).

2.5. Imunofluorescência

Objetivando avaliar a influência da infecção por *N. ceranae* sobre a ocorrência de apoptose no intestino médio, e a interrelação entre esses fenômenos e a influência de pesticida, abelhas operárias foram submetidas a administração do patógeno e exposição ao ciantraniliprole na concentração de $CL_{50/10}$ por ser nessa concentração que se verificou redução de sobrevivência por interação. Tanto a inoculação quanto a exposição seguiram procedimento descrito para a sobrevivência crônica (seção 4.5). Assim, três tratamentos foram realizados, a saber, exposição a $Cl_{50/10}$, $Cl_{50/10}+Nosema$ e apenas a *Nosema*, além do controle.

Para cada tratamento, cinco abelhas de diferentes gaiolas foram coletadas após oito dias de exposição e crioimobilizadas a $-4^{\circ}C$ por 1 min. Ato contínuo, os intestinos médios foram dissecados em microscópio estereoscópico utilizando solução fisiológica para insetos (0,12 M de NaCl, 0,2M de KH_2PO_4 e 0,2 M de Na_2HPO_4 ; pH 7,2).

Para avaliar a intensidade da resposta celular de apoptose dependente de caspase no intestino médio, os intestinos médios dissecados foram transferidos para solução fixadora Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 1h. As amostras foram então lavadas 5 vezes por 10 min em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,12M pH 7,2 e transferidas para PBS contendo Tween-20 1% (PBST) por 15 minutos, incubadas por 72 h a $5^{\circ}C$ no anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (Asp175, #9664; 1:500) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA; produzido em coelho) em PBS 0,12M. As amostras foram então lavadas em PBS e incubadas por 24h a $5^{\circ}C$ com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a FITC (1:500) (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), lavadas com PBS. Por fim, os núcleos serão contracolorados fluorescentemente com a $2\ \mu g/mL$ 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Os intestinos foram analisados e fotodocumentados em montagem total com o microscópio EVO M5000 (Thermo Fisher) em modo de fluorescência para elaboração de pranchas representativas em aumento de 200 vezes, permitindo discernir na imagem a morfoanatomia da região.

Para a contagem de marcações, cinco campos aleatórias para cada região, a saber, regiões anterior, medial e posterior do intestino médio, foram consideradas em aumento de 400 vezes, e o número de marcações foi contabilizado manualmente em montagem total ao longo de todos os planos das 15 áreas selecionadas. Os tratamentos foram comparados considerando as marcações totais por intestino médio, como também segregado entre as porções anterior, medial e posterior do intestino médio comparando cada região entre os tratamentos; por fim, o número de marcações entre as regiões em cada tratamento também foi avaliado a fim de verificar a homogeneidade da resposta do intestino médio.

2.6. Histopatologia

2.6.1. Preparação de amostras e cortes histológicos

Visando avaliar os impactos histopatológicos da associação do pesticida ciantraniliprole com o patógeno *N. ceranae* no intestino médio de *A. mellifera* africanizadas, abelhas operárias foram submetidas a administração do patógeno e exposição ao pesticida ciantraniliprole na concentração $CL_{50/10}$ onde se verificou redução de sobrevivência. Além disso, abelhas operárias também foram expostas somente ao pesticida, e somente infectadas, além de abelhas controle. A inoculação do patógeno e a exposição ao pesticida ciantraniliprole $CL_{50/10}$ seguiram o mesmo procedimento da experimentação para análise de sobrevivência crônica e análise de imunofluorescência.

Para cada tratamento, cinco abelhas operárias foram coletadas após oito dias de exposição e crioimobilizadas a $-4^{\circ}C$ por 1 min. Em seguida seus intestinos médios foram dissecados em microscópio estereoscópico e solução fisiológica para insetos (0,12 M de NaCl, 0,2M de KH_2PO_4 e 0,2 M de Na_2HPO_4 ; pH 7,2) e então embebidos em solução fixadora Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 48 h a $5^{\circ}C$. Então, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,12M pH 7,2, desidratadas em série etanólica crescente (70, 80, 90, 95 e 99%), submetidas ao processo de inclusão e emblocadas em historresina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Alemanha). Por fim, cortes histológicos de 3 μm de espessura foram obtidos, corados com coloração padrão de hematoxilina e eosina, e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60.

2.6.2. Parâmetros histopatológicos e índice de lesão

Para analisar semiquantitativamente os danos histopatológicos e compará-los entre os grupos experimentais por regiões do intestino médio, bem como comparar entre

essas regiões para cada grupo, um índice de lesão foi calculado para o intestino médio inteiro a partir de parâmetros histopatológicos (Bernet et al. 2001; Grella et al., 2019). Além disso, um índice de lesão foi calculado para cada porção do intestino médio, i. e., anterior, medial e posterior, para avaliar o impacto localmente e comparar semelhanças e diferenças com o estado de saúde global do órgão.

O método de cálculo do índice foi a adaptação para abelhas que Grella et al.(2019) realizou do protocolo histopatológico para peixes de Bernet et al. (2001), porém acrescido de alterações baseadas em Ribeiro et al.(2024) a partir de Velmuragan et al. (2007), Monteiro et al. (2008) e Flores-Lopes e Thomaz (2011). Através da seguinte equação $I_{org} = \sum (a \times w)$, onde I_{org} é o valor do índice de órgão, “a” é o valor da pontuação e “w” o fator de impacto ou importância (Bernet et al. 2001), entretanto, distintamente de Grella et al. (2019) e Bernet et al. (2001), o valor de pontuação adotado foi a proporção de células afetadas de um tipo celular em relação as células totais desse mesmo tipo à semelhança do método de Ribeiro et al.(2024).

Considerando os tipos de alterações teciduais, o fator de impacto adotado apresenta três níveis de importância, a saber: grau 1, lesões patológicas menores e facilmente reversíveis; grau 2, lesões patológicas moderadas e com algum grau de refratariedade em sua reversibilidade; grau 3, lesões patológicas graves e irreversíveis (Bernet et al., 2001; Grella et al., 2019). Assim, os seguintes parâmetros histopatológicos usados como biomarcadores de estresse foram identificados neste trabalho e classificados quanto ao seu grau de impacto: fragmentos celulares (grau 1), vacuolização (grau 2), picnose (grau 3) e eliminação celular (grau 3). Todos os valores atribuídos seguiram Grella et al. (2019), com exceção de eliminação celular.

A identificação e quantificação consistiu em avaliar 8 cortes histológicos de cada indivíduo selecionados a cada 4 cortes sequenciais em um total de 5 indivíduos. Embora um número superior a 8 cortes pudesse ser selecionado para a região medial do intestino médio, a espessura nas porções anterior e posterior é inferior, limitando a oito cortes nessas regiões, portanto, a fim de equalização, a região medial seguiu o mesmo padrão numérico. Foram identificados e contados vacuolização, fragmentos celulares, picnose e eliminação celular em cada corte, e a proporção para os parâmetros histopatológicos para cada tipo celular foi estabelecida para cada corte histológico. A mediana dos valores dos 8 cortes foi adotada como medida de tendência central para representar o indivíduo, pois sua maior refratariedade a valores discrepantes observados em alguns cortes a torna um resumo do conjunto de dados

mais representativo que a média, neste caso. Em decorrência disso, conquanto se tenha identificado células digestivas com núcleo picnótico no epitélio, foram encontradas em muito poucos cortes em todos os grupos experimentais, portanto seu número não é indicador representativo da saúde geral do órgão dos indivíduos e, por consequência, não sendo utilizado para o cálculo do índice de lesão, uma vez que a mediana resultou em valores nulos.

A área de contagem foi definida com campo de visão de aumento de 200 vezes estabelecendo um núcleo de uma célula epitelial como referência, sendo a contagem realizada nessa área com o campo de visão de 400 vezes de aumento. Elementos liberados no lúmen, como fragmento celular e células eliminadas, só foram contados na cercania luminal do epitélio.

2.7. Estatística

Os dados de concentração-mortalidade foram avaliados quanto aos pressupostos de normalidade (shapiro-wilk) e homocedasticidade (teste de Barret) e então submetidos à análise Probit, gerando curva de concentração-mortalidade (Finney 1964), a concentração mais elevada não foi considerada por ter resultado em mortalidade de todas as abelhas. As curvas de sobrevivência foram estimadas utilizando o estimador de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram comparadas com o teste de Log-Rank com ajuste de Homer a significância de 0.001. A análise de sobrevivência foi realizada utilizando os pacotes survival, survminer no software R. Os dados de marcação de caspase-3 clivadas foram organizados com a soma dos valores dos 5 campos de contagem de cada porção (anterior, medial e posterior) do intestino médio e integralizados para o intestino médio ou apenas para cada porção do intestino médio, a depender da análise. Para comparar as marcações entre os diferentes tratamentos no intestino médio inteiro, bem como as análises considerando suas diferentes porções, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Skapiro-Wilk e avaliados quanto a homocedasticidade por meio do teste de Levene, ambos com significância de 0.05. A presença de outliers também foi verificada. Para identificar as diferenças, os dados foram testados para distintas distribuições e por fim ajustados em modelo(glm) com distribuição Binomial Negativa com correção para overdispersão. As comparações entre os tratamentos foram feitas com o Teste Tukey com ajuste de Bonferonni utilizando o pacote emmeans no software R. Para comparar as diferenças entre as porções do intestino médio de cada tratamento em indivíduos do Controle e infectados por *N. ceranae*, os

dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade, homogeneidade, verificação de outliers e modelagens anteriormente descritos, enquanto as diferenças foram avaliadas com ANOVA e as comparações feitas com o teste TukeyHSD. Para os dados dos indivíduos expostos a CL_{50/10} foi adotada uma análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla com o teste de Conover-Iman com ajuste de Bonferonni utilizando o pacote conover.test do software R. Para os dados dos indivíduos expostos a CL_{50/10} e infectados com *N. ceranae* se utilizou de ANOVA de Friedman seguida pela comparação por meio do teste de Conover-Iman com ajuste de Bonferonni. Para avaliar os parâmetros histopatológicos, se testou os dados para normalidade e homocedasticidade. Como os dados atenderam o pressuposto de normalidade, se adotou análise paramétrica - ANOVA e teste Tukey, sendo que para a eliminação celular houve violação do pressuposto de homocedasticidade ($p < 0.05$), por consequência a ANOVA teve ajuste para homocedasticidade Welch-ANOVA.

3. Resultados

3.1. Bioensaio de concentração-mortalidade

O modelo quantal de concentração-mortalidade Probit adotado foi adequado ($\chi^2 = 12,20$; $P > 0,05$), estimando as concentrações letais de ciantraniliprole após 24h (Tabela 1). Não houve mortalidade no grupo controle.

Tabela 1. Concentrações letais após 24 horas da exposição (g.l.= 7; coeficiente angular = $1,1063(\sim 48^\circ) \pm ep = 0,1299856$, inter.conf.inf. = $0,7989708$, inter.conf.sup. = $1,413803$; coeficiente linear = $6,56113 \pm ep = 0,1848491$, inter.conf.inf. = $6,123965$, inter.conf sup. = $6,998302$).

Concentração letal	Concentração estimada (mg i.a. L ⁻¹)	Intervalos de confiança (95%) (mg i.a. L ⁻¹)	χ^2 (Valor P)
CL ₁₀	0,002	0,001- 0,004	
CL ₂₅	0,009	0,005 - 0,015	
CL ₅₀	0,039	0,027 - 0,051	12,20 (0,90)
CL ₇₅	0,16	0,110 - 0,249	
CL ₉₀	0,56	0,34 - 1,14	

3.2. Bioensaio de sobrevivência em exposição crônica

A probabilidade de sobrevivência estimada por Kaplan-Meier revelou que o tratamento com redução significativa da probabilidade de sobrevivência das abelhas em comparação ao controle consistiu nas abelhas infectadas com o patógeno *N. ceranae* e expostas a concentração CL_{50/10} do ciantraniliprole (Figura 1). O tratamento com abelhas apenas infectadas com o patógeno, o tratamento com abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} e os tratamentos com as demais concentrações do ciantraniliprole com abelhas infectadas e não infectadas não apresentaram diferença em relação ao controle (Figura 1).

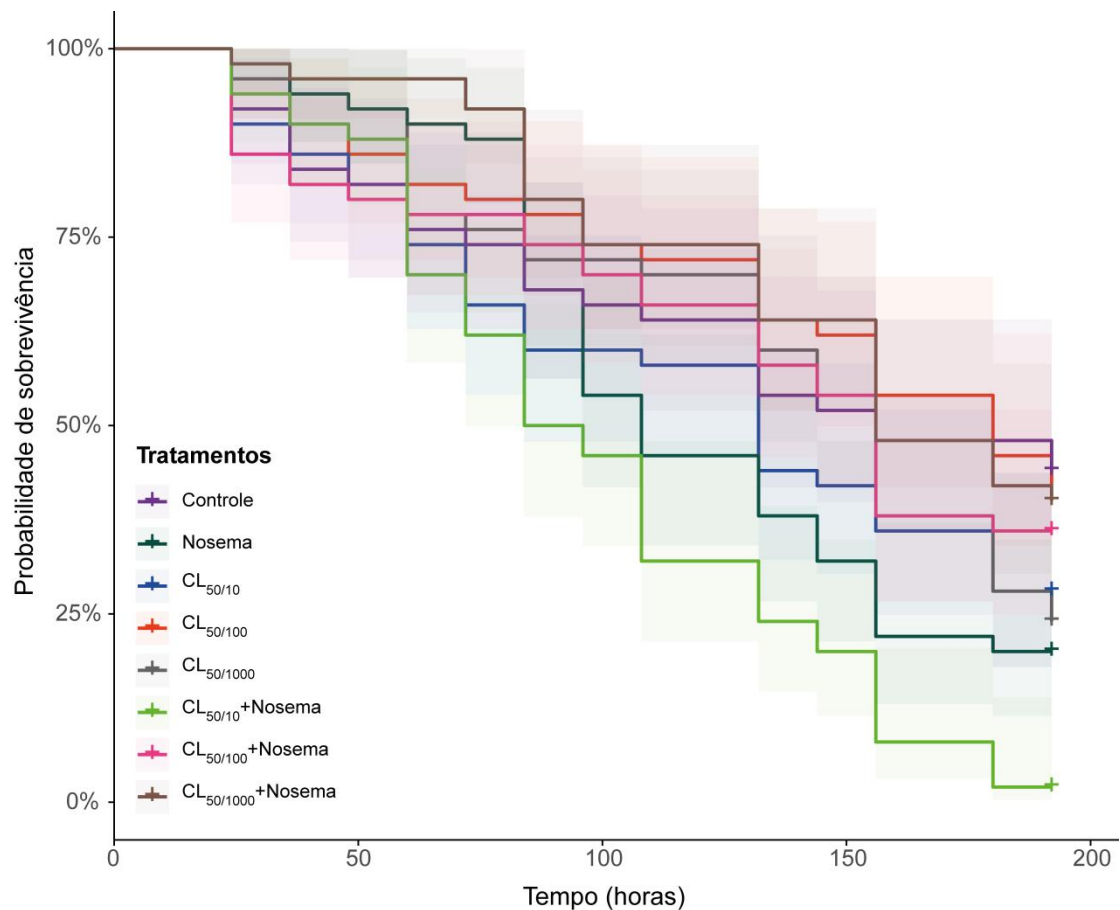


Figura 1: Curvas de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* expostas a diferentes concentrações subletais do inseticida cintraniliprole e infecção por *Nosema ceranae* obtidas pelo estimador Kaplan-Meier ($p > 0.001$). As cores sombreadas são os intervalos de confiança (95%) correspondentes.

3.3. Detecção de Apoptose no intestino médio

3.3.1. Intestino médio total

A imunofluorescência para o marcador capase-3 clivada da ativação da via de sinalização para apoptose ao longo de todo o intestino médio apresentou diferença entre os tratamentos. As abelhas expostas a CL_{50/10} de ciantraniliprole apresentaram a maior ativação da via de sinalização para apoptose no intestino médio, seguido daquelas expostas a CL_{50/10}+*Nosema*, enquanto nas abelhas apenas com *Nosema* foi similar ao controle (Figura 2).

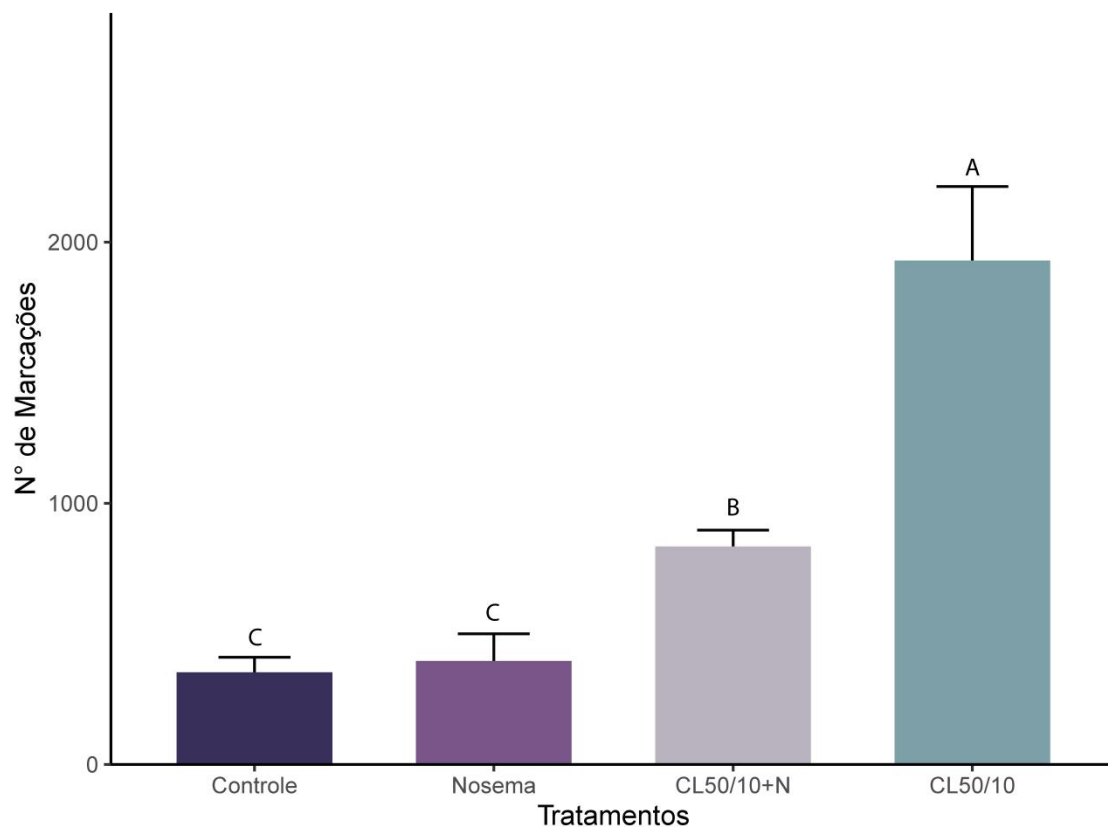


Figura 2: Quantificação da ativação via de sinalização para apoptose pela caspase-3 clivadas no intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença pelo teste Tukey com ajuste de Bonferonni.

3.3.2. Porções do intestino médio

Na porção anterior do intestino médio, as operárias expostas ao pesticida CL_{50/10} com e sem *Nosema* apresentaram maior quantidade de células em apoptose que nas abelhas controle (Figuras 3 e 4). As abelhas apenas infectadas com *N. ceranae* apresentaram menor quantidade de células em apoptose que aquelas expostas à CL_{50/10} de ciantraniliprole (Figuras 3 e 4).

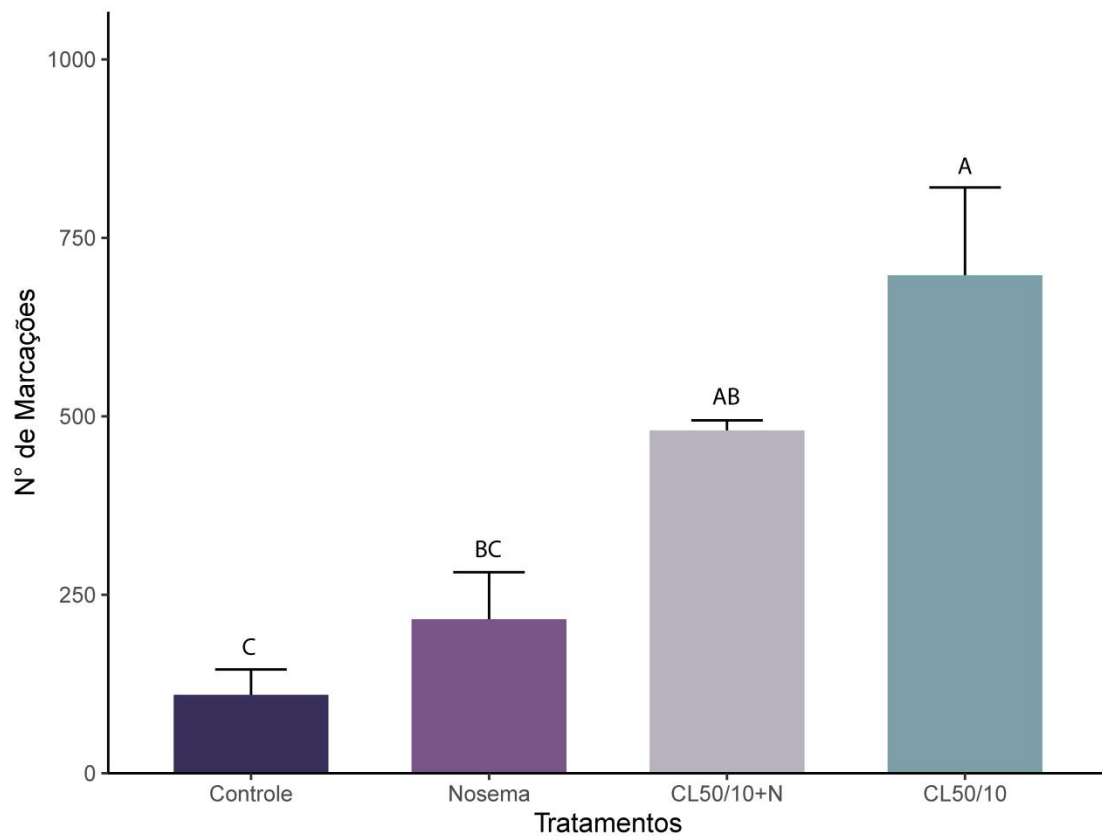


Figura 3: Quantificação da ativação via de sinalização para apoptose pela caspase-3 clivadas na porção anterior do intestino médio de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *Nosema ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença pelo teste Tukey com ajuste de Bonferonni.

