

MAYARA BADARÓ ARTHIDORO DE CASTRO

**EFEITOS CITOTÓXICOS NO INTESTINO MÉDIO, GLÂNDULAS
HIPOFARÍNGEAS E CÉREBRO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*
EXPOSTAS A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS CRÔNICAS DO INSETICIDA
LAMBDA-CIALOTRINA**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadora: Jamile Fernanda Silva Cossolin

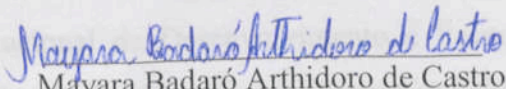
**VIÇOSA-MINAS GERAIS
2019**

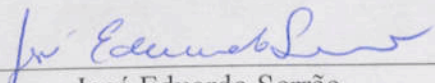
MAYARA BADARÓ ARTHIDORO DE CASTRO

**EFEITOS CITOTÓXICOS NO INTESTINO MÉDIO, GLÂNDULAS
HIPOFARÍNGEAS E CÉREBRO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*
EXPOSTAS A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS CRÔNICAS DO INSETICIDA
LAMBDA-CIALOTRINA**

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

APROVADA: 19 de julho de 2019.


Mayara Badaró Arthidoro de Castro
Autora


José Eduardo Serrão
Orientador

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

T

C355e
2019
Castro, Mayara Badaró Arthidoro de, 1992-
Efeitos citotóxicos no intestino médio, glândulas
hipofaríngeas e cérebro de operárias da abelha *Apis mellifera*
expostas a concentrações subletais crônicas do inseticida
lambda-cialotrina / Mayara Badaró Arthidoro de Castro. –
Viçosa, MG, 2019.

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

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-31.

1. Enterócitos. 2. Glândulas endócrinas. 3. Neurônios.
4. Inseticidas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 571.6

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. José Eduardo Serrão pela orientação, paciência e ensinamentos transmitidos.

À coorientadora Dra. Jamile Fernanda Silva Cossolin e ao Dr. Luis Carlos Martinez Castrillon pelo apoio e contribuição no trabalho.

Aos amigos de laboratório pelo auxílio na pesquisa, em especial Raíssa, Lídia, Paulo Henrique, Matheus e André, e pelas horas de distração e alegria, que sempre me ajudou durante todo o trabalho.

Aos funcionários e técnicos, que contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente Gecelmino do apiário e aos técnicos do núcleo de microscopia da Universidade Federal de Viçosa.

À minha mãe por sempre estar ao meu lado, incentivando meus sonhos e por todo seu amor.

À minha família por todo apoio, principalmente minhas irmãs, Marina e Mayra.

Ao meu namorado Sebastian, que mesmo distante, me apoiou nos momentos mais difíceis e incentivou a continuar.

A minhas companheiras de república por toda a companhia, em especial Gislaine por todo apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

As professoras Dr^a. Luciane Cristina de Oliveira Lisboa e Dr^a. Maria do Carmo Queiroz Fialho por participarem da banca avaliadora e pela contribuição no trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

Ao apiário da família Raad por ceder colônias que foram usadas no desenvolvimento do projeto.

RESUMO

CASTRO, Mayara Badaró Arthidoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeitos citotóxicos no intestino médio, glândulas hipofaríngeas e cérebro de operárias da abelha *Apis mellifera* expostas a concentrações subletais crônicas do inseticida lambda-cialotrina.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadora: Jamile Fernanda Silva Cossolin.

A abelha *Apis mellifera* é economicamente importante, tanto pelos seus produtos como mel, cera e própolis, quanto pelos serviços de polinização em diversas culturas. As ameaças à sobrevivência desses insetos, no entanto, vêm provocando grandes perdas e elevados prejuízos tanto na agricultura como na apicultura. Dentre as causas envolvidas na perda das abelhas melíferas, a intensificação do uso de pesticidas em cultivos agrícolas é uma das principais. Embora atualmente testes para a regularização do uso de inseticidas considerem os seus efeitos tóxicos agudos sobre os polinizadores, pouco se sabe sobre efeitos de exposição crônica a doses subletais que podem persistir no ambiente. Este trabalho investigou o efeito da exposição crônica a doses subletais do inseticida piretroide lambda-cialotrina no intestino médio, glândula hipofaríngea e cérebro de *A. mellifera*. As abelhas foram alimentadas por oito dias com sacarose a 50% contendo a $CL_{50/100}$ do inseticida. Posteriormente, o intestino médio, a glândula hipofaríngea e o cérebro das abelhas foram analisados em microscopia luz e eletrônica de transmissão. A organização tecidual do intestino médio não foi afetada após a exposição, exceto na região posterior deste órgão, com a presença de alguns fragmentos celulares no lúmen e alterações nas mitocôndrias. A glândula hipofaríngea foi severamente afetada pelo inseticida com alterações na organização do retículo endoplasmático rugoso, que mudou para aspecto vesicular, e algumas características de morte celular. O cérebro apresentou extensas lacunas tanto na região de neurópila quanto na região dos corpos celulares, principalmente nos corpora pedunculata bem como alterações celulares semelhantes a processos de morte. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que mesmo em concentrações subletais e ingerido cronicamente, o inseticida lambda-cialotrina é tóxico para abelhas causando danos no intestino médio, glândulas hipofaríngeas e cérebro, podendo afetar aspectos fisiológicos e comportamentais destes insetos.

Palavras chave: Enterócito. Célula secretora. Neurônio. Inseticida.

ABSTRACT

CASTRO, Mayara Badaró Arthidoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal glands and brain of *Apis mellifera* bee workers exposed to chronic sublethal concentrations of the lambda-cyhalothrin insecticide.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-adviser: Jamile Fernanda Silva Cossolin.

The honeybee *Apis mellifera* is economically important, not only for its products such as honey, wax and propolis, but also for its role in pollination. The hazard to the survival of these insects, however, have been causing high losses in both agriculture and beekeeping. One of the main causes involved in the loss of honey bees is the increased use of pesticides in agricultural crops. Although currently testing for the regularization of insecticide use consider its acute toxic effects on pollinators, little is known about the effects of chronic exposure to sublethal doses that may persist in the environment. This work investigated the effect of chronic exposure to sublethal doses of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on the midgut, hypopharyngeal gland and brain of *A. mellifera*. The bees were fed for eight days with 50% sucrose containing the LC_{50/100} insecticide. Subsequently, the midgut, the hypopharyngeal gland and the brain of the bees were analyzed in light and electron microscopy transmission. The tissue organization of the midgut was found not to be affected after exposure, except in the posterior region. This region was shown to have a presence of some cellular fragments in the lumen and changes in the mitochondria. The hypopharyngeal gland was severely affected by the insecticide. The effects included changes in the organization of the rough endoplasmic reticulum which caused changes to the vesicular appearance and some characteristics of cell death. The brain presented extensive gaps in the neuropil as well as in the cellular bodies region, especially in the corpora pedunculata. These resembled cellular alterations similar to what is seen in death processes. The results obtained in this work indicate that in sublethal concentrations and ingested chronically, the insecticide lambda-cyhalothrin is toxic to bees causing damage to the midgut, hypopharyngeal glands and brain, and may affect the physiological and behavioral aspects of these insects.

Keywords: Enterocyte. Secretory cell. Neuron. Insecticide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Abelhas	11
2.2 Teste de toxicidade	11
2.3 Exposição crônica	11
2.4 Histologia.....	11
2.5 Ultraestrutura	12
3 RESULTADOS	13
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO.....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

A abelha *Apis mellifera* é um inseto economicamente importante no mundo todo. Seus produtos, como mel, geleia real, própolis e cera são amplamente comercializados (Iwasa, 2004; Atkins, 1992). Além disso, as abelhas melíferas são consideradas polinizadores importantes para culturas agrícolas (Johnson, 2010). Por serem generalistas, são os únicos polinizadores capazes de suplementar a polinização em diferentes culturas e, embora nem sempre mais eficientes que as abelhas nativas, são bem confiáveis pelo seu constante forrageio na área cultivada (Williams, 2002). A maioria dos serviços de polinização também utilizam as abelhas melíferas devido ao seu detalhado e bem desenvolvido sistema de manejo e sua alta capacidade de sobrevivência tanto em ambientes naturais quanto modificados (Southwicki e Southwicki, 1992).

A contribuição das abelhas para a agricultura foi destacada principalmente pelo declínio no número dos polinizadores manejados em algumas partes do mundo. Em 2006 numerosos registros de perdas alarmantes de colônias sem causas definidas ocorreram nos Estados Unidos da América (van Engelsdorp et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007). Esse fenômeno, conhecido por “colony collapse disorder” (CCD), foi caracterizado pela rápida perda da população de abelhas adultas da colônia, restando apenas as crias e algumas poucas abelhas recém emergidas assistindo a rainha. Além disso, nenhuma abelha adulta morta é encontrada perto ou dentro da colônia e pode ocorrer uma invasão tardia por pragas, como, por exemplo, pequenos besouros das colmeias, ou cleptoparasitismo por colônias vizinhas de abelhas (Cox-Foster et al., 2007; van Engelsdorp et al., 2009; Pires et al., 2016).

Algumas hipóteses estão sendo propostas para definir as causas do CCD, dentre as quais incluem o parasitismo pelo ácaro *Varroa destructor* ou pelos microsporídeos *Nosema ceranae* e *Nosema apis*; infecções virais; estresse nutricional provocado pelo manejo das colônias em monoculturas, as quais inviabilizam a variabilidade da oferta nutritiva para as abelhas, que, portanto podem sofrer um prejuízo no sistema de defesa natural; sensibilidade a inúmeros pesticidas, que podem apresentar diversos efeitos prejudiciais no desempenho de atividades como aprendizagem, nutrição e locomoção. A causa mais provável, no entanto, seria a interação sinérgica entre esses múltiplos fatores biológicos, ambientais e químicos (Farooqui, 2013; Bekić et al., 2014; Pires et al., 2016; van Engelsdorp et al., 2017).

A intensificação do emprego de pesticidas em práticas agrícolas é um dos principais fatores que contribuem para o declínio de polinizadores (Potts, 2010). Inúmeros casos de extinção de colônias devido à exposição das abelhas adultas a pesticidas aplicados em campos de cultivo vizinhos foram relatados por diversos apicultores no mundo todo (Basu e Chakrabarti, 2015).

Inseticidas pulverizados em plantas podem ser tóxicos para as abelhas quando elas entram em contato com as plantas tratadas ou quando elas sobrevoam pela área contaminada e absorvem partículas tóxicas dispersas no ar. Elas podem, também, intoxicar toda colônia trazendo pólen e néctar contaminados (Rortais et al., 2005). As abelhas podem, portanto, ficar expostas continuamente a produtos químicos no ambiente como consequência de suas atividades de forrageio. Tradicionalmente, as regulamentações sobre pesticidas consideram apenas os efeitos do envenenamento direto, mas como o dano causado pela toxicidade aguda não é a única ameaça, efeitos subletais como paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais, tanto de curto quanto em longo prazo, estão cada vez mais em foco (van Egelsdorp e Meixner, 2010), a dose subletal, portanto, representa uma ameaça à sobrevivência de toda a colônia da abelha (Basu e Chakrabarti, 2015). Efeitos prejudiciais de inseticidas neurotóxicos, em dosagens subletais, em abelhas foram identificados como na redução na memória olfatória, aprendizado, locomoção e menor capacidade de resposta ao estímulo de sacarose (Aliouane et al., 2009), contaminação, comprometimento da colônia e prejuízo nos serviços de polinização (Stanley et al., 2015).

Os piretroides são uma das principais classes de inseticidas neurotóxicos, a qual é composta por sintéticos análogos aos inseticidas piretrinas naturais, originalmente encontrados nas flores de *Crisantemum cinerifolius* (Davies et al., 2007). O desenvolvimento de piretroides sintéticos é o resultado de modificações na estrutura das piretrinas naturais, a fim de aumentar a fotoestabilidade, mantendo a eficiente atividade inseticida e toxicidade aguda relativamente baixa a mamíferos (Soderlund et al. 2002). Esses inseticidas alteram o funcionamento dos canais de sódio, prolongando a entrada de íons Na^+ para o interior da célula (Santos et al. 2007), especialmente as nervosas, causando paralisia e morte do inseto (Davies et al., 2007).

Existem dois grupos de piretroides com efeitos sintomáticos característicos, denominados Tipo I e Tipo II. Em sua fórmula química, os piretroides Tipo II distinguem-se dos piretroides Tipo I pela presença de um grupo α -ciano na sua estrutura. Em comparação com os piretroides do Tipo I, que exercem sua neurotoxicidade principalmente por interferência na

função dos canais de sódio no sistema nervoso central, os piretroides do Tipo II podem, também, afetar os canais de cálcio e cloreto (He et al., 2008).

O inseticida lambda-cialotrina é um piretroide do tipo II, que penetra a cutícula do inseto, quando aplicado topicamente, interrompendo a condução nervosa em poucos minutos, o que acarreta na interrupção da alimentação, perda do controle muscular, paralisia e eventual morte. Ele pode também atravessar rapidamente, devido à sua natureza lipofílica, membranas biológicas e tecidos (He et al., 2008).

Resíduos de lambda-cialotrina foram encontrados no néctar e pólen de plantas (Choudhary e Sharma, 2008), indicando que abelhas podem ser afetadas pela ingestão do inseticida no ambiente natural. Quando as moléculas de inseticidas são ingeridas, o primeiro órgão em contato com o inseticida é o trato digestivo (Denecke et al., 2018).

O trato digestivo dos insetos pode ser dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Cavalcante e Cruz-Landim, 1999). Em abelhas melíferas, o intestino médio é um importante local na desintoxicação de químicos após a exposição por via oral (Kiljanek et al., 2016).

O intestino médio das abelhas apresenta uma estrutura de tubo cilíndrico, grosso e longo. O seu epitélio é constituído por quatro tipos de células: dois tipos representados por células prismáticas, um tipo está localizado na região anterior ao redor da válvula estomodeal e o outro tipo perfaz todo o restante do epitélio, denominadas células digestivas ou enterócitos. Outros dois tipos de células são representados por células basais, que são as células regenerativas, que se encontram em conjunto (ninho) e as células endócrinas que se localizam de forma isolada (Cruz Landim, 2009).

Embora o intestino médio seja o principal local por onde inseticidas penetram (Denecke et al., 2018), outros órgãos não-alvos dos insetos podem ser afetados pela ingestão do químico quando este atravessa a barreira do intestino médio e é distribuído pela hemolinfa (Dai et al., 2010; Catae et al., 2014).

As glândulas hipofaríngeas são compartilhadas por todos himenópteras, mesmo que apresentando um grau variado no desenvolvimento, e são exclusivas dessa ordem. Nas abelhas, as unidades secretoras dessas glândulas se caracterizam por estruturas globulares, formadas por células que possuem em seu interior um canalículo coletor de secreção e um canal extracelular que dirige a secreção para o local onde ela será descarregada. Em *A. mellifera* essa organização é representada por ácinos pluricelulares formados por inúmeras células secretoras, que

descarregam suas secreções em um canal axial (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). Sua função, nas abelhas melíferas, é muito conhecida e possui um ciclo secretório bem definido relacionado à divisão de trabalho com as operárias nutridoras apresentando o mais alto desenvolvimento produzindo geleia real, enquanto nas forrageiras, a glândula entra em um estágio de pós-secreção e regride (Cruz-Landim e Costa, 1998).

Os inseticidas piretroides afetam tanto o sistema nervoso periférico quanto o nervoso central dos insetos (Davies et al., 2007). O sistema nervoso central nos insetos, é composto pelo cérebro, a cadeia nervosa ventral e o sistema estomogástrico. No cérebro os corpos celulares dos neurônios estão localizados na periferia, enquanto o interior é ocupado pelas regiões de sinapse, caracterizando as neurópilas (Chapman, 2013). Dentre as várias regiões do cérebro, os corpora pedunculata, também conhecidos por corpos pedunculados, correspondem aos principais centros de associação de estímulos recebidos dos olhos, das antenas e da região posterior do corpo. No cérebro das abelhas, essas estruturas pares estão localizadas dorso-lateralmente e são constituídas por duas neurópilas, cada uma, em forma de cálice dos quais partem os pedúnculos que aproximam os cálices na região central (Iwama e Shibuya 1998; Haddad et al. 2004; Cruz Landim, 2009).

Considerando que as abelhas são importantes polinizadores e estão expostas à pesticidas encontrados em doses subletais no campo que podem afetar sua biologia, este estudo avaliou a histopatologia e citotoxicidade causadas no intestino médio, cérebro e glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera* expostas cronicamente à dose subletal do inseticida lambda-cialotrina contribuindo para a compreensão dos efeitos deste químico em baixa dosagem em organismos não-alvos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Abelhas

Quadros de cria de abelhas *A. mellifera* foram coletados no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos à 35 °C em umidade à 70% em estufa incubadora B.O.D para obtenção de operárias recém-emergidas.

2.2 Teste de toxicidade

Para se obter a concentração letal mediana (CL_{50}), o inseticida lambda-cialotrina (KARATE ZEON® 50 CS) foi testado em seis diferentes concentrações. A maior concentração corresponde ao valor da dose de campo recomendada pelo fabricante, para o controle da praga do feijão, Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* raça B), a qual foi sequencialmente dividida por progressão geométrica de fator 2, obtendo-se as seguintes dosagens: 200 µL, 100 µL, 50 µL, 25 µL, 12,5 µL e 6,25 µL. Todas as doses foram diluídas em 50 mL de solução de sacarose a 50 %. Para as abelhas do controle, foi administrado somente a solução de sacarose a 50 %. As soluções contendo o inseticida e o controle foram administradas per os em 30 operárias com três dias de vida adulta em triplicata por 24 h. A CL_{50} do inseticida para as abelhas foi estimada por Probit, utilizando o programa de computador XLStat 7.5.2.

2.3 Exposição crônica

Após a determinação das concentrações letais, as abelhas, recém-emergidas com três dias de idade, foram alimentadas com a CL_{50} diluída 100 vezes ($CL_{50/100}$) em sacarose 50% durante oito dias. Após o terceiro dia de exposição, foi oferecido também pólen para as abelhas do tratamento e do controle. As abelhas do controle receberam somente a solução de sacarose 50%.

2.4 Histologia

As abelhas tratadas cronicamente com o inseticida e controle foram crioanestesiadas a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, dissecadas em NaCl a 125 mM o intestino médio, dividido em região anterior, média e posterior, cérebro e glândula hipofaríngea foram transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h. Em seguida as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e incluídos em historesina Leica. Secções com 2 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz com câmera digital acoplada.

2.5 Ultraestrutura

As abelhas foram dissecadas e o intestino médio, cérebro e glândula hipofaríngea, foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (contendo sacarose à 2%), pH 7,2 por 24 h. Depois de lavados com tampão cacodilato de sódio, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por duas horas. Após nova lavagem em tampão cacodilato de sódio, o material foi desidratado em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebido em resina LR-White. Secções semifinas foram utilizadas para orientação dos cortes ultrafinos, que foram contrastados com acetato de uranila aquosa 2% e citrato de chumbo (Reynolds 1963), examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3 RESULTADOS

A concentração letal (CL_{50}) obtida do inseticida lambda-cialotrina, em suspensão, para a *A. mellifera* foi de $60 \mu\text{L.L}^{-1}$. A CL_{50} foi dividida por cem vezes e a dose subletal resultante do inseticida em suspensão, de $0,6 \mu\text{L.L}^{-1}$, foi utilizada para conduzir a exposição crônica das abelhas neste trabalho.

O intestino médio de *A. mellifera* nas regiões anterior, média e posterior foi caracterizado por um epitélio simples, com células colunares contendo núcleo esférico e borda estriada apical bem desenvolvida, estando o lúmen revestido por camadas de matriz peritrófica (Fig. 1 A-C). Alterações no epitélio do intestino médio de abelhas tratadas com o lambda-cialotrina durante oito dias ocorreram apenas na região posterior do órgão, com a liberação de fragmentos celulares no lúmen do intestino, que estavam presentes em maiores quantidades em relação ao encontrado no controle (Fig. 1).

Assim como na histologia, as análises em microscopia eletrônica de transmissão não foram evidenciadas diferenças nas células digestivas das regiões anterior e média do intestino médio, caracterizadas por microvilosidades longas, citoplasma apical rico em mitocôndria, a região perinuclear rica em retículo endoplasmático rugoso, região basal com invaginação da membrana plasmática associada à mitocôndria (Fig. 2).

As células da região posterior do intestino médio apresentaram microvilosidades apicais bem desenvolvidas (Fig. 3 A) e invaginações de membrana plasmática basal formando um labirinto basal associado com mitocôndrias (Fig. 3 B). Nas abelhas tratadas com o inseticida, foram observados grandes fragmentos celulares com conteúdo finamente granular, aparentemente livre de organelas liberados por entre as microvilosidades (Fig. 3 C), desestruturação na região basal caracterizada por alterações nas mitocôndrias associadas ao labirinto basal com desorganização das cristas (Fig. 3 E) e formação de espaços elétrons-transparentes no citoplasma perinuclear (Fig. 3 D).

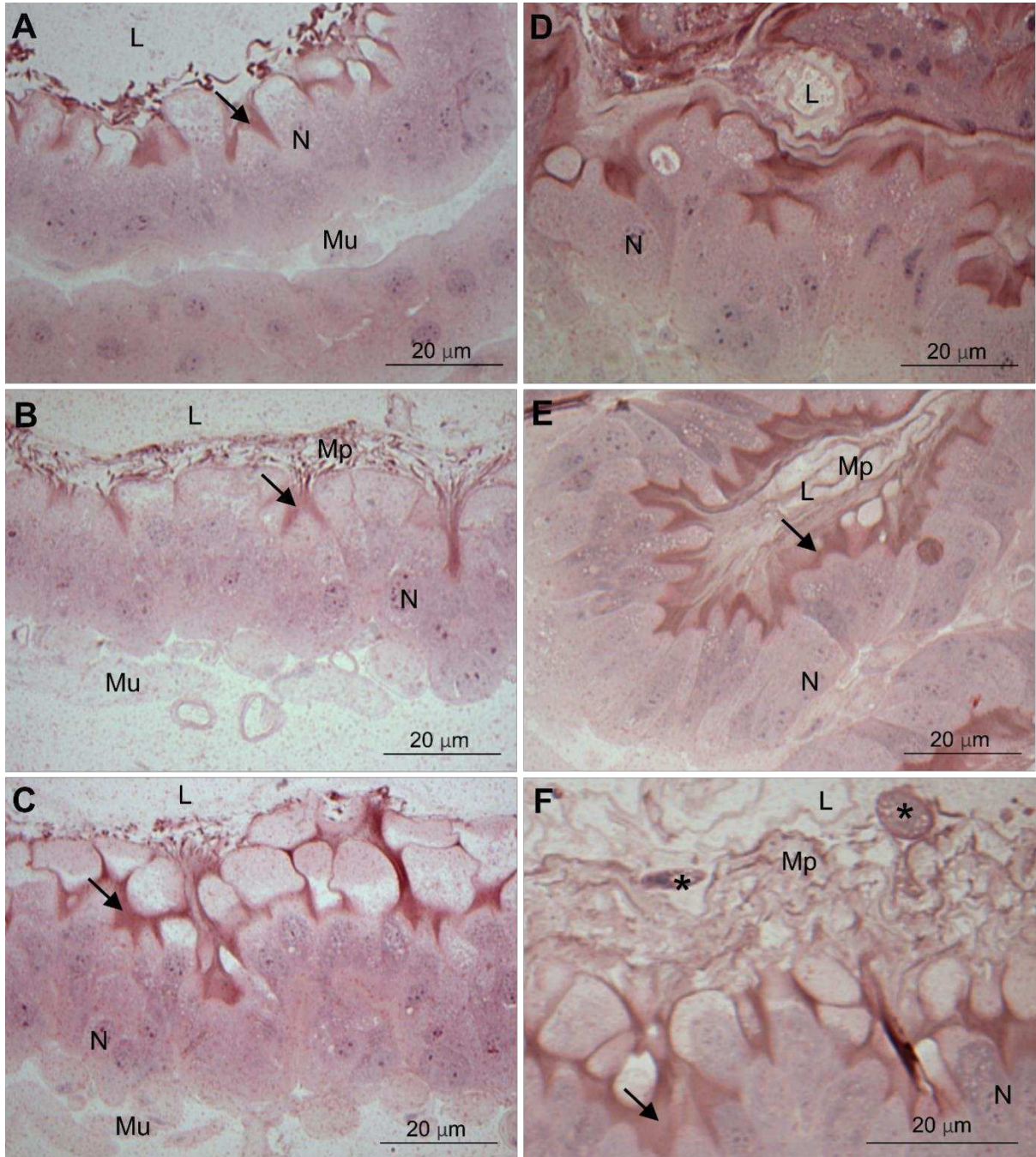


Figura 1. Fotomicrografia do intestino médio de operárias de *Apis mellifera*. A-C. Regiões anterior, média e posterior do grupo controle apresentando epitélio com camada única de células cilíndricas contendo núcleo esférico (N) e porção apical com borda estriada (seta). Note o lúmen (L) com camadas da matriz peritrófica (Mp). D-F. Regiões anterior, média e posterior em abelhas tratadas com lambda-cialotrina, mostrando que nas regiões anterior (D) e média (E) não ocorreram danos celulares, enquanto na posterior (F) ocorreram liberações de restos celulares para o lúmen (*). Mu – músculo.

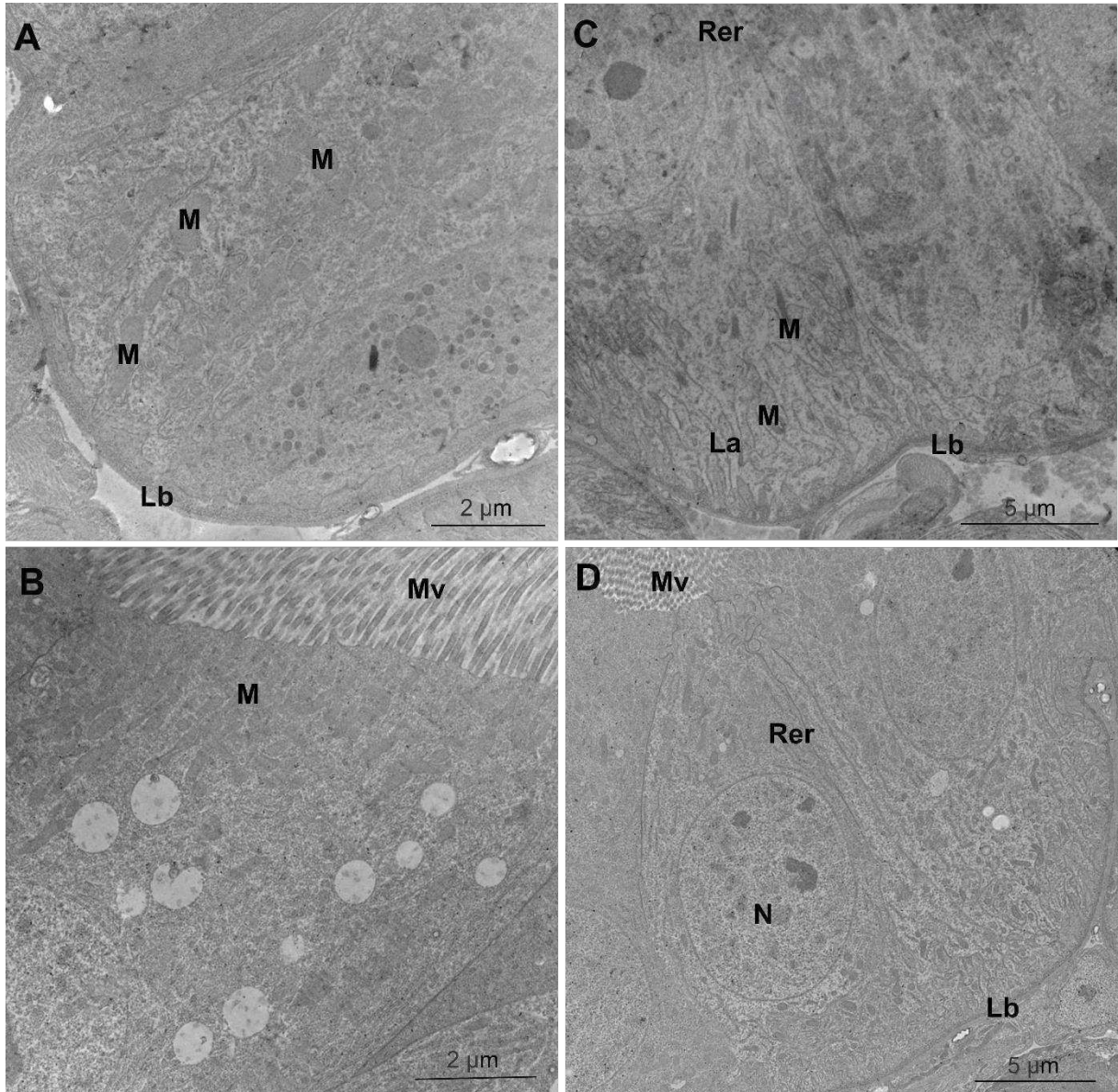


Figura 2. Micrografia eletrônica das regiões anterior e média do intestino médio de *Apis mellifera*. A-B. Controle. A. Região basal da célula da região anterior do intestino médio, contendo mitocôndrias. B. Região apical da célula da região média do intestino médio com microvilosidades apicais e inúmeras mitocôndrias na região citoplasmática adjacente. C-D. Abelhas tratadas com lambda-cialotrina. C. Célula da região anterior do intestino médio, em evidência mitocôndrias associadas ao labirinto basal e retículo endoplasmático rugoso na região perinuclear. D. Célula da região média do intestino médio com retículo endoplasmático rugoso evidente e microvilosidades. M – mitocôndrias. Lb – lâmina basal. Mv – microvilosidades. Rer – retículo endoplasmático rugoso. La – labirinto basal. N – núcleo.

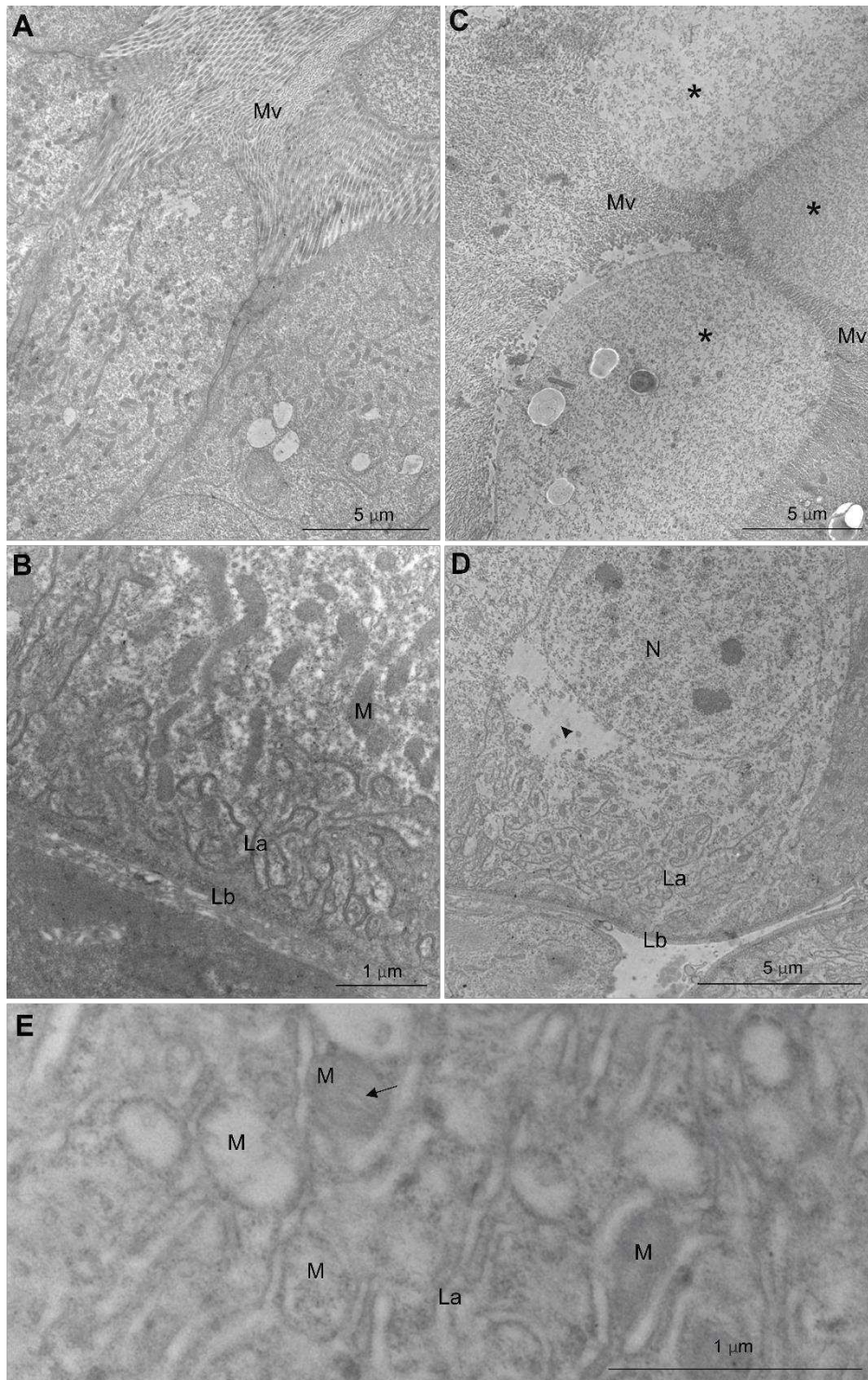


Figura 3. Micrografia eletrônica da região posterior do intestino médio de *Apis mellifera*. A-B. Controle. A. Células com microvilosidades apicais e citoplasma adjacente rico em mitocôndrias. B. Região basal com dobras da membrana formando o labirinto basal (La) curto e associado a mitocôndrias. C-E. Abelhas tratadas com lambda-cialotrina. C. Fragmentos celulares (*) contendo material finamente granular liberados para o lúmen próximos às microvilosidades. D. Região perinuclear mostrando citoplasma com amplos espaços elétron-transparentes (ponta de seta). E. Detalhe do labirinto basal mostrando mitocôndrias com ausência de cristas ou dilatadas (seta). Lb – lâmina basal. N – núcleo. Mv – microvilosidades. M – mitocôndrias.

As glândulas hipofaríngeas das abelhas *A. mellifera* apresentaram células secretoras, que se agrupam em número variado, formando ácinos, pelos quais canais secretores saem em forma de feixe e desembocam juntos no canal axial. O núcleo dessas células estava localizado centralmente com predomínio de cromatina descondensada e alguns grumos de cromatina condensada (Fig. 4). Não houve alterações aparentes na histologia entre as abelhas do controle e as expostas ao tratamento. Entretanto, as análises em microscopia eletrônica de transmissão mostraram variações nas células secretoras das operárias alimentadas cronicamente com lambda-cialotrina. No grupo controle as células secretoras eram ricas em retículo endoplasmático rugoso disposto em forma de cisternas empilhadas (Fig. 5 A-B), bolhas de secreção e vesículas de secreção com conteúdo homogêneo e elétron-denso (Fig. 5 A-C). Nas abelhas tratadas com o inseticida, as vesículas contendo secreção apresentaram o conteúdo periférico mais elétron-denso que aquele central (Fig. 6 A, C-D) e o retículo endoplasmático rugoso em formato vesicular dilatado com conteúdo elétron-transparente, semelhante a microsossomos (Fig. 6 B-D). Apesar das alterações no citoplasma, o núcleo permaneceu intacto com cromatina descondensada e alguns grumos condensados (Fig. 6 E). Algumas células secretoras apresentaram autolisossomos e perda do conteúdo citoplasmático caracterizado por espaços elétron-transparentes. (Fig. 6 F).

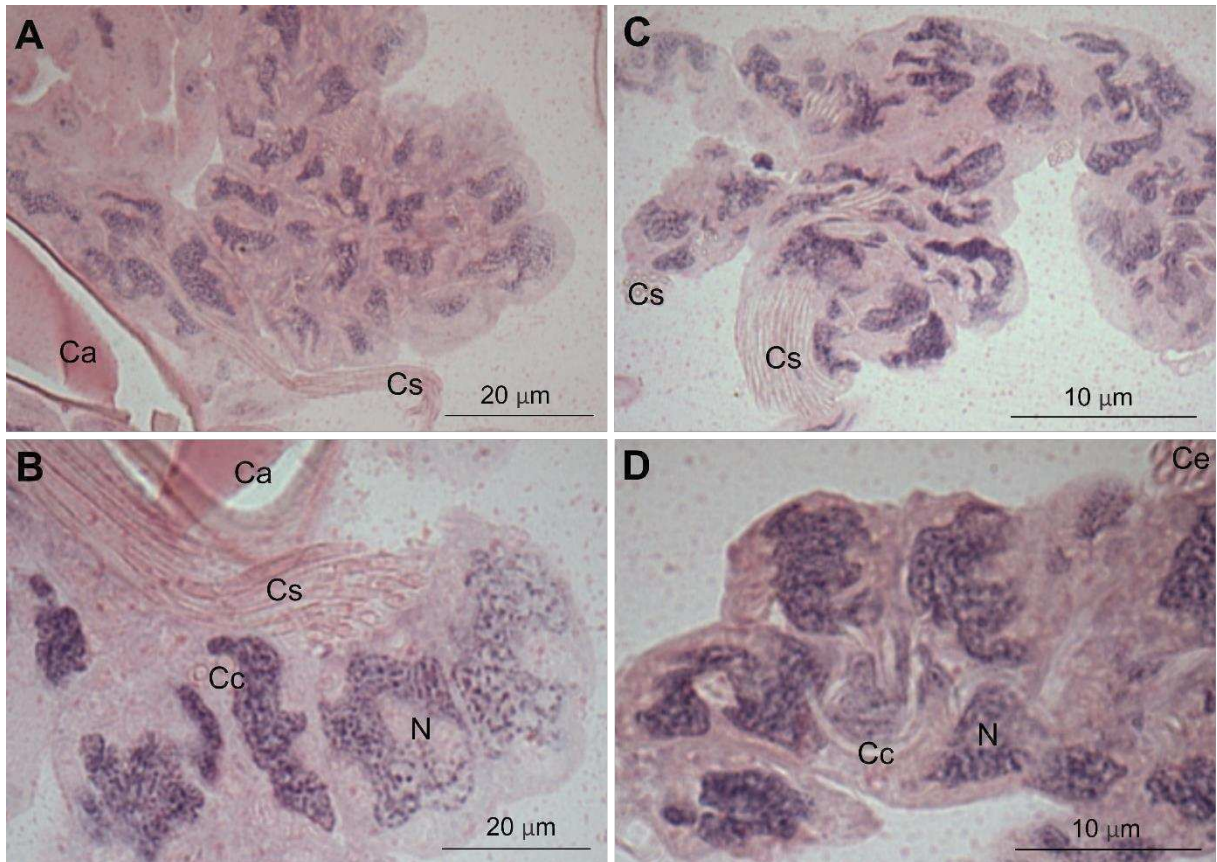


Figura 4. Fotomicrografia das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera*. A-B. Ácinos glandulares do grupo controle compostos por células com núcleo contendo predomínio de cromatina descondensada e grumos de cromatina condensada (N), cada ácino se conecta com o canal axial (Ca) através de feixes de canais secretores (Cs), que estão conectados aos canais coletores (Cc) C-D. Ácinos glandulares do tratamento não apresentaram alterações histológicas.

No cérebro das abelhas do grupo controle, a neurópila se mostrou acidófila com aspecto homogêneo (Fig. 7 A) e os corpos celulares adensados com núcleo rico em cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Fig. 7 B). No grupo tratado com o lambda-cialotrina, a neurópila mostrou intensa vacuolização (Fig. 7 C) e os corpos celulares estavam mais separados com a formação de lacunas entre os mesmos (Fig. 7 D).

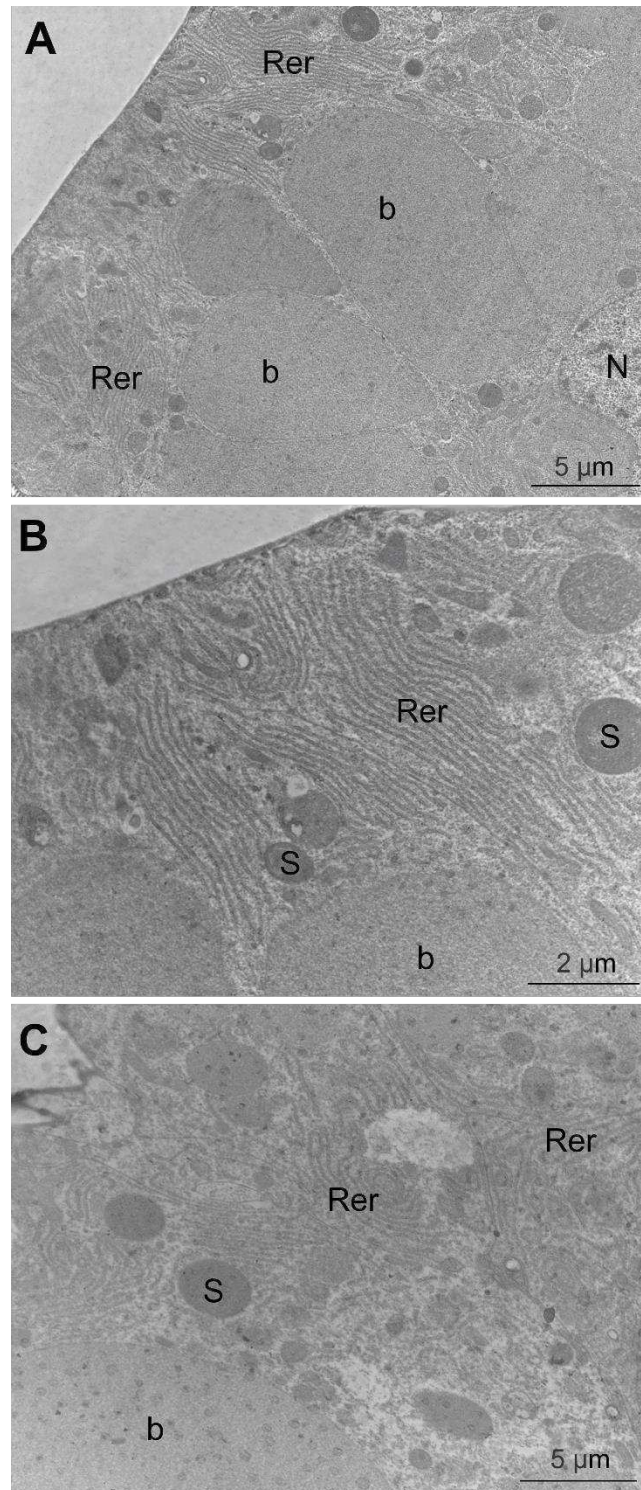


Figura 5. Micrografia eletrônica das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera*. A. Aspecto geral da composição citoplasmática contendo grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Rer) organizados em cisternas empilhadas e bolhas contendo secreção (b). B-C. Destaque para organização do retículo endoplasmático rugoso (Rer) e aspecto uniforme do conteúdo da vesícula de secreção (S). N. núcleo.

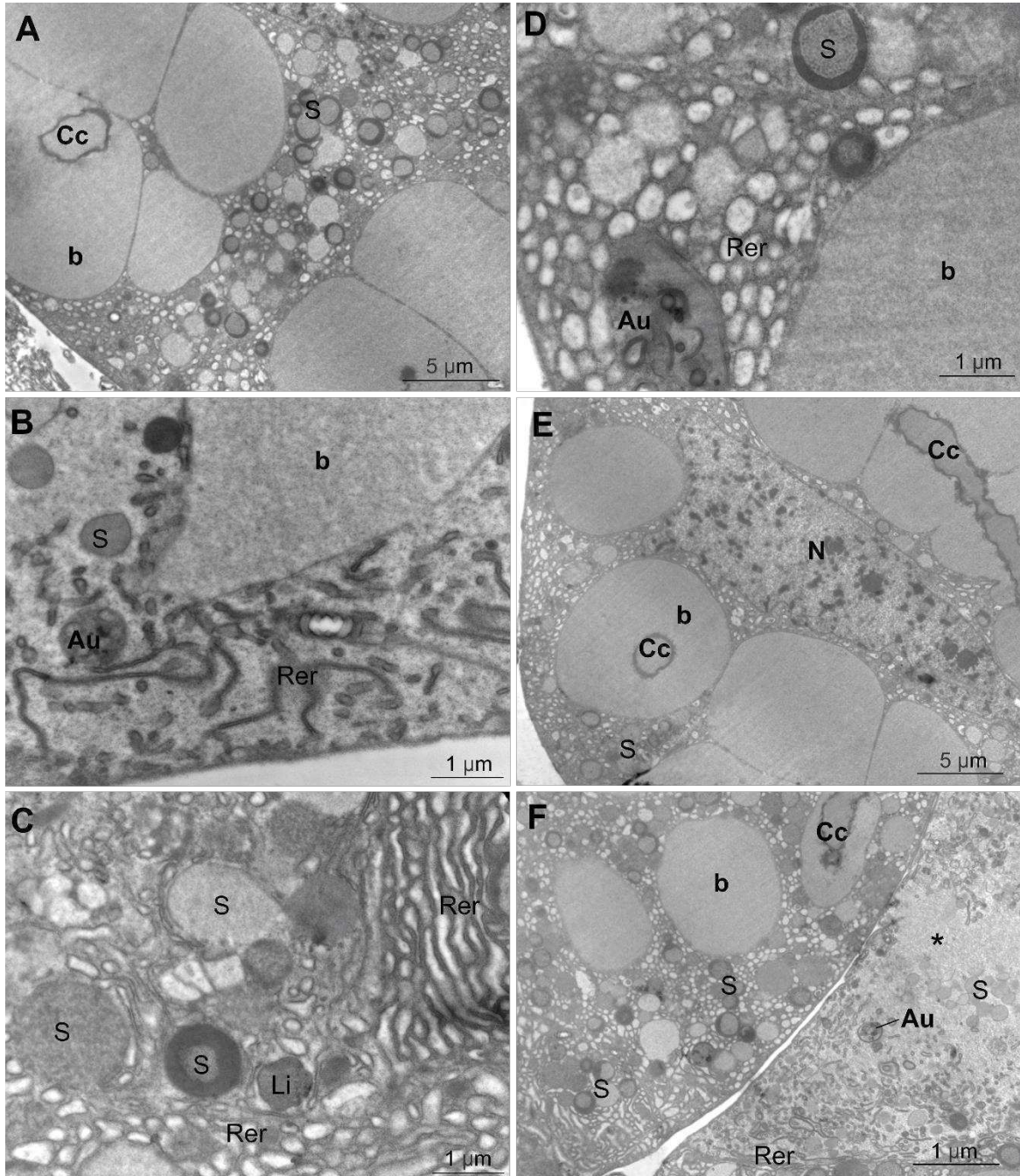


Figura 6. Micrografia eletrônica das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera*. A. Aspecto geral da célula secretora, contendo bolhas (b) e vesículas de secreção (S). B-D. Diferentes intensidade de degradação do retículo endoplasmático. B. Fase inicial das alterações celulares mostrando desorganização das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer) e presença de autolisossomo (Au). C. Fase intermediária do processo de degradação celular, mostrando uma parte do retículo endoplasmático rugoso desfazendo a organização em cisternas, localizado na região superior direita da foto, e outra parte intensamente vacuolizada (Rer), região inferior da foto, e alterações no aspecto das vesículas de secreção. D. Processo de vacuolização avançado, apresentando retículo bem vacuolizado (Rer), presença de autolisossomo (Au). E. Com o tratamento, os núcleos permaneceram sem danos aparentes (N). F. Comparação dos citoplasmas em células em diferentes estágios de morte, à esquerda, célula aparentemente no estágio inicial da degradação, e à direita, célula apresentando avançado estágio de degradação, apresentando citoplasma elétron-transparente e intensa vacuolização do retículo endoplasmático rugoso. Cc – canal coletor. Li – lisossomo.

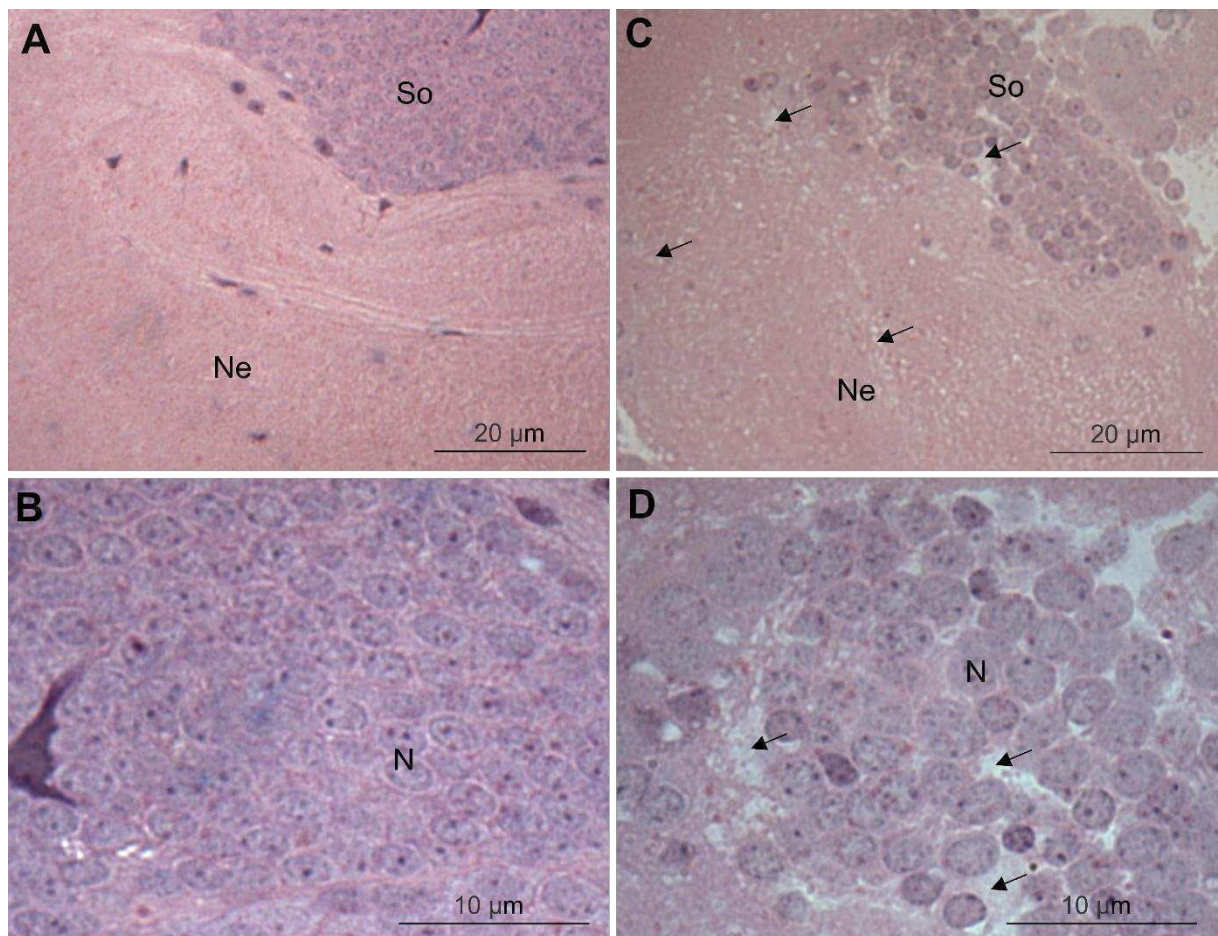


Figura 7. Fotomicrografia dos corpos pedunculados de *Apis mellifera*. A-B. Controle. A. Neurópila (Ne) do cálice com corpos celulares dos neurônios (So). B. Detalhe dos corpos celulares com núcleos esféricos (N). C-D. Grupo Tratamento. C. Região do cálice apresentando neurodegeneração severa (setas). D. Detalhe dos corpos celulares mostrando regiões com lacunas (setas).

Em nível subcelular, a região dos corpos celulares dos neurônios das abelhas controle apresentou um núcleo esférico bem desenvolvido rico em cromatina descondensada e algumas mitocôndrias no citoplasma (Fig. 8 A-B). Na região da neurópila, os prolongamentos dos neurônios evidenciaram mitocôndrias esféricas com muitas cristas (Fig. 8 C). Nas abelhas tratadas com inseticida, os neurônios apresentaram regiões citoplasmáticas desestruturadas com formação de espaços elétron-transparentes (Fig. 8 D), indicativo de morte celular, grânulos de secreção com conteúdo elétron-transparente (Fig. 8 E), mas os núcleos inalterados (Fig. 8 D-E). Os prolongamentos neuronais na neurópila apresentaram mitocôndrias em degeneração, caracterizadas por dilatações nas cristas, ou ainda sua completa desestruturação (Fig. 8 F).

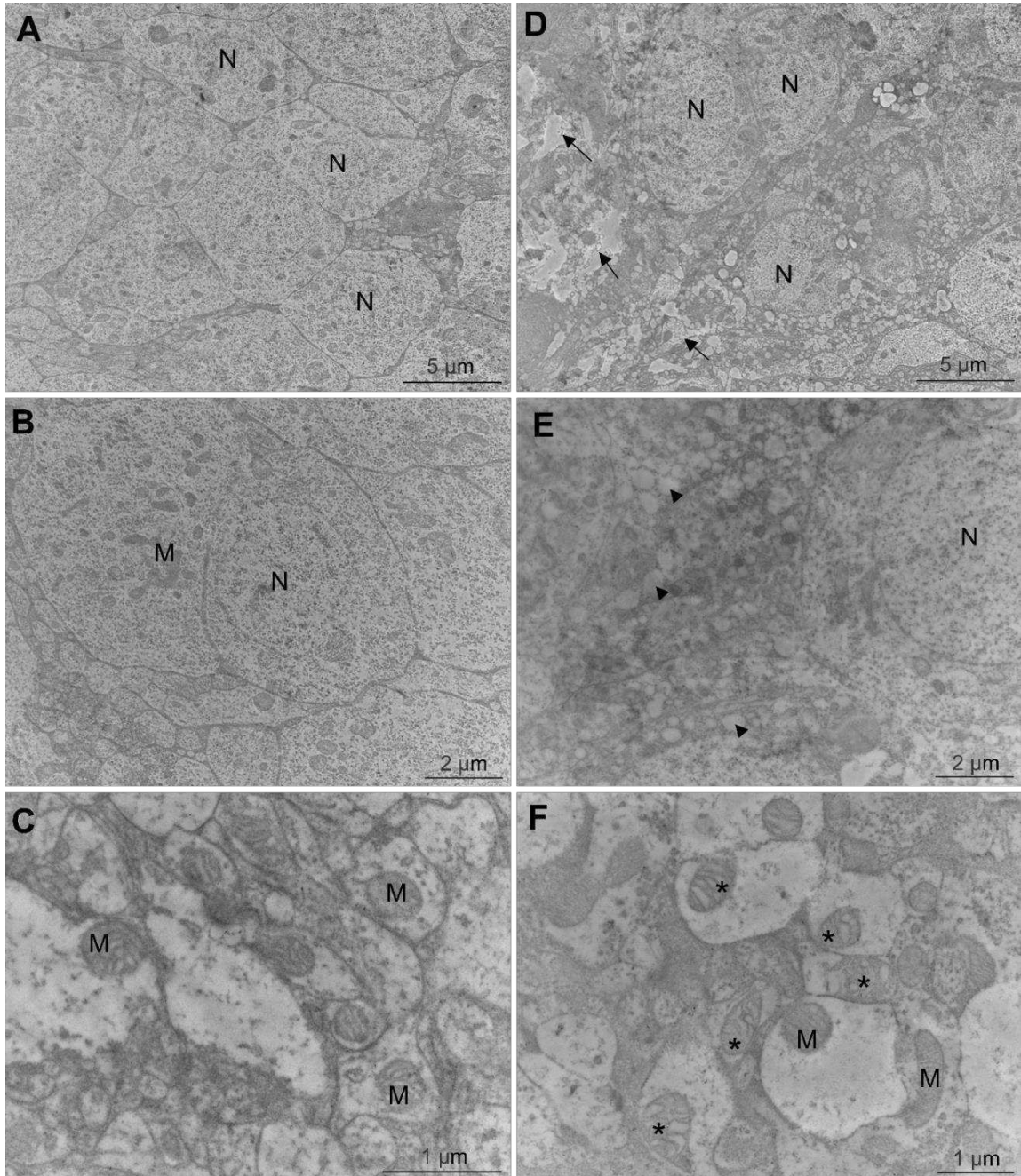


Figura 8. Micrografia eletrônica dos corpos pedunculados de *Apis mellifera*. A-C. Grupo controle. A. Visão geral do somata, mostrando células volumosas com núcleo central esférico (N). B. Detalhes do corpo celular contendo mitocôndrias (M) e pouca quantidade de grânulos de secreção. C. Região da neurópila, evidenciando as mitocôndrias (M) contidas nos prolongamentos dos neurônios. D-F. Grupo tratado com inseticida. D. Visão geral do somata, mostrando danos no citoplasma (setas), note que os núcleos não foram alterados com o tratamento (N). É possível notar numerosos grânulos de secreção (pontas de seta), que estão ausentes no grupo controle. F. Região da neurópila apresentando prolongamentos de neurônios contendo mitocôndrias em degeneração (*).

4 DISCUSSÃO

As células do intestino médio de *A. mellifera* alimentadas com a $CL_{50/100}$ de lambda-cialotrina por oito dias não foram afetadas nas regiões anterior e média. No entanto, houve um aumento pronunciado no desgaste celular na região posterior do órgão, evidenciado pela maior frequência de restos celulares liberados para o lúmen. A metabolização de lambda-cialotrina no intestino pela enzima P450 já foi verificada por Pilling et al. (1995). O sucesso da imobilização do inseticida pela provável atividade dessa enzima na desintoxicação celular pode explicar a ausência de danos nas células na região anterior e média deste órgão após a ingestão do inseticida. Enquanto o intenso desgaste na região posterior pode estar relacionado com a maior atividade de absorção que ocorre nessa área do intestino médio de *A. mellifera* (Jimenez e Guillian, 1990), pois embora pouco se saiba como pequenas moléculas de inseticidas, como piretroides, penetram o epitélio do intestino e atingem a hemocele do inseto, isso pode ocorrer por difusão transcelular, por proteínas transportadoras, pela via paracelular devido às características lipofílicas desses inseticidas e seu pequeno peso molecular, eles podem se difundir facilmente através da membrana plasmática das células epiteliais do intestino médio e ou atravessar as junções septadas entre as células chegando à hemolinfa (Denecke et al., 2018). Desse modo, a facilidade de absorção de moléculas de inseticidas piretroides associado ao extenso labirinto basal formado pelas invaginações da membrana plasmática das células digestivas localizadas na região posterior, que apresenta alta atividade de absorção do conteúdo luminal para a hemolinfa (Serrão e Cruz Landim, 1995; 1996, 2000), indica que a interação célula-inseticida pode ser maior nessa região, tanto pela maior absorção do lúmen quanto pelo maior contato da membrana plasmática com a hemolinfa, resultando em maior dano celular. Além disso, o intestino de *A. mellifera* tem a atividade absorptiva e secretora estimulada em situações em que as células são expostas a patógenos e tóxicos, causando desgaste mais rápido das células que são, então, eliminadas para lúmen, prejudicando a longevidade da abelha (Catae et al. 2014).

Os resultados aqui obtidos mostram que as células das glândulas hipofaríngeas também são afetadas pela exposição crônica à dose subletal do lambda-cialotrina e apresentam grande quantidade de dilatações no retículo endoplasmático rugoso. Embora a formação de microsomos contendo enzimas de desintoxicação possa estar relacionada a uma dilatação do retículo endoplasmático rugoso e liso (Nakatsugawa e Morelli, 1976), as alterações do retículo

endoplasmático rugoso nas glândulas hipofaríngeas, submetidas ao tratamento com o inseticida, parecem estar mais relacionadas a uma degeneração celular do que um processo de desintoxicação, devido a ocorrência simultânea de processos de morte celular.

Além das mudanças no retículo endoplasmático rugoso, as células das glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* exposta ao inseticida mostram vacúolos, vesículas de secreção com conteúdo heterogêneo e autolisossomos, sugerindo um possível processo de morte celular mediado por necrose, como reportado por Silva-de-Moraes e Bowen (2000) durante a degeneração dessa glândula em operárias campeiras. No entanto, as alterações nas glândulas hipofaríngeas iniciam em operárias com idade aproximada de 15 dias (Halberstadt, 1966; Halberstadt, 1980; Silva-de-Morais e Bowen). As abelhas, deste estudo, alimentadas com lambda-cialotrina com 11 dias de idade, portanto, podem sofrer degeneração prematura nas células da glândula hipofaríngea, seguindo o mesmo processo de morte que ocorre naturalmente nessas células.

Danos às glândulas hipofaríngeas também foram identificados em abelhas contaminadas por patógenos como *Nosema apis* (Wang e Moeller, 1971) e *Varroa destructor* (Pinto et al., 2011). Como no ambiente natural, as abelhas podem estar expostas aos diversos tipos de contaminação e a interação entre esses fatores com os danos ocorridos por exposição ao lambda-cialotrina pode ocorrer, é esperado um maior comprometimento da função exercida por essas glândulas e por consequência, prejuízos para toda colônia.

Nas operárias expostas ao inseticida, a região dos corpora pedunculata mostra sinais evidentes de neurodegeneração nos corpos celulares dos neurônios e na neurópila, que contém mitocôndrias apresentando indícios de degeneração. Danos nas mitocôndrias dos neurônios ocorrem em operárias de *A. mellifera* expostas à dose subletal do inseticida neurotóxico imidaclopride (Catae et al. 2017).

Alterações nas mitocôndrias, como encontrado nos prolongamentos de células nervosas neste trabalho, podem indicar processos de morte celular (Sims e Muyderman, 2010; Wang e Chen, 2015). Liao et al. (2018) relatam redução na longevidade, aprendizado e no desempenho da memória de *A. mellifera* quando expostas a doses subletais de lambda-cialotrina. Pelo fato da região dos corpora pedunculata estar envolvida em funções como aprendizado, memória e comportamento social (Menzel et al., 1988), a perda de células nesta região, como indicado neste estudo, a partir da exposição por lambda-cialotrina, pode estar relacionada aos efeitos negativos desse inseticida na longevidade e no comportamento da abelha.

5 CONCLUSÃO

Os danos nas abelhas *A. mellifera*, verificados neste trabalho após a exposição crônica e dosagens subletais de lambda-cialotrina, indicam que esse inseticida, nessa concentração, pode prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos da colônia. Como a organização das atividades na colônia dependem de todos indivíduos, essas alterações podem afetar a colônia como um todo. Nesse sentido, a liberação comercial de novos compostos deveria também compreender melhor os efeitos desses compostos a longo prazo em insetos benéficos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honey bees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, p. 113–122, 2009.
- ANDERSON T.D; LYDY M.J. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.21, p.1507-1514, 2002.
- ATKINS, E.L. Injury to honey bee by poisoning. J.E. Graham (Ed.), *The Hive and the Honey Bee*, Dadant and Sons, Hamilton, p.1153-1208, 1992.
- BEKIĆ, B.; JELOČNIK, M.; SUBIĆ, J. Honey bee colony collapse disorder (*Apis mellifera* L.) - possible causes. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, v.14, p.13-8, 2014.
- BASU, P.; CHAKRABARTI, P.B. Sub-lethal effects of pesticides on pollinators with special reference to honey bees. P.A. Sinu, K.R. Shivanna (Ed), *Mutualistic interaction between flowering plants and animals*, Manipal University, p.174-189, 2015.
- BULA. Karate Zeon 50 CS. Disponível em: https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/karate_zeon_50_.pdf?token=1562329020. Acesso em: 10. jul. 2019.
- CATAE, A. F. et al. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy Research and Technique*, v. 77, p. 274-281, 2014.
- CATAE, A. F. et al. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology*, v. 27, p. 109-121, 2018.
- CAVALCANTE, V. M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*, v. 24, p. 19-40, 1999.
- CHAPMAN, R. F. *The Insects: Structure and Function*. 5 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 929 p., 2013.
- CHOUDHARY, A.; SHARMA, D. C. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 144, p. 143-150, 2008.
- COX-FOSTER, D.L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, v.318, p.283-287, 2007.
- CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: UNESP. 408 p., 2009.

- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP. 194 p., 2002.
- CRUZ-LANDIM, C.; COSTA, R. A. C. Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. *Journal of Comparative Biology*, v. 3, p. 151-63, 1998.
- DAI, P. L. et al. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honey bee *Apis mellifera ligustica*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, p. 644-649, 2010.
- DAVIES, T. G. E. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, v. 59, p. 151-162, 2007.
- DENECKE, S. et al. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 103, p. 22-35, 2018.
- FAