

**PEDRO HENRIQUE AMBROSIO NERE**

**EFEITO CITOTÓXICO DO INSETICIDA LAMBDA-CIALOTRINA NO INTESTINO  
MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE LARVAS DA ABELHA *Apis mellifera*  
LINNAEUS, 1758**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

N444e  
2023  
Nere, Pedro Henrique Ambrosio, 1990-  
Efeito citotóxico do inseticida lambda-cialotrina no  
intestino médio e corpo gorduroso de larvas da abelha *Apis  
mellifera* Linnaeus, 1758 / Pedro Henrique Ambrosio Nere. –  
Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 44-58.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.379>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Citologia. 2. Abelhas - Desenvolvimento.  
3. Abelhas - Toxicologia. I. Serrão, José Eduardo, 1965-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799


**PEDRO HENRIQUE AMBROSIO NERE**

**EFEITO CITOTÓXICO DO INSETICIDA LAMBDA-CIALOTRINA NO INTESTINO  
MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE LARVAS DA ABELHA *Apis mellifera*  
LINNAEUS, 1758**

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: 07 de junho de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 PEDRO HENRIQUE AMBROSIO NERE  
Data: 21/06/2023 15:48:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Pedro Henrique Ambrosio Nere  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 JOSE EDUARDO SERRAO  
Data: 21/06/2023 17:22:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Eduardo Serrão  
Orientador

## **DECLARAÇÃO COVID**

A pandemia de COVID-19 iniciada em março de 2020 afetou a realização dessa tese, impossibilitando análises feitas em equipamentos multiusuários pertencentes à Universidade Federal de Viçosa. Dentre os equipamentos com acesso restrito estão os microscópios de luz e microscópio eletrônico de transmissão. Devido a isso, houve atraso na conclusão dos experimentos em andamento e a impossibilidade de desenvolver novos experimentos. A utilização dos equipamentos foi retomada somente após a realização da campanha de vacinação contra COVID-19, que por sua vez foi postergada por um governo negacionista.

*Ao que esteve presente, meu grande amigo e  
inseparável companheiro felino, Steven.*

*Ao futuro, e suas infinitas possibilidades, do meu  
amado sobrinho, Bernardo.*

## AGRADECIMENTOS

Durante essa jornada fui agraciado com a amizade e apoio de pessoas incríveis. Aqui deixo registrado meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela excelência em ensino. É com grande orgulho que concluo meu doutoramento em uma universidade que, além de ser a mais bonita do país, é reconhecida por estar entre as melhores do mundo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e todos funcionários do departamento, em especial à Beth, por sua simpatia, competência e pronta disponibilidade.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo agraciamento da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 303243/2022-8) pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, 02367-18, 00856-19) pelo apoio financeiro.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e seus funcionários pela atenção e ajuda prestada sempre que solicitada.

Ao meu orientador, José Eduardo Serrão, pela forma humanizada de compartilhar seu conhecimento e de acolher seus alunos. Pelo exemplo de profissionalismo, didática e paciência. Agradeço pelo tempo que passei sob sua orientação e por reavivar em mim o prazer em fazer ciência.

À minha família fundada pela vida e sustentada por laços de amor e respeito. Ana, Kelen, Matheus, Reila e Valéria, a presença de vocês foi crucial durante todo processo de doutoramento. Agradeço pelo conforto e pertencimento que me é atribuído. Amo vocês.

Aos meus avós, Edmundo e Nalzira, por todo apoio fornecido durante minha trajetória acadêmica. De origem humilde, pouco entendiam o que lhes era explicado sobre o motivo de “nunca me formar”, mas confiaram e investiram em minhas decisões. Agradeço por todas as oportunidades que me foram concedidas.

Ao meu grande irmão, Thiago, pela amizade, companheirismo, pelas vindas apressadas à Viçosa e pelas idas às cegas às cachoeiras. Sua presença foi de extrema importância durante todo esse período. Te amo.

Aos amigos e vizinhos, Davi, Fernanda e Patrícia, por todo companheirismo durante esses anos e pela disponibilidade em cuidar do Steven quando precisei me ausentar.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, que tornaram essa experiência mais agradável. Em especial aos meus queridos amigos André, Camila, Jamile, Lenise e Luiza, por me acompanharem nos bons e maus momentos, pelos encontros, conversas e risadas, sempre regados à cerveja.

Ainda, um agradecimento mais que especial para Bárbara, por ter me presenteado com sua amizade e com ele que é hoje o meu maior companheiro, Steven. Muito obrigado pelas contribuições e trocas de conhecimentos científicos, por todas nossas brincadeiras bobas e sem sentido que apenas nós enxergamos graça, por compartilhar toda sua alegria e espontaneidade e por dividir comigo o mesmo neurônio. Agradeço pelos momentos que passei em sua companhia, pois foram os melhores. De toda convivência no laboratório 211, a sua é a que sentirei mais falta.

Por tudo isso e por todos eles, sou eternamente grato.

*“(...) O meu passado é a referência que me projeta e que eu devo ultrapassar.*

*Portanto, ao meu passado, eu devo o meu saber e a minha ignorância, as minhas necessidades, as minhas relações, a minha cultura e o meu corpo.*

*Hoje, que espaço o meu passado deixa para a minha liberdade? Não sou escrava dele.*

*O que eu sempre quis foi comunicar da maneira mais direta o sabor da minha vida. Unicamente o sabor da minha vida.*

*Acredito que eu consegui fazê-lo.*

*Vivi num mundo de homens, guardando em mim o melhor da minha feminilidade.*

*Não desejei e nem desejo nada mais do que viver sem tempos mortos. (...)”*

(Simone de Beauvoir)

## RESUMO

NERE, Pedro Henrique Ambrosio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Efeito citotóxico do inseticida lambda-cialotrina no intestino médio e corpo gorduroso de larvas da abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758.** Orientador: José Eduardo Serrão.

Pela polinização, as abelhas da espécie *Apis mellifera* desempenha um papel ecológico contribuindo com a manutenção e equilíbrio da biodiversidade, e econômico, com o aumento da produtividade de áreas cultivadas. O uso de pesticidas representa um risco a estes organismos pois se mantêm ativos no ambiente por longos períodos, contaminando recursos utilizados por estes animais. O lambda-cialotrina é um inseticida que atua no sistema nervoso causando paralisia e morte. O intestino médio e o corpo gorduroso formam a primeira barreira dos insetos contra a ação de xenobióticos, desempenhando papel na detoxificação do organismo. O efeito deste inseticida durante a fase larval, nas células dos órgãos em questão, poderá se refletir em prejuízos no desenvolvimento, comportamento e longevidade das abelhas na fase adulta. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do lambda-cialotrina, no intestino médio e corpo gorduroso das larvas de operárias de *A. mellifera*, expostas cronicamente à concentração encontrada nos grãos de pólen. O inseticida foi exposto às larvas através da alimentação seguindo o protocolo explicitado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) n° 239. A concentração esperada para atingir as larvas através da alimentação foi de 0,057 ng/mL. O epitélio do intestino médio das larvas alimentadas com lambda-cialotrina mostrou intensa vacuolização e protrusões citoplasmáticas, núcleo picnótico e vesículas de secreção apócrina na borda estriada. O teste para polissacarídeos mostrou fortes reações no citoplasma e mais fracas e irregulares na borda estriada do epitélio intestinal. O teste para proteínas evidenciou as áreas de vacuolização e danos na integridade celular no intestino médio. Nas células do corpo gorduroso o inseticida induziu o aumento no armazenamento de polissacarídeos e a redução do diâmetro das gotículas lipídicas. As características indicam a ocorrência de mudanças estruturais, apoptose e autofagia no intestino médio e alteração no padrão de armazenamento de nutrientes no corpo gorduroso de larvas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina, o que pode afetar diversos aspectos fisiológicos e alterar o desenvolvimento desses insetos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citologia. Desenvolvimento. Histologia. Microscopia. Piretroide. Toxicologia.

## ABSTRACT

NERE, Pedro Henrique Ambrosio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. **Cytotoxic effect of the insecticide lambda-cyhalothrin on the midgut and fat body of the honey bee *Apis mellifera* larvae.** Adviser: José Eduardo Serrão.

Through pollination, *Apis mellifera* bees play an ecological role, contributing to the maintenance and balance of biodiversity, and an economic one, with increased productivity in cultivated areas. The use of pesticides may pose a risk to these organisms as they remain active in the environment for long periods, contaminating resources used by these animals. Lambda-cyhalothrin is an insecticide that acts on the nervous system causing paralysis and death. The midgut and the fat body are the first barrier of insects against the action of xenobiotics, playing a role in the detoxification of the organism. The effect of this insecticide during the larval stage, on the cells of the organs in question, may be reflected in damage to the development, behavior and longevity of these bees in the adult stage. This study aimed to evaluate the cytotoxic effect of lambda-cyhalothrin on the midgut and fat body of *A. mellifera* worker larvae chronically exposed to the concentration found in pollen grains. The insecticide was exposed to the larvae through food, following the protocol explained by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) n° 239. The expected concentration to reach the larvae through food was 0.057 ng/mL. The midgut epithelium of larvae fed lambda-cyhalothrin showed intense vacuolization and cytoplasmic protrusions, pyknotic nucleus and presence of apocrine secretion vesicles on the striated border. The histochemical test for polysaccharides showed strong reactions in the cytoplasm and weaker and irregular ones in the striated border of the intestinal epithelium. Histochemical testing for proteins showed areas of vacuolation and damage to cell integrity in the midgut. In fat body cells, the insecticide induced an increase in the storage of polysaccharides and a reduction in the diameter of lipid droplets. The characteristics indicate the occurrence of structural changes, apoptosis and autophagy in the midgut and alteration in the storage of nutrients in the fat body of *A. mellifera* larvae exposed to lambda-cyhalothrin, which can affect several physiological aspects and alter the development of these insects.

**KEYWORDS:** Cytology. Development. Histology. Microscopy. Pyrethroid. Toxicology.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
1.1. Abelhas e o declínio dos polinizadores.....	11
1.2. Piretroide Lambda-cialotrina .....	14
1.3. Sistema digestório em abelhas - Intestino médio.....	17
1.4. Corpo gorduroso .....	20
2. OBJETIVO .....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Insetos .....	24
3.2. Exposição ao inseticida.....	24
3.3. Histotoxicidade .....	26
3.4. Histoquímica.....	27
3.5. Quantificação de proteínas e polissacarídeos no corpo gorduroso .....	27
3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	28
3.7. Estatística .....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1. Microscopia de Luz .....	29
4.2. Microscopia eletrônica de transmissão .....	35
5. DISCUSSÃO .....	37
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Abelhas e o declínio dos polinizadores

As abelhas são insetos pertencentes à Hymenoptera, ordem também composta pelas vespas e formigas, e que possuem riqueza e diversidade de espécies com ampla distribuição global (Orr et al., 2021). Tal diversidade também está presente nos diferentes tipos de comportamentos sociais, categorizados como: (i) abelhas solitárias, onde cada fêmea constrói seu ninho e cuida da sua prole de forma independente; (ii) grupo comunal e quase-social, onde várias fêmeas adultas formam grupos e cada indivíduo se reproduz independentemente (grupo comunal difere de quase-social pelo fato de no último existir cuidado aloparental), e (iii) eussocialidade, convencionalmente definida por uma sobreposição de gerações, divisão de trabalho, divisão reprodutiva e cuidado cooperativo da prole (Wcislo e Fewell 2017).

Dentre as abelhas, as colônias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) são um clássico exemplo do comportamento eussocial. A divisão de trabalho expressa por estes organismos é um dos fenômenos comportamentais mais estudados no reino animal (Johnson, 2010). Duas castas estão presentes em *A. mellifera*: a rainha, única fêmea responsável pela reprodução, e as operárias, responsáveis por todas as demais tarefas não reprodutivas, como, a construção da colmeia, cuidado da prole e a coleta de recursos (Winston e Fergusson; 1984; Page e Peng, 2001).

As operárias, por sua vez, apresentam polietismo (divisão de trabalho não relacionados à reprodução), classificado como polietismo etário, uma vez que se refere às atividades realizadas correlacionadas com a idade da operária (Guzmán-Novoa et al, 1994; Calderone, 1998). No entanto, o polietismo etário também se baseia em diferenças internas e fisiológicas entre as operárias, e pode ser considerado como polietismo físico temporário (Robinson, 2009). Podem ser identificadas quatro classes dentre as operárias de *A. mellifera* (faxineiras,

nutridoras, abelhas de meia idade e campeiras) e um estado generalista que ocorre no inverno das regiões temperadas (Johnson, 2010).

As operárias faxineiras são abelhas recém-emergidas e passam os primeiros dias como adultas exercendo a função de limpar as células dos favos da colmeia (Johnson, 2010). As nutridoras são operárias de, aproximadamente, quatro dias de idade e permanecem nessa classe por entorno de uma semana. Neste período elas são responsáveis por produzir a geleia real, uma secreção proteica das glândulas hipofaríngeas, utilizada como alimento para as larvas e outros indivíduos da colônia. Nutridoras também cuidam da rainha e a auxiliam na propagação dos feromônios pela colmeia (Johnson, 2010). Após o período como nutridoras, as abelhas de meia idade (12 e 21 dias) permanecem nessa classe por, aproximadamente, uma semana. Abelhas nesta classe são as que possuem o maior repertório de tarefas na colônia que, por vezes, se sobrepõem às tarefas de outras classes. Suas atividades compreendem cerca de 15 tarefas, entre elas a construção e manutenção da colmeia, recebimento e processamento do néctar e guardar a entrada da colmeia (Johnson, 2010). Após este período, as abelhas operárias passam a fazer o trabalho de campeiras, e a partir de então não mais se envolvem com tarefas no interior da colmeia, seu único trabalho é coletar os quatro recursos indispensáveis para a sobrevivência da colônia: água, própolis, néctar e grãos de pólen (Johnson, 2010).

Assim como os demais insetos da ordem, *A. mellifera* apresenta desenvolvimento holometábolo, compreendendo os estágios de ovo, cinco instares larvais, pupa e adulto. O tempo de duração de cada ínstar larval é distinto, e estes podem ser diferenciados pela correlação do diâmetro da cápsula cefálica e peso corporal da larva (Rembold et al., 1980; Michelette e Soares, 1993), conforme dados apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** – Características dos ínstares larvais de operárias de *Apis mellifera* africanizada (Michelette e Soares, 1993).

Instar larval (operárias)	Duração (horas)	Diâmetro da cápsula cefálica (mm±DP)	Peso corporal (mg) min-max
L1	17±3	0,32±0,026	0,11-0,30
L2	19±3	0,44±0,032	0,31-1,05
L3	18±3	0,65±0,045	1,50-4,45
L4	24±3	0,92±0,094	4,80-24,8
L5	37±3	1,49±0,048	24,30-126,7

A importância dos estudos com abelhas vai além dos aspectos biológicos, pois, estes insetos desempenham um papel fundamental na economia brasileira e mundial, seja pela extração de seus produtos exclusivos; mel, geleia real, cera e própolis, ou pelo trabalho que exercem enquanto coletam materiais para a produção destes, a polinização (Castilhos et al., 2016; Cornara et al., 2017; Khalifa et al., 2021).

Os polinizadores são os responsáveis pelo equilíbrio ecológico na manutenção da biodiversidade, na reprodução de plantas incluindo as de larga produção na agricultura (Khalifa et al., 2021). *A. mellifera* destaca-se por sozinha ser responsável por, aproximadamente, os mesmos benefícios econômicos das demais espécies de abelhas combinadas (Kleijn et al., 2015). Devido ao seu nível de domesticação, grande número de indivíduos, pronta acessibilidade e facilidade no transporte, estes organismos destacam-se como ideais para a utilização comercial na polinização de grandes áreas produtivas (Klein et al., 2007; Khalifa et al., 2021).

Nas últimas décadas tem sido relatado um declínio geral no número de polinizadores (Potts et al., 2010; Rhodes, 2018; Zattara e Aizen, 2021) assim como o distúrbio do colapso da colônia, conhecido mundialmente pelo termo inglês *Colony collapse disorder* (CCD), que afeta as colônias de *A. mellifera* (Roy et al., 2018; Evans e Chen, 2021), fenômenos estes que estão sendo atribuídos em parte à: (i) patógenos e parasitos (Smith et al., 2013; Gregorc et al.,

2016), (ii) mudanças climáticas (Le Conte e Navajas, 2008), (iii) restrições na dieta (Grab et al., 2019), (iv) uso indevido de agentes pesticidas (Sanchez-Bayo e Goka et al., 2014; Kiljanek et al., 2016; Abati et al., 2021) e, sobretudo, às (v) interações entre todos fatores (Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; Cornelissen et al., 2019; Neov et al., 2021; Dicks et al., 2021; Siviter et al., 2021).

## **1.2. Piretroide Lambda-cialotrina**

O crescimento populacional e a alta demanda por alimentos são fatores que fizeram necessária a obtenção de novas técnicas para melhorias na produção de alimentos (Oerke, 2006; Popp et al., 2013). O uso de pesticidas está atrelado à essas mudanças, uma vez que, com o aumento da área produtiva houve também um aumento na perda dos produtos pré-colheita, causado por diversas pragas agrícolas (Popp et al., 2013). Atualmente, pesticidas se tornaram indispensáveis para a agricultura em grande escala e são extensivamente usados no controle do ataque de insetos, fungos, ervas-daninhas entre outras pragas de plantações, assim aumentando a produtividade com a redução das perdas pré-colheita, mas seu uso indiscriminado causa a contaminação do solo, água e ar, além da intoxicação de animais não-alvo (Ceuppens et al., 2015; Johnson, 2015; Verma e Bhardwaj, 2015; Abraham et al., 2018).

Devido a essa dependência dos pesticidas, o desenvolvimento de novos compostos que possam ser usados na agricultura é constante. O lambda-cialotrina é um piretroide orgânico sintético que imita a estrutura e as propriedades inseticidas provenientes da piretrina. Este é preferido como ingrediente ativo em inseticidas pois permanece efetivo por longos períodos, com meia-vida variando entorno de três semanas, por possuir alta afinidade por lipídeos, baixa volatilidade e baixa toxicidade aguda em mamíferos. O lambda-cialotrina pode ser utilizado no controle de diversos insetos praga, como, besouros, cigarrinhas, lagartas,

percevejos e moscas, e em diversas culturas, como algodão, batata, café, feijão, milho, soja, tomate e trigo (Santos et al., 2007; He et al., 2008).

O lambda-cialotrina atua no sistema nervoso dos insetos causando paralisia ou morte. É classificado como um piretroide tipo II, por possuir um grupamento ciano (CN), que, além de modular a ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem presentes na fibra nervosa, também afeta os canais de cálcio, importantes na condução do estímulo nervoso (Davies et al., 2008). O inseticida se liga aos canais de cálcio alterando o seu ciclo de abertura e fechamento, o que resulta em uma estimulação contínua do nervo, causando tremores, perda do controle de produzir movimentos coordenados e morte (Bradberry et al., 2005; Soderlund, 2012).

O foco na letalidade e no controle de espécies pragas, juntamente com a falsa percepção de segurança ambiental do lambda-cialotrina, resulta em escassos estudos com outros animais não-alvo, o que inclui vertebrados e invertebrados que podem ser benéficos às plantações, como inimigos naturais de pragas e polinizadores (Desneux et al., 2007). Tais estudos mostram que os efeitos adversos do lambda-cialotrina incluem múltiplos prejuízos em diferentes aspectos da saúde desses animais, incluindo alterações hematológicas, hepáticas, pulmonares, renais e aspectos reprodutivos em coelhos e ratos (Basir et al., 2010; Fetoui et al., 2010; Yousef, 2010), alterações hematológicas, danos nos tecidos branquiais, cardíacos, hepáticos, renais e aumento na taxa de mortalidade em peixes (Çavas e Ergene-Gözükara 2003; Wang et al., 2007; Li et al., 2014; Amin et al., 2020), alterações hematológicas, alterações comportamentais e aumento da taxa de mortalidade em anfíbios (Campana et al., 2003; Nkontcheu et al., 2017), vacuolização do citoplasma e necrose no fígado no lagarto *Eremias argus* (Chang et al., 2016), morte embrionária, retardo do crescimento e anormalidades no desenvolvimento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* da linhagem

“golden black” (Sadaf et al., 2022), aumento na taxa de mortalidade em joaninhas (Jalali et al., 2002; Rodrigues et al., 2013).

Estudos toxicológicos em abelhas, especialmente em *A. mellifera*, são menos escassos, visto sua importância para as plantações, no entanto, tais trabalho têm como foco abelhas adultas e os efeitos dos pesticidas durante o período de desenvolvimento é negligenciado. Da mesma maneira que os estudos previamente apresentados, pesquisas com abelhas mostram uma ampla variedade de efeitos negativos à exposição do lambda-cialotrina, incluindo a redução no consumo de alimento, redução na taxa reprodutiva e aumento na taxa de mortalidade em adultos de *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae) (Ceuppens et al., 2015), danos histológicos no intestino médio, glândulas hipofaríngeas, sistema nervoso, alterações no padrão de locomoção, interação social, interação com o alimento, memória, longevidade e aumento na taxa de mortalidade em adultos de *A. mellifera* (Abdel Razik, 2019; Bailey et al., 2005; Ingram et al., 2015; Melis et al., 2015; Liao et al., 2018; Castro et al., 2020; Shurjeel et al., 2020).

Mortalidade é um importante fator toxicológico, no entanto, os demais efeitos subletais, como os previamente apresentados, principalmente em insetos não-alvo, permanecem negligenciados, mesmo com estes insetos estando presentes em sistemas afetados por esses químicos (Desneux et al., 2007). Além dos efeitos da aplicação direta de pesticidas em organismos não-alvo, diversos pesticidas são encontrados no campo em concentrações residuais, associados a substratos que são coletados por abelhas operárias e utilizados na alimentação de toda a colônia, como no néctar e grãos de pólen, possivelmente afetando aspectos biológicos (Mullin, et al., 2010). Portanto, avaliar os efeitos dos pesticidas nas concentrações residuais encontradas nos campos de aplicação, em indivíduos adultos e imaturos, pode ser uma importante ferramenta para entender como os pesticidas afetam aspectos biológicos desses organismos e como isso pode ser refletido na dinâmica da colônia.

Embora os alvos dos piretroides sejam as proteínas canais presentes no sistema nervoso, o intestino médio é um dos primeiros órgãos que entra em contato com as moléculas do inseticida quando essas são ingeridas, assim, desempenhando o primeiro papel na detoxificação do organismo (Denecke et al., 2018). Além disso, o inseticida pode transpor a barreira formada pelo epitélio intestinal e circular pela hemolinfa, atingindo outros órgãos, como o corpo gorduroso (Denecke et al., 2018). Devido a isso, apesar de não serem os órgãos alvos, surge a necessidade de estudos sobre os efeitos da interação entre os pesticidas e as células do intestino médio e do corpo gorduroso dos insetos.

### **1.3. Sistema digestório em abelhas - Intestino médio**

O sistema digestório em abelhas pode ser dividido em três partes, classificadas pela origem embrionária, morfológica e fisiológica: o intestino anterior (ou estomodeu), intestino médio (mesêntero ou ventrículo) e o intestino posterior (proctodeu) (FIG. 1) (Gullan e Cranston, 2010). O intestino anterior, de origem ectodermal, é formado pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo. As células epiteliais do intestino anterior são achatadas e não estão diretamente envolvidas no processo de digestão, sua principal função é a produção e secreção da cutícula que envolve toda superfície do intestino anterior, por sua vez responsável pelo processamento inicial e direcionamento do alimento para o intestino médio (Chapman, 2013; Nation, 2022).

A maior parte do sistema digestório em abelhas é formada pelo intestino médio. De origem endodermal, ele apresenta um epitélio simples, constituído por três tipos celulares: as células digestivas, as células endócrinas e as células regenerativas (Chapman, 2013; Nation, 2022), todas estas apoiadas em uma fina lâmina basal sobre uma dupla camada de células musculares circulares e longitudinais (Caccia et al., 2019).

As células digestivas são as mais numerosas, estão ativamente envolvidas na produção e secreção de enzimas digestivas, na absorção de nutrientes e produção da matriz peritrófica (Serrão e Cruz-Landim, 1996a; 2000; Cruz-Landim, 2008; Hegedus et al., 2009). Possuem formato cúbico ou colunar, com modificações na membrana plasmática apical, chamadas microvilosidades, que são projeções em forma de dedos com o intuito de aumentar a área da membrana plasmática, melhorando suas funções metabólicas, como secreção e absorção (Chapman, 2013; Nation, 2022).

Células endócrinas são responsáveis por regular as funções do intestino médio através da secreção de hormônios (Chapman, 2013). Estas células estão localizadas na região basal entre as células digestivas e não chegam a atingir o lúmen. Suas principais características são a presença de um lúmen claro e grânulos de secreção acumulados majoritariamente na região basal. Em insetos, estas células não são facilmente identificadas sob microscopia de luz utilizando técnicas clássicas, por isso, sua presença pode estar camuflada às demais células digestivas (Serrão e Cruz-Landim, 1996b; Neves et al., 2003).

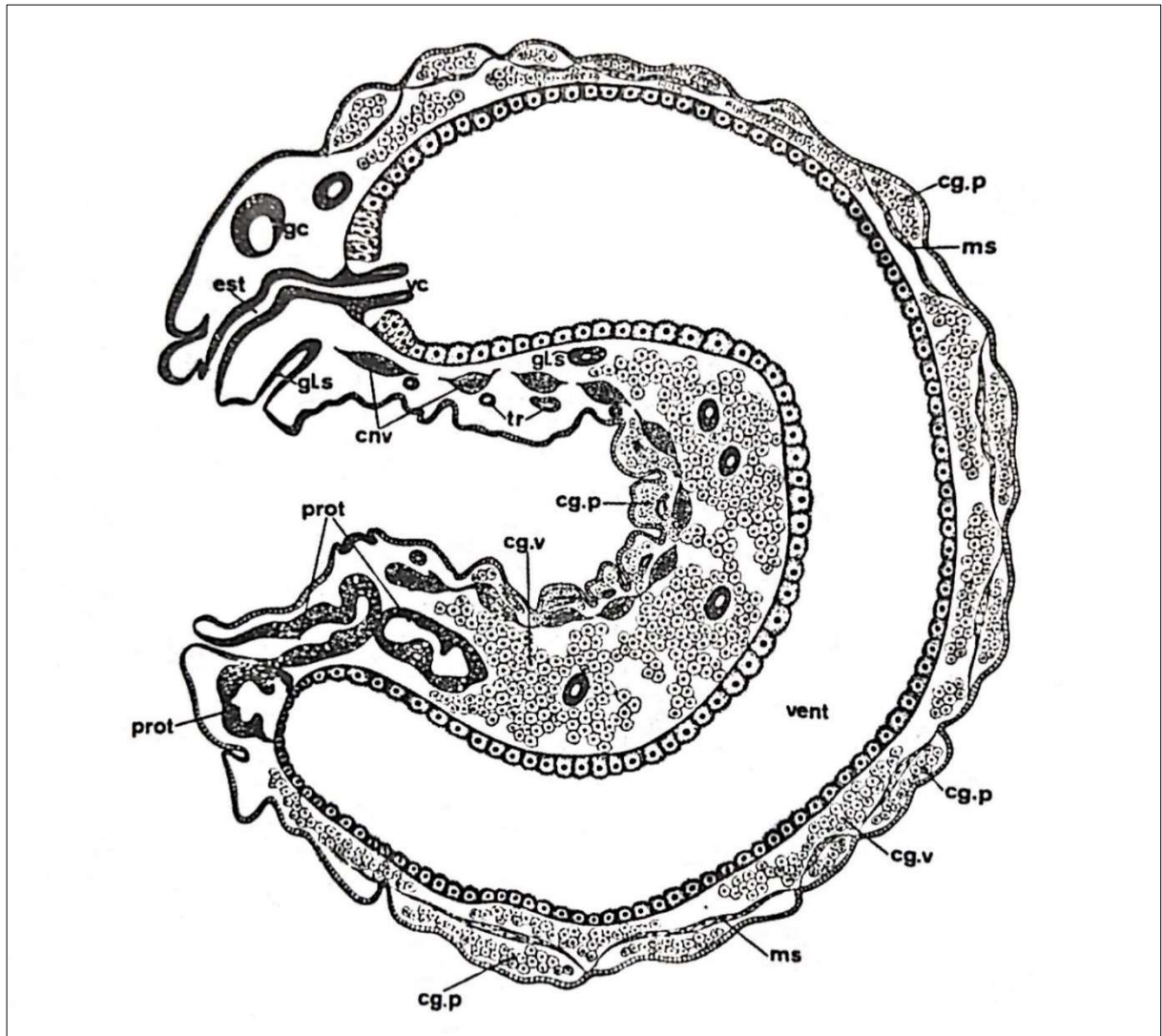
Células regenerativas são encontradas ao longo de todo intestino médio, agrupadas em ninhos, próximas à base das células digestivas e endócrinas. À medida que células maduras vão sendo perdidas (idade, desgaste, apoptose, perdas por secreção apócrina e holócrina) células regenerativas se diferenciam para ocupar o lugar deixado por essas células (Martins et al., 2006; Fernandes et al., 2010).

As células do intestino médio não são revestidas por uma cutícula, há, no entanto, uma estrutura acelular composta por um gel proteoglicano e microfibrilas de quitina, denominada matriz peritrófica (membrana peritrófica ou envelope peritrófico), que é produzida pelas células digestivas e cujas funções envolvem: servir como uma proteção física às microvilosidades do contato direto com partículas de alimentos, formar uma barreira contra a

entrada de vírus, bactérias e outros microrganismos, além de auxiliar na digestão pela associação com enzimas digestivas (Chapman, 2013; Nation, 2022).

Assim como o intestino anterior, o intestino posterior é de origem ectodermal, e por isso também possui uma camada cuticular sobreposta às células epiteliais, de formato cúbico ou achatadas, no entanto, essa cutícula é mais fina e permeável do que a encontrada no intestino anterior. É normalmente subdividido em 3 regiões: piloro, íleo e reto. Localizado no piloro estão inseridos os túbulos de Malpighi, principal órgão de excreção dos insetos. As funções do intestino posterior estão relacionadas ao processo final da digestão, como reabsorção de água, íons e demais substâncias, e na excreção dos pellets fecais (Chapman, 2013; Nation, 2022).

Como é comum de se observar em insetos holometábolos, o sistema digestório nas abelhas é extensivamente remodelado durante a metamorfose (Cruz-Landim, 2008; Gonçalves et al., 2017). Quando no estágio de pupa, as células do intestino se desprendem em direção ao lúmen, enquanto as células regenerativas darão origem ao novo epitélio pelo processo de mitose (Neves et al., 2002; Martins et al., 2006). Embora a dieta das larvas e adultos sejam semelhantes, essa reorganização se faz necessária para que o intestino se adeque ao corpo do adulto e suas peculiaridades, como a presença das musculaturas de voo e o desenvolvimento do estômago social (papo), responsável por armazenar substâncias nutritivas que servem de alimento para as larvas e utilizadas nas trocas pelo processo de trofalaxia (Cruz-Landim, 2008).



**Figura 1** – Esquema de corte longitudinal de uma larva de *Apis mellifera* no segundo ínstar larval, mostrando a segmentação do intestino, a distribuição do corpo gorduroso e demais regiões anatômicas. Estomodeu (est), ventrículo (vent), proctodeu (prot), corpo gorduroso parietal (cg.p), corpo gorduroso visceral (cg.v), gânglio cerebral (gc), glândula salivar larval (gls), cadeia nervosa ventral (cnv), traquéias (tr), válvula cardíaca (vc) e musculatura segmentar (ms) (Cruz-Landim, 2008).

#### 1.4. Corpo gorduroso

O corpo gorduroso nas larvas de abelhas é constituído por dois tipos celulares: os trofócitos, tipo celular mais abundante e de origem mesodérmica, e os enócitos, encontrados mais espaçadamente e de origem ectodérmica. Pode ser organizado em dois compartimentos: o corpo gorduroso parietal, logo abaixo do tegumento, e o perivisceral, ao redor dos órgãos internos (FIG. 1) (Oliveira e Cruz-Landim, 2003; Cruz-Landim, 2008).

Os trofócitos não se encontram aderidos uns aos outros, por isso permanecem em um formato esférico com núcleo central, rodeados por uma lâmina basal própria, o que facilita as trocas com a hemolinfa (Cruz-Landim, 2008). Durante a fase larval, o corpo gorduroso tem a função primordial de armazenar reservas energéticas para a metamorfose, o que inclui lipídios, carboidratos e proteínas, porém, parte dessas reservas é direcionada para atender o metabolismo das células epiteliais durante as mudas e demais órgãos envolvidos no processo. Além disso, o corpo gorduroso desempenha papel na imunidade inata, na detoxificação de xenobióticos, metabolismo intermediário, regulação hormonal e síntese de componentes da hemolinfa (Feyereisen, 1999; Li et al., 2007; Cruz-Landim, 2008; Li et al., 2019). Modificações dos trofócitos, que exercem funções especializadas, também são ocasionalmente encontrados e recebem denominações específicas. Em larvas e abelhas recém-emergidas urócitos e trofócitos com depósitos de ferro podem ser observados com certa frequência, essas células são especializadas no armazenamento de ácido úrico e ferro, respectivamente, uma vez que as larvas não eliminam os resíduos metabólicos durante a fase larval (Cruz-Landim, 2008; Furtado et al., 2013).

Os enócitos ficam dispersos em meio aos trofócitos no corpo gorduroso, são células grandes de formato esférico com contornos bem definidos e irregulares, com citoplasma acidófilo livre de granulações. Durante a metamorfose os enócitos são degradados e uma nova linhagem é formada a partir das células não diferenciadas (Cruz-Landim, 2008; Nation, 2022). A principal função atribuída aos enócitos é a produção de hidrocarbonetos e de ceras presentes na cutícula, embora também possam estar ligados à homeostase do organismo, como na detoxificação de xenobióticos e na imunidade inata (Martins e Ramalho-Ortigão, 2012).

Nos adultos, já que a maior parte dos trofócitos e todos enócitos foram histolizados durante a metamorfose para obtenção de energia, o corpo gorduroso é menos abundante e

majoritariamente localizado na região parietal. Apesar disso, suas funções destacadas como principais permanecem semelhantes: os trofócitos são responsáveis por fornecer energia para as funções metabólicas do inseto e sintetizar proteínas da hemolinfa a partir de substâncias armazenadas, ao passo que, os enócitos sintetizam os hidrocarbonetos e as ceras da cutícula dos insetos (Cruz-Landim, 2008; Nation, 2022).

Além de todas as funções inerentes ao desenvolvimento do inseto, estudos demonstram que o corpo gorduroso, o que inclui trofócitos e enócitos, desempenham um papel essencial na detoxificação do organismo e na resistência aos pesticidas (Scott et al., 1998; Feyereisen, 1999; Martins et al., 2011; Martins e Ramalho-Ortigão, 2012; Li et al., 2019). Assim, entender como esses químicos afetam essas células e seu metabolismo em períodos em que estas são cruciais, como na fase larval, pode auxiliar na elucidação de questões sobre como essa interação é refletida no desenvolvimento desses insetos, seu comportamento e longevidade na fase adulta.

## 2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico da ingestão crônica do inseticida lambda-cialotrina, com a concentração residual encontrada nos grãos de pólen, nos órgãos não-alvo, intestino médio e corpo gorduroso, das larvas da abelha *Apis mellifera*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Insetos

Quadros de cria de *A. mellifera* africanizadas foram coletadas de cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' W) e levadas para o laboratório onde foram mantidas a temperatura e umidade ambiente para extração imediata.

#### 3.2. Exposição ao inseticida

Para avaliar o efeito do inseticida nas larvas foram realizados bioensaios e utilizadas 384 larvas de *A. mellifera*, sendo 192 para o grupo controle e 192 para o tratamento, utilizando uma fórmula comercial de lambda-cialotrina (Karate Zeon® 50CS, 50g/L ingrediente ativo, Syngenta, São Paulo, Brasil). O bioensaio seguiu as orientações descritas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD 239, 2016). Larvas de primeiro ínstar foram coletadas e transferidas para células artificiais (9 mm de diâmetro e profundidade de 8 mm) com 20 µL de dieta. As células foram acomodadas em placa de cultivo de 48 poços contendo um pedaço de algodão com solução esterilizante (15% p/v glicerol e cloreto de metilbenzetonio a 0,2% p/v), transferidas para câmara hermética e mantidas em BOD a  $34 \pm 1$  °C e  $95 \pm 5\%$  de umidade. A dieta larval continha 50% p/p de uma solução de açúcar (D-frutose, D-glicose e extrato de levedura) e 50% p/p de geleia real. Do terceiro ao sexto dia do bioensaio, uma vez ao dia, as larvas controle foram alimentados com dieta artificial pura e as do tratamento com dieta contendo lambda-cialotrina em diferentes proporções (Tabela 2).

**Tabela 2** – Detalhe da dieta oferecida diariamente para larvas de *Apis mellifera* africanizada (OECD 239, 2016) com a proporção diária de inseticida.

Dia	Volume/larva ( $\mu\text{L}$ )	D-Glicose (% w/w)	D-frutose (% w/w)	Extrato de levedura (% w/w)	Geleia real (% w/w)	Lambda- cialotrina $5 \times 10^{-10}$ (g/mL)
1	20	12	12	2	50	-
2	-	-	-	-	-	-
3	20	15	15	3	50	0,48
4	30	18	18	4	50	0,86
5	40	18	18	4	50	1,47
6	50	18	18	4	50	2,24

A concentração de lambda-cialotrina utilizada foi aquela com base no resíduo encontrado em grãos de pólen (1,7 ng/g) (Mullin et al., 2010), calculada com a quantidade total de pólen consumida durante a fase larval (5,4 mg) como sugerido por Rortais et al., (2015). As proporções e os volumes da dieta foram como descritos pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD 239, 2016) A concentração total de lambda-cialotrina esperada para atingir as larvas através da alimentação foi de 0,057 ng/mL (ingestão máxima de 0,0080 ng/larva), estimada conforme equação descrita por Tadei et al., (2020):

$$Cd = \frac{Cp \cdot Pc}{Vd}$$

$Cd$  = concentração estimada de inseticida na dieta (ng/mL)

$Cp$  = concentração encontrada no pólen (ng/g)

$Pc$  = quantidade total de polén consumida durante a fase larval (g)

$Vd$  = volume total da dieta consumida durante a fase larval (mL)

### **3.3. Histotoxicidade**

No sétimo dia, após o período de alimentação, cinco larvas do controle e cinco do tratamento, no estágio L5, foram recolhidas. As extremidades do corpo foram cortadas e as larvas transferidas para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 20 min em cada concentração. As amostras foram embebidas em historesina (Leica), cortadas em micrótomo automático (Leica RM2255) com navalhas de vidro, obtendo seções com 3  $\mu\text{m}$  de espessura. Lâminas histológicas contendo os cortes das amostras foram coradas com hematoxilina (15 min) e eosina (30 s) (HE), seguido da análise de quaisquer alterações e danos estruturais das células, e fotografia em microscópio Olympus BX60.

#### **3.3.1. Quantificação de lipídios e diâmetro da gotícula lipídica no corpo gorduroso**

Para quantificar as alterações na quantidade de lipídios foi utilizado o software GIMP 2.10 (<https://www.gimp.org/>). O programa permite, após selecionar cores referentes à lipídios, convertê-las em tons de cinza para transformá-las em densidade de pixels (Solomon, 2009). As imagens digitalizadas foram obtidas usando objetiva de 40x, abertura numérica 0.75 e mesmos parâmetros de iluminação. Três campos aleatórios do corpo gorduroso para cada larva ( $n = 5$ ) foram analisados, totalizando 15 imagens do tratamento e 15 do controle (Soares et al., 2016). Para análise do tamanho das gotículas de lipídeos, 20 gotículas do tratamento e 20 do controle foram selecionadas e o diâmetro ou eixo maior foi medido (Fujii et al., 2022) utilizando o software Image J (<https://imagej.nih.gov/>).

### **3.4. Histoquímica**

Algumas secções obtidas como descrito acima foram submetidas aos testes histoquímicos para detecção de proteínas totais e polissacarídeos neutros e glicoconjugados. Todas as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX 60.

#### **3.4.1. Azul Mercúrio de Bromofenol – Proteínas**

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

#### **3.4.2. Ácido periódico-Schiff (PAS) – Polissacarídeos**

As amostras foram transferidas para ácido periódico 0,4% por 30 min., lavadas rapidamente em água destilada e submetidas ao reagente de Schiff (1,5 g de fucsina básica; 4,5 g de metabissulfito de potássio; 1 g de carvão ativado; 45 ml de HCl 1%; 300 ml de H<sub>2</sub>O) por 1 h no escuro. Por fim, lavadas em água corrente por 30 min.

### **3.5. Quantificação de proteínas e polissacarídeos no corpo gorduroso**

Para quantificar as alterações na quantidade de proteínas e polissacarídeos foi utilizado o software GIMP 2.10 (<https://www.gimp.org/>). O programa permite, após selecionar cores referentes a proteínas e polissacarídeos, convertê-las em tons de cinza para transformá-las em densidade de pixels (Solomon, 2009). As imagens digitalizadas foram obtidas usando objetiva de 40x, abertura numérica 0.75 e mesmos parâmetros de iluminação. Três campos aleatórios do corpo gorduroso para cada larva (n = 5) foram analisados, totalizando 15 imagens do tratamento e 15 do controle (Soares et al., 2016).

### 3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Cinco larvas do grupo controle e cinco larvas alimentadas com dieta contendo 0,057 ng/mL de lambda-cialotrina foram dissecadas. O intestino médio e corpo gorduroso foram transferidos para solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 e 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.). Seções ultrafinas (70-90 nm de espessura) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrotomo Sorvall MT2-BMT2-B (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### 3.7. Estatística

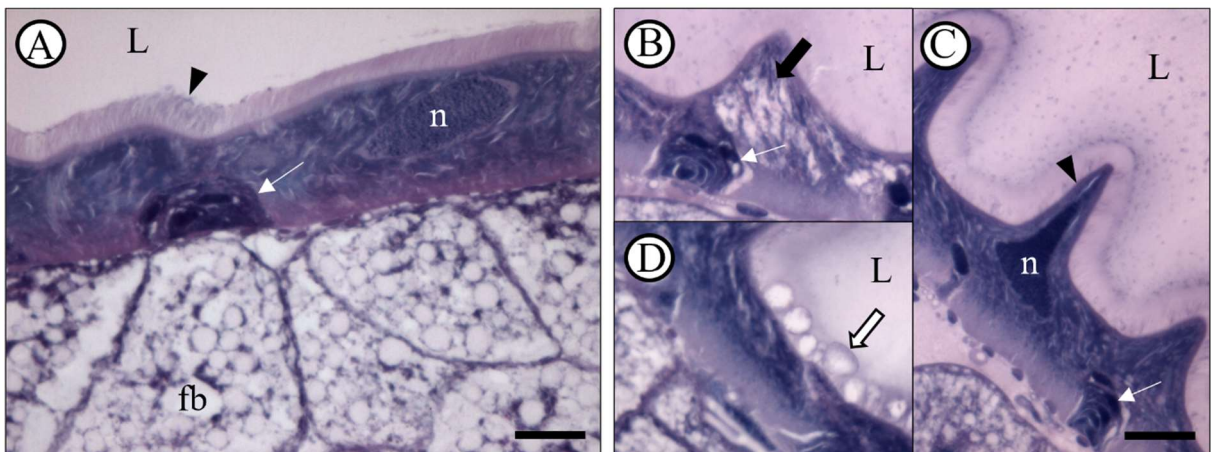
Os dados obtidos pela quantificação dos pixels marcados para lipídios, proteínas e carboidratos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente, seguido pela Análise de Variância (ANOVA), e teste de Tukey a 5% de significância. Os dados de diâmetro da gotícula lipídica foram analisados usando GLM com distribuição Gaussiana e as diferenças constatadas pelo teste de teste de Kruskal-Wallis e Conover-Iman, a 5% de significância, e ajustado pelo método de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando o *software* R (<https://cran.r-project.org/>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Microscopia de Luz

O epitélio do intestino médio das larvas de *A. mellifera* do grupo controle foi formado por uma única camada de células digestivas cúbicas, com núcleo esférico e regiões de eucromatina evidentes (FIG. 2A). A região apical do epitélio apresentou borda estriada bem desenvolvida, enquanto a região basal estava apoiada sobre uma fina membrana basal, onde também foram encontrados ninhos de células regenerativas (FIG. 2A).

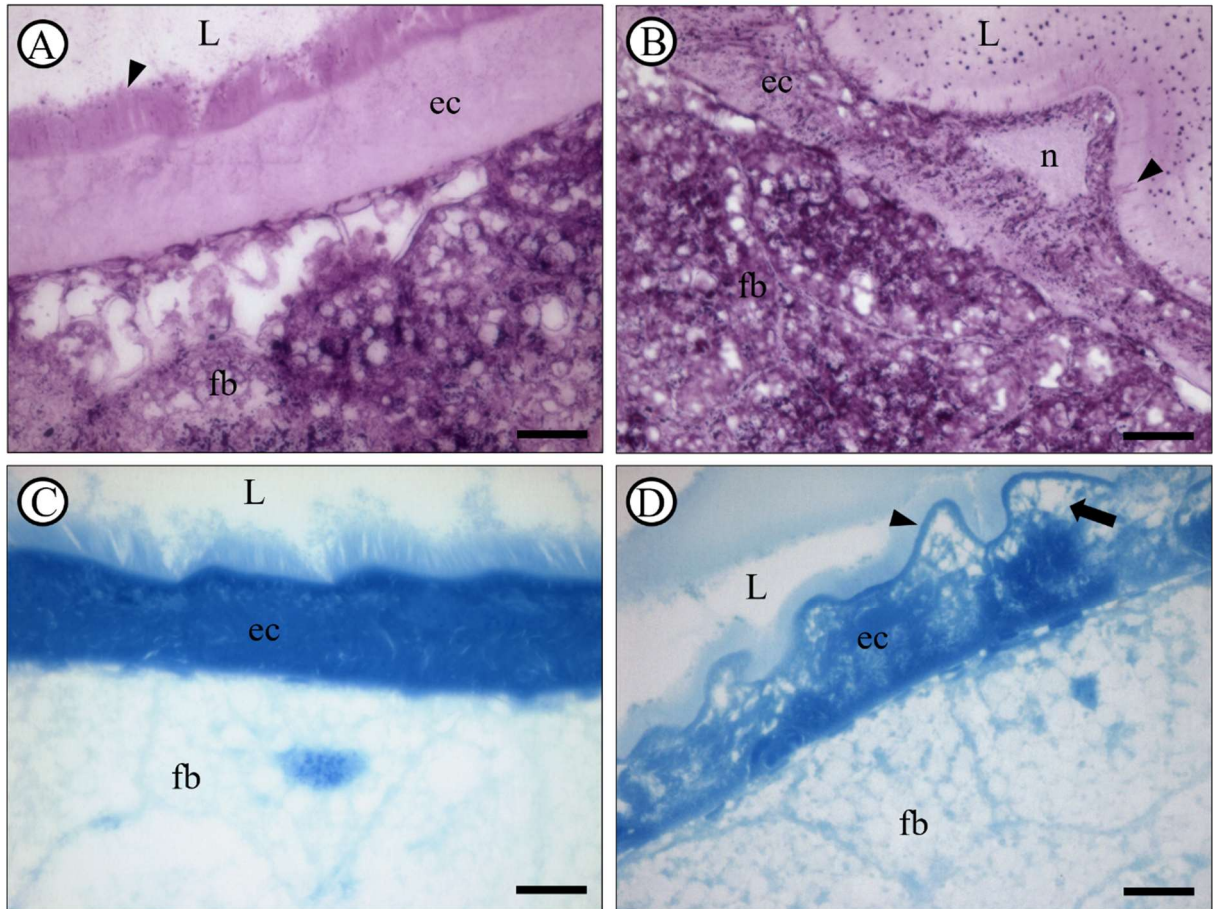
Nas larvas expostas ao lambda-cialotrina foi possível observar alterações histológicas nas células digestivas e regenerativas com ocorrência de intensa vacuolização citoplasmática (FIG. 2B), protrusões do citoplasma apical em direção ao lúmen, núcleos com aumento de heterocromatina comparados ao grupo controle (núcleo picnótico) (FIG. 2C) e borda estriada com vesículas de secreção apócrina (FIG. 2D).



**Figura 2** – Micrografias de luz do intestino médio de larvas de *Apis mellifera*. [A] Epitélio do intestino médio formado por células digestivas coradas com hematoxilina e eosina mostrando as microvilosidades (cabeça de seta) voltadas para o lúmen (L), núcleo de uma célula digestiva (n), ninho de células regenerativas (seta branca) e região do corpo gorduroso (fb). [B, C, D] Epitélio do intestino médio de larvas tratadas com lambda-cialotrina corado com hematoxilina e eosina. A células digestivas apresentam protrusão do citoplasma (cabeça de seta) e do núcleo (n), rico em heterocromatina, em direção ao lúmen. Em algumas regiões também se observa vacuolização do citoplasma (seta grande preta), vacuolização nos ninhos de células regenerativas (seta pequena branca) e vesículas de secreção apócrina na borda estriada (seta grande branca). Barras = 20  $\mu$ m.

O teste de PAS no epitélio do intestino médio de larvas de *A. mellifera* do grupo controle evidenciou distribuição uniforme de carboidratos no citoplasma e reação forte na borda estriada (FIG. 3A), enquanto nas larvas tratadas com lambda-cialotrina o epitélio apresentou forte reação no citoplasma e mais fracas e irregulares na borda estriada (FIG. 3B).

O teste para detecção de proteínas nas larvas do grupo controle evidenciou distribuição uniforme destes compostos por todo o citoplasma das células digestivas e fracas marcações na borda estriada (FIG. 3C). O epitélio do grupo tratado com o inseticida apresentou reações irregulares no citoplasma, evidenciando as áreas de vacuolização e danos na integridade celular, e mais fracas na borda estriada em relação ao grupo controle (FIG. 3D).



**Figura 3** – Micrografias de luz do intestino médio de larvas de *Apis mellifera* coradas por técnicas histoquímicas. [A] Epitélio do intestino médio do grupo controle e [B] do grupo tratado, evidenciando polissacarídeos neutros. Observar como a região com microvilosidades (cabeça de seta) voltadas para o lúmen (L) do grupo tratado com lambda-cialotrina possui uma marcação mais clara quando comparada ao grupo controle, da mesma maneira, o interior das células digestivas (ec) no grupo tratado apresenta um acúmulo de polissacarídeos. [C] Epitélio do intestino médio do grupo controle e [D] do grupo tratado, evidenciando proteínas, mostrando o lúmen (L), células digestivas (ec), região do corpo gorduroso (fb), protrusões citoplasmáticas (cabeça de seta) e vacuolização (seta grande preta) do citoplasma nas células digestivas. Barras = 20  $\mu$ m.

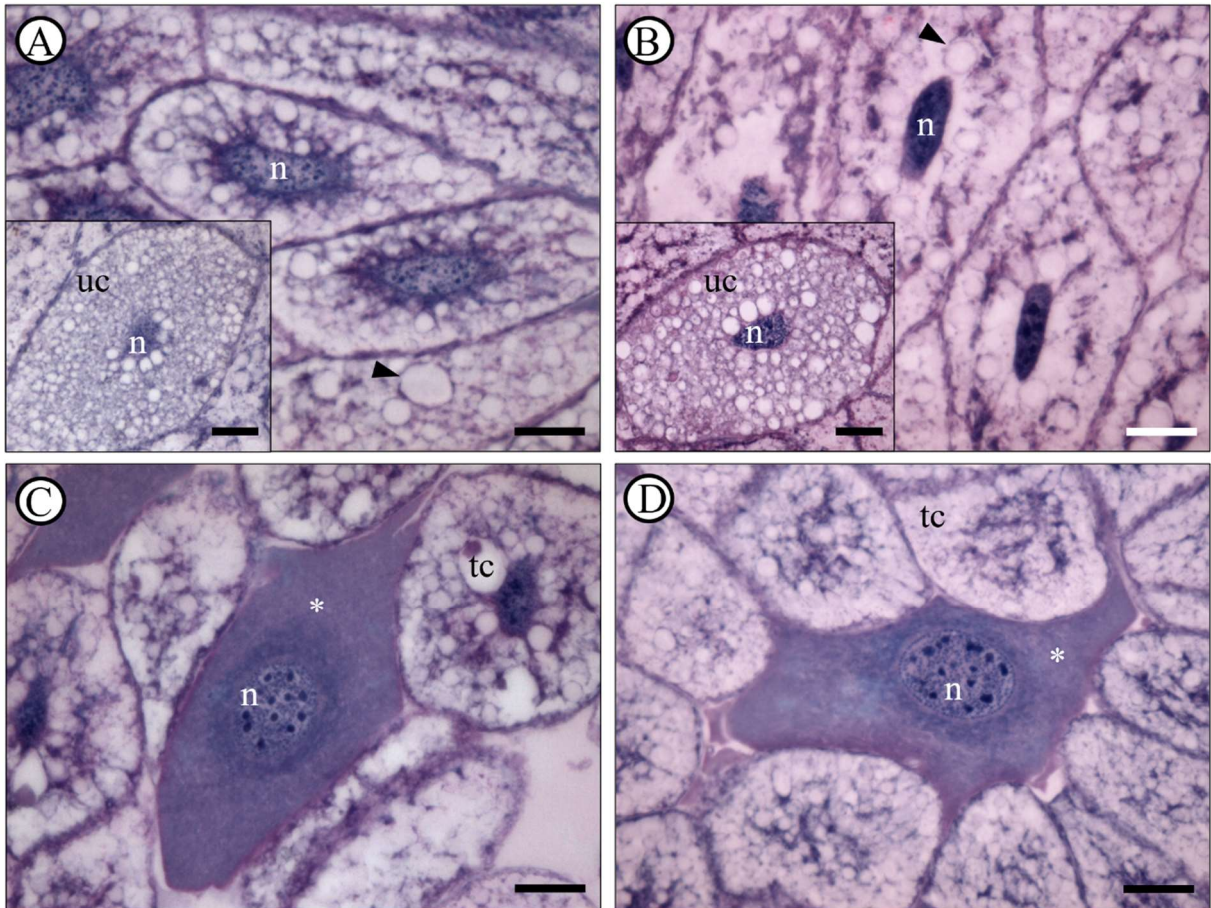
O corpo gorduroso das larvas de *A. mellifera* do grupo controle foi formado por trofócitos ovóides, com núcleo central rico em eucromatina e citoplasma com gotas lipídicas bem desenvolvidas (FIG. 4A). Ocasionalmente urócitos também foram encontrados, de formato ovoide e maiores que os trofócitos, com núcleo central rico em eucromatina e depósitos de urato de tamanhos variados em abundância ocupando a maior parte do citoplasma (FIG. 4A). Em meio às células do corpo gorduroso, enócitos também foram

encontrados, com formato esférico com contornos irregulares, com núcleo central rico em eucromatina, nucléolos evidentes e citoplasma uniformemente basófilo (FIG. 4C).

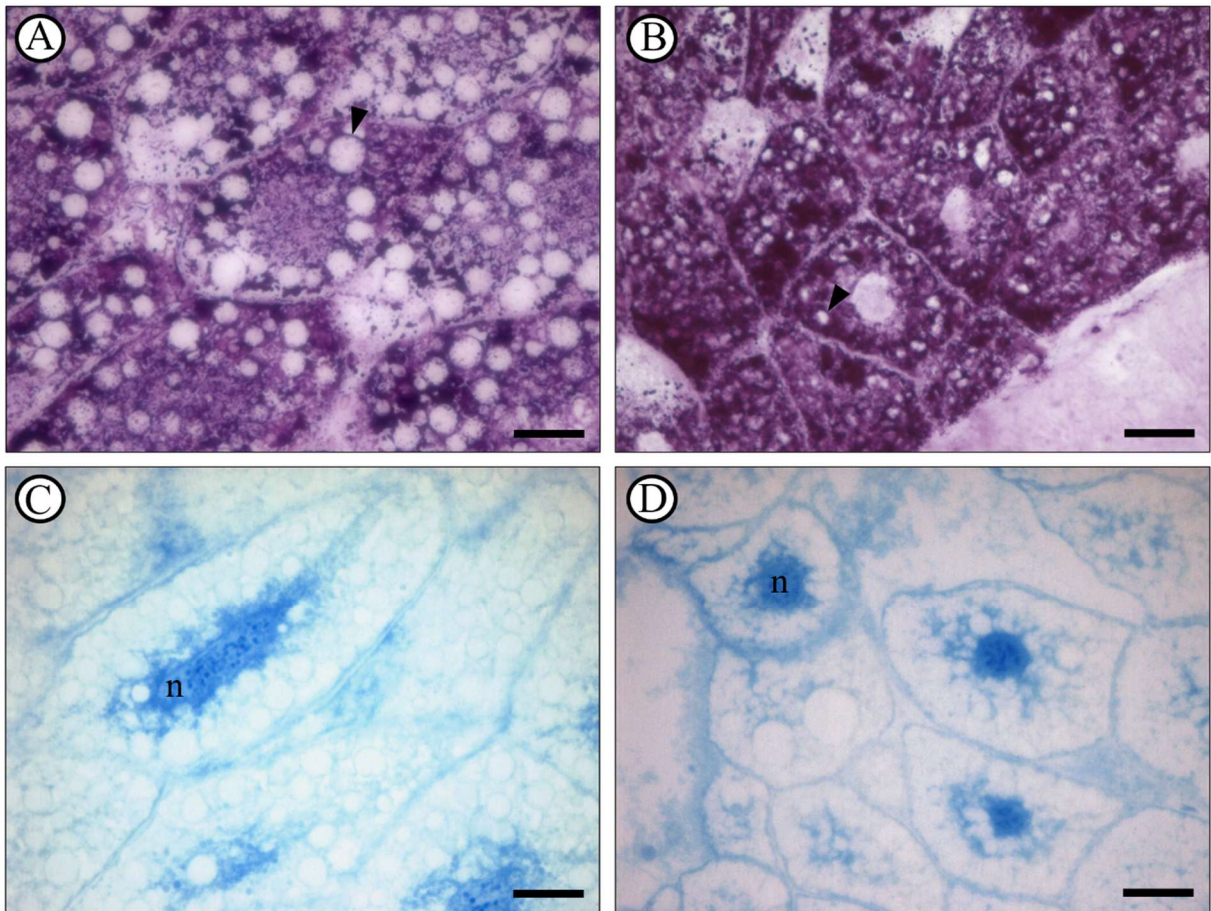
As larvas de *A. mellifera* alimentadas com lambda-cialotrina não apresentaram alterações histológicas nos trofócitos, urócitos e enócitos (FIG. 4B e 4D). No citoplasma, a densidade de pixels referente à quantidade de lipídios não mostrou alteração em relação ao grupo controle ( $F_{1,30} = 2.919$ ,  $p = 0.0986$ , FIG. 6A), no entanto, houve redução no diâmetro das gotículas lipídicas ( $t = 3.380$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0008$ ; FIG. 6B).

O teste de PAS nas larvas do grupo controle evidenciou que grande parte da região citoplasmática do trofócito, não ocupada pelas gotículas lipídicas, apresenta reações para polissacarídeos neutros (FIG. 5A). Nos trofócitos das larvas alimentadas com lambda-cialotrina houve reação mais intensa comparada ao do controle (FIG. 5B), com aumento na densidade de pixels ( $F_{1,30} = 4.475$ ,  $p = 0.0434$ ), indicando um maior acúmulo de polissacarídeos nestas células (FIG. 6C).

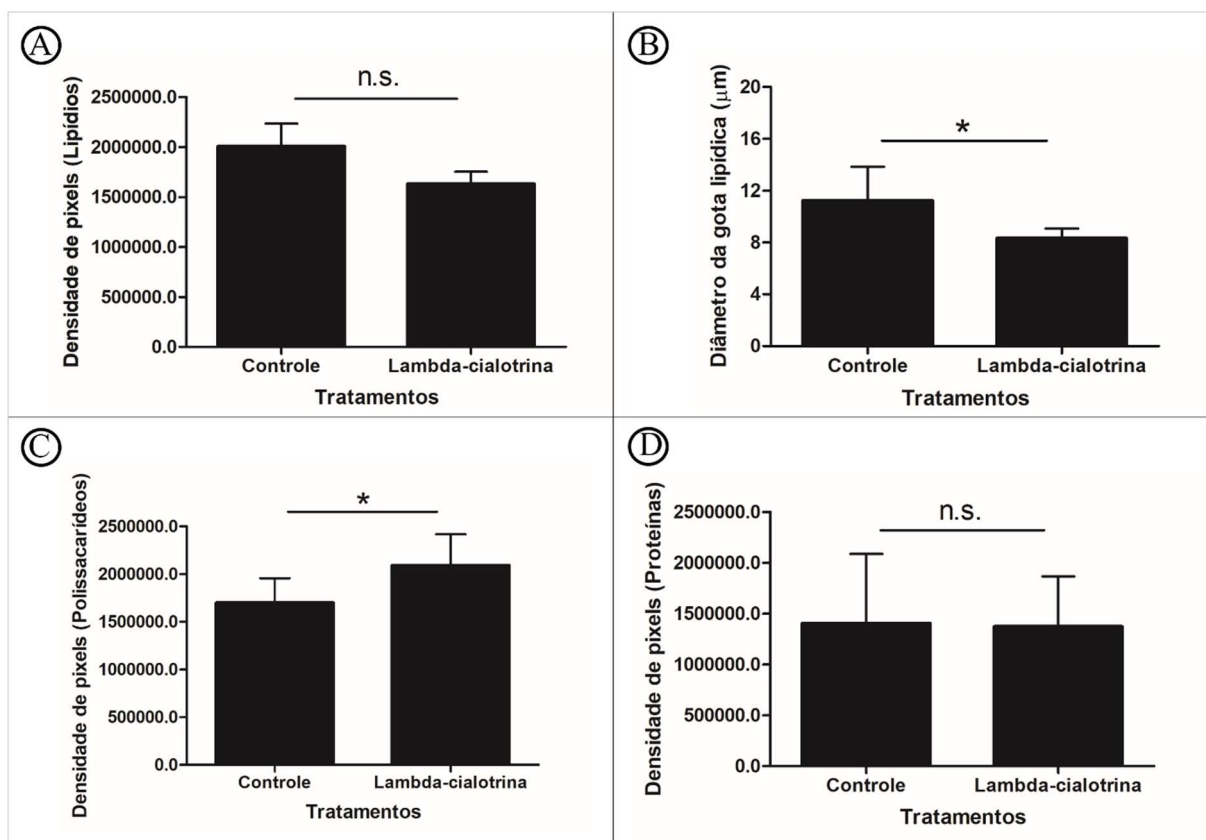
O teste com mercúrio bromofenol não evidenciou alterações na distribuição de proteínas das larvas alimentadas com lambda-cialotrina em relação ao controle (FIG. 5C e 5D) e o teste estatístico não identificou diferença significativa na quantidade de proteínas armazenadas entre os dois tratamentos ( $F_{1,30} = 1.154$ ,  $p = 0.292$ , FIG. 6D).



**Figura 4** – Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera*. [A] Trofócitos de larvas do grupo controle corado com hematoxilina e eosina. Citoplasma com gotículas lipídicas em abundância, de variados tamanhos e bem definidas (cabeça de seta), o núcleo (n) rico em eucromatina. Em detalhe um urócito (uc). [B] Trofócitos de larvas do grupo tratado com lambda-cialotrina corado com hematoxilina e eosina. Citoplasma com gotículas lipídicas menores e com limites menos definidos (cabeça de seta) e núcleo (n). Em detalhe um urócito (uc). [C] Enócitos do grupo controle e [D] tratado com lambda-cialotrina em meio aos trofócitos (tc), corados com hematoxilina e eosina. O citoplasma basófilo (\*) e núcleo rico em eucromatina (n), com nucléolos evidentes. Barras = 20  $\mu$ m.



**Figura 5** – Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* coradas por técnicas histoquímicas. **[A]** Trofócitos do grupo controle e **[B]** tratado com lambda-cialotrina, marcados para polissacarídeos neutros, evidenciando a diferença na marcação do citoplasma, mais fortemente marcado no grupo tratado comparado ao controle, e no tamanho das gotículas lipídicas (cabeça de seta), maiores no grupo controle. **[C]** Trofócitos marcados para proteínas do grupo controle e **[D]** tratado com lambda-cialotrina. Núcleo evidenciado por (n). Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

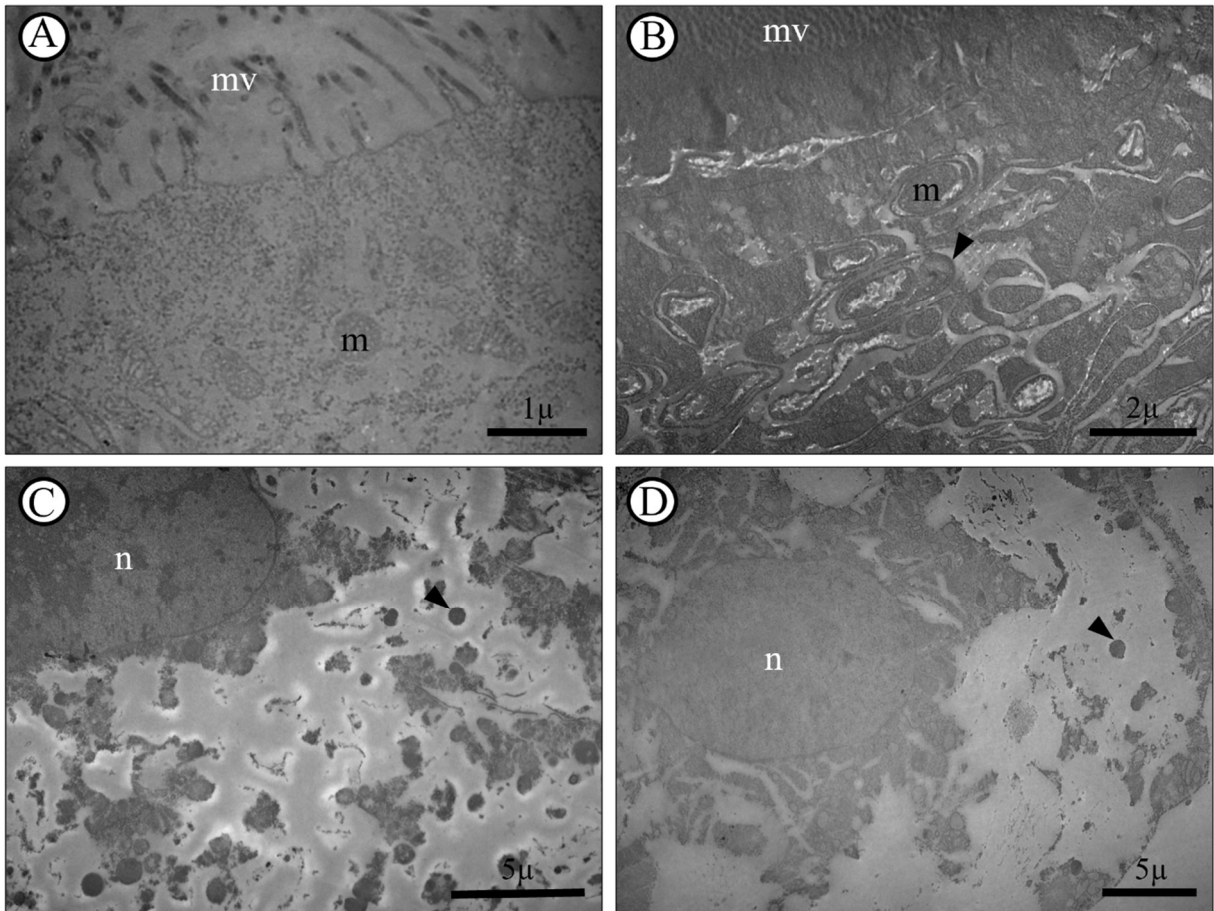


**Figura 6** – Efeito no corpo gorduroso das larvas *A. mellifera* à exposição a dose residual de lambda-cialotrina. **[A]** Densidade de pixels para lipídios (média ± SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso do grupo controle e tratado com lambda-cialotrina. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste ANOVA ( $p > 0,05$ ). **[B]** Diâmetro das gotículas lipídicas (média ± SD) no citoplasma do corpo gorduroso do grupo controle e tratado com lambda-cialotrina. Houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **[C]** Densidade de pixels para polissacarídeos (média ± SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso do grupo controle e tratado com lambda-cialotrina. Houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ). **[D]** Densidade de pixels para proteínas (média ± SD) no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso do grupo controle e tratado com lambda-cialotrina. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste ANOVA ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2. Microscopia eletrônica de transmissão

As análises ultraestruturais revelaram a região apical do epitélio do intestino médio das larvas de *A. mellifera* do grupo controle formado por microvilosidades organizadas e citoplasma rico em mitocôndrias (FIG. 7A). Nas larvas alimentadas com lambda-cialotrina a ultraestrutura mostrou que os vacúolos eram autofágicos com conteúdo majoritariamente formado por mitocôndrias com as cristas danificadas (FIG. 7B).

No corpo gorduroso das larvas do grupo controle, as análises ultraestruturais mostraram os trofócitos com núcleo oval rico em eucromatina e citoplasma abundante rico em gotas lipídicas e mitocôndrias (FIG. 7C). Os trofócitos das larvas alimentadas com lambda-cialotrina não diferem dos encontrados nas larvas do grupo controle (FIG. 7D).



**Figura 7** – Micrografias eletrônicas de transmissão do intestino médio e corpo gorduroso de larvas de *A. mellifera*. [A] Célula digestiva do epitélio do intestino médio de larva do grupo controle, evidenciando as microvilosidades (mv) e citoplasma contendo mitocôndrias de aspecto normal (m). [B] Célula digestiva do epitélio do intestino médio de larva alimentada com lambda-cialotrina mostrando microvilosidades (mv) e no citoplasma diversas vesículas autofágicas (cabeça de seta) contendo mitocôndrias danificadas (m). [C] Trofócito de larva do grupo controle e [D] trofócito de larva alimentada com lambda-cialotrina evidenciado o núcleo (n) e mitocôndrias de aspecto normal (m).

## 5. DISCUSSÃO

As alterações histológicas apresentadas pelo epitélio do intestino médio das larvas de *A. mellifera* alimentadas com dieta contaminada com lambda-cialotrina incluem intensa vacuolização citoplasmática nas células digestivas e regenerativas, protrusões do citoplasma com o núcleo compactado em direção ao lúmen nas células digestivas. Resultados semelhantes foram encontrados no epitélio de operárias adultas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina (Castro et al., 2020), spiromesifen (Serra et al., 2021), iprodione (Carneiro et al., 2020) e imidacloprid (Carneiro et al., 2022), operárias de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera: Apidae) expostas ao fipronil (Farder-Gomes et al., 2021a), lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) expostas ao esquamocina (Fiaz et al., 2018) e azadiractina (Farder-Gomes et al., 2021b) e em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) expostas ao novaluron (Fiaz et al., 2021).

A intensa vacuolização das células epiteliais do intestino médio, representam vacúolos autofágicos como evidenciado pelas análises ultraestruturais. A macroautofagia (aqui considerada como autofagia) consiste na produção de vesículas que capturam organelas e demais componentes citosólicos e a entrega dessa carga intracelular aos lisossomos, posteriormente efetuando a degradação e reciclagem de seus componentes (Mizushima, 2007; Rabinowitz e White, 2010). Em baixos níveis de estímulo, a autofagia pode representar uma resposta primária ao estresse metabólico, na tentativa de restabelecer a homeostase, eliminando as organelas danificadas (Moreau et al., 2010). No entanto, células com alto índice de vacuolização podem ter suas funções comprometidas (Shintani e Klionsky, 2004), além disso, a autofagia pode preceder a apoptose caso a primeira falhe como um mecanismo de defesa (Gump e Thorburn, 2011; Mariño et al., 2014). Assim, os vacúolos autofágicos observados nas células do intestino médio de larvas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina estão relacionadas à resposta metabólica na tentativa de reduzir os danos causados

pelo pesticida. Ainda, as funções das células digestivas e das células regenerativas podem ser comprometidas, devido aos danos nas mitocôndrias afetando a síntese de ATP, prejudicando a absorção de nutrientes e a renovação do tecido danificado.

As protrusões apicais, chamadas “*bleb*” ou “*membrane blebbing*” e o núcleo picnótico, observados nas células digestivas de larvas de *A. mellifera* alimentadas com lambda-cialotrina, são características morfológicas associadas às primeiras etapas visíveis da morte celular por apoptose (Kerr et al., 1972; Allen, 1997; Hacker, 2000; Van-Cruchten e Van-Den-Broeck, 2002). A apoptose é um tipo de morte celular que acontece de forma programada e controlada, desencadeada por duas vias principais: a extrínseca e a via intrínseca. O processo apoptótico nas duas vias é mediado por uma cascata de eventos moleculares, cujas principais efetoras são as enzimas cisteína proteases da família das caspases (Hengartner, 2000; Elmore, 2007). A clivagem mediada por caspases em substratos específicos iniciam modificações estruturais, como clivagem da lamina nuclear, resultando na compactação do núcleo (picnose) (Goldman et al., 2002). A clivagem de outros componentes do citoesqueleto (Ndozangue-Tourigine et al., 2008) assim como da quinase PAK2, que regula a morfologia celular através de rearranjos do citoesqueleto, induz a perda da forma celular e de suas funções e a formação das protrusões apicais (Rudel e Bokoch, 1997), características semelhantes às das células aqui apresentadas. Dessa forma, é plausível sugerir que células do intestino médio de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina estão utilizando o processo apoptótico como recurso para eliminação de células danificadas.

O aumento de secreção apócrina em células digestivas do intestino médio de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina também foi observado. O epitélio do intestino médio em insetos é responsável pela produção de enzimas digestivas além de proteínas formadoras da matriz peritrófica a qual protege as células do epitélio contra danos físicos e químicos (Terra e Ferreira, 2012). Há um aumento na liberação de vesículas de secreção apócrina,

contendo enzimas digestivas e demais enzimas que participam na detoxificação, quando o organismo é exposto a agentes xenobióticos (Ferreira et al, 1990). Proteínas da superfamília citocromo p450 podem fazer parte da carga transportada por essas vesículas, visto que elas metabolizam xenobióticos, tornando-os hidrossolúveis e facilitando o processo de detoxificação, e estão amplamente associadas a criação de resistência aos inseticidas em insetos (Feyereisen, 1999; Li et al., 2007). Logo, o aumento de secreção apócrina em células do epitélio de larvas de *A. mellifera* é um indicativo de que esteja ocorrendo uma resposta metabólica na tentativa de neutralizar os efeitos da exposição ao lambda-cialotrina.

A reação de PAS evidenciou forte reação na borda estriada do intestino médio das larvas do grupo controle, enquanto houve um aumento na deposição de polissacarídeos no citoplasma e reações mais fracas e irregulares na borda estriada das células digestivas de larvas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina. A região apical das células digestivas é modificada em microvilosidades. Nesta região encontra-se o glicocálice, constituído por glicoproteínas e glicolipídios, tal como no citoplasma dessas células também podem ser encontrados reservas de glicogênio (Serrão e Cruz-Landim, 2000), o que explica a afinidade do PAS com essas regiões. As microvilosidades desempenham papel na digestão, absorção de nutrientes e transporte de íons, e em algumas abelhas podem aumentar área da superfície apical em até 230 vezes (Serrão e Cruz-Landim, 1996a; Terra et al., 2019), e o glicocálice funciona como proteção dessa região contra danos físicos e químicos (Alberts et al., 2015). As reações fracas e irregulares na borda estriada das larvas expostas ao lambda-cialotrina pode indicar que as funções protetivas do glicocálice estão comprometidas pela ação do inseticida, concomitantemente, o acúmulo de polissacarídeos neutros no citoplasma é um indício de que essas células estejam armazenando fontes de energia para serem utilizadas nos processos de detoxificação.

As marcações evidenciadas pelo mercúrio de bromofenol mostram que toda a região citoplasmática e a borda estriada das células digestivas do grupo controle é positiva para proteínas, ao passo que, nas larvas expostas ao lambda-cialotrina essas células tiveram uma marcação irregular no citoplasma, evidenciando as áreas vacuolizadas e com danos na integridade celular. As células do intestino médio dos insetos exercem função na digestão e absorção dos nutrientes, na produção e secreção de enzimas digestivas e de defesa contra xenobióticos (Terra e Ferreira, 2012) e de proteínas que compõem a matriz peritrófica (Terra et al., 2019). Assim, a ampla distribuição de proteínas nas células digestivas das larvas do grupo controle pode ser atribuída à essas funções celulares, enquanto que, as regiões afetadas das larvas expostas ao lambda-cialotrina podem estar com suas funções comprometidas.

Os componentes celulares do corpo gorduroso, trofócitos e urócitos, das larvas de *A. mellifera* alimentadas com dieta contaminada com lambda-cialotrina não apresentam alterações histológicas. O corpo gorduroso nas larvas de insetos é encontrado em abundância e tem como principal função a de armazenamento de nutrientes, mas também atua no metabolismo intermediário, função que é mais evidente nos adultos (Cruz-Landim, 2008; Liu et al., 2009; Arrese & Soulages, 2010). Assim, devido ao grande número dessas células no indivíduo imaturo, é possível que a dosagem residual de lambda-cialotrina aqui utilizada não tenha induzido alterações histológicas no órgão.

Os trofócitos das larvas expostas ao lambda-cialotrina apresentam redução no diâmetro das gotículas lipídicas, no entanto, não houve diferença significativa entre a densidade de pixels referentes aos lipídios em comparação ao grupo controle. Nas larvas de insetos, os trofócitos atuam na sinalização e regulação hormonal, armazenamento de nutrientes (lipídios, carboidratos e proteínas) e também na imunidade inata, pela síntese de enzimas que desempenham papel na detoxificação do organismo (Oliveira e Cruz-Landim, 2003; Roma et al., 2010; Skowronek et al., 2021). Essas células abrigam um grande número

de receptores e sinalizadores em sua membrana plasmática que atuam como um sistema de integração de múltiplos sinais que regulam o desenvolvimento e o comportamento do organismo (Liu et al., 2009). Os sinais recebidos, hormonais ou nutricionais, geram uma resposta do órgão, na forma de mobilização de nutrientes e na liberação de moléculas sinalizadoras, conhecidas como *Fat Body Signals* (FBSs) (Liu et al., 2009; Li et al., 2019). A maior parte da glicose consumida com a dieta alimentar é convertida em lipídios, para que sejam utilizados como fonte de energia durante a metamorfose, no entanto, a glicose também é armazenada em sua forma polimérica, o glicogênio, que pode ser prontamente degradado quando sob alta demanda energética (Arrese & Soulages, 2010). Assim, apesar de não ter ocorrido uma mudança significativa na quantidade de lipídeos nos trofócitos de larvas expostas ao lambda-cialotrina, é possível que uma via de sinalização de deficiência nutricional tenha sido ativada, como resultado de uma ineficácia na absorção de nutrientes devido aos danos nas células do intestino médio, o que poderá ser verificado em estudos futuros. Além disso, é plausível considerar que exista uma alta demanda energética pelo processo de detoxificação, e que a célula esteja utilizando suas reservas para este fim. Deste modo, pode ter ocorrido uma mobilização de lipídeos, que armazenados em gotículas menores são de mais fácil acesso às ações enzimáticas pela via da  $\beta$ -oxidação devido ao aumento na área de superfície acessível (McClements & Decker, 2000; Osborn & Akoh, 2004).

A demanda energética também pode explicar o aumento de polissacarídeos evidenciados pela reação de PAS nos trofócitos das larvas alimentadas com lambda-cialotrina. O substrato para a produção de ATP depende de múltiplos fatores, entre eles a razão substrato/moléculas de ATP e a criação de resíduos metabólicos, como é o caso das espécies reativas de oxigênio (EROs), que são danosos às células. Embora a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos tenha uma razão de produção de ATP maior, quando comparada aos produtos da glicólise, o consumo de oxigênio também aumenta, o que por sua vez resulta em maiores

números de EROs (Leverne, 2007). Por isso, é possível que a glicólise esteja sendo a principal via utilizada pelos trofócitos para a síntese de ATP a fim de suprir sua demanda energética e evitar maiores produções de EROs.

Nenhuma modificação estrutural foi observada nos urócitos das larvas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina em comparação às do grupo controle. Os urócitos são especialização de trofócitos adaptados a armazenar grânulos de urato provenientes da metabolização de ácidos nucleicos ou da degradação de proteínas (Oliveira e Cruz-Landim, 2003; Furtado et al., 2013; Skowronek et al., 2021). Devido ao aumento dos processos apoptóticos e autofágicos em algumas células do intestino médio das larvas alimentadas com lambda-cialotrina, seria esperado que houvesse modificações estruturais nos urócitos a fim de armazenar a alta produção de urato como subproduto da metabolização dessas células senescentes, no entanto, este não ocorreu. Assim, podemos presumir que ao invés de modificações estruturais em células preexistentes ocorreu um aumento no número de trofócitos que se diferenciaram em urócitos, com o intuito de suprir essa demanda, o que poderá ser avaliado em estudos futuros.

Em meio às células do corpo gorduroso também ocorrem enócitos, no entanto, não observamos alterações nessas células no grupo tratado com lambda-cialotrina. Enócitos são de origem ectodérmica e responsáveis pela síntese de hidrocarbonetos, proteínas e lipídios que compõem o exoesqueleto dos insetos (Arrese & Soulages, 2010; Martins e Ramalho-Ortigão, 2012). Dados de Martins et al. (2011) verificaram que os enócitos também contribuem com uma pequena participação no processo de detoxificação em adultos de *Aedes aegypti*. Assis et al. (2022) reportaram alterações nos enócitos de adultos da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* Klug, 1810 (Hymenoptera: Apidae) expostas ao imidacloprido, entre elas, o aumento de vacuolização citoplasmática e compactação e fragmentação do núcleo. Assim, apesar de desempenharem um papel na detoxificação, os enócitos das larvas de *A. mellifera*

não sofreram alterações, possivelmente devido à maior quantidade de células presentes no corpo gorduroso de imaturos, já que estes dispõem de grande quantidade de corpo gorduroso parietal e perivisceral, e o mesmo não ocorre nos adultos (Cruz-Landim, 2008). Ainda, é plausível considerar que estas células sejam bem tamponadas, e, quando expostas a baixas concentrações de lambda-cialotrina, mantenham suas funções íntegras devido ao seu importante papel na formação da nova cutícula, responsável pelo crescimento das larvas.

As reações para proteínas não mostram diferença nos trofócitos das larvas alimentadas com lambda-cialotrina em relação ao grupo controle. Organismos sob condições de estresse, como é o caso da exposição ao inseticida, exigem alta demanda energética que pode levar o inseto a um estímulo catabólico proteico, diminuindo seus níveis de proteínas (Arrese and Soulages, 2010). Associado a este fato, como mencionado previamente, o corpo gorduroso, além de armazenamento, é o principal local onde enzimas de detoxificação são produzidas (Li et al., 2019). Assim, é possível que os níveis da catálise e síntese proteica nas larvas de *A. mellifera* expostas ao lambda-cialotrina sejam semelhantes, resultando em quantidades iguais à observada no grupo controle.

## 6. CONCLUSÃO

A ingestão da concentração residual de lambda-cialotrina encontrada em grãos de pólen causa danos estruturais e induz apoptose nas células do intestino médio, e, alterações no padrão de armazenamento de nutrientes no corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera*. Ambos órgãos, intestino médio e corpo gorduroso, não são alvos do inseticida, no entanto, as mudanças induzidas, possivelmente, comprometem a função destes e trazem prejuízos ao desenvolvimento desses insetos. Nossos dados reforçam a importância do manejo adequado de inseticidas e do desenvolvimento de novas tecnologias em pesticidas para que se obtenha o mínimo de prejuízos em espécies não-alvo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abati, R., Sampaio, A. R., Maciel, R. M. A., Colombo, F. C., Libardoni, G., Battisti, L., Lozano, E. R., Ghisi, N. C., Costa-Maia, F. M. & Potrich, M. (2021). Bees and pesticides: The research impact and scientometrics relations. *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (25), 32282-32298.
- Abdel razik, M. A. R. A. M. (2019). Toxicity and side effects of some insecticides applied in cotton fields on *Apis mellifera*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 4987-4996.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Wilson, J.; & Hunt, T. (2015). *Molecular biology of the cell* (Vol. 6, p. 1342). USA: New York: Garland Science.
- Allen, R. T.; Hunter III, W. J.; & Agrawal, D. K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 37(4), 215-228.
- Amin, M.; Yousuf, M.; Attaullah, M.; Nabi, G.; Buner, I. D.; Ahmad, N., Ullah, U. & Khan, Z. (2020). Comparative acute toxicity of organophosphates and synthetic pyrethroid pesticides in vivo exposed fresh water fish *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 23(3), 366-372.
- Arrese, E. L. & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.
- Assis, J. C.; Costa Domingues, C. E.; Tadei, R.; Silva, C. I.; Lima, H. M. S.; Decio, P.; & Silva-Zacarin, E. C. (2022). Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Environmental Pollution*, 304, 119140.

- Bailey, J.; Scott-Dupree, C.; Harris, R.; Tolman, J. & Harris, B. (2005). Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie*, 36(4), 623-633.
- Basir, A.; Khan, A.; Mustafa, R.; Zargham Khan; M., Rizvi, F.; Mahmood, F. & Yousaf, A. (2011). Toxicopathological effects of lambda-cyhalothrin in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Human & Experimental Toxicology*, 30(7), 591-602.
- Bradberry, S. M.; Cage, S. A.; Proudfoot, A. T. & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological reviews*, 24, 93-106.
- 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.
- Calderone, N. W. (1998). Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 29(1-2), 127-158.
- Campana, M. A.; Panzeri, A. M.; Moreno, V. J. & Dulout, F. N. (2003). Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 99-103.
- Carneiro, L. S.; Martinez, L. C.; De Oliveira, A. H.; Cossolin, J. F. S.; De Resende, M. T. C. S.; Gonçalves, W. G., Medeiros-Santana, L. & Serrão, J. E. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of The Total Environment*, 815, 152847.
- Carneiro, L. S.; Martínez, L. C.; Gonçalves, W. G.; Santana, L. M. & Serrão, J. E. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 109991.
- Castilhos, D., Bergamo, G. C., Fonseca, V. L. I., & Belchior-Filho, V. (2016). Apiculture in Rio Grande do Norte, Brazil: a four-year follow-up survey. *Latin american journal of business management*, 7(1), 96-116.

- 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.
- Çavaş, T. & Ergene-Gözükara, S. (2003). Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 93-99.
- Ceuppens, B.; Eraerts, M.; Vleugels, T.; Cnops, G.; Roldan-Ruiz, I. & Smagghe, G. (2015). Effects of dietary lambda-cyhalothrin exposure on bumblebee survival, reproduction, and foraging behavior in laboratory and greenhouse. *Journal of pest science*, 88, 777-783.
- Chang, J.; Li, J.; Wang, H.; Wang, Y.; Guo, B.; Yin, J.; Hao, W.; Li, W.; Li, J. & Xu, P. (2016). Tissue distribution, metabolism and hepatic tissue injury in Chinese lizards (*Eremias argus*) after a single oral administration of lambda-cyhalothrin. *Environmental Pollution*, 218, 965-972.
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: structure and function*. (Vol. 5, p. 929). Cambridge university press.
- Cornara, L.; Biagi, M.; Xiao, J. & Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in pharmacology*, 412.
- Cornelissen, B.; Neumann, P. & Schweiger, O. (2019). Global warming promotes biological invasion of a honey bee pest. *Global change biology*, 25(11), 3642-3655.
- Cruz-Landim, C. (2008). *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. (Vol. 1, p. 408). São Paulo, Editora UNESP
- Davies, T. G. E.; Field, L. M.; Usherwood, P. N. R. & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162.

- 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.
- Dicks, L. V.; Breeze, T. D.; Ngo, H. T.; Senapathi, D.; An, J.; Aizen, M. A.; Basu, P.; Buchori, D.; Galetto, L.; Garibaldi, L. A.; Gemmill-Herren, B.; Howlett, B. G.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Johnson, S. D.; Kovács-Hostyánszki, A.; kwon, Y. J.; Lattorff, H. M. G.; Lungharwo, T.; Seymour, C. L.; Vanbergen, A. J. & Potts, S. G. (2021). A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Nature Ecology & Evolution*, 5(10), 1453-1461.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Evans, J. D. & Chen, Y. (2021). Colony collapse disorder and honey bee health. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*, 229-234.
- Farder-Gomes, C. F.; Fernandes, K. M.; Bernardes, R. C.; Bastos, D. S. S.; Martins, G. F. & Serrão, J. E. (2021a). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of The Total Environment*, 774, 145679.
- Farder-Gomes, C. F.; Saravanan, M.; Martinez, L. C.; Plata-Rueda, A.; Zaniccio, J. C. & Serrao, J. E. (2022). Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 41(2), 466-475.
- Fernandes, K. M.; Araújo, V. A.; Serrão, J. E.; Martins, G. F.; Campos, L. A. & Neves, C. A. (2010). Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 56(2), 489.

- 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.
- Fetoui, H.; Makni, M.; Garoui, E. M. & Zeghal, N. (2010). Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593-599.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology*, 44(1), 507-533.
- Fiaz, M.; Martinez, L. C.; Plata-Rueda, A.; Cossolin, J. F. S.; Serra, R. S.; Martins, G. F. & Serrão, J. E. (2021). Behavioral and ultrastructural effects of novaluron on *Aedes aegypti* larvae. *Infection, Genetics and Evolution*, 93, 104974.
- Fiaz, M.; Martínez, L. C.; Silva Costa, M.; Cossolin, J. F. S.; Plata-Rueda, A.; Gonçalves, W. G.; Sant'Ana, A. E. G.; Zanuncio, J. C. & Serrão, J. E. (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 1-8.
- Fujii, T.; Kodama, S.; Ishikawa, Y.; Yamamoto, M.; Sakurai, T. & Fónagy, A. (2022). Lipid droplets in the pheromone glands of bombycids: Effects of larval diet on their size and pheromone titer. *Journal of Insect Physiology*, 142, 104440.
- Furtado, W. C.; Azevedo, D. O.; Martins, G. F.; Zanuncio, J. C. & Serrão, J. E. (2013). Histochemistry and ultrastructure of urocytes in the pupae of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). *Microscopy and Microanalysis*, 19(6), 1502-1510.
- Goldman, R. D.; Gruenbaum, Y.; Moir, R. D.; Shumaker, D. K. & Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & development*, 16(5), 533-547.

- Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Santana, W. C., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2017). Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. *Developmental biology*, 431(2), 194-204.
- 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), 1255957.
- Grab, H.; Branstetter, M. G.; Amon, N.; Urban-Mead, K. R.; Park, M. G.; Gibbs, J.; Blitzer, E. J.; Poveda, K.; Loeb, G. & Danforth, B. N. (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science*, 363(6424), 282-284.
- 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.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2010). The insects: an outline of entomology. (Vol. 4, p. 565). *John Wiley & Sons*.
- Gump, J. M. & Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection?. *Trends in cell biology*, 21(7), 387-392.
- Guzmán-Novoa, E.; Page, R. E. & Gary, N. E. (1994). Behavioral and life-history components of division of labor in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34, 117-409.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, 301, 5-17.

- He, L. M.; Troiano, J.; Wang, A. & Goh, K. (2008). Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 71-91.
- Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C. & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology*, 54, 285-302.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Ingram, E. M.; Augustin, J.; Ellis, M. D. & Siegfried, B. D. (2015). Evaluating sub-lethal effects of orchard-applied pyrethroids using video-tracking software to quantify honey bee behaviors. *Chemosphere*, 135, 272-277.
- Jalali, M. A.; Van Leeuwen, T.; Tirry, L. & De Clercq, P. (2009). Toxicity of selected insecticides to the two-spot ladybird *Adalia bipunctata*. *Phytoparasitica*, 37, 323-326.;
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral ecology and sociobiology*, 64, 305-316.
- Johnson, R. M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual review of entomology*, 60, 415-434.
- Karate Zeon® 50 CS [Bula]. Paulínia/SP – Brasil: Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. Disponível em: <  
[https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/kgtney466/files/media/document/2022/06/15/karate\\_zeon\\_50\\_.pdf](https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/kgtney466/files/media/document/2022/06/15/karate_zeon_50_.pdf)>. Acesso em: 31/01/2023.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khalifa, S. A.; Elshafiey, E. H.; Shetaia, A. A.; El-Wahed, A. A. A.; Algethami, A. F.; Musharraf, S. G.; AlAjmi, M. F.; Zhao, C.; Masry, S. H. D.; Abdel-Daim, M. M.; Halabi, M. F.; Kai, G.; Naggar, Y. A.; Bishr, M.; Diab, M. A. M. & El-Seedi, H. R. (2021).

- Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 688.
- Kiljanek, T.; Niewiadowska, A. & Posyniak, A. (2016). Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science*, 60(2), 5-24.
- Kleijn, D.; Winfree, R.; Bartomeus, I.; Carvalheiro, L.G.; Henry, M.; Isaacs, R.; Klein, A.M.; Kremen, C.; M'Gonigle, L.K.; Rader, R.; Ricketts, T.H.; Williams, N.M.; Lee Adamson, N.; Ascher, J.S.; Báldi, A.; Batáry, P.; Benjamin, F.; Biesmeijer, J.C.; Blitzer, E.J.; Bommarco, R.; Brand, M.R.; Bretagnolle, V.; Button, L.; Cariveau, D.P.; Chifflet, R.; Colville, J.F.; Danforth, B.N.; Elle, E.; Garratt, M.P.D.; Herzog, F.; Holzschuh, A.; Howlett, B.G.; Jauker, F.; Jha, S.; Knop, E.; Krewenka, K.M.; Le Féon, V.; Mandelik, Y.; May, E.A.; Park, M.G.; Pisanty, G.; Reemer, M.; Riedinger, V.; Rollin, O.; Rundlöf, M.; Sardiñas, H.S.; Scheper, J.; Sciligo, A.R.; Smith, H.G.; Steffan-Dewenter, I.; Thorp, R.; Tschamtkke, T.; Verhulst, J.; Viana, B.F.; Vaissière, B.E.; Veldtman, R.; Westphal, C. & Potts, S.G. (2015). Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature communications*, 6(1), 7414.
- Klein, A. M.; Vaissière, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C. & Tschamtkke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.
- Le Conte, Y. & Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.
- Leverve, X., Batandier, C., & Fontaine, E. (2007). Choosing the right substrate. In: *Sepsis: New Insights, New Therapies: Novartis Foundation Symposium* 280 (pp. 108-127). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

- Li, M.; Wang, J.; Lu, Z.; Wei, D.; Yang, M. & Kong, L. (2014). NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 146, 82-92.
- Li, S.; Yu, X. & Feng, Q. (2019). Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64, 315-333.
- Li, X.; Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 231-253.
- Liao, C. H.; He, X. J.; Wang, Z. L.; Barron, A. B.; Zhang, B.; Zeng, Z. J. & Wu, X. B. (2018). Short-term exposure to lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory-related characteristics of worker bees *Apis mellifera*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 75, 59-65.
- Liu, Y.; Liu, H.; Liu, S.; Wang, S.; Jiang, R. J. & Li, S. (2009). Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 71(1), 16-30.
- Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 81-94.
- Martins, G. F. & Ramalho-Ortigao, J. M. (2012). Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9(2), 139-152.
- Martins, G. F.; Neves, C. A.; Campos, L. A. O. & Serrão, J. E. (2006). The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2), 161-168.
- Martins, G. F.; Ramalho-Ortigão, J. M.; Lobo, N. F.; Severson, D. W.; McDowell, M. A. & Pimenta, P. F. P. (2011). Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 308-315.

- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of food science*, 65(8), 1270-1282.
- Melisie, D.; Damte, T. & Kumar, A. (2015). Effects of some insecticidal chemicals under laboratory condition on honeybees [*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)] that forage on onion flowers. *African journal of agricultural research*, 10(11), 1295-1300.
- Michelette, E. R. F. & Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24(4), 431-440.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
- Moreau, K.; Luo, S. & Rubinsztein, D. C. (2010). Cytoprotective roles for autophagy. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 206-211.
- Mullin, C. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; VanEngelsdorp, D. & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one*, 5(3), e9754.
- Nation, J. L. (2022). *Insect physiology and biochemistry*. (Vol. 4, p. 586). CRC press.
- Ndozangue-Touriguine, O.; Hamelin, J., & Bréard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 76(1), 11-18.
- Neov, B.; Shumkova, R.; Palova, N. & Hristov, P. (2021). The health crisis in managed honey bees (*Apis mellifera*). Which factors are involved in this phenomenon?. *Biologia*, 76, 2173-2180.
- Neves, C. A.; Gitirana, L. B. & Serrão, J. E. (2002). Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41(2), 443-459.

- Neves, C. A.; Gitirana, L. B. & Serrão, J. E. (2003). Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63, 683-690.
- Nkontcheu, D. B. K.; Tchamadeu, N. N.; Ngealekeleoh, F. & Nchase, S. (2017). Ecotoxicological effects of imidacloprid and lambda-cyhalothrin (insecticide) on tadpoles of the African common toad, *Amietophrynus Regularis* (Reuss, 1833) (Amphibia: Bufonidae). *Emerging Science Journal*, 1(2), 49-53.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Oliveira, V. P. & Cruz-Landim, C. (2003). Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências*, 11(2), 195-205.
- Organisation for Economic Co-operation and Development 239 (OECD) (2016). Guidance document on honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, following repeated exposures. *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Ser. Test. Assess.* 34, 1–16.
- Orr, M. C.; Hughes, A. C.; Chesters, D.; Pickering, J.; Zhu, C. D. & Ascher, J. S. (2021). Global patterns and drivers of bee distribution. *Current Biology*, 31(3), 451-458.
- Osborn, H. T., & Akoh, C. C. (2004). Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 84(3), 451-456.
- Page Jr, R. E. & Peng, C. Y. S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36(4-6), 695-711.
- Popp, J.; Pető. K. & Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*, 33, 243-255.

- Potts, S. G.; Roberts, S. P.; Dean, R.; Marris, G.; Brown, M. A.; Jones, R., Neumann, P. & Settele, J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of apicultural research*, 49(1), 15-22.
- Rabinowitz, J. D. & White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science*, 330(6009), 1344-1348.
- Rembold, H.; Kremer, J. P. & Ulrich, G. M. (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 11(1), 29-38.
- Rhodes, C. J. (2018). Pollinator decline—an ecological calamity in the making?. *Science progress*, 101(2), 121-160.
- Rodrigues, A. R.; Spindola, A. F.; Torres, J. B.; Siqueira, H. A. & Colares, F. (2013). Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicology and environmental safety*, 96, 53-60.
- Roma, G. C.; Bueno, O. C. & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron*, 41(5), 395-401.
- Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M. P. & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83.
- Roy, D.; Debnath, P.; Mondal, D. & Sarkar, P. (2018). Colony collapse disorder of honey bee: A neoteric ruction in global apiculture. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 26(3), 1-12.
- Rudel, T. & Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, 276(5318), 1571-1574.
- Sadaf, K.; Ahmad, K. R.; Ahmad, S. N.; Kanwal, U.; Suleman, S.; Aslam, Z.; Inayat, I.; Siddique, S. & Kanwal, M. A. (2022). Mitigating properties of vitamin E and olive oil on

- the teratomorphogenic impacts of lambda-cyhalothrin in developing chick embryos. *Toxicology Reports*, 9, 1901-1905.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.
- Santos, M. D.; Areas, M. A. & Reyes, F. G. R. (2008). Piretróides—uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(3), 339-349.
- Scott, J. G.; Liu, N. & Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1-3), 147-155.
- Serra, R. S.; Cossolin, J. F. S.; de Resende, M. T. C. S.; de Castro, M. A.; Oliveira, A. H.; Martinez, 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. & da Cruz-Landim, C. (2000). Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *Journal of Apicultural Research*, 39(1-2), 9-17.
- Serrao, J. E., & Cruz-Landim, D. (1996a). A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*, 1-6.
- Serrao, J. E., & Cruz-Landim, D. (1996b). Ultrastructure of midgut endocrine cells in workers of stingless bee (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia, Sér. Zool*, 81, 151-156.
- Shintani, T. & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995.

- Shurjeel, H. K.; Aqueel, M. A.; Ashraf, E.; Ali, A. & Rubab, A. (2020). Effect of insecticides on the longevity of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Sarhad Journal of Agriculture*, 36(3), 768-776.
- Siviter, H., Bailes, E. J., Martin, C. D., Oliver, T. R., Koricheva, J., Leadbeater, E., & Brown, M. J. (2021). Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature*, 596(7872), 389-392.
- Skowronek, P.; Wójcik, Ł. & Strachecka, A. (2021). Fat body—Multifunctional insect tissue. *Insects*, 12(6), 547.
- Smith, K. M.; Loh, E. H.; Rostal, M. K.; Zambrana-Torrel, C. M.; Mendiola, L. & Daszak, P. (2013). Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth*, 10, 434-445.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86, 165-181.
- Solomon, R. W. (2009). Free and open source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology*, 192(6), W330-W334.
- Stefanini, M., Martino, C. D., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174.
- 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.
- Terra, W. R. & Ferreira, C. (2012). Biochemistry and molecular biology of digestion. In *Insect molecular biology and biochemistry* (pp. 365-418). Academic press.
- Terra, W. R.; Barroso, I. G.; Dias, R. O. & Ferreira, C. (2019). Molecular physiology of insect midgut. In *Advances in insect physiology* (Vol. 56, pp. 117-163). Academic Press.

- Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*, 31(4), 214-223.
- Verma, N. & Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides—a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175, 3093-3119.
- Wang, W.; Cai, D. J.; Shan, Z. J.; Chen, W. L.; Poletika, N. & Gao, X. W. (2007). Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(2), 184-188.
- Wcislo, W., & Fewell, J. H. (2017). Sociality in bees. *Comparative social evolution*, 50-83.
- Winston, M. L. & Fergusson, L. A. (1985). The effect of worker loss on temporal caste structure in colonies of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Canadian journal of zoology*, 63(4), 777-780.
- Yousef, M. I. (2010). Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1152-1159.
- Zattara, E. E. & Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth*, 4(1), 114-123.