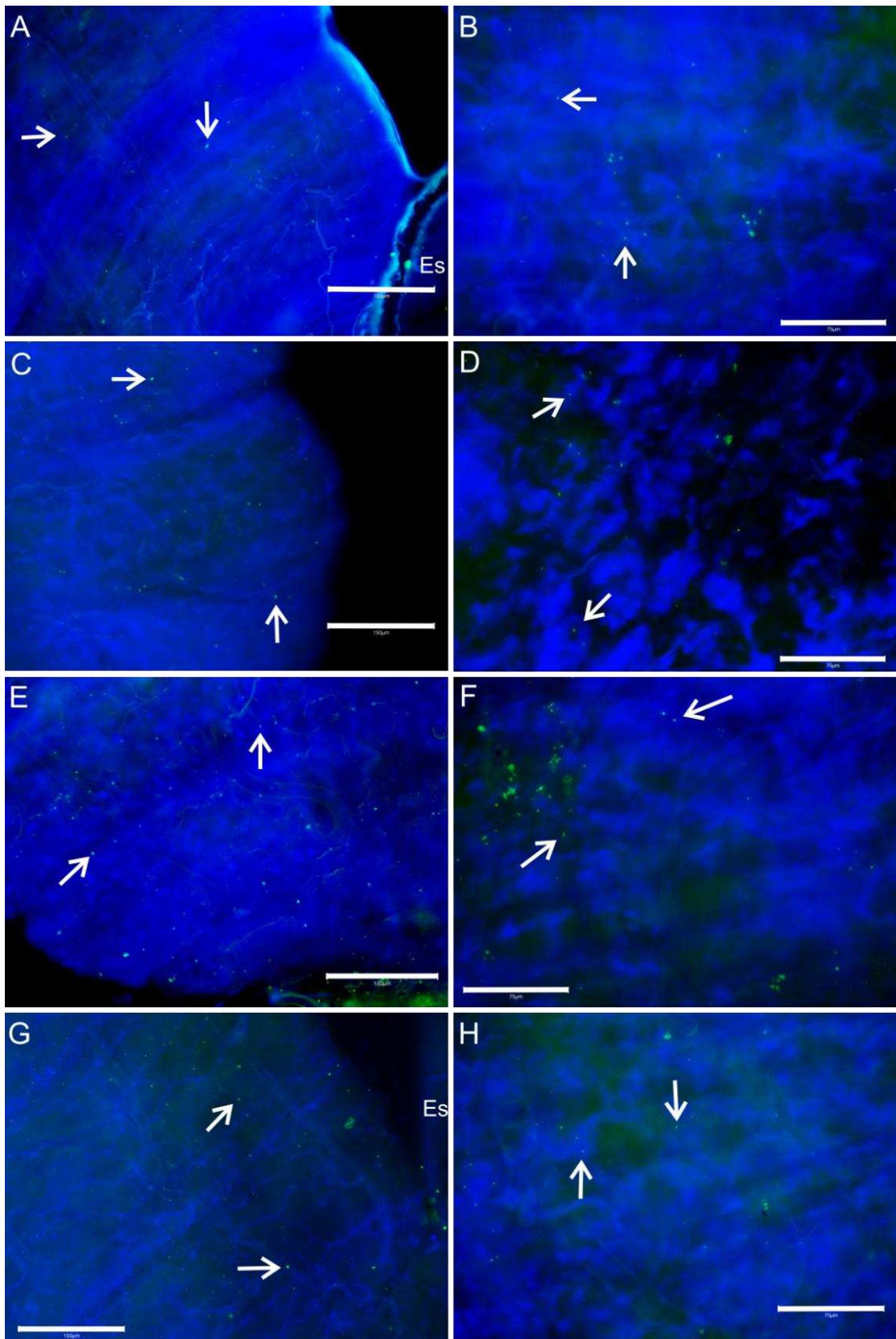


Figura 4: Montagem total da região anterior do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* expostas a diferentes concentrações subletais do inseticida cinatraniliprole e

infecção por *Nosema ceranae* mostrando imunomarcações positivas para caspase-3 clivada (setas). A-B: controle. C-D: infectado com *Nosema*. E-F: exposto a concentração CL_{50/10} do pesticida. G-H: infectado com patógeno e exposto à CL_{50/10} do pesticida. Es: estomodeu. Núcleos em azul corados com DAPI. Barras de escalas A,C,E,G: 150 µm. Barras de escala B,D,F,H: 75 µm.

Na região medial do intestino médio, as operárias submetidas ao tratamento CL_{50/10} apresentaram número de células positivas para caspase-3 clivada superior a todos os tratamentos e o controle, enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferença entre si e com o controle (Figuras 5 e 6). Este mesmo padrão foi observado para a região posterior do intestino médio, onde as operárias expostas ao tratamento CL_{50/10} apresentaram quantificação de caspases - 3 clivadas maior que todos os tratamentos além do controle; os demais tratamentos e o controle não apresentaram diferença significativa entre si (Figuras 7 e 8).

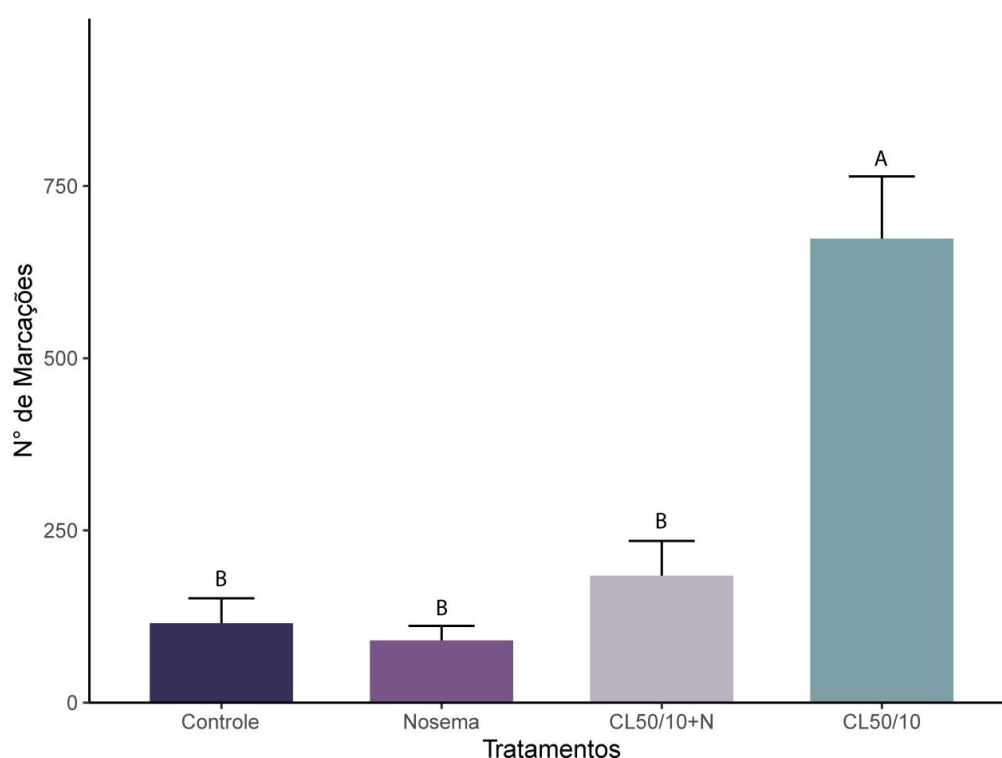


Figura 5: Quantificação da ativação via de sinalização para apoptose pela caspase-3 clivadas na porção medial do intestino médio de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *Nosema ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e

expostas a ciantraniliprole $CL_{50/10}$. $CL_{50/10}$: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole $CL_{50/10}$. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença pelo teste Tukey com ajuste de Bonferonni.

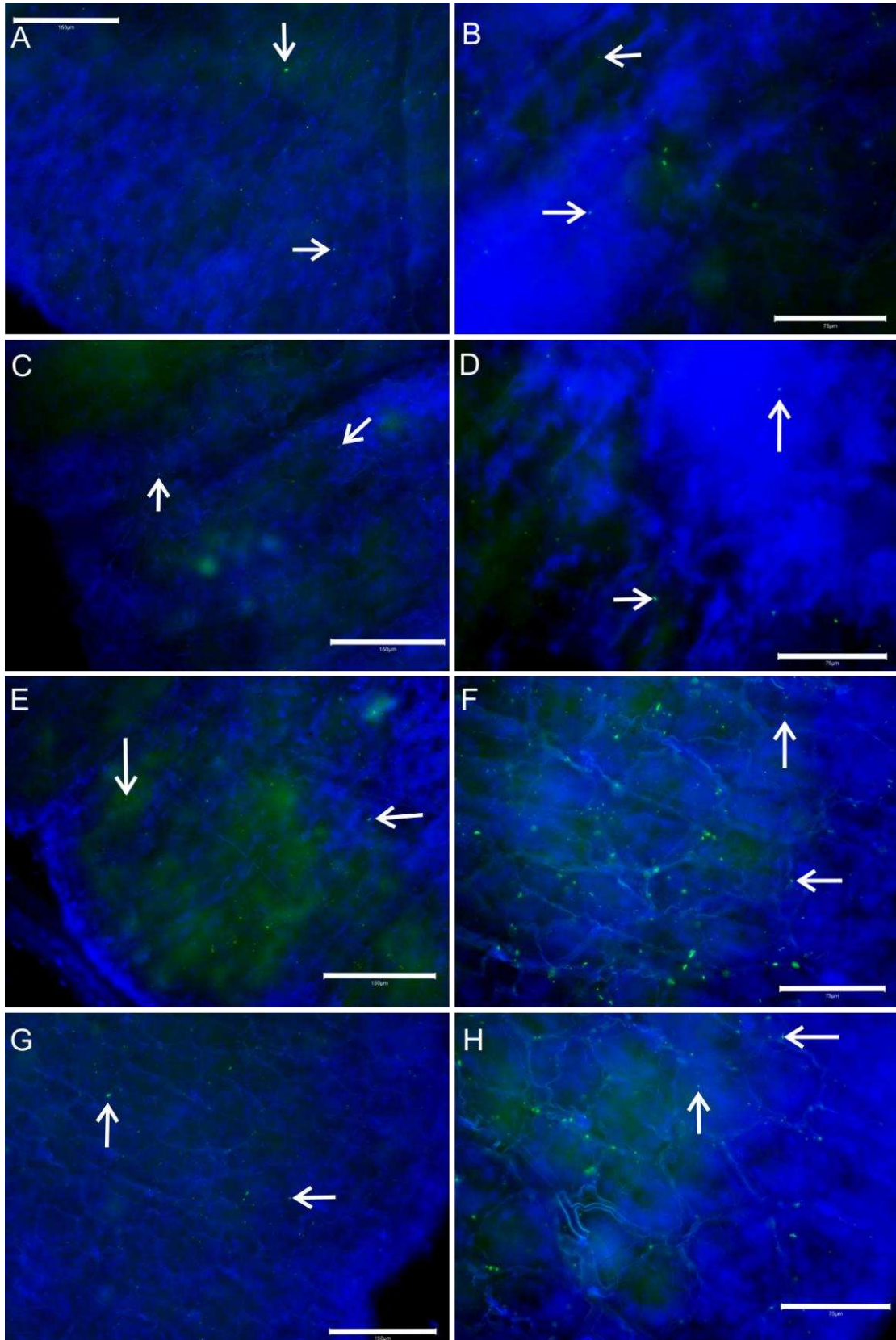


Figura 6: Montagem total da região medial do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* expostas a diferentes concentrações subletais do inseticida cinatraniliprole e

infecção por *Nosema ceranae* mostrando imunomarcações positivas para caspase-3 clivada (setas). A-B: controle. C-D: infectado com *Nosema*. E-F: exposto à CL50/10 do inseticida. G-H: infectado com patógeno e exposto à CL50/10 do inseticida. Es: estomodeu. Núcleos em azul corados com DAPI. Barra de escala A,C,E,G: 150 µm. Barra de escala B,D,F,H: 75 µm.

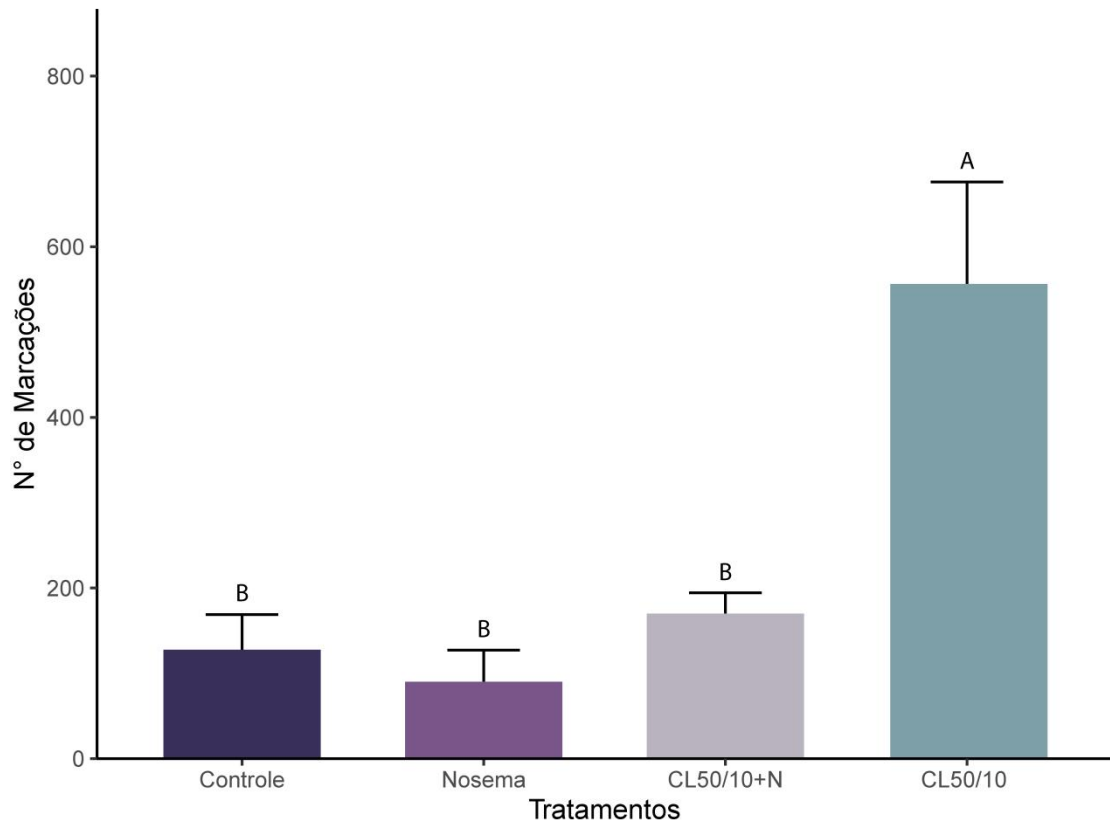


Figura 7: Quantificação da ativação via de sinalização para apoptose pela caspase-3 clivadas na porção posterior do intestino médio de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. *Nosema*: grupo experimental de abelhas infectadas com *Nosema ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL50/10. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL50/10. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença pelo teste Tukey com ajuste de Bonferonni.

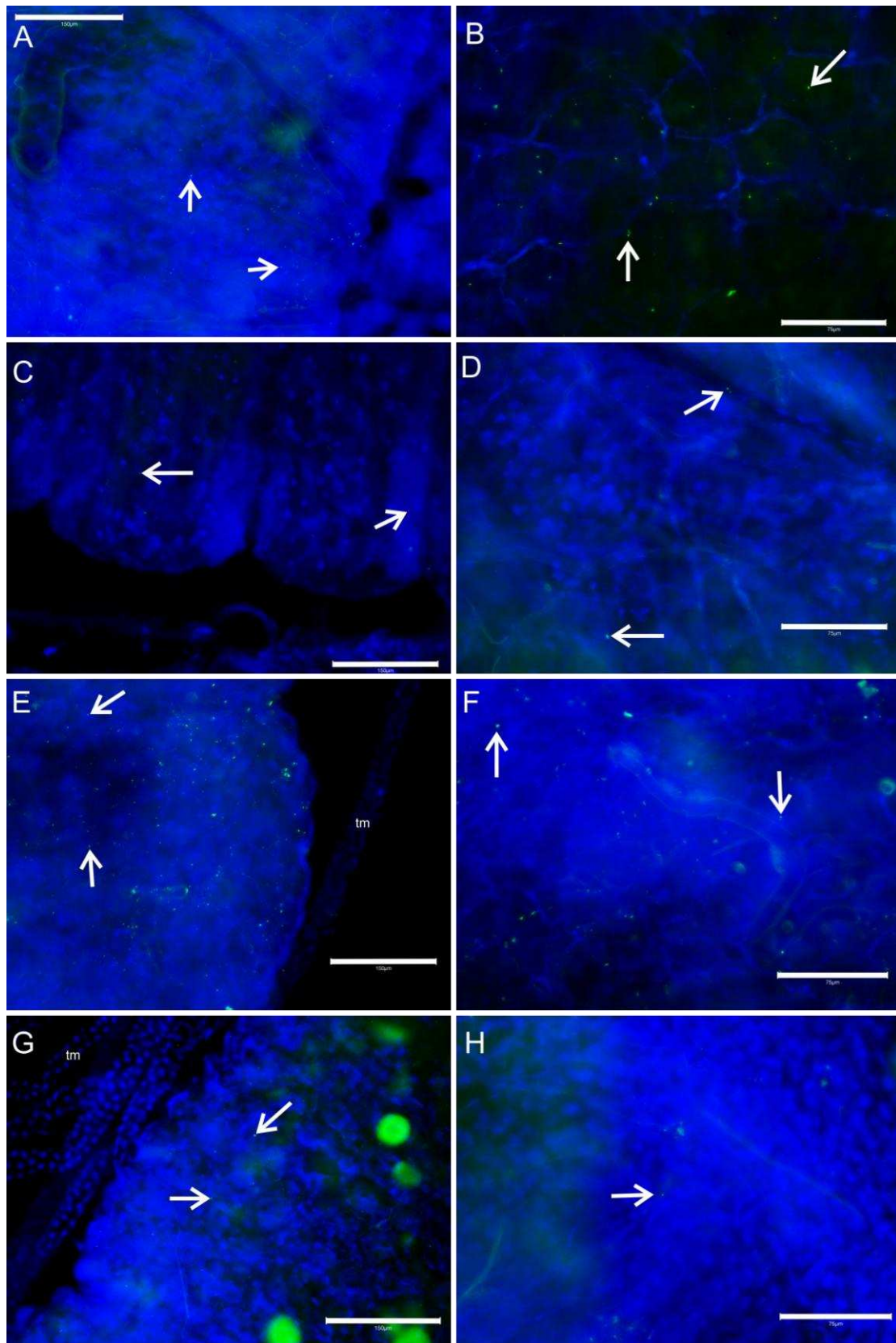


Figura 8: Montagem total da região posterior do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* expostas a diferentes concentrações subletais do inseticida cinatraniliprole e

infecção por *Nosema ceranae* mostrando marcação de caspase-3 clivada (setas). A-B: controle. C-D: infectado com *Nosema*. E-F: exposto à CL50/10 do inseticida. G-H: infectado com patógeno e exposto à CL50/10 do inseticida. Es: estomodeu. Tm: túbulo de Malpighi. Núcleos em azul corados com DAPI. Barra de escala A,C,E,G: 150 μ m. Barra de escala B,D,F,H: 75 μ m.

3.3.3. Intestino médio comparando porções em cada tratamento

A análise comparando a intensidade da resposta da via de sinalização de apoptose entre as diferentes porções do intestino médio por grupo experimental evidencia diferença apenas em abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a CL_{50/10} de ciantranilprole. Nesse tratamento, a região anterior do intestino médio apresentou quantificação superior às porções medial e posterior, estas sem diferença entre si. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferença significativa entre as porções anterior, medial e posterior do intestino médio (Figura 9).

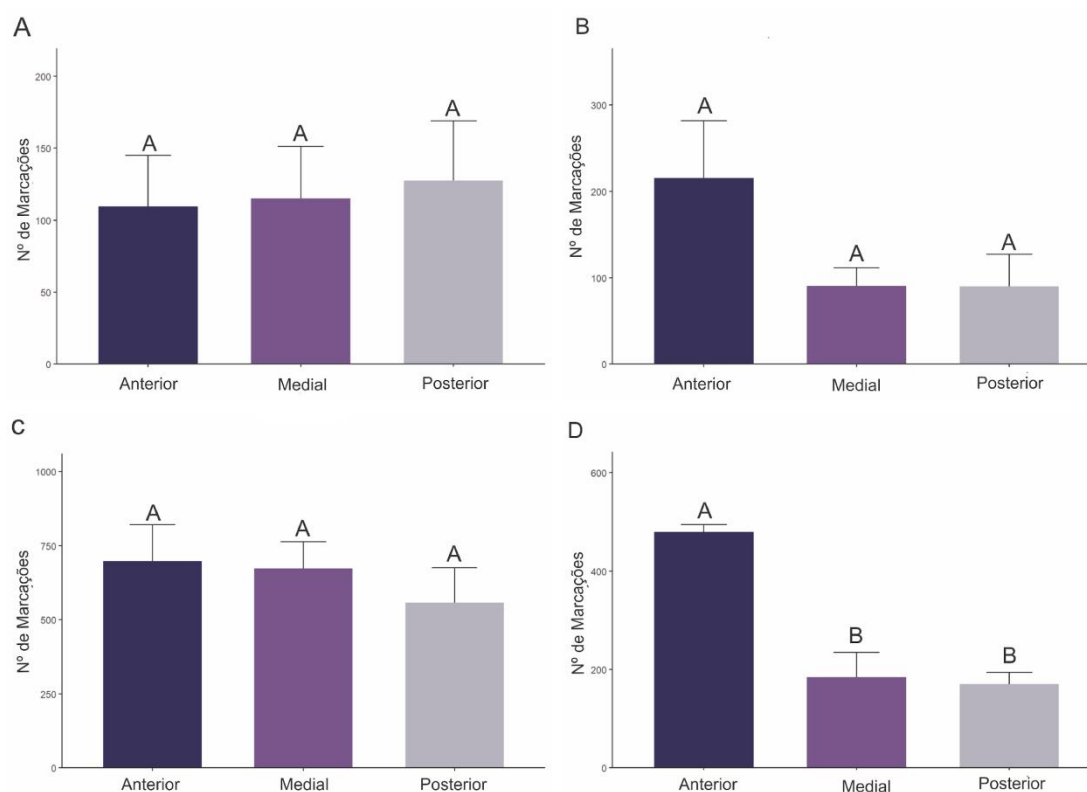


Figura 9: Quantificação da ativação via de sinalização para apoptose pela caspase-3 clivadas entre as porções anterior, medial e posterior do intestino médio de *Apis mellifera* para o controle e os diferentes tratamentos. A: grupo controle. B: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. C: grupo experimental com

abelhas expostas ao ciantraniliprole em concentração CL_{50/10}. D: grupo experimental com abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole em concentração CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença estatística pelos testes de Tukey (A, B), Kruskal-Wallis (C) e Friedman (D).

3.4. Histopatologia

3.4.1. Vacuolização

3.4.1.1. Intestino médio total

A quantificação de proporção de células digestivas com vacuolização do epitélio do intestino médio de operárias de *A. mellifera* revelou diferenças entre todos os grupos experimentais. Abelhas com exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} e infectadas com *N. ceranae* apresentaram maior proporção de vacuolização dentre todos os tratamentos, seguido de abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} e abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* e abelhas do grupo controle (Figura 10). Não foram identificadas células regenerativas com vacuolização citoplasmática.

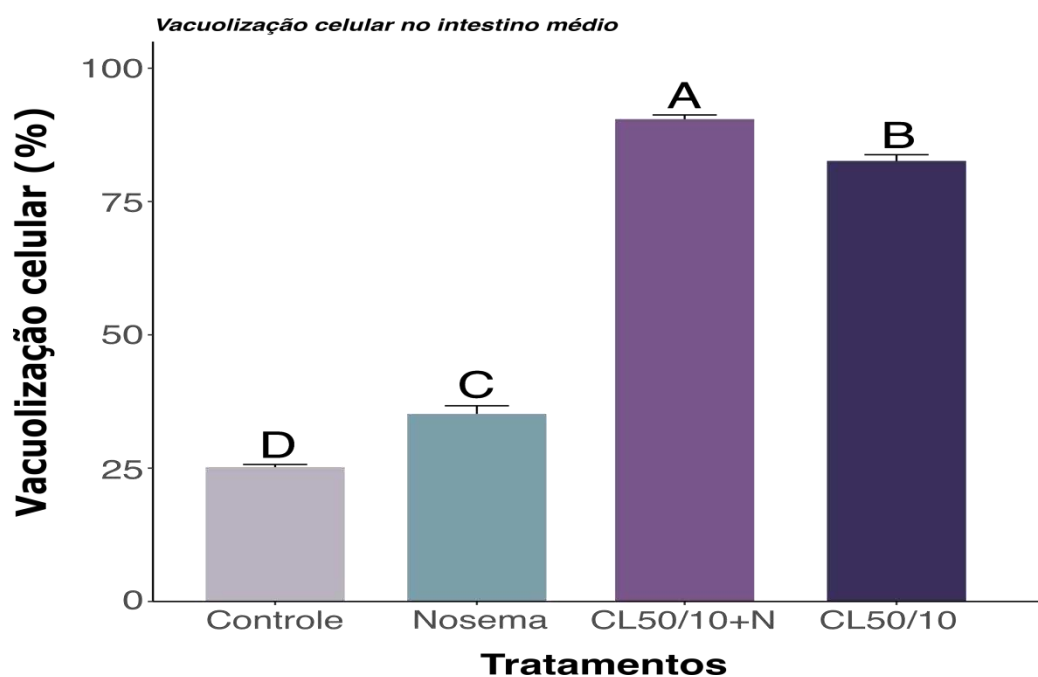


Figura 10: Quantificação da proporção de células digestivas vacuolizadas para o intestino médio total de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

3.4.1.2. Porções do intestino médio

Na porção anterior do epitélio do intestino médio de operárias de *A. mellifera*, a proporção de células digestivas com vacuolização revelou diferenças entre alguns dos grupos experimentais. As abelhas do tratamento com exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} são similares com aquelas do tratamento com exposição a ciantraniliprole CL_{50/10} e infecção com *N. ceranae*, mas ambos os tratamentos possuem proporções de células vacuolizadas superiores ao do controle e das abelhas apenas infectadas com *N. ceranae* (Figura 11 e Anexo B: figura B1).

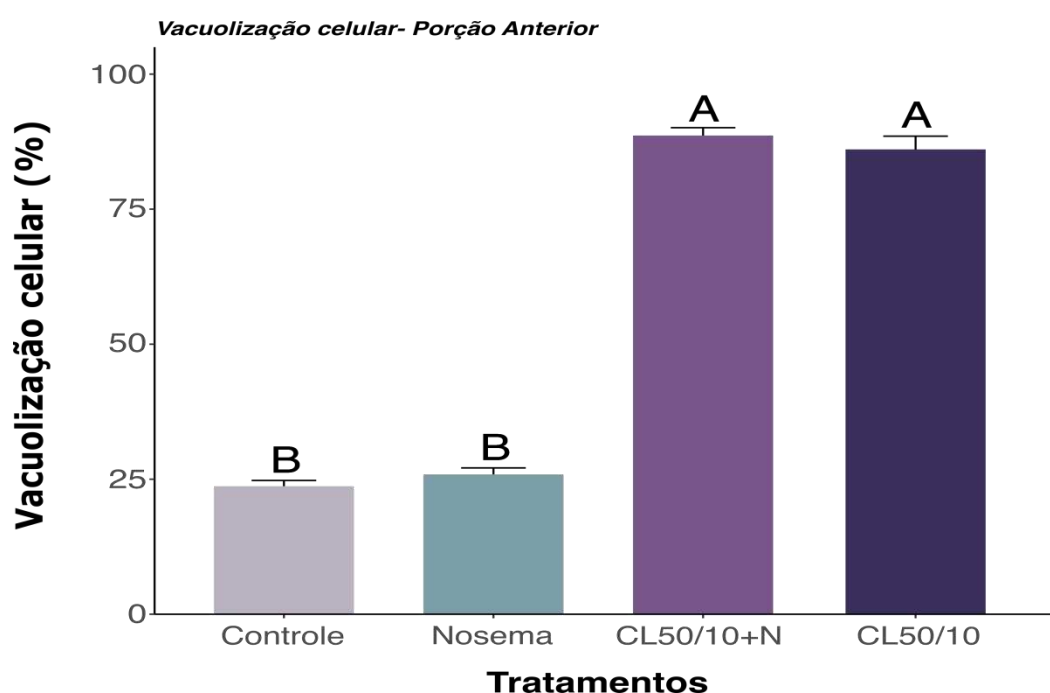


Figura 11: Quantificação da proporção de células digestivas vacuolizadas para a porção anterior do intestino médio de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

Em sua porção medial do epitélio do intestino médio, a proporção de células digestivas com vacuolização do tratamento com exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} e infecção com *N. ceranae* apresentou o maior valor entre todos os tratamentos, seguida do tratamento apenas com abelhas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10},

seguida do grupo controle e abelhas apenas infectadas com *N. ceranae*, que são similares (Figuras 12 e Anexo B: figura B2).

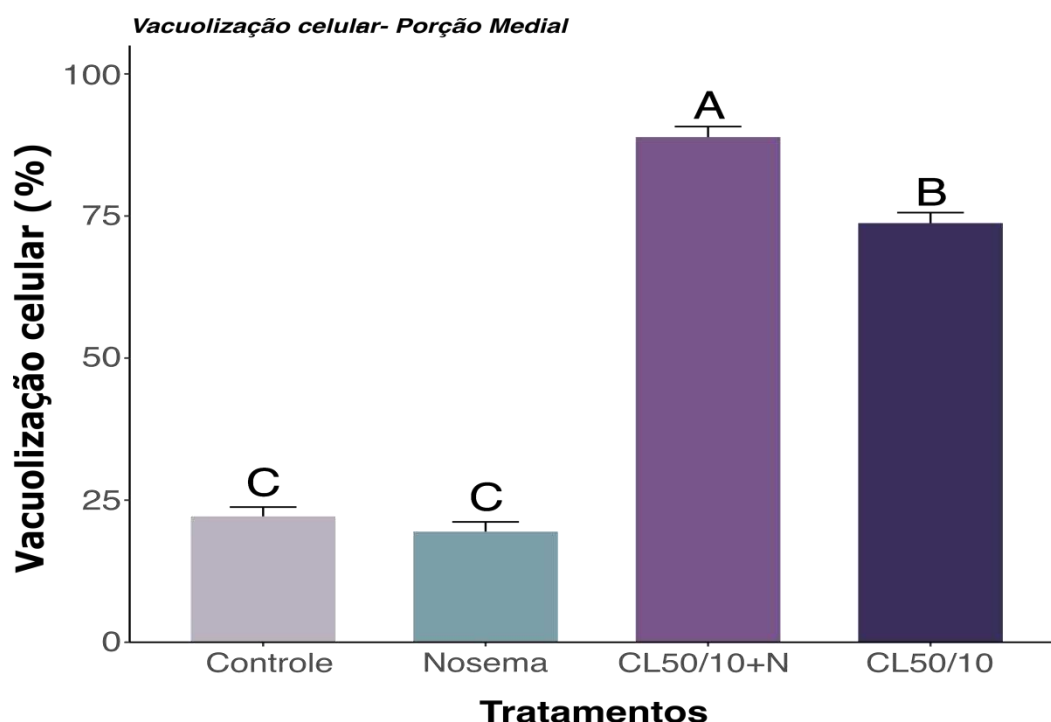


Figura 12: Quantificação da proporção de células digestivas vacuolizadas para a porção medial do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

Na porção posterior do epitélio do intestino médio, as proporções de células com vacuolização dos tratamentos com CL_{50/10} com e sem infecção por *N. ceranae* não possuem diferença estatística entre si, e foram superiores à s abelhas apenas infectadas com *N. ceranae* e do grupo controle. As abelhas somente infectadas por *N. ceranae* apresentaram média de proporções de vacuolização superior à s abelhas do grupo controle (Figuras 13 e Anexo B: figura B3).

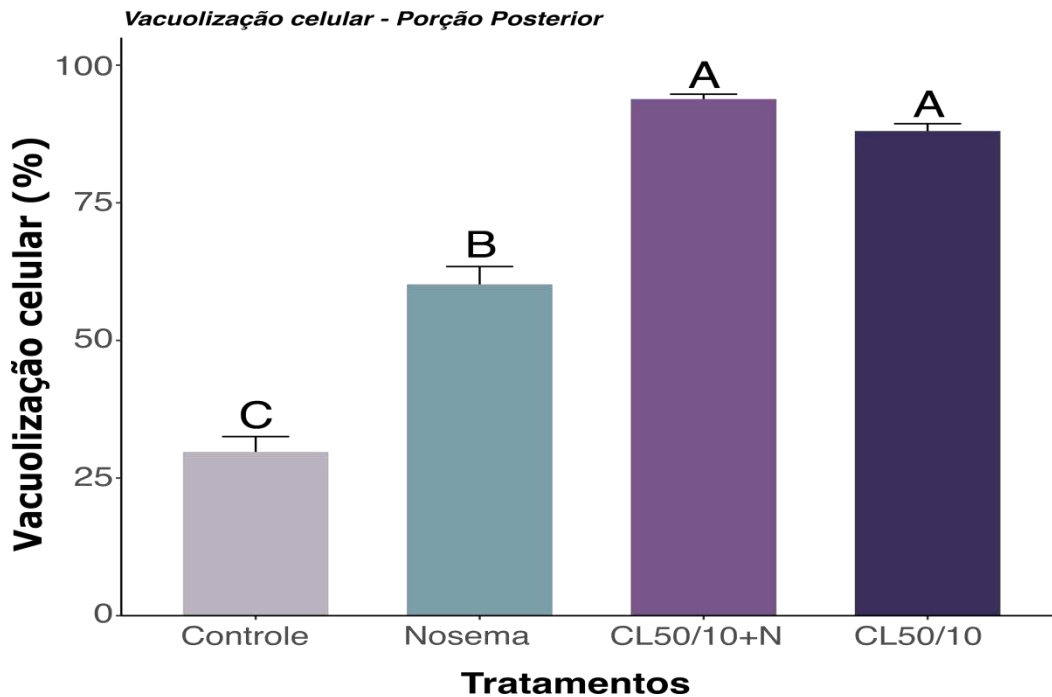


Figura 1 3 : Quantificação da proporção de células digestivas vacuolizadas para porção posterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

3.4.2. Fragmentação celular

3.4.2.1. Intestino médio total

A quantificação da proporção de fragmentos de células digestivas liberados na cercania luminal do epitélio do intestino médio de operárias de *A. mellifera*, revelou diferenças entre alguns grupos experimentais. Conquanto os tratamentos expostos ao ciantraniliprole CL_{50/10} tanto com abelhas infectadas quanto não infectadas por *N. ceranae* não tenham apresentados diferença entre si, apresentaram valores superiores em relação ao grupo controle e ao tratamento com abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* (Figura 14).

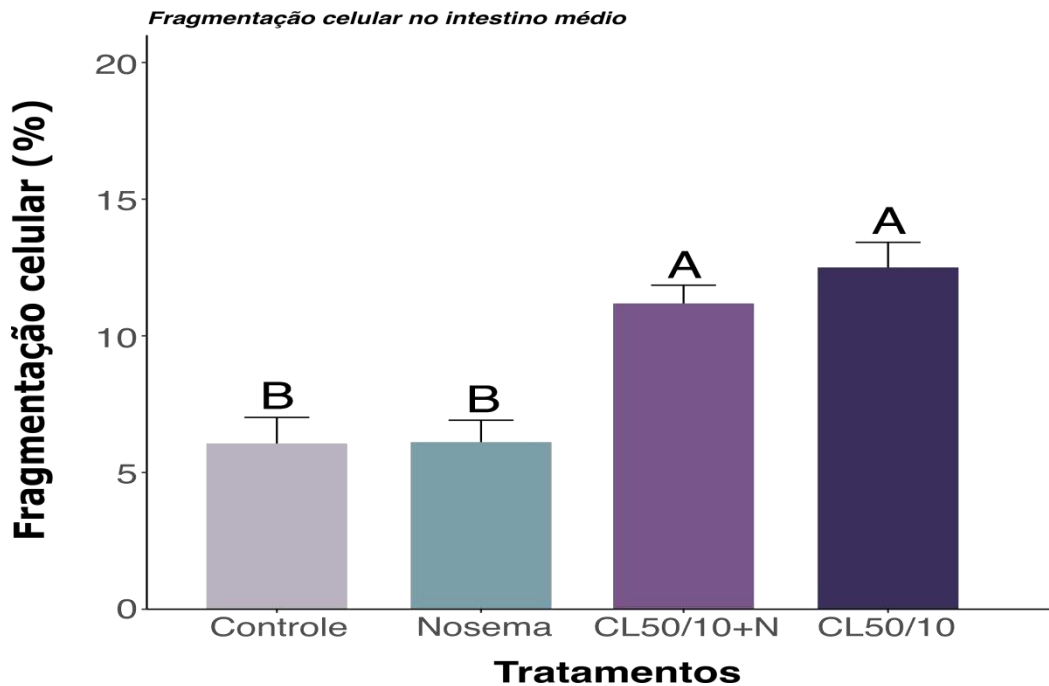


Figura 14: Quantificação da proporção de fragmentação de células digestivas para o intestino médio total de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

3.4.2.2. Porções do intestino médio

A proporção de fragmentos celulares liberados na porção anterior do intestino médio de operárias de *A. mellifera* apresentou diferenças entre alguns tratamentos. Os grupos experimentais com operárias expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} com e sem infecção por *N. ceranae* foram similares, mas suas proporções foram superiores aos dos grupos controle e abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* (Figuras 15 e Anexo B: figura B1).

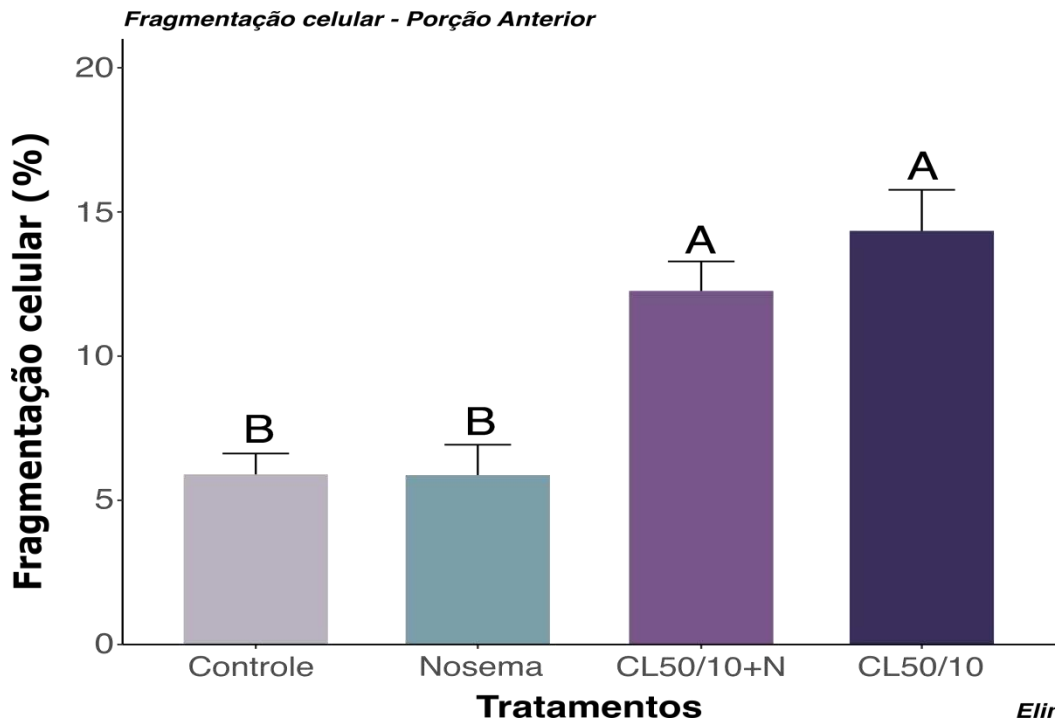


Figura 15: Quantificação da proporção de fragmentação de células digestivas para a porção anterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

Na porção medial do intestino médio, as proporções de fragmentos celulares liberados pelos tratamentos com exposição o ciantraniliprole CL_{50/10} com e sem infecção pela *N. ceranae* não apresentaram diferença entre si, mas foram superiores ao controle. Além disso, o tratamento com infecção por *N. ceranae* e exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} também apresentou proporção de fragmentos celulares superior estatisticamente das abelhas somente infectadas por *N. ceranae* (Figuras 16 e Anexo B: figura B2).

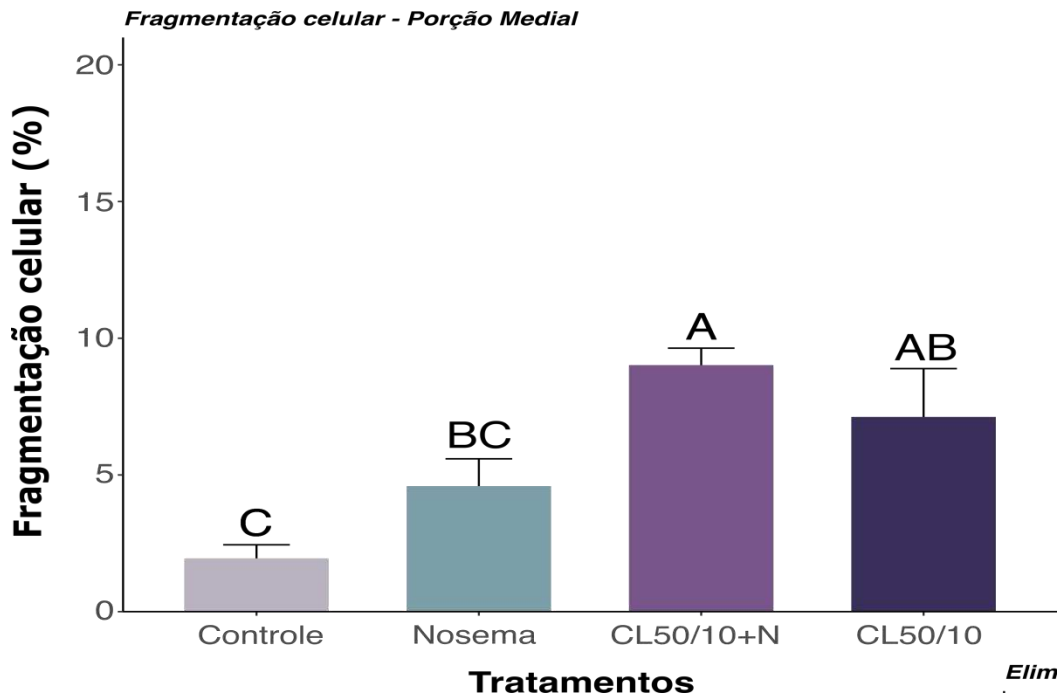


Figura 16: Quantificação da proporção de fragmentação de células digestivas para a porção medial do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

A porção posterior do epitélio do intestino médio apresentou proporções de fragmentos celulares diferentes estatisticamente entre alguns grupos experimentais. As abelhas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} apresentaram maior média de proporção que o grupo controle e abelhas infectadas por *N. ceranae*, sem ter diferença com abelhas infectadas e também expostas ao pesticida em CL_{50/10} (Figuras 17 e Anexo B: figura B3).

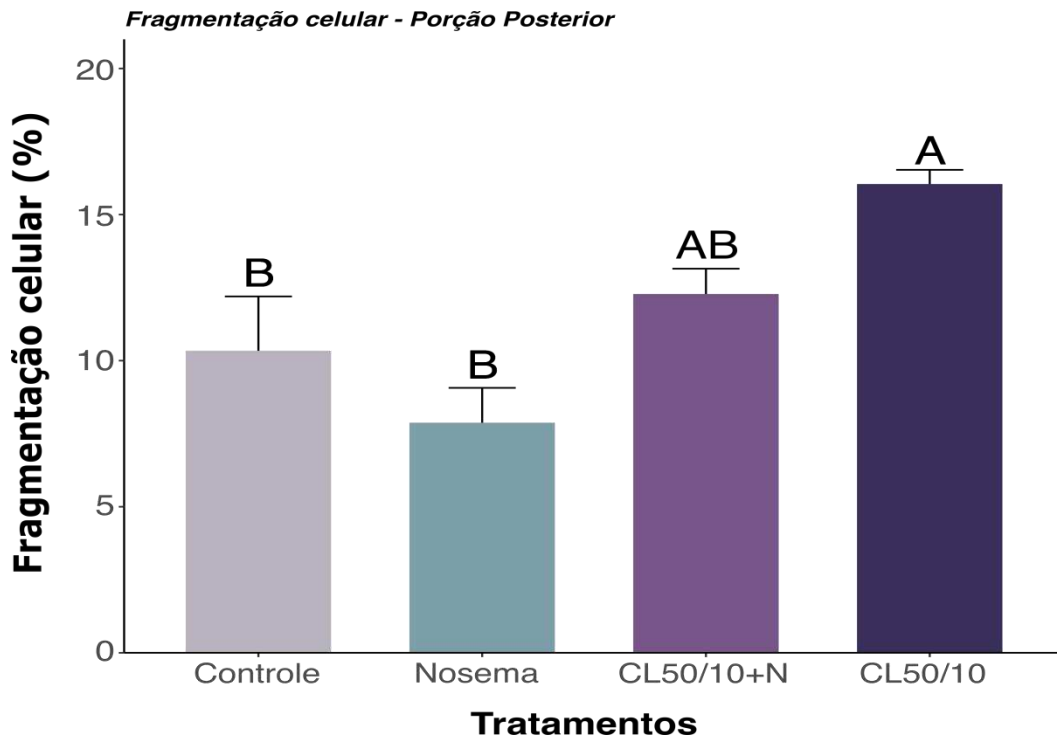


Figura 17: Quantificação da proporção de fragmentação de células digestivas para a porção posterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

3.4.3. Eliminação celular

3.4.3.1. Intestino médio total

A quantificação da proporção de células digestivas eliminadas na região do lúmen próxima ao epitélio, no intestino médio de *A. mellifera*, revelou diferenças estatísticas entre alguns grupos experimentais. O tratamento de abelhas com ciantraniliprole CL_{50/10} e infecção por *N. ceranae* apresentou proporção superior aos demais grupos experimentais. Já o tratamento apenas com ciantraniliprole CL_{50/10} possui proporção superior de eliminação celular ao tratamento somente com infecção por *N. ceranae* e o grupo controle (Figura 18). Em todos os grupos experimentais foram identificadas células digestivas eliminadas no lúmen sem núcleo picnótico e com núcleo picnótico (embora raras), algumas com borda estriada residual e, ou, vacuolizações. As células

sem núcleo picnótico apresentaram graus variados de cromatina condensada (Figura 19).

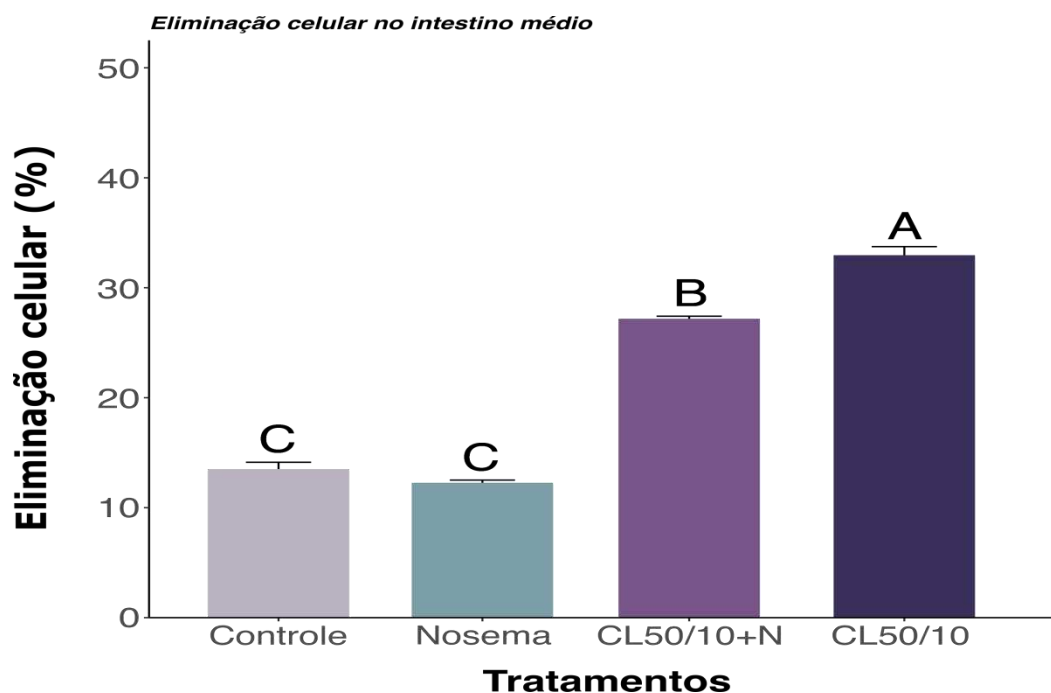


Figura 18 : Quantificação da proporção de células digestivas eliminadas para o intestino médio total de *Apis mellifera* em condição controle e expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por Welch-ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

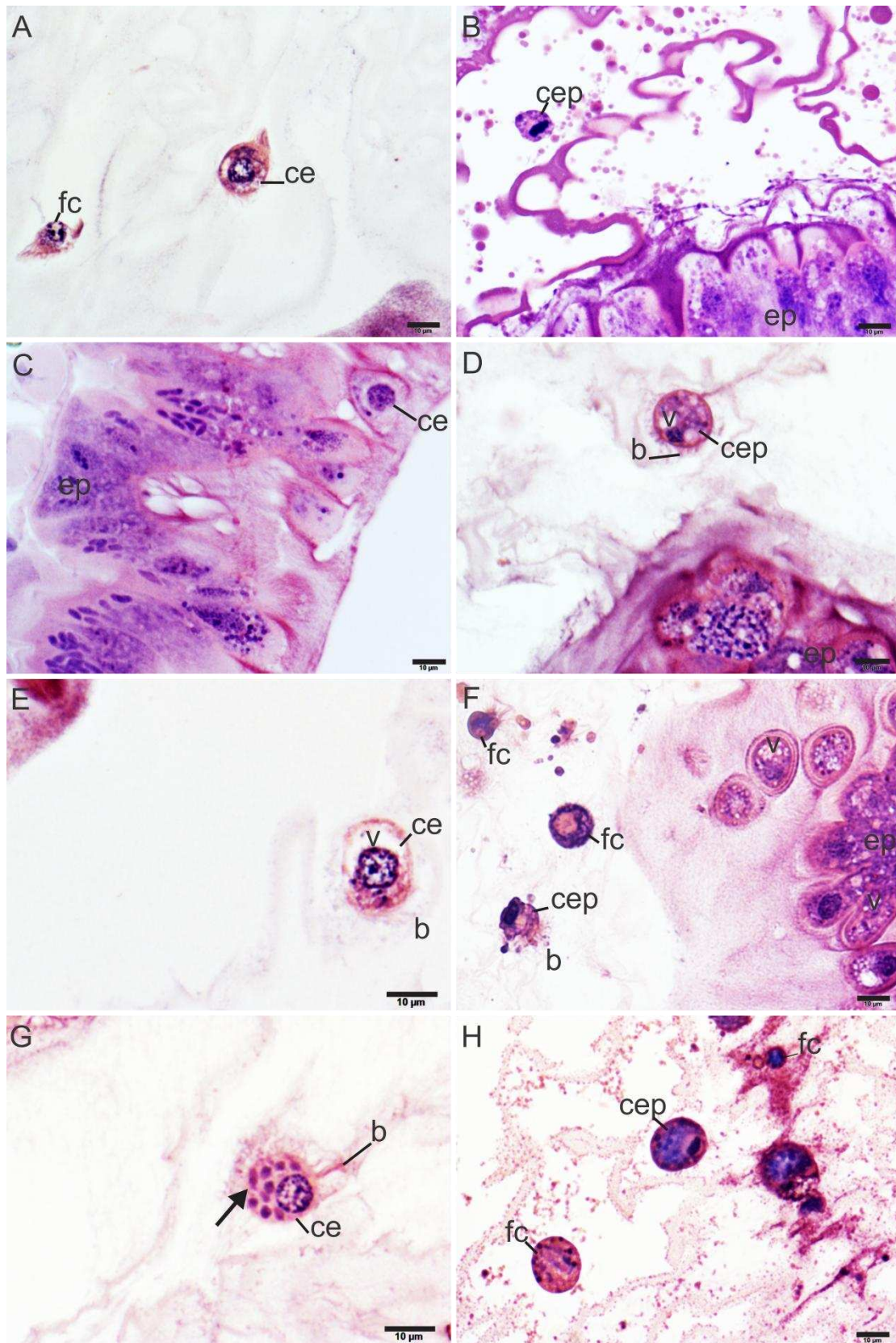


Figura 19: Histologia de operárias de *Apis mellifera* evidenciando a presença e mostrando detalhe de células digestivas eliminadas para o lúmen do intestino médio

com e sem núcleo picnótico em todos os tratamentos. A-B: grupo experimental controle. C-D: grupo experimental infectado com *Nosema*. E-F: grupo experimental exposto a concentração $CL_{50/10}$ do inseticida. G-H: grupo experimental infectado com patógeno e exposto a $CL_{50/10}$ do inseticida. cep: células eliminadas com núcleo picnótico. ce: célula eliminada com núcleo com graus variados de condensação geral da cromatina, porém não picnótico. fc: fragmento celular. v: vacuolização. ep: epitélio. b: borda estriada. Barra: 10 μ m.

3.4.3.2. Porções do intestino médio

O cálculo da proporção de células digestivas eliminadas para o lúmen na porção anterior do intestino médio de operárias de *A. mellifera* em diferentes grupos experimentais apontou algumas diferenças estatísticas. As operárias dos tratamentos com exposição ao ciantraniliprole $CL_{50/10}$ com e sem infecção com *N. ceranae* não possuem diferença entre si, mas apresentaram proporções superiores ao grupo controle e as abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* (Figuras 20 e Anexo B: figura B1).

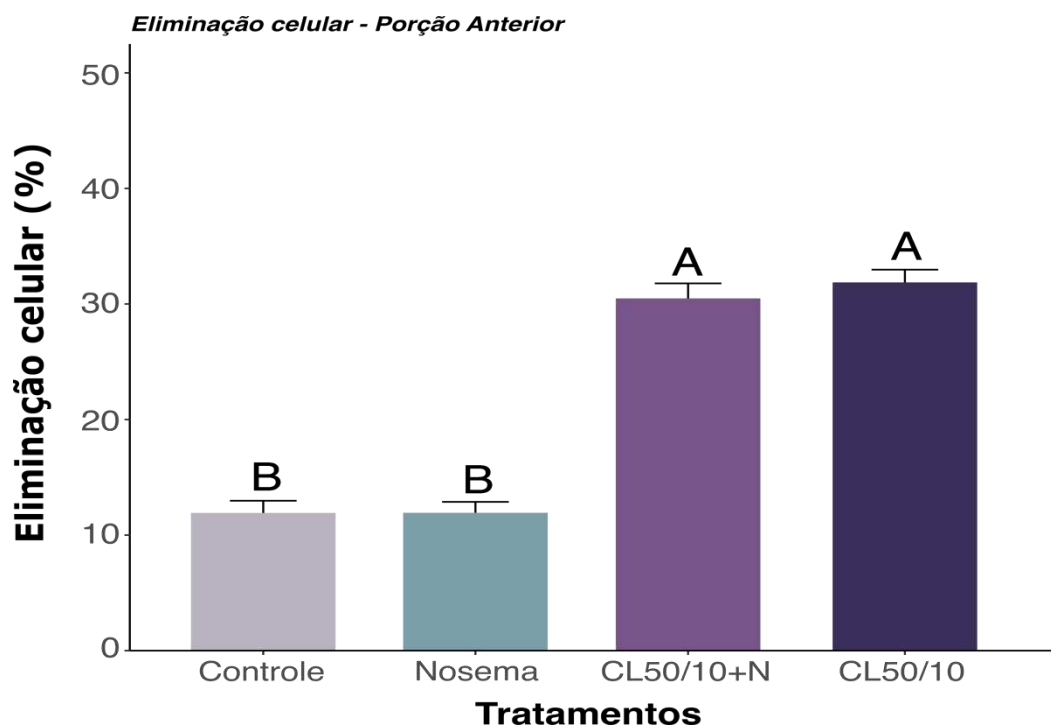


Figura 20 : Quantificação da proporção de células digestivas eliminadas para a porção anterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole $CL_{50/10}$. CL50/10:

abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por Welch-ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

Na porção medial e posterior do intestino médio, a média das proporções de células eliminadas no tratamento com exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} é superior aos demais grupos experimentais. As operárias infectadas por *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} possuem média superior a dos grupos controle e abelhas apenas infectadas com *N. ceranae*, que não possuem diferença estatística entre si (Figuras 21 e Anexo B: figura B2; Figuras 22 e Anexo B: figura B3).

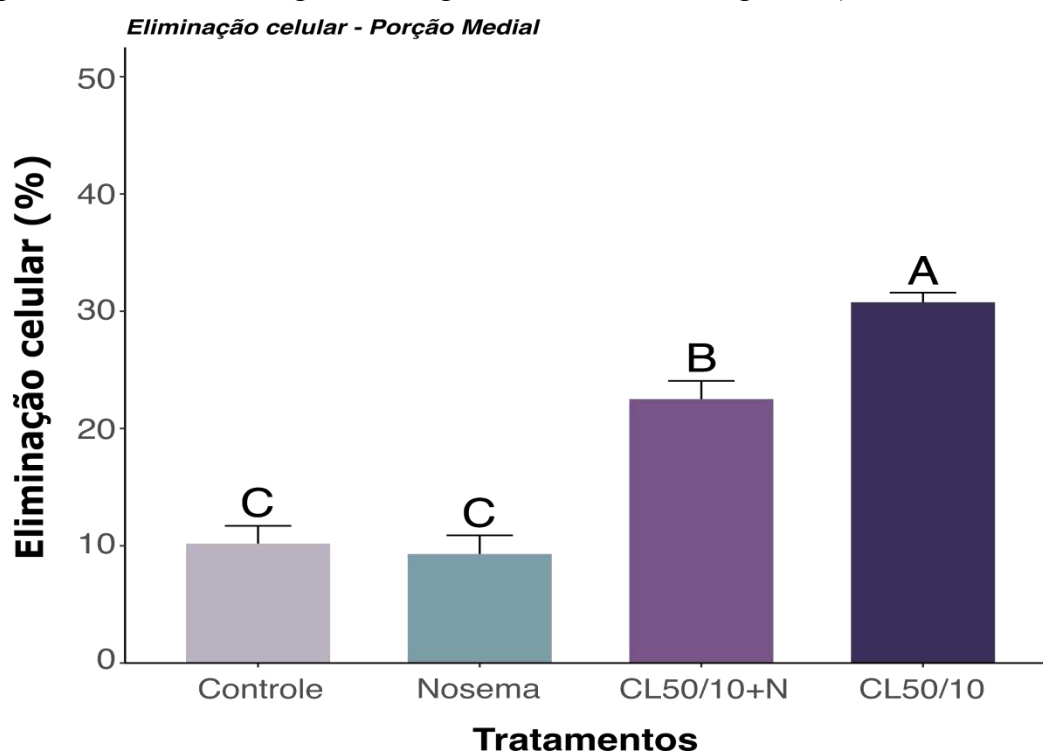


Figura 21 : Quantificação da proporção de células digestivas eliminadas para a porção medial do intestino médio de *Apis mellifera*, expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por Welch-ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

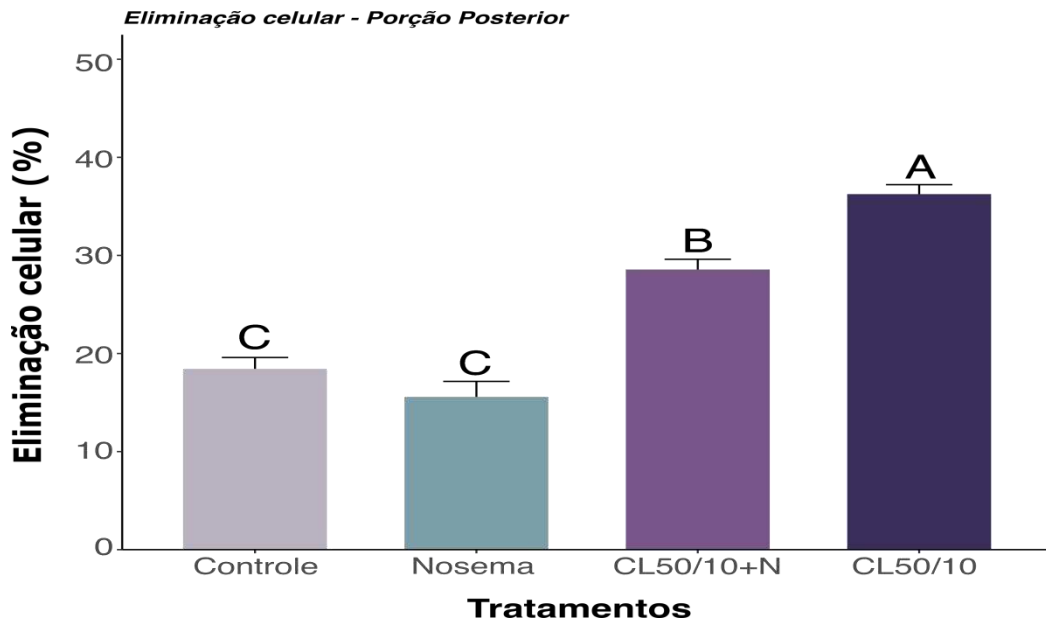


Figura 22 : Quantificação da proporção de células digestivas eliminadas para a porção posterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por Welch-ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

3.4.4. Índice de lesão

3.4.4.1. Intestino médio total

O cálculo do índice de lesão para o epitélio do intestino médio inteiro das operárias de *A. mellifera* revelou valores com diferença estatística de todos os tratamentos em relação ao grupo controle. As abelhas do tratamento com exposição ao ciantraniliprole CL_{50/10} bem como as abelhas do tratamento com exposição do ciantraniliprole CL_{50/10} e inoculadas com o patógeno *N. ceranae* não apresentaram diferença estatística entre si, ambos os tratamentos com os maiores valores de índice de lesão dentre todos os grupos experimentais. Já as abelhas do tratamento apenas com infecção por *N. ceranae* obtiveram valor superior de índice de lesão em relação ao grupo controle (Figura 23).

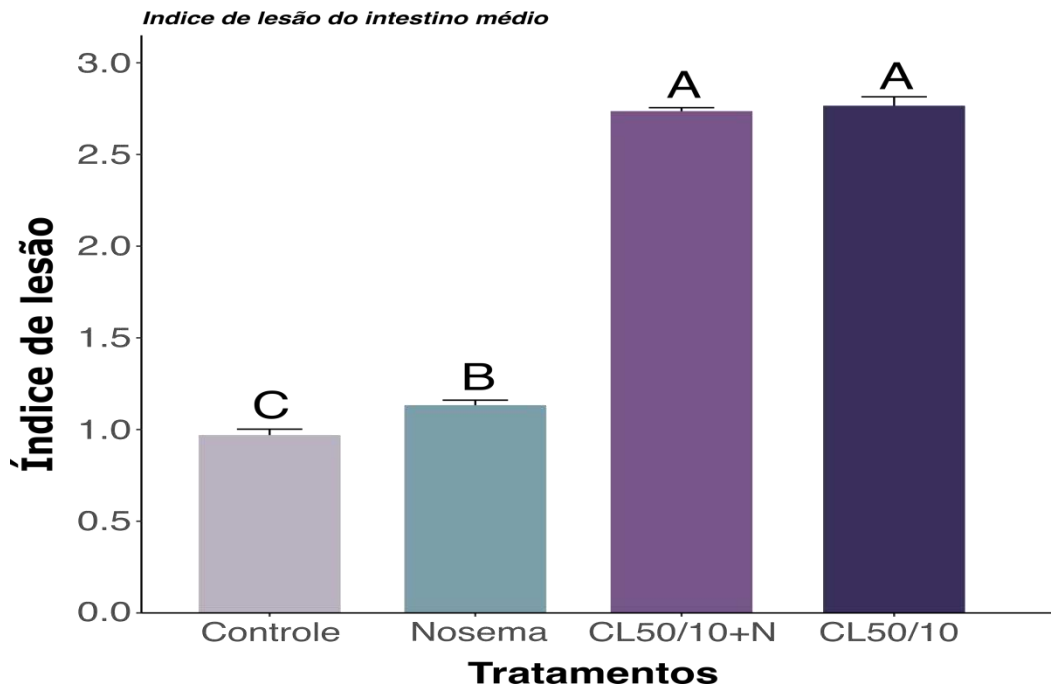


Figura 23: Cálculo do índice de lesão para o intestino médio total de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

3.4.4.2. Porções do intestino médio

Nas porções anterior e medial do epitélio do intestino médio, o cálculo do índice de lesão de *A. mellifera* operárias obteve valores para cada um dos grupos experimentais e foram identificadas diferenças estatísticas. As abelhas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} tanto do tratamento com infecção por *N. ceranae* quanto do tratamento sem infecção não possuem diferença entre si, mas possuem maior média de índice de lesão que as abelhas do grupo controle e aquelas apenas infectadas com *N. ceranae* (Figura 24 e Anexo B: figura B1; Figura 25 e Anexo B: figura B2).

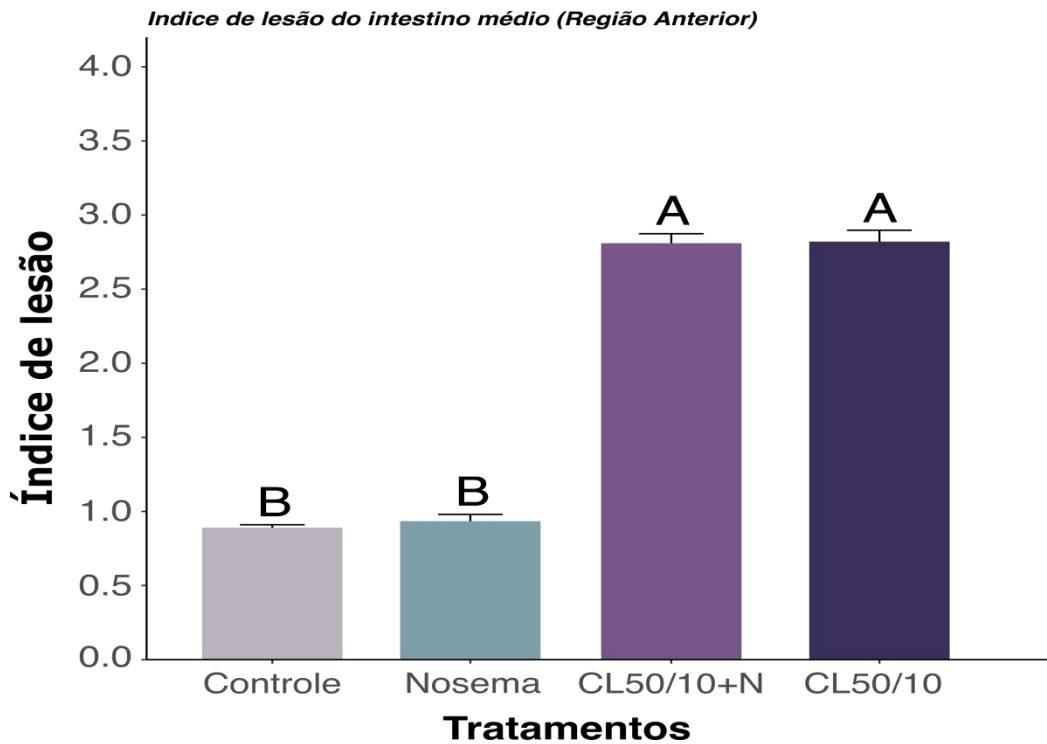


Figura 24: Cálculo do índice de lesão para a porção anterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantranilprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantranilprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$).

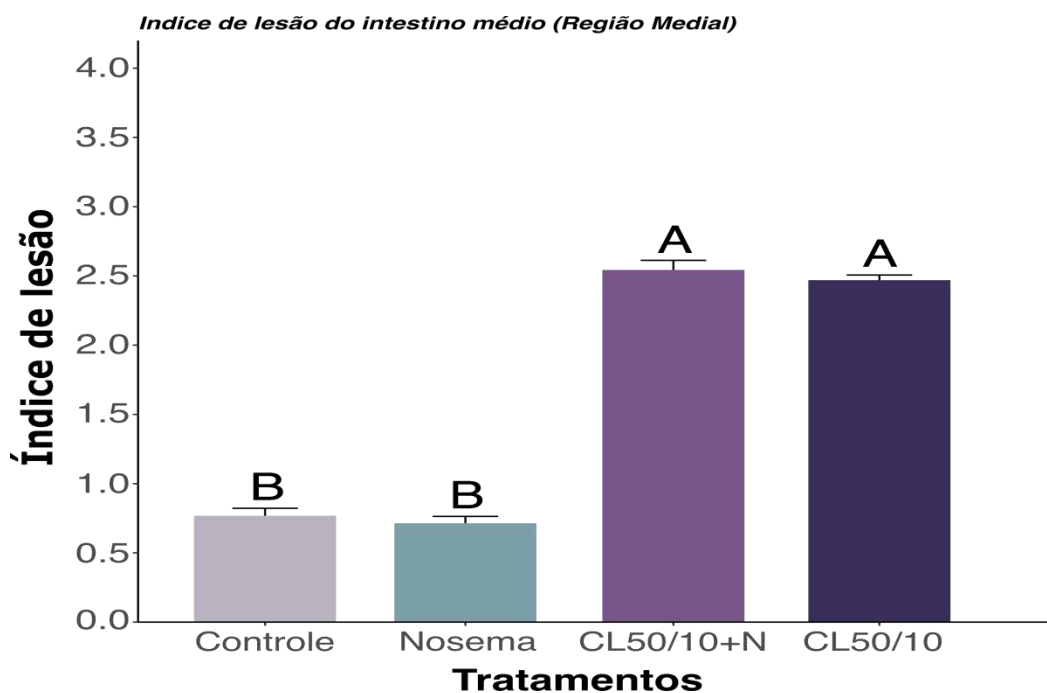


Figura 25: Cálculo do índice de lesão para a porção medial do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

Na porção posterior do epitélio do intestino médio, o índice de lesão das operárias expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} com e sem infecção com *N. ceranae* não possuem diferença estatística entre si, mas com valores superiores dos demais grupos experimentais. O tratamento com abelhas apenas infectadas com *N. ceranae* possui índice de lesão intermediária entre os valores das abelhas expostas ao ciantraniliprole com e sem infecção com *Nosema* e o grupo controle, cuja o índice de lesão é o menor (Figuras 26 e Anexo B: figura B3).

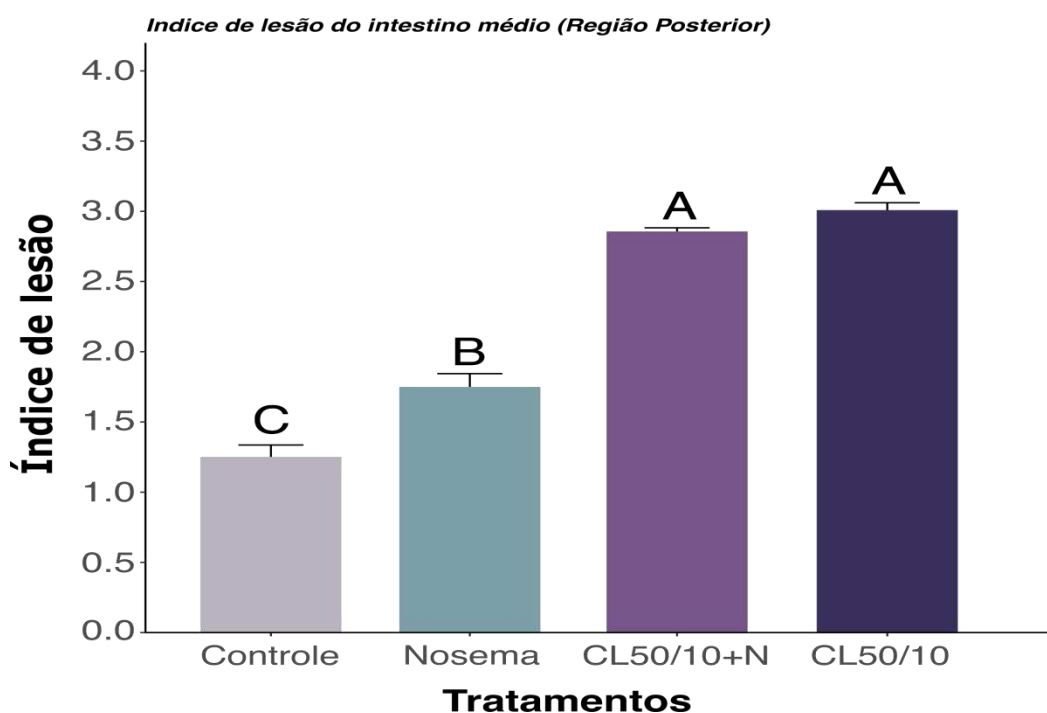


Figura 26: Cálculo do índice de lesão para a porção posterior do intestino médio de *Apis mellifera* expostas a diferentes tratamentos. Nosema: grupo experimental de abelhas infectadas com *N. ceranae*. CL50/10+N: abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. CL50/10: abelhas apenas expostas a ciantraniliprole CL_{50/10}. Barras indicam erro-padrão e letras distintas indicam diferença por ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

4. Discussão

Neste estudo, o resultado obtido no bioensaio de mortalidade corrobora a toxicidade aguda do ciantraniliprole em operárias de *A. mellifera* africanizadas. A curva de concentração-resposta é uma estimativa do comportamento sigmóide de incremento da toxicidade com resposta de mortalidade à medida do incremento da concentração do ciantraniliprole, indicando seu caráter dependente da concentração. O valor de concentração letal mediana (CL50) 0,039 mg L⁻¹i.a. está dentro da faixa de concentração de aplicação desse pesticida na atividade agrícola, sendo uma concentração campo-realista para toxicidade aguda letal. Em *Bombus impatiens*, o teste de toxicidade aguda com ciantraniliprole não encontrou ajuste ao modelo dose-dependente em quantidades de ciantraniliprole aplicadas em campo, sugerindo que esse pesticida não apresenta risco para abelhas no ambiente (Mundy-Heisz et al., 2022). Entretanto, teste de toxicidade aguda com ciantraniliprole já foi realizado para fase larval de *Apis mellifera* indicando a toxicidade do pesticida e seu ajuste ao modelo dose-dependente em níveis praticados em aplicações de campo (Kim et al., 2022), assim como para abelhas adultas *A. mellifera* e *Bombus terrestris* em condições de laboratório e campo (Dinter e Samel, 2014). Embora esses estudos junto ao presente trabalho não permitam comparações quanto a sensibilidade das diferentes populações de abelhas ao ciantraniliprole por não serem todos concentração-dependentes ou dose-dependentes, seus resultados convergem para a relevância da toxicidade aguda do ciantraniliprole para abelhas em contexto de aplicações campo-realista.

A análise de sobrevivência crônica indicou que o tratamento com o menor tempo letal mediano consistiu na concentração Cl_{50/10} de ciantraniliprole associada a infecção pelo patógeno *N. ceranae*. Assim, a exposição crônica com concentração subletal mais elevada de Cl_{50/10} em abelhas infectadas com *N. ceranae* é onde se verifica uma associação deletéria na sobrevivência de *A. mellifera* africanizada entre o pesticida e o patógeno, com os tratamentos com concentrações inferiores não apresentando diferença significativa em relação ao controle. A associação deletéria entre o pesticida e o patógeno sobre *A. mellifera* pode ser explicada pela fragilização das abelhas ao pesticida por meio do patógeno. A fragilização das abelhas a pesticidas por parte de *N. ceranae* já foi observado em outros estudos (Vidau et al., 2011; Pettis et al., 2012; Retsching et al., 2015; Zheng et al., 2024), embora não seja um fenômeno que se verifique em todos os casos (Gregorc et al., 2016; Tadei et al., 2020), possivelmente

em decorrência do grau de toxicidade de cada pesticida. Além disso, a presente pesquisa demonstra que o efeito deletério associado entre o patógeno e o ciantraniliprole é dependente da concentração do pesticida. Assim, o uso da abordagem geométrica como a adotada nesta pesquisa para identificar faixas de concentração onde há associação deletéria ainda não é uma prática adota na literatura especializada, por conseguinte, as concentrações utilizadas nesses estudos (Gregorc et al., 2016; Tadei et al., 2020) podem ser valores onde não há efeito conjunto dos estressores que seja discriminável.

O elo causal entre os estressores *N. ceranae* e o pesticida ciantraniliprole responsável pela fragilização das abelhas a ação de pesticida tem sido investigado. Alguns autores consideram que *N. ceranae* causa estresse energético, o que poderia ser responsável pela redução de suas sobrevivências e que esse fenômeno é contornável pela alimentação *ad libitum* (Mayack e Naug, 2009). Entretanto, já foi verificado redução de sobrevivência em abelhas europeias mesmo em contexto de alimentação *ad libitum* (Dussaubat et al., 2012; Sinpoo et al., 2018), deste modo a investigação do elo causal entre os dois estressores que explique a redução de sobrevivência ainda está em aberto. Embora os estressores, seja o pesticida, seja o patógeno, isoladamente não tenham apresentado efeito significativo na sobrevivência, a associação do patógeno *N. ceranae* com a concentração $CI_{50/10}$ do ciantraniliprole demonstra efeito deletério quando presentes em conjunto, além de indicar que a associação deletéria é dependente de concentração. Isso é preocupante, uma vez que contextos campo realistas são caracterizados por grande variedade de situações de estresse e a possibilidade de múltiplos estressores conjuntos em diferentes concentrações, representando um risco até mesmo para *A. mellifera* africanizada, como evidenciado pela ação deletéria na sobrevivência de abelhas pela associação de *N. ceranae* e ciantraniliprole.

As sobrevivências dos grupos experimentais de *A. mellifera* africanizada apenas com a exposição ao ciantraniliprole não possuem diferença significativa do controle, provavelmente decorrente da ação do sistema de detoxificação (Rand et al., 2015; Gao et al., 2022), enquanto o tratamento com abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* não apresentou diferença de sobrevivência em relação ao controle. A capacidade de redução da sobrevivência em abelhas por parte de *N. ceranae* é fato estabelecido (Panek et al., 2018), entretanto abelhas menos susceptíveis não possuem suas sobrevivências afetadas em contextos laboratoriais (Huang et al., 2012). Assim, a não

redução da sobrevivência no grupo experimental com abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* sugere que *A. mellifera* africanizada possui de fato menor susceptibilidade a esse patógeno. O menor impacto desse patógeno em abelhas africanizadas quando comparadas com abelhas europeias, é comumente interpretado como decorrente de fatores climáticos e de manejo (Guimaraes-Cestaro et al., 2020), porém a não redução da sobrevivência a nível laboratorial verificado na presente pesquisa indica que características intrínsecas das abelhas africanizadas precisam ser consideradas.

A análise de imunomarcção da caspase-3 do grupo experimental com exposição ao pesticida ciantraniliprole $CI_{50/10}$ em *A. mellifera* africanizada infectadas com *N. ceranae* apresentou maior ativação da via de sinalização para apoptose que o controle e o grupo com abelhas apenas infectadas, porém inferior a abelhas com exposição ao pesticida, mas sem infecção, considerando as marcações de todo o intestino médio. Esse resultado intermediário decorre de um balanço dos estímulos pró-apoptóticos derivados do estresse celular pela ação do inseticida, razão pela qual foi superior ao do grupo com abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* e o controle, e os estímulos anti-apoptóticos do patógeno *N. ceranae* nas células hospedeiras (Martin-Hernandez et al., 2017), razão pela qual foi inferior ao grupo de abelhas apenas expostas ao inseticida ciantraniliprole. Isso resulta de como o processo de ativação da apoptose é consequência de um balanço molecular dos agentes reguladores pró- e anti-apoptóticos (Gyrd-Hansen e Meier., 2010; Liu et al., 2017; Arancibia et al., 2021). Desta forma, a natureza quantitativa da tomada de decisão pela apoptose ou sobrevivência pelas células do epitélio do intestino médio das abelhas é, portanto, modulada quantitativamente, onde a prevalência de estímulos pró ou antiapoptóticos desloca o balanço molecular para a consecução ou não da apoptose, respectivamente. O estresse celular pelo inseticida tende a deslocar o balanço molecular para maior ativação da via de sinalização para apoptose como resposta a esse estresse, que por sua vez é contrabalanceado pela ação inibitória que o patógeno exerce, reduzindo a magnitude da resposta apoptótica.

A redução da resposta apoptótica nas abelhas infectadas por *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole quando comparada ao grupo de abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole, considerando a função apoptótica de manutenção da homeostase e detoxificação a nível tecidual (Elmore, 2007; Moore, 2008; Morishita & Mizushima, 2019; Bertherloot et al., 2021), desdobra-se em uma possível maior absorção do pesticida por via oral por se tratar de um epitélio absorptivo do sistema digestivo

(Denecke et al., 2018; Caccia, S., 2019). Por consequência, pode-se ocorrer ou intensificar os efeitos injuriantes, uma vez que os efeitos toxicológicos são dependentes da intensidade do estímulo estressor (Calabrese e Baldwin, 2001), com o risco de suplantarem o sistema de detoxificação (Martínez et al., 2018). Assim, essa redução da resposta apoptótica de defesa ao pesticida em abelhas infectadas e expostas ao ciantraniliprole provavelmente contribuiu causalmente pela maior susceptibilidade à ação do ciantraniliprole. Isso se justifica na redução de sobrevivência nesse mesmo grupo experimental quando comparado ao grupo de abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole $Cl_{50/10}$ e o grupo controle, que não diferiram entre si. Este cenário torna a infecção de *N. ceranae* em contexto de múltiplos estressores um fator de particular importância, pois a redução da resposta apoptótica a estressores químicos causada pelo patógeno pode atuar como mecanismo mediador da relação entre o patógeno e pesticida, uma vez que *N. ceranae* fragiliza a abelha à ação de estressores químicos de via oral.

O grupo experimental com exposição crônica subletal ao pesticida ciantraniliprole $Cl_{50/10}$ apresentou intensa ativação da via de sinalização para apoptose, considerando as marcações de todo o intestino médio, sendo superior e significativamente distinto do controle e demais tratamentos. Usualmente esse resultado é relatado como marcador de citotoxicidade e interpretado como condição patológica de dano celular, além de comprometimento da atividade epitelial e função do órgão (Farder-Gomes et al., 2021; Carneiro et al., 2022; Carneiro et al., 2023). Assim, pode ser situado na cadeia causal da redução da sobrevivência das abelhas (Chakrabarti et al., 2020). De fato, já se verificou que clorantraniliprole, diamida antranilica tal qual ciantraniliprole, portanto com o mesmo mecanismo de ação, apresenta toxicidade por danos no intestino médio de insetos (Castro e Castro et al., 2021). Entretanto, o presente resultado decorrente da ação do ciantraniliprole para a via da apoptose junto à não redução da sobrevivência das abelhas desse mesmo grupo experimental, evidenciam que a apoptose diante da exposição crônica subletal se configurou como um importante mecanismo de resposta tecidual para a manutenção da homeostase. Por atuar na eliminação das células comprometidas quanto por ser um fenômeno de detoxificação tecidual (Elmore, 2007; Moore, 2008; Hakim et al., 2010; Morishita & Mizushima, 2019; Bertherloot et al., 2021; Carneiro et al., 2022; Carneiro et al., 2023), a apoptose possui a capacidade de ser um mecanismo

reestabelecendo a homeostase tecidual, atuando em conjunto com o sistema de detoxificação enzimático.

O grupo experimental com *A. mellifera* africanizada apenas infectadas com *N. ceranae* não apresentou diferença de ativação da via de sinalização para apoptose em relação ao grupo controle, sendo inferior aos demais tratamentos considerando marcações de todo o intestino médio. Apesar de *N. ceranae* manipular a maquinaria imune celular do hospedeiro em decorrência de seu forte processo coevolutivo (Lourenço et al., 2021; Fowler et al., 2022), suprimindo a apoptose do epitélio intestinal (Higes et al., 2013; Kurze et al., 2015), neste estudo não foi identificada diferença entre abelhas infectadas e controle. A redução da apoptose é usualmente interpretada como uma estratégia eficiente de infecção no órgão (Higes et al., 2013; Kurze et al., 2015; Sinpoo et al., 2018; Paris et al., 2018). De fato, abelhas europeias que foram selecionadas para tolerância a nosemose não tiveram sua capacidade de defesa por apoptose suplantada pelo patógeno, sendo uma característica conspícua de sua tolerância, portanto a supressão ou não da apoptose é central ao curso infeccioso (Kurze et al., 2015). Entretanto, mesmo abelhas tolerantes há infecção em suas células e altos títulos de esporos por abelha (Kurze et al., 2015; Kurze et al., 2016), todavia o não comprometimento da capacidade de renovação epitelial junto ao menor estresse energético (Kurze et al., 2016), provavelmente repercute no curso global da infecção explicando a sobrevivência superior de abelhas tolerantes a nível individual (Huang et al., 2012). Logo, parte da menor susceptibilidade observada em *A. mellifera* africanizada à nosemose pode ser atribuída não somente a condições exógenas de clima e manejo (Guimaraes-Cestaro et al., 2020), mas também pela característica intrínseca de menor capacidade de seu mecanismo de defesa celular apoptótico ser suprimido pela *N. ceranae*, dificultando uma evolução agressiva da doença ao nível tanto individual quanto da colônia.

A ativação da via de sinalização apoptótica considerando a porção anterior do intestino médio, o grupo experimental com exposição ao ciantraniliprole CI_{50/10} em *A. mellifera* africanizada infectadas com o patógeno *N. ceranae* apresentou maior ativação da via que o controle, porém sem diferença do grupo de abelhas apenas infectadas nem do grupo de abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole. Embora se trate de resultados envolvendo o mesmo tipo de marcação como variável resposta e os mesmos tipos de tratamento como variável explicativa, a porção anterior apresentou padrão de resultado distinto das marcações no intestino médio inteiro das abelhas.

Sabe-se que *N. ceranae* possui tropismo pelo epitélio do intestino médio que é diferencial em relação as porções desse intestino que o epitélio pertence, com preferência pela porção medial e sobretudo a posterior em detrimento da anterior (Kurze et al., 2018). Por consequência, há supressão crescente da apoptose da porção anterior para a medial e a posterior (Kurze et al., 2018). Maior colonização do patógeno implica em maior prevalência de moléculas antiapoptóticas produzidas pela *N. ceranae* (Kurze et al., 2015; Martin-Hernandez et al., 2017). Assim, é compreensível a porção anterior do intestino médio, pouco colonizada por *N. ceranae*, apresentar ativação superior da via para apoptose no grupo infectado pelo patógeno e exposto ao ciantraniliprole quando comparado ao controle, como ocorreu no intestino médio inteiro, mas não ser distinguível do grupo de abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole, diferentemente do que ocorreu quando se considerou a marcação para o intestino médio inteiro.

Para a ativação da via de sinalização para apoptose considerando a porção medial e posterior do intestino médio, o tratamento com exposição ao pesticida ciantraniliprole $Cl_{50/10}$ em *A. mellifera* africanizada infectadas com *N. ceranae* não apresentou diferença em relação ao controle e para o tratamento de abelhas apenas infectadas. Apenas o tratamento com abelhas expostas somente ao ciantraniliprole $Cl_{50/10}$ apresentou diferença do controle e de todos os demais tratamentos, possuindo maior ativação da via. O padrão de resultados das porções medial e posterior são distintos do observado para a porção anterior por refletirem seus maiores níveis de colonização de *N. ceranae* (Kurze et al., 2018). Assim, o grupo experimental com abelhas infectadas com *N. ceranae* e o grupo com abelhas infectadas e expostas a ciantraniliprole, apresentaram baixa ativação da via de sinalização nas porções medial e posterior provavelmente decorrente da maior quantidade de moléculas anti-apoptóticas derivadas da maior presença do patógeno (Kurze et al., 2015; Martin-Hernandez et al., 2017). Devido a função da apoptose na manutenção da homeostase e resposta a dano (Lieberthal & Levine, 1996; Elmore, 2007; Hakim et al., 2010), o resultado de redução da resposta apoptótica nas abelhas infectadas e expostas ao ciantraniliprole pode ser a explicação para a redução da sobrevivência, sendo esse efeito provavelmente causado apenas pela redução observada na porção medial e posterior, com pouca ou nenhuma contribuição da porção anterior. Deste modo, considerar as porções do intestino médio e a colonização diferencial do patógeno *N. ceranae* é crucial na compreensão da fisiopatologia do patógeno *N. ceranae* em

contexto de exposição a pesticida. Por conseguinte, a hipótese aqui verificada de que a redução da apoptose pode participar da fragilização da abelha frente a ação de pesticida é, portanto, decorrente da ação do patógeno na porção medial e posterior do intestino médio.

A ativação da via de sinalização da via apoptótica considerando as diferentes porções comparadas entre si para cada tratamento, indicou que apenas o grupo experimental de abelhas *A. mellifera* africanizadas infectadas por *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole $CI_{50/10}$ apresentou diferença entre porções, com a porção anterior com maior ativação da via em relação a porção medial e posterior, que não diferiram entre si. A análise da intensidade de ativação da via apoptótica dentro de cada grupo comparando as diferentes porções entre si evidencia o padrão de resposta das diferentes regiões do intestino médio, indicando se o intestino médio possui ou não uma resposta homogênea ou heterogênea a um mesmo tratamento. As abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole apresentaram heterogeneidade em relação a porção anterior comparada a porção medial e posterior, por consequência da colonização diferencial do patógeno (Kurze et al., 2018). Apesar disso, as abelhas apenas infectadas tiveram resposta homogênea do intestino médio, provavelmente devido a *A. mellifera* africanizada ser menos susceptível a redução da apoptose causada por *N. ceranae* como os resultados anteriores para intensidade da via apoptótica apontam, dado que não indicaram diferenças entre abelhas apenas infectadas e o controle nos níveis da via apoptótica para nenhuma porção do intestino.

Uma provável explicação para a divergência entre o resultado de abelhas apenas infectadas por *N. ceranae* e o grupo infectado e exposto ao ciantraniliprole, decorre da natureza quantitativa da tomada de decisão pela apoptose, fruto de um balanço entre moléculas pró e antiapoptóticas (Liu et al., 2017; Arancibia et al., 2021). Estímulos antiapoptóticos ou próapoptóticos implicam em mais moléculas anti ou proapoptóticas, respectivamente, sendo responsáveis por deslocar o balanço para a tomada de decisão pela ocorrência de apoptose ou sobrevivência celular (Liu et al., 2017; Arancibia et al., 2021). Abelhas mais tolerantes são menos susceptíveis a manipulação desse balanço em condições de apenas infecção (Kurze et al., 2018), porém as moléculas antiapoptóticas produzidas por *N. ceranae* (Kurze et al., 2015; Martin-Hernandez et al., 2017) possivelmente tornam recalcitrante o deslocamento do balanço molecular rumo a consecução da apoptose quando estímulos próapoptóticos

surgem, como no contexto de exposição a estressores químicos como o pesticida ciantraniliprole.

A análise histopatológica do tratamento com exposição ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10} em operárias de *A. mellifera* africanizada infectadas com o patógeno *N. ceranae* apresentou maior proporção de células digestivas vacuolizadas do intestino médio inteiro que todos os demais grupos experimentais. Além disso, o tratamento com operárias somente expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} apresentou maior proporção que as operárias apenas infectadas com *N. ceranae*, com as abelhas do grupo controle possuindo a menor quantidade de células digestivas vacuolizadas. Estes resultados indicam que, conquanto isoladamente os estressores exercem ação citoestressora, com o ciantraniliprole sendo um indutor de vacuolização superior ao patógeno, suas ações concomitantes nas células digestivas resultam em um maior fenótipo de estresse a nível tecidual. Além disso, a intensificação de vacuolização citoplasmática evidencia que, embora a via transcelular não seja a única que um pesticida pode percorrer para atravessar o epitélio do intestino médio (Denecker et al., 2018), é uma via presente na toxicocinética de ciantraniliprole em *A. mellifera* e provavelmente de outras abelhas.

O ciantraniliprole gera níveis de vacuolização provavelmente dependentes de sua concentração, dado que a vacuolização é um bioindicador de estresse celular (Malaspina & Zacarin, 2006, Chen et al., 2008; Grella et al., 2019), o efeito tóxico de pesticidas é concentração-dependente (Calabrese e Baldwin, 2001; Dai et al., 2019; Castro e Castro et al., 2021; Calabrese et al, 2022; Guedes et al, 2022) e citotóxico (Rost-Roszkowka, 2008; Castro e Castro et al., 2021; Gomez-Virgilio et al., 2022). *Nosema ceranae* também é um citoestressor isoladamente de *A. mellifera*, com estresse celular e processos de vacuolização já reportados (Higes et al., 2007; Tadei et al., 2020). Por ser um indicador de estresse celular e responder a sua intensidade, e o grau de infecção de *N. ceranae* variar, é provável que o grau de vacuolização decorra do nível de infecção. A vacuolização, portanto, é um bioindicador da ação tanto isolada quanto associada entre pesticida e *N. ceranae*, indicando histopatologicamente que o nível de infecção e a concentração de um dado pesticida possuem ação estressora concomitante e superior a elas atuando isoladamente.

A vacuolização é um processo de intensa formação de vesículas luscentes no citoplasma celular, que possuem ultraestrutura com lúmen eletroluscente. Embora existam outras explicações para o processo de vacuolização (Aki et al., 2012; Aki et

al., 2013; Shubin et al., 2016), em abelhas a interpretação corrente é a intensificação de processos autofágicos (Grella et al., 2019). Isso ocorre em razão do vulto de evidências em microscopia correlativa de luz e eletrônica (Carneiro et al., 2022; Serra et al., 2023; Lu et al., 2023), luz tradicional e fluorescência (Araujo et al., 2019; Farder-Gomes et al., 2022; Gomes et al., 2024; Wang et al., 2024), além de resultados de expressão gênica e, ou, abundância proteica da via autofágica (Carneiro et al., 2022; Lu et al., 2023; Wang et al., 2024), indicando incremento de macroautofagia em contexto de exposição a pesticidas. A autofagia do tipo macroautofagia é uma via lisossomal ativada para manutenção celular, mas que pode ser intensificada sob condições de estresse celular onde há abundância de macromoléculas e organelas danificadas e disfuncionais, a fim de reciclá-las autodigestivamente (Cao et al., 2021; Li et al., 2022; Yamamoto et al., 2023). Nesse processo, os componentes danificados são englobado por meio de fagóforo, formando autofagossomos e autolisossomos (Cao et al., 2021; Li et al., 2022). Embora os autofagossomos sejam de menor tamanho, podem formar autolisossomos de grande tamanho visíveis em microscopia de luz (Fedorko et al., 1968), o que possui congruência com os dados histopatológicos de vacuolização.

Vacuolização citoplasmática por processos autofágicos que reciclam macromoléculas e organelas danificadas em contexto de alto estresse celular possui função citoprotetora, impedindo que a célula evolua para ativação de morte celular programada como último mecanismo de defesa (Moore et al., 2008a, 2008b; Chiarelli et al., 2016). Neste contexto, a resposta do sistema autofágico é um mecanismo alostático que atua contra a perda da homeostase ou promove retorno a condição homeostática. Diante de injúrias danosas os quais os sistemas de detoxificação e antioxidante de primeiro nível de citoproteção, e sistema autofágico de segundo nível de citoproteção, não reestabelecem a homeostase, os danos acumulados comprometem a viabilidade celular, e o sistema de morte celular programada é acionado (Moore et al., 2008a, 2008b; Fairlie et al., 2020; Sorice, 2022), o qual a intensa vacuolização autofágica pode contribuir na eliciação da via de sinalização apoptótica (Fairlie et al., 2020; Sorice, 2022). Deste modo, o significado biológico da vacuolização só pode ser adequadamente compreendido em associação com outros parâmetros histológicos e análises como letalidade e, ou, sobrevivência, permitindo avaliar o impacto das respostas celulares e teciduais na saúde do organismo.

O resultado de proporção de células digestivas com vacuolização considerando a porção anterior do intestino médio, indicou o mesmo nível de vacuolização para os tratamentos de operárias de *A. mellifera* expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} tanto infectadas quanto não infectadas por *N. ceranae*, mas superior ao controle e abelhas apenas infectadas. Este resultado indica que a infecção por *N. ceranae* não influenciou na proporção de células vacuolizadas na porção anterior, apenas o estresse ocasionado pelo pesticida ciantraniliprole. Isso é compreensível, uma vez que a colonização por *N. ceranae* ao longo do epitélio do intestino médio não é equânime, mas diferencial, apresentando pouca infecção do epitélio da porção anterior e maior infecção do epitélio medial e posterior (Kurze et al., 2018). Por consequência, o fator estressante decorrente de *N. ceranae* não é significativo na porção anterior e a vacuolização nessa porção não é um bioindicador de estresse representativo para todo o intestino médio da interação pesticida-abelha-patógeno.

O resultado da proporção de células digestivas com vacuolização considerando a porção medial do intestino médio, indicou maior vacuolização do tratamento com operárias *A. mellifera* expostas ao ciantraniliprole e infectadas com *N. ceranae* do que abelhas apenas expostas ao ciantraniliprole e o controle. Além das operárias apenas expostas terem vacuolização superior ao controle. Estes resultados são importantes, pois indicam que a maior colonização do epitélio da porção medial pelo patógeno (Kurze et al., 2018) implicou em maior vacuolização, entretanto, este fator de estresse só foi detectável na presença do pesticida. Esse fenômeno, embora não aponte efeitos aditivos, multiplicativos ou sinérgicos entre o patógeno e o pesticida na abelha, indica susceptibilização das células digestivas das abelhas a intensificação da vacuolização citoplasmática.

O resultado da proporção de células digestivas vacuolizadas da porção posterior do intestino médio apresentou as operárias de *A. mellifera* com o mesmo nível de vacuolização entre os tratamentos com exposição ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10}, tanto infectadas quanto não infectadas pelo patógeno *N. ceranae*, ambos superiores ao controle e abelhas apenas infectadas. As operárias apenas infectadas por *N. ceranae* apresentaram uma proporção de células digestivas superior as abelhas do grupo controle. Estes resultados, distintamente do observado da porção medial, evidenciam que o epitélio da porção posterior infectado com *N. ceranae* apresentou vacuolização adicional, provavelmente decorrente da maior preferência de colonização do patógeno pela porção posterior em relação a porção medial e seu efeito estressor (Higes et al.,

2007; Kurze et al., 2018; Tadei et al., 2020). Entretanto, diferentemente do esperado, abelhas infectadas e não infectadas expostas ao pesticida não obtiveram diferença significativa mesmo com a maior colonização de *N. ceranae* nessa porção do epitélio intestinal (Kurze et al., 2018), incongruente do resultado da porção medial para abelhas infectadas e expostas. Considerando que o epitélio de cada porção do intestino médio possui diferenças celulares funcionais de natureza bioquímica, metabólica e ultraestruturais (da Cruz Landim, 2009), provavelmente essa diferença entre o resultado observado e o esperado se deve a características intrínsecas do epitélio de cada porção ainda não elucidadas.

O resultado de proporção de fragmento celular das células digestivas para todo o intestino médio de operárias de *A. mellifera* expostas ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10} tanto infectadas quanto não infectadas ao patógeno *N. ceranae* foram semelhantes estatisticamente e superiores ao controle, que não diferiu das abelhas apenas infectadas pelo patógeno. Foram observados fragmentos celulares com vacuolização citoplasmática nos tratamentos com abelhas expostas ao pesticida, tanto infectadas quanto não infectadas. Essa vacuolização nos fragmentos celulares provavelmente é um fenômeno colateral da intensa vacuolização decorrente da ação do pesticida, sem ter uma relação causal com a fragmentação. A intensificação da liberação de fragmentos celulares pode ser interpretada como um marcador de estresse celular e tecidual no intestino médio de abelhas, respondendo com incremento de liberação a um estressor tóxico como pesticidas (Grella et al, 2019; Santos-Junior et al., 2019; Motta et al., 2024; Reis et al., 2024). Assim, o resultado indica que a fragmentação celular das células digestivas liberadas no lúmen do intestino médio quando considerado integralmente o órgão, não é um bom bioindicador histopatológico da associação do pesticida com o patógeno. Não apresenta resposta a infecção pela *N. ceranae*, mas é intensificado pela ação do pesticida, razão pela qual, quando ambos os estressores estão presentes, seu efeito é semelhante a ação isolada do pesticida no epitélio.

A fragmentação das células digestivas é um fenômeno intimamente associado a secreção apócrina. Grânulos de secreção contendo enzimas digestivas podem estar presentes na região apical do citoplasma das protusões citoplasmáticas, no citosol e nas membranas, além de produtos de excreção (da Cruz Landim, 2009). Quando as protusões citoplasmáticas se projetam para o lúmen e se despreendem do epitélio, por conseguinte se configuram como fragmentos celulares, eventualmente se rompendo e

liberando o conteúdo enzimático e, ou, de excreção no lúmen (da Cruz Landim, 2009). Entretanto, a liberação de enzimas de detoxificação no lúmen também está associada aos fragmentos celulares, tendo sido identificado enzimas desse sistema no conteúdo citoplasmático dos fragmentos liberados (Ferreira et al., 1990; Cristofolletti et al., 2001). Baseado neste fato e na observação do incremento de fragmentos celulares em *Podisus nigrispinus* expostos a pesticida, Martínez et al.(2018) argumentou que a fragmentação pode ter funcionalidade na detoxificação via secreção apócrina de enzimas. Grella et al.(2019) estendeu essa interpretação para os casos de incrementos de fragmentação em abelhas expostas a pesticida, o que foi subscrito por outros estudos histopatológicos e ultraestruturais em toxicologia envolvendo *A. mellifera* (Reis et al., 2024) e *Partamona helleri* (Motta et al., 2024). Desta forma, a fragmentação celular se qualifica como um biomarcador de estresse celular, funcionando em contraposição a ação de tóxicos ao atuar conjuntamente com o sistema de detoxificação.

O resultado da proporção de fragmento celular para a porção anterior do intestino médio foi semelhante de operárias de *A. mellifera* tanto infectadas quanto não infectadas com patógeno *N. ceranae*, mas superiores a das abelhas apenas infectadas pelo patógeno e as abelhas controle. Embora a semelhança deste resultado com o resultado global para o intestino médio sugere que a fragmentação na porção anterior não é bioindicadora de estresse para a associação pesticida-patógeno, é necessário considerar as demais porções, pois a porção anterior possui pouca colonização de *N. ceranae* (Kurze et al., 2018), o que por si só explica porque não ocorreu efeito associado.

O resultado da porção medial do intestino médio para proporção de fragmentos celulares liberados, foi superior no grupo experimental com exposição ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10} em *A. mellifera* operárias infectadas com o patógeno *N. ceranae* do que no grupo controle, entretanto sem diferença com as abelhas apenas expostas ao pesticida. Por sua vez, as operárias apenas expostas ao pesticida apresentaram valor superior a proporção de fragmentos celulares do grupo controle, mas não das abelhas apenas infectadas. Apesar deste resultado apresentar um padrão de diferenças distinto da porção anterior, não indica claramente uma interpretação diferente. Todavia, a não distinção entre abelhas somente expostas ao pesticida e aquelas apenas infectadas sugere um incremento de estresse advindo da ação de *N. ceranae*, pois interpreta-se o incremento de fragmentação celular como biomarcador

de estresse (Grella et al, 2019; Santos-Junior et al., 2019; Motta et al., 2024; Reis et al., 2024). É possível que a não peremptoriedade do resultado quanto a possibilidade de interpretação decorra do aumento gradual de colonização por parte de *N. ceranae* das células digestivas do epitélio, uma vez que a porção medial está entre a anterior e a posterior, pouco colonizada e muito colonizada, respectivamente.

O resultado da proporção de fragmento celular na porção posterior do tratamento com operárias de *A. mellifera* expostas ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10} foi superior a todos os demais tratamentos, com exceção das operárias tanto expostas ao pesticida quanto infectadas por *N. ceranae*. Já as operárias tanto expostas quanto infectadas também apresentaram mesma proporção que abelhas somente infectadas e aquelas do grupo controle. A porção posterior do intestino médio apresenta naturalmente maior nível de protusões citoplasmáticas e fragmentação celular do que a região medial (da Cruz Landim, 2009), razão pela qual a diferença entre o controle e as abelhas apenas infectadas observada na porção medial pode ter desaparecido na região posterior, mesmo com o maior nível de infecção do patógeno (Kurze et al., 2018). Entretanto, a validade da fragmentação celular como biomarcador de estresse de ação do pesticida observado na porção anterior e medial, permanece válida para a região posterior do intestino médio.

O resultado da proporção de células digestivas eliminadas no lúmen ao longo de todo o intestino médio do tratamento com *A. mellifera* africanizada expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} em operárias infectadas com *N. ceranae* foi inferior ao de operárias apenas expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10}, porém superior ao controle e abelhas somente infectadas. Considerando que a eliminação celular é não só um mecanismo de manutenção da homeostase via descarte de células senescentes e desgastadas pela intensa atividade metabólica, mas também uma resposta alostática a estressores (Hakim et al, 2010; Liu & Levine, 2015; Farder-Gomes et al, 2021; Bertherloot et al., 2021; Carneiro et al., 2023; Sun, 2024), o resultado lógico era uma proporção superior de células eliminadas. Entretanto, a eliminação celular pode ser considerada uma morte celular programada do tipo apoptótica (Jimenez e Gilliam, 1989), dente modo, a capacidade de *N. ceranae* suprimir apoptose dependente de capase (Higes et al., 2013), provavelmente da via intrínseca (Martin-Hernandez et al., 2017), permite concluir que o efeito supressor de *N. ceranae* nas células digestiva do epitélio reduziu a eliminação celular. Apesar de não ter impedido o incremento de apoptose decorrentes da ação tóxica do pesticida (Carneiro et al., 2023; Sun, 2024), o

efeito supressor do patógeno reduziu a resposta de eliminação celular ao pesticida, razão pela qual o padrão de resultado é idêntico ao observado previamente para marcações de caspase-3 no intestino médio inteiro.

O resultado da proporção de células digestivas eliminadas no lúmen pelo epitélio da porção anterior do intestino médio em *A. mellifera* operárias infectadas com *N. ceranae* e expostas ao pesticida ciantraniliprole CL_{50/10} foi semelhante ao de operárias apenas expostas ao pesticida, mas superior as abelhas do controle e operárias apenas infectadas, sendo que estas não diferiram daquelas. Este resultado decorre da baixa colonização deste epitélio pelo patógeno *N. ceranae* (Kurze et al., 2018), razão pela qual seus efeitos supressores de apoptose não são significativos à semelhança do resultado anterior para imunomarcação de caspase-3 nesta mesma região do intestino médio. Tanto o resultado da proporção de células digestivas eliminadas pelo epitélio da porção medial quanto da porção posterior do intestino médio em *A. mellifera* operárias infectadas com *N. ceranae* e expostas ao ciantraniliprole CL_{50/10} foram inferiores ao de operárias apenas expostas ao ciantraniliprole e superiores ao de operárias somente infectadas que, por sua vez, não diferiram do controle. Estes resultados indicam que o aumento do patógeno *N. ceranae* no epitélio, embora não tenha reduzido a eliminação celular natural desta região, reduziu a resposta alostática do tecido à injúria causada pelo pesticida, corroborando a interpretação dos resultados de imunomarcação para caspase-3 observados previamente.

Os resultado histopatológico de células eliminadas indicam que tanto células com núcleo picnótico quanto células sem núcleo picnótico são eliminadas de modo programado, além de células eliminadas com e sem vacuolização, embora tenha sido raro encontrar células digestivas com núcleo picnótico. A eliminação celular possui semelhanças e diferenças com a visão clássica de apoptose onde há picnose (Bortner et al., 1995). A célula morta não tem os corpos apoptóticos fagocitados mas sim eliminado no lúmen, sendo a própria célula eliminada no lúmen considerada um corpo apoptótico por Jimenez e Gilliam (1989). Existe documentado na histologia do intestino médio de abelhas, células eliminadas no lúmen com e sem núcleo picnótico (da Cruz Landim, 2009), mas não há interpretação concernente a essa discrepância observada. Isso parece indicar que a condensação de cromatina é algo secundário na eliminação celular em insetos, podendo estar ou não presente, por razões ainda desconhecidas.

A relação entre as células epiteliais com núcleo picnótico e as células eliminadas com núcleo picnótico é evidente, onde se pressupõe que as células eliminadas com núcleo picnótico eram células digestivas com picnose ainda no epitélio em processo de apoptose, mas não há explicação para células eliminadas sem núcleo picnótico. Entretanto, existe a possibilidade da dinâmica das caspases efetoras atuarem primeiro e principalmente nas adjacências celulares, promovendo a perda de adesão celular por desorganização do citoesqueleto (Ndozangue-Touriguini et al., 2008), o que resultaria na eliminação celular antes das picnose se tornar perceptível em parte dos casos. A favor dessa possibilidade está o padrão de distribuição das mitocôndrias nas células digestivas, principalmente na porção apical logo abaixo das microvilosidades, e na porção basal associadas ou não ao labirinto basal (da Cruz-Landim, 2009). Essa distribuição torna razoável que os apoptossomos se concentrem e tornem essa localidade a região inicial de disparo da cadeia proteolítica de caspases, de onde o núcleo é a região mais distante. Antagônico a essa explicação é o número de trabalhos com pesticidas em que há incremento de células com picnose nuclear ainda no epitélio do intestino médio (Catae et al., 2017; Carneiro et al., 2020; Carneiro et al., 2022; Reis et al., 2024), ao mesmo tempo em que há número substancial de estudos toxicológicos onde esse fenômeno não é observado (Castro et al., 2020; Carneiro et al., 2023; Serra et al., 2023; Ibrahim et al., 2023; Motta et al., 2024; Reis et al., 2024). Esta questão permanece sem resposta determinante, mas avaliar o incremento de proporção de picnose no epitélio, bem como de eliminação celular com e sem picnose, e se há correlação entre esses resultados, podem fornecer subsídios empíricos para uma interpretação elucidativa desse fenômeno.

O resultado dos índices de lesão do intestino médio inteiro para os tratamentos com *A. mellifera* operárias expostas ao ciantraniliprole $CL_{50/10}$, tanto infectadas quanto não infectadas por *N. ceranae*, não apresentaram diferença entre si, mas valores superiores aos índices do controle e abelhas apenas infectadas. O controle obteve o menor índice de lesão. Estes resultados indicam que em termos de nível global de comprometimento das células e do tecido, a infecção pelo patógeno não exerce influência no órgão quando exposto ao pesticida. Pela capacidade de estimular vacuolização, fragmentação celular e eliminação celular, é razoável que isoladamente o pesticida seja capaz de elevar substancialmente o índice de lesão do órgão. Apesar de o patógeno *N. ceranae* também atuar isoladamente, concomitante ao pesticida o acúmulo e impacto dos marcadores de estresse celular é semelhante aos ocasionados

somente pelo pesticida, aparentemente indicando que globalmente sua associação não afeta a saúde do órgão.

Embora o resultado de índice de lesão global do intestino médio indique que não há diferença de impacto do pesticida entre o tratamento com abelhas expostas ao ciantraniliprole $CL_{50/10}$ com e sem infecção pelo patógeno *N. ceranae*, apenas o tratamento com a exposição ao pesticida e a infecção pelo patógeno se observou redução de sobrevivência. Esse tipo de índice se baseia em biomarcadores de estresse celular e tecidual, sendo utilizado para avaliar o nível do fenótipo de estresse de um órgão a um injuriante, frequentemente químico, e assim inferir o nível de lesão de um órgão (Bernet et al. 2001). Entretanto, a inferência do biomarcador de estresse como uma lesão é um salto dedutivo (Bernet et al. 2001), e depende da adequada interpretação de seus parâmetros histológicos individuais, isto é, o corpo teórico da biologia celular subjacente ao biomarcador. É preciso considerar o significado biológico dos biomarcadores, a fim de caracterizar como uma lesão real ou uma resposta alostática. Isso evidencia a limitação do método de cálculo de índice de lesão que, todavia, pode ser contornado por meio complementariedade das análises dos parâmetros histopatológicos analisados individualmente. Com essa conjunção de resultados, fica evidente que parâmetros como o incremento da vacuolização e a redução da eliminação celular observados nas abelhas infectadas e expostas ao pesticida, em relação a abelhas apenas expostas, se anularam mutuamente mascarando qualquer diferença. Conquanto o aumento da vacuolização possa ter significado alostático, a redução da eliminação celular é deletéria e pode contribuir para a intoxicação.

Todos os resultados de índice de lesão do intestino médio para cada porção, seja anterior, média ou posterior, apresentaram *A. mellifera* expostas ao ciantraniliprole, tanto infectadas quanto não infectadas por *N. ceranae*, com índices de lesão semelhantes, além de maiores em relação ao controle e abelhas apenas infectadas, que não diferiram entre si, com exceção da porção posterior onde abelhas apenas infectadas foram superiores ao controle. Isso indica que o nível de fenótipo de estresse de abelhas expostas ao pesticida tanto infectadas quanto não infectadas é superior a abelhas não expostas e infectadas, mas não é diferente entre si. Todavia, o significado biológico da distinção ou semelhança do nível de fenótipo de estresse depende da interpretação biológica dos fenômenos celulares subjacentes utilizados no cálculo e sua função na relação causal com o(s) agente(s) injuriante(s), como previamente

discutido. O maior tropismo de *N. ceranae* por parasitar as células digestivas da porção posterior do intestino médio (Kurze et al., 2018), provavelmente explica a diferença do índice de lesão da porção posterior em relação ao índice de lesão global do intestino médio nas abelhas apenas infectadas pelo patógeno. Assim, apesar de seu nome, o índice de lesão é uma métrica eficiente para avaliar o fenótipo de estresse geral das porções do intestino médio, mas seu significado quanto a lesão e feito deletério depende da interpretação biológica de cada componente.

5. Considerações finais

A letalidade do ciantraniliprole evidencia o potencial desse pesticida em contribuir para o declínio global de abelhas. Apesar de isoladamente o pesticida não afetar as abelhas em concentrações subletais, associado ao patógeno *Nosema ceranae* apresenta efeito deletério reduzindo a sobrevivência de *Apis mellifera* africanizada. A capacidade de reduzir a apoptose representa um elo causal subjacente ao efeito deletério da associação do patógeno com o pesticida, sendo um mecanismo responsável pela capacidade de *N. ceranae* fragilizar abelhas ao pesticida ciantraniliprole. A ativação da via apoptótica, a proporção de células digestivas vacuolizadas, a fragmentação celular, a eliminação celular e o índice de lesão de cada porção epitelial do intestino médio evidenciam que utilizar o intestino médio inteiro para avaliar a resposta tecidual não é representativo, com cada porção apresentando suas peculiaridades responsivas para cada um desses fenômenos celulares. Além disso, é fundamental considerar dados de biomarcadores de estresse de cada porção independente de outras porções a fim de evitar enviesamento.

De modo geral, os estressores tóxico e patogênico podem exercer ação citoestressora vacuolizadora nas células digestivas isoladamente, dependendo da concentração e nível de infecção, respectivamente, podendo ocorrer associação de seus efeitos intensificando o nível de vacuolização, entretanto isso irá depender de qual porção do intestino médio o epitélio pertence por razões intrínsecas ainda não compreendidas. A fragmentação das células digestivas indica a eficiência do biomarcador de estresse para ação do ciantraniliprole em todas as porções do intestino médio. Entretanto, não possui responsividade consistente a infecção por *N. ceranae*, com ou sem exposição ao pesticida. A proporção de eliminação celular evidencia o efeito supressor da apoptose pelo patógeno *N. ceranae*. Este efeito de redução se torna perceptível quando o epitélio está sob forte ação tóxica de pesticida, pois a eliminação celular é a resposta de morte celular programada do tipo apoptose-like com

responsividade alostática à injúria. Embora seja interpretado como um parâmetro histopatológico de estresse, onde maiores e menores níveis indicam maior e menor estresse, respectivamente; seu declínio pode implicar em uma menor capacidade de contraposição aos efeitos deletérios dos pesticidas, resultando em maior toxicidade. Portanto, a interpretação do significado biológico deste biomarcador não é direta, dependendo da contextualização da cadeia de causa e efeito até a eliminação celular, isto é, que geram o fenômeno de seu incremento ou redução, e após, ou seja, seus desdobramentos fisiológicos na sobrevivência. Quanto ao índice de lesão, apesar de seu nome, é uma métrica para fenótipo de estresse, e a depender da interpretação causal dos parâmetros individuais utilizados nos cálculos e o impacto ou não na sobrevivência, inferências de lesão podem ser realizadas.

Deste modo, o presente estudo fornece subsídios teóricos, empíricos e metodológicos para a compreensão das relações entre o patógeno *N. ceranae* e o pesticida ciantraniliprole, relacionados ao declínio global de abelhas e suas síndromes de estresse. Por fim, aponta a necessidade de considerar os impactos da presença de mais de um estressor e o potencial chave do patógeno *N. ceranae* susceptibilizar abelhas melíferas a estressores tóxicos, na elaboração de manejo das abelhas e políticas de conservação.

6. Referências Bibliográficas

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.
- 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
- Aki, T., Nara, A., & Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell biology and toxicology*, 28, 125-131.
- Aki, T., Funakoshi, T., Unuma, K., & Uemura, K. (2013). Impairment of autophagy: from hereditary disorder to drug intoxication. *Toxicology*, 311(3), 205-215.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology*, 11(9), 2284-2290.
- Arancibia, S. M. F., Grecco, H. E., & Morelli, L. G. (2021). Effective description of bistability and irreversibility in apoptosis. *Physical Review E*, 104(6), 064410.
- Atkins, E. L. (1992). Injury to honey bees by poisoning. *The Hive and the Honey Bee*, Rev. Dadant and Sons, Hamilton, IL.
- Basu, P., & Chakrabarti, P. (2015). Sub-Lethal Effects of Pesticides on Pollinators with Special Reference to Honey Bees.
- BenVau, L. R., & Nieh, J. C. (2017). Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific reports*, 7(1), 14144.
- Bernardes, R. C., Botina, L. L., Araujo, R. D. S., Guedes, R. N. C., Martins, G. F., & Lima, M. A. P. (2022). Artificial intelligence-aided meta-analysis of toxicological assessment of agrochemicals in bees. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10.

Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, *18*(5), 1106-1121.

Bhadra, K. (2022). A mini review on molecules inducing caspase-independent cell death: A new route to cancer therapy. *Molecules*, *27*(19), 6401.

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*, 973-992.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, *37*(1), 1-18.

Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology*, *86*, 40-47.

Buja, L. M., Burton, K. P., Chien, K. R., & Willerson, J. T. (1988). Altered calcium homeostasis and membrane integrity in myocardial cell injury. In *Cellular Ca²⁺ Regulation* (pp. 115-124). Boston, MA: Springer US.

Caccia, S., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2019). The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue research*, *377*, 505-525.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in pharmacological sciences*, *22*(6), 285-291.

Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., & Picó, Y. (2018). Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, *241*, 106-114.

Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., & Gabaldon, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC biology*, *10*, 1-14.

Carneiro, L. S., Martinez, L. C., De Oliveira, A. H., Cossolin, J. F. S., De Resende, M. T. C. S., Gonçalves, W. G., ... & Serrão, J. E. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment*, *815*, 152847.

Carneiro, L. S., Santos, C. G., de Resende, M. T. C. S., de Souza, D. L. L., dos Santos Souza, D., da Cruz Souza, A. M., ... & Serrão, J. E. (2023). Effects of the insecticide imidacloprid on the post-embryonic development of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Science of The Total Environment*, 905, 167278.

Castro e Castro, B. M. D., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., Wilcken, C. F., Zanuncio, A. J. V., ... & Serrão, J. E. (2021). Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*, 263, 128008.

Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, D. (2021). An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin du cancer*, 108(3), 304-322.

Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto™(flupyradifurone) and Transform®(sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Plos one*, 15(5), e0233033.

Chen, T. S., Wang, X. P., Sun, L., Wang, L. X., Xing, D., & Mok, M. (2008). Taxol induces caspase-independent cytoplasmic vacuolization and cell death through endoplasmic reticulum (ER) swelling in ASTC-a-1 cells. *Cancer letters*, 270(1), 164-172.

Chiarelli, R., Martino, C., Agnello, M., Bosco, L., & Roccheri, M. C. (2016). Autophagy as a defense strategy against stress: focus on *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos exposed to cadmium. *Cell Stress and Chaperones*, 21(1), 19-27.

Collison, E., Hird, H., Cresswell, J., & Tyler, C. (2016). Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health—a critical analysis. *Biological Reviews*, 91(4), 1006-1019.

Cordova, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J. S., Lahm, G. P., ... & Tao, Y. (2006). Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(3), 196-214.

Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F., & Terra, W. R. (2001). Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 47(2), 143-155.

- Da Cruz-Landim, C., Serrao, J. E., & SilvaDeMoraes, R. L. M. (1996). Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios*, 95-104.
- Da 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.da
- da Cruz-Landim, C. (2009). *Abelhas*. Unesp.
- Danforth, B. (2007). Bees. *Current biology*, 17(5), R156-R161.
- Deehan, M., Lin, W., Blum, B., Emili, A., & Frydman, H. (2021). Intracellular density of Wolbachia is mediated by host autophagy and the bacterial cytoplasmic incompatibility gene cifB in a cell type-dependent manner in *Drosophila melanogaster*. *MBio*, 12(1), e02205-20.
- 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*, 248, 126075.
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176.
- Demarco, B., Chen, K. W., & Broz, P. (2020). Cross talk between intracellular pathogens and cell death. *Immunological reviews*, 297(1), 174-193.
- 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.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.
- Di Noi, A., Casini, S., Campani, T., Cai, G., & Caliani, I. (2021). Review on sublethal effects of environmental contaminants in honey bees (*Apis mellifera*), knowledge gaps and future perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1863.
- Di Pasquale, Garance et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, v. 8, n. 8, p. e72016, 2013.
- Dinter, A., & Samel, A. (2015). Cyantraniliprole: pollinator profile of the novel insecticides under laboratory, semi-field and field conditions.

Doeke, M. A., Frazier, M., & Grozinger, C. M. (2015). Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 185-193.

Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental microbiology*, 17(4), 969-983.

Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., ... & Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PloS one*, 7(5), e37017.

Eiri, D. M., Suwannapong, G., Endler, M., & Nieh, J. C. (2015). *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*, 10(5), e0126330.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Espallardo, T. V., Muñoz, A., & Palau, J. L. (2012). Pesticide residues in the atmosphere. *Pesticides: evaluation of environmental pollution*, 203-232.

Fairlie, W. D., Tran, S., & Lee, E. F. (2020). Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways. *International review of cell and molecular biology*, 352, 115-158.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., Fell, R. 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 719-731.

Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, 774, 145679.

Fedorko, M. E., Hirsch, J. G., & Cohn, Z. A. (1968). Autophagic vacuoles produced in vitro: I. Studies on cultured macrophages exposed to chloroquine. *The Journal of Cell Biology*, 38(2), 377-391.

Ferreira, C., Bellinello, G. L., Ribeiro, A. F., & Terra, W. R. (1990). Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory

vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, 20(8), 839-847.

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

Finney, D. J. (1947). The estimation from individual records of the relationship between dose and quantal response. *Biometrika*, 34(3/4), 320-334.

Formato, G., Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Martín-Hernández, R., Milito, M., Croppi, S., & Higes, M. (2022). Nosemosis prevention and control. *Applied Sciences*, 12(2), 783.

Forsgren, E., & Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary parasitology*, 170(3-4), 212-217.

Fowler, A. E., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2020). Parasite defense mechanisms in bees: behavior, immunity, antimicrobials, and symbionts. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(1), 59-76.

Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.

Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., ... & Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-28.

Galon, L., Bragagnolo, L., Korf, E. P., Dos Santos, J. B., Barroso, G. M., & Ribeiro, V. H. V. (2021). Mobility and environmental monitoring of pesticides in the atmosphere—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 32236-32255.

Gao, L., Qiao, H., Wei, P., Moussian, B., & Wang, Y. (2022). Xenobiotic responses in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 109(3), e21869.

Giannini, T.C.; Boff, S.; Cordeiro, G.D.; Cartolano Jr, E.A.; Veiga, E.A.K.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*. 46, 209–223, 2015.

Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., & Genersch, E. (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these

important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental microbiology*, 13(2), 404-413.

Gisder, S., Schüler, V., Horchler, L. L., Groth, D., & Genersch, E. (2017). Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 301.

Goblirsch, M. (2018). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 49(1), 131-150.

Gómez-Virgilio, L., Silva-Lucero, M. D. C., Flores-Morelos, D. S., Gallardo-Nieto, J., Lopez-Toledo, G., Abarca-Fernandez, A. M., ... & Cardenas-Aguayo, M. D. C. (2022). Autophagy: a key regulator of homeostasis and disease: an overview of molecular mechanisms and modulators. *Cells*, 11(15), 2262.

Gomes, D. S., Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Farder-Gomes, C. F., Bastos, D. S. S., Bernardes, R. C., & Serrão, J. E. (2024). Acute exposure to fungicide fluazinam induces cell death in the midgut, oxidative stress and alters behavior of the stingless bee *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 282, 116677.

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).

Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., & Baer, B. (2018). Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *Journal of invertebrate pathology*, 159, 78-86.

Grella, T. C., Soares-Lima, H. M., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2019). Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere*, 236, 124255.

Gregorc, A., & Ellis, J. D. (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(2), 200-207.

Gregorc, A., Silva-Zacarin, E. C., Carvalho, S. M., Kramberger, D., Teixeira, E. W., & Malaspina, O. (2016). Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere*, *147*, 328-336.

Grupe, A. C., & Quandt, C. A. (2020). A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS pathogens*, *16*(6), e1008580.

Guimarães-Cestaro, L., Martins, M. F., Martínez, L. C., Alves, M. L. T. M. F., Guidugli-Lazzarini, K. R., Nocelli, R. C. F., ... & Teixeira, É. W. (2020). Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *The Science of Nature*, *107*, 1-14.

Gyrd-Hansen, M., & Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 561-574.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology*, *55*(1), 593-608.

Harwood, G. P., & Dolezal, A. G. (2020). Pesticide–virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses*, *12*(5), 566.

He, X., Fu, Z., Li, M., Liu, H., Cai, S., Man, N., & Lu, X. (2015). *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in Bm N cells (*Bombyx mori*). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *47*(9), 696-702.

Hegedus, D. D., Toprak, U., & Erlandson, M. (2019). Peritrophic matrix formation. *Journal of Insect Physiology*, *117*, 103898.

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.

Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, *92*(2), 93-95.

Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of invertebrate pathology*, *94*(3), 211-217.

Higes, M., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2010). Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41(3), 375-392.

Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). Nosema ceranae (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 17-29.

Huang, Q., Wu, Z. H., Li, W. F., Guo, R., Xu, J. S., Dang, X. Q., ... & Evans, J. D. (2021). Genome and evolutionary analysis of Nosema ceranae: A microsporidian parasite of honey bees. *Frontiers in Microbiology*, 12, 645353.

Ismail, Mohd Mansor, and Wan Iryani Wan Ismail. "Development of stingless beekeeping projects in Malaysia." E3S Web of Conferences. Vol. 52. EDP Sciences, 2018.

Johnson, Reed M. et al. Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie*, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

Johnson, R. M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual review of entomology*, 60(1), 415-434.

Kearns, Carol Ann; Inouye, David William. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *Bioscience*, v. 47, n. 5, p. 297-307, 1997.

Keeling, P. (2009). Five questions about microsporidia. *PLoS pathogens*, 5(9), e1000489.

Kim, J., Chon, K., Kim, B. S., Oh, J. A., Yoon, C. Y., & Park, H. H. (2022). Assessment of acute and chronic toxicity of cyantraniliprole and sulfoxaflor on honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Pest Management Science*, 78(12), 5402-5412.

Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., ... & Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 96(1), 1-10.

Kurze, C., Le Conte, Y., Dussaubat, C., Erler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., ... & Moritz, R. F. (2015). Nosema tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS One*, 10(10), e0140174.

Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G. I., Le Conte, Y., Kryger, P., & Moritz, R. F. (2016). *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research*, *115*, 2381-2388.

Kurze, C., Le Conte, Y., Kryger, P., Lewkowski, O., Müller, T., & Moritz, R. F. (2018). Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *Journal of invertebrate pathology*, *154*, 1-4.

Lahm, G. P., Selby, T. P., Freudenberger, J. H., Stevenson, T. M., Myers, B. J., Seburyamo, G., ... & Cordova, D. (2005). Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *15*(22), 4898-4906.

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.

Lieberthal, W., & Levine, J. S. (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *271*(3), F477-F488.

Lim, D., Dematteis, G., Tapella, L., Genazzani, A. A., Cali, T., Brini, M., & Verkhratsky, A. (2021). Ca²⁺ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration. *Cell Calcium*, *98*, 102453.

Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *22*(3), 367-376.

Liu, B., Oltvai, Z. N., Bayır, H., Silverman, G. A., Pak, S. C., Perlmutter, D. H., & Bahar, I. (2017). Quantitative assessment of cell fate decision between autophagy and apoptosis. *Scientific reports*, *7*(1), 17605.

Liu, Y., Zhang, S., Wang, W., Tang, S., Zhu, Y., Wang, M., ... & Lu, H. (2023). Swainsonine-induced vacuolar degeneration is regulated by mTOR-mediated autophagy in HT22 cells. *Toxicology Letters*, *373*, 41-52.

Liu, X., Cooper, A. M., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of insect physiology*, *114*, 109-115.

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death?. *Oncogene*, *23*(16), 2766-2773.

Lourenço, A. P., Guidugli-Lazzarini, K. R., de Freitas, N. H., Message, D., Bitondi, M. M., Simões, Z. L., & Teixeira, É. W. (2021). Immunity and physiological changes in adult honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*: The natural colony environment. *Journal of Insect Physiology*, *131*, 104237.

Lu, K., Song, Y., & Zeng, R. (2021). The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Current Opinion in Insect Science*, *43*, 103-107.

Lu, Q., Xu, S., Hao, Z., Li, Y., Huang, Y., Ying, S., ... & Wang, H. (2023). Dinotefuran exposure induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in *Bombyx mori*. *Journal of Hazardous Materials*, *458*, 131997.

Lundin, Ola et al. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0136928, 2015.

Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Büttner, S., Eisenberg, T., & Kroemer, G. (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *382*(2), 227-231.

Malaspina, O., & da Silva-Zacarin, E. C. M. (2006). Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Journal of Morphological Sciences*, *23*(3), 0-0.

Malci, A., Lin, X., Sandoval, R., Gundelfinger, E. D., Naumann, M., Seidenbecher, C. I., & Herrera-Molina, R. (2022). Ca²⁺ signaling in postsynaptic neurons: Neuroplastin-65 regulates the interplay between plasma membrane Ca²⁺ ATPases and ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, *106*, 102623.

Marín-García, P. J., Peyre, Y., Ahuir-Baraja, A. E., Garijo, M. M., & Llobat, L. (2022). The role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bee colony losses and current insights on treatment. *Veterinary Sciences*, *9*(3), 130.

Martín-Hernández, R., Higes, M., Sagastume, S., Juaranz, Á., Dias-Almeida, J., Budge, G. E., ... & Boonham, N. (2017). Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One*, *12*(2), e0170183.

Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., ... & Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology*, *20*(4), 1302-1329.

Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., da Silva Neves, G., 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.

Mayack, C., & Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of invertebrate pathology*, *100*(3), 185-188.

Mayer, L., Degrendele, C., Šenk, P., Kohoutek, J., Příbylová, P., Kukučka, P., ... & Lammel, G. (2024). Widespread pesticide distribution in the European atmosphere questions their degradability in air. *Environmental science & technology*, *58*(7), 3342-3352.

McGregor, Samuel Emmett et al. Insect pollination of cultivated crop plants. Washington, DC: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 1976.

McGowan, J., De la Mora, A., Goodwin, P. H., Habash, M., Hamiduzzaman, M. M., Kelly, P. G., & Guzman-Novoa, E. (2016). Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *Journal of microbiological methods*, *131*, 16-22.

Meeus, I., Pisman, M., Smagghe, G., & Piot, N. (2018). Interaction effects of different drivers of wild bee decline and their influence on host-pathogen dynamics. *Current opinion in insect science*, *26*, 136-141.

Moore, M. N. (2008). Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy*, *4*(2), 254-256. (b)

Motta, J. V. D. O., Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Bastos, D. S. S., Resende, M. T. C. S., Castro, B. M. C., ... & Serrão, J. E. (2023). Midgut cell damage and oxidative stress in *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae) workers caused by the insecticide lambda-cyhalothrin. *Antioxidants*, *12*(8), 1510.

Motta, J. V., Gomes, D. S., da Silva, L. L., de Oliveira, M. S., Bastos, D. S. S., Resende, M. T. C. S., ... & Serrão, J. E. (2024). Effects of sublethal concentration of thiamethoxam formulation on the wild stingless bee, *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae): Histopathology, oxidative stress and behavioral changes. *Science of The Total Environment*, *957*, 177626.

Moore, M. N., Allen, J. I., & Somerfield, P. J. (2006). Autophagy: role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*, 62, S420-S425.

Morio, B., Panthu, B., Bassot, A., & Rieusset, J. (2021). Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases. *Cell Calcium*, 94, 102336.

Morishita, H., & Mizushima, N. (2019). Diverse cellular roles of autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 35(1), 453-475.

Mundy-Heisz, K. A., Prosser, R. S., & Raine, N. E. (2022). Acute oral toxicity and risks of four classes of systemic insecticide to the Common Eastern Bumblebee (*Bombus impatiens*). *Chemosphere*, 295, 133771.

Nasuti, C., Cantalamessa, F., Falcioni, G., & Gabbianelli, R. (2003). Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, 191(2-3), 233-244.

Nauen, R., Slater, R., Sparks, T. C., Elbert, A., & Mccaffery, A. (2019). IRAC: insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides. *Modern crop protection compounds*, 3, 995-1012.

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.

Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., & Bréard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 76(1), 11-18.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. Test No. 213 .

Oliveira, A. H., Souza, A. M. D. C., de Resende, M. T. C. S., Carneiro, L. S., de Oliveira, J. F., Serra, R. S., & Serrão, J. E. (2023). The peritrophic matrix delays *Nosema ceranae* infection in the honey bee *Apis mellifera* midgut. *Physiological Entomology*, 48(2-3), 61-67.

Oliveira, M. S. D., Pereira, G. D. S., Martinez, L. C., Reis, A. B., Resende, M. T. C. S. D., Silva, L. L. D., ... & Serrão, J. E. (2024). Effects of chronic oral exposure to insecticide teflubenzuron on the midgut of the honey bee *Apis mellifera* workers: histopathological insights into pesticide toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.

Ollerton, Jeff; Winfree, Rachael; Tarrant, Sam. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

Panek, J., Paris, L., Roriz, D., Mone, A., Dubuffet, A., Delbac, F., ... & El Alaoui, H. (2018). Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 159, 121-128.

Paris, L., El Alaoui, H., Delbac, F., & Diogon, M. (2018). Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current opinion in insect science*, 26, 149-154.

Patel, S., & Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends in cell biology*, 20(5), 277-286.

Peng, Y. C., & Yang, E. C. (2016). Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.

Pettis, J. S., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2), 153-158.

Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Noceli, R.C.F., Malaspina, O., Petis, J.S., Teixeira, E.W. 2016. Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51: 422-442.

Priyadarshini Chakrabarti, P. C., Santanu Rana, S. R., Sreejata Bandopadhyay, S. B., Naik, D. G., Sagartirtha Sarkar, S. S., & Parthiba Basu, P. B. (2015). Field populations of native Indian honey bees from pesticide intensive agricultural landscape show signs of impaired olfaction.

Potts, S. G., Imperatriz Fonseca, V., Ngo, H. T., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L., ... & Viana, B. F. (2016). Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.

Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific reports*, 5(1), 11779.

Retschnig, G., Williams, G. R., Odemer, R., Boltin, J., Di Poto, C., Mehmman, M. M., ... & Neumann, P. (2015). Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. *Environmental Microbiology*, *17*(11), 4322-4331.

Ricketts, Taylor H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are the regeneral patterns?. *Ecology letters*, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.

Ritter, W. F. (1990). Pesticide contamination of ground water in the United States-A review. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, *25*(1), 1-29.

Rosenberg, P. (2022). VDAC2 as a novel target for heart failure: Ca²⁺ at the sarcomere, mitochondria and SR. *Cell calcium*, *104*, 102586.

Rost-Roszkowska, M. M. (2008). Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) during degeneration and regeneration. *Annals of the Entomological Society of America*, *101*(1), 151-158.

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.

Sánchez-Vázquez, V. H., Martínez-Martínez, E., Gallegos-Gómez, M. L., Arias, J. M., Pallafacchina, G., Rizzuto, R., & Guerrero-Hernández, A. (2023). Heterogeneity of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store determines colocalization with mitochondria. *Cell Calcium*, *109*, 102688.

Sankhla, M. S., Kumari, M., Sharma, K., Kushwah, R. S., & Kumar, R. (2018). Water contamination through pesticide & their toxic effect on human health. *International journal for research in applied science and engineering technology*, *6*(1), 967-970.

Santos-Junior, V. C., 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.

Sattler, C., Kächele, H., & Verch, G. (2007). Assessing the intensity of pesticide use in agriculture. *Agriculture, ecosystems & environment*, *119*(3-4), 299-304.

Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., ... & vanEngelsdorp, D. (2022). A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 292-304.

Serra, R. S., Cossolin, J. F. S., de Resende, M. T. C. S., de Castro, M. A., Oliveira, A. H., Martínez, L. C., & Serrão, J. E. (2021). Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, 270, 129439.

Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., & Zanuncio, J. C. (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature*, 109(2), 17.

Sinpoo, C., Paxton, R. J., Disayathanoowat, T., Krongdang, S., & Chantawannakul, P. (2018). Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of insect physiology*, 105, 1-8.

Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7(34), 55863

Smagghe, G., & Tirry, L. (2001). Insect midgut as a site for insecticide detoxification and resistance. In *Biochemical sites of insecticide action and resistance* (pp. 293-321). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual review of entomology*, 34(1), 77-96.

Sorice, M. (2022). Crosstalk of autophagy and apoptosis. *Cells*, 11(9), 1479.

Stanley, D. A., Garratt, M. P., Wickens, J. B., Wickens, V. J., Potts, S. G., & Raine, N. E. (2015). Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. *Nature*, 528(7583), 548-550.

Stiber, J. A., & Rosenberg, P. B. (2011). The role of store-operated calcium influx in skeletal muscle signaling. *Cell Calcium*, 49(5), 341-349.

Stefanini, M., Martino, C. D., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173-174.

Sun, G. (2024, March). Death and survival from executioner caspase activation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 156, pp. 66-73). Academic Press.

Tadei, R., Menezes-Oliveira, V. B., & Silva-Zacarin, E. C. (2020). Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. *Environmental Pollution*, 267, 115622.

Tarek, H., Hamiduzzaman, M. M., Morfin, N., & Guzman-Novoa, E. (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*).

T O'Neal, S., Anderson, T. D., & Wu-Smart, J. Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current opinion in insect science*, 26, 57-62.

Tokarev, Y. S., Huang, W. F., Solter, L. F., Malysh, J. M., Becnel, J. J., & Vossbrinck, C. R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of invertebrate pathology*, 169, 107279.

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.

Vapa-Tankosić, J., Miler-Jerković, V., Jeremić, D., Stanojević, S., & Radović, G. (2020) "Investment in Research and Development and New Technological Adoption for the Sustainable Beekeeping Sector." *Sustainability* 12.14 (2020): 5825.

Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J. L., ... & Delbac, F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PloS one*, 6(6), e21550.

Yamamoto, H., Zhang, S., & Mizushima, N. (2023). Autophagy genes in biology and disease. *Nature Reviews Genetics*, 24(6), 382-400.

Wang, W., Su, Y., Qi, R., Li, H., Jiang, H., Li, F., ... & Sun, H. (2024). Indoxacarb triggers autophagy and apoptosis through ROS accumulation mediated by oxidative phosphorylation in the midgut of *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 200, 105812.

Williams, C. S. (1995). Conserving Europe's bees: why all the buzz?. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(8), 309-310.

Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., ... & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-36.

Wolff, Luis Fernando, and João Carlos Costa Gomes. "Beekeeping and agroecological systems for endogenous sustainable development." *Agroecology and Sustainable Food Systems* 39.4 (2015): 416-435.

Woodcock, Ben A. et al. Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications*, v. 7, p. 12459, 2016.

Woyciechowski, M. & Moroń, D. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*)

Zheng, X., Wang, X., Yang, J., Peng, W., & Zhao, Y. (2024). Parasite-insecticide interactions: The impact of *Nosema ceranae* and fenpyroximate on honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 27(1), 102198.

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.

Anexo A:

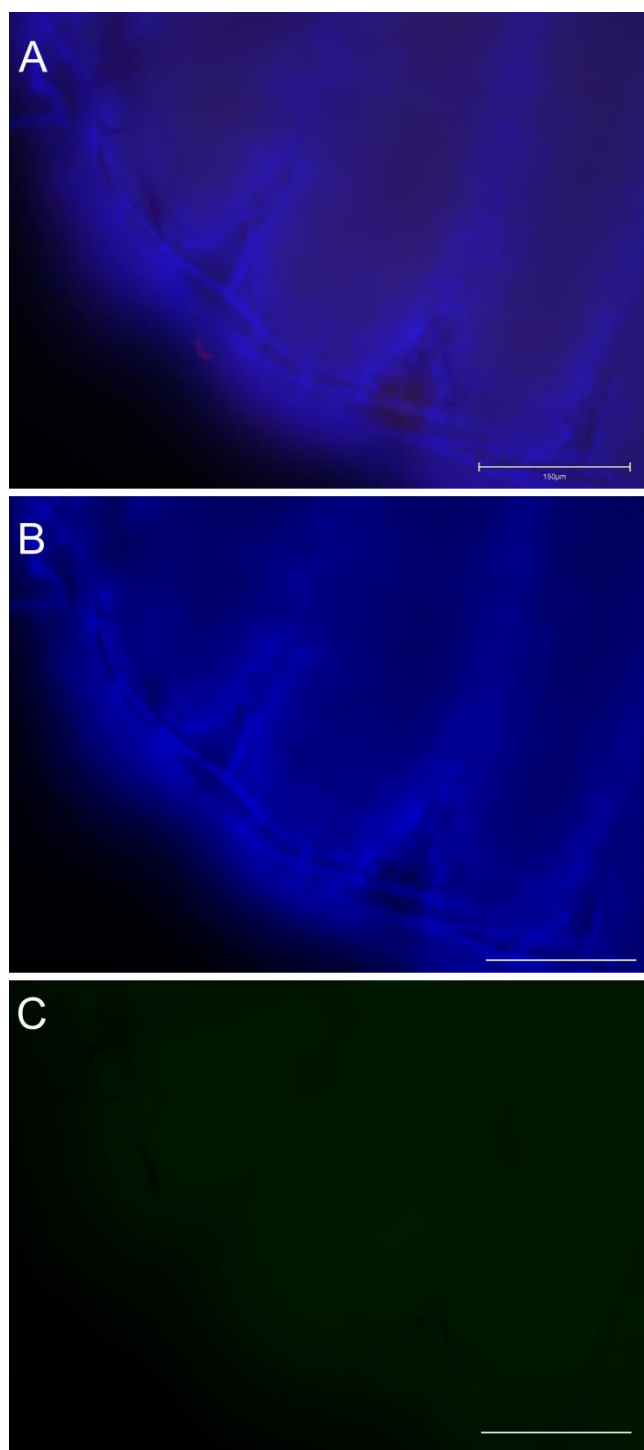


Figura A1: Imagem de controle negativo da técnica de imunomarcação indireta para caspase-3 clivada em montagem total da região anterior do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* mostrando ausência de imunomarcações positivas. A: montagem com DAPI e GFP. B: DAPI. C: GFP. Não houve diferença entre as porções do intestino médio e entre os tratamentos. Barra de escala: 150 µm.

Anexo B:

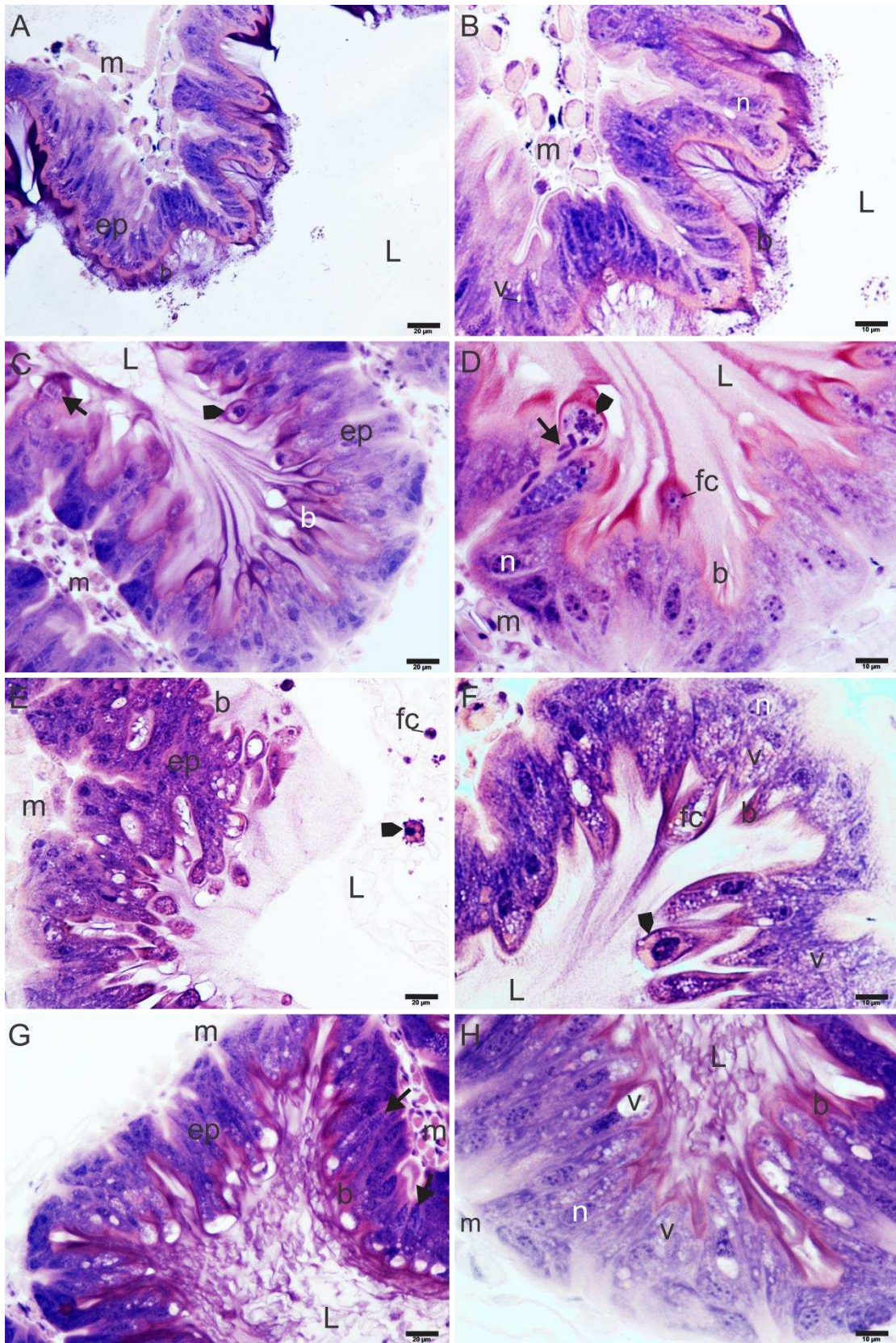


Figura B1: Histologia da porção anterior do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* africanizada mostrando os parâmetros histopatológicos epiteliais avaliados e a infecção por *Nosema ceranae* (seta). A-B: grupo experimental controle. C-D: grupo experimental infectado com *Nosema*. E-F: grupo experimental exposto a concentração CL_{50/10} do inseticida. G-H: grupo experimental infectado com patógeno e exposto a CL_{50/10} do inseticida. Cabeça de seta: eliminação celular. fc: fragmento celular. v: vacuolização. n: núcleo. ep: epitélio. b: borda estriada. m: músculo. L: lúmen. Barra imagens A,C,E,G: 20 µm. Barra imagens B,D,F,H: 10 µm.

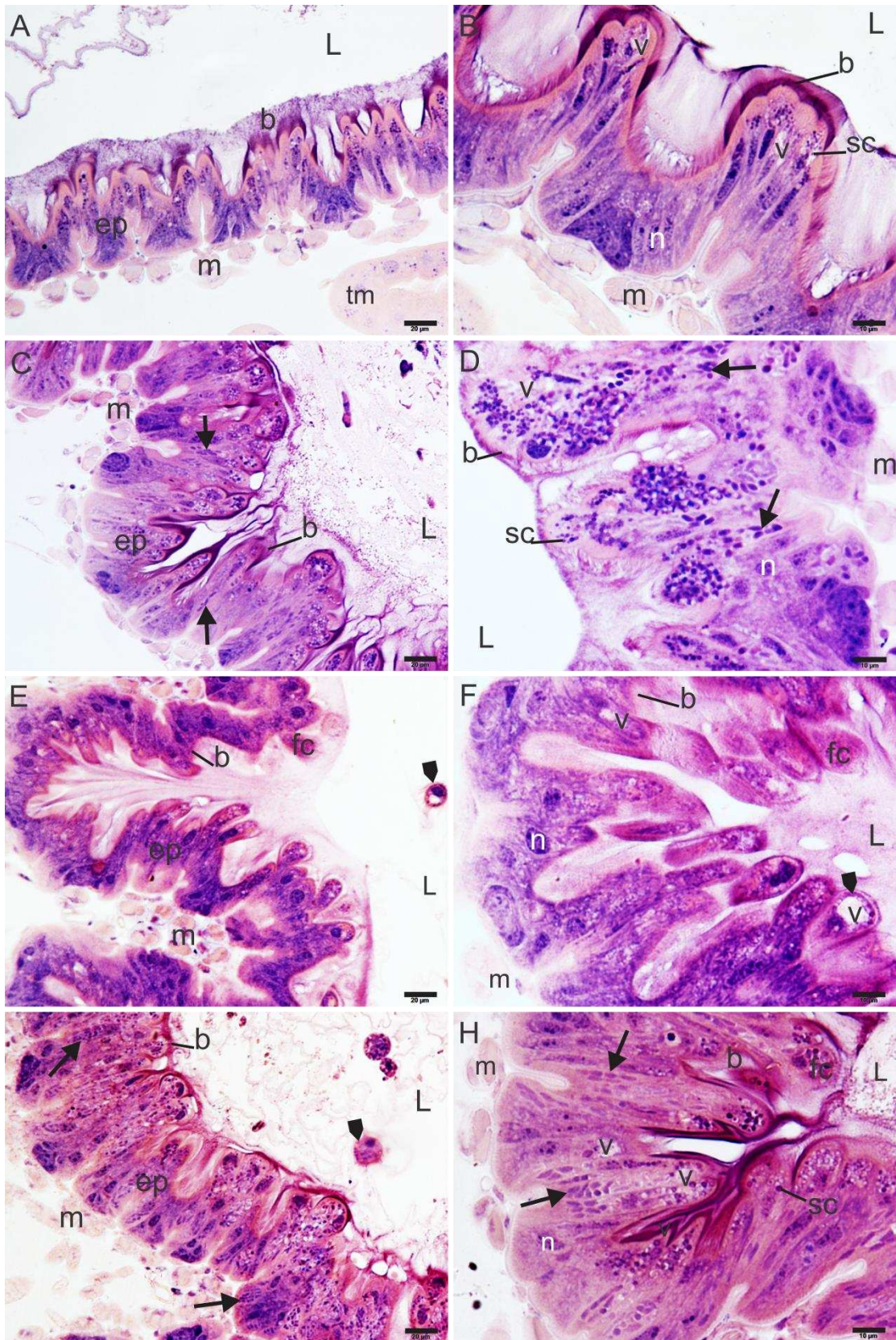


Figura B2: Histologia da porção medial do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* africanizada mostrando os parâmetros histopatológicos epiteliais avaliados e a infecção por *Nosema ceranae* (seta). A-B: grupo experimental controle. C-D: grupo experimental infectado com *Nosema*. E-F: grupo experimental exposto a concentração CL_{50/10} do inseticida. G-H: grupo experimental infectado com patógeno e exposto a CL_{50/10} do inseticida. Cabeça de seta: eliminação celular. fc: fragmento celular. v: vacuolização. n: núcleo. ep: epitélio. b: borda estriada. m: músculo. L: lúmen. Barra imagens A,C,E,G: 20 µm. Barra imagens B,D,F,H: 10 µm.

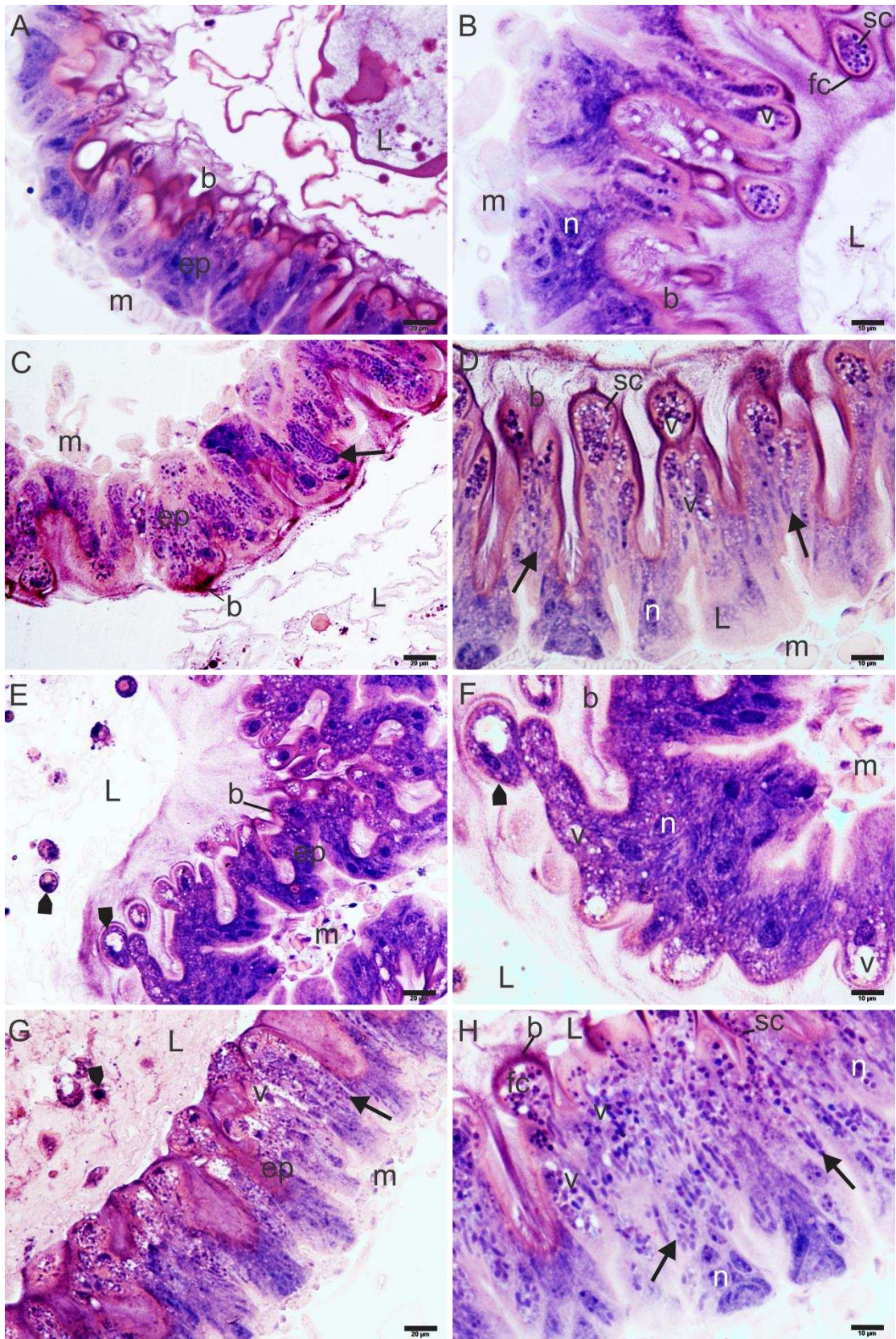


Figura B3: Histologia da porção posterior do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* africanizada mostrando os parâmetros histopatológicos epiteliais avaliados e

a infecção por *Nosema ceranae* (seta). A-B: grupo experimental controle. C-D: grupo experimental infectado com *Nosema*. E-F: grupo experimental exposto a concentração CL_{50/10} do inseticida. G-H: grupo experimental infectado com patógeno e exposto a CL_{50/10} do inseticida. Cabeça de seta: eliminação celular. fc: fragmento celular. v: vacuolização. n: núcleo. ep: epitélio. b: borda estriada. m: músculo. L: lúmen. Barra imagens A,C,E,G: 20 µm. Barra imagens B,D,F,H: 10 µm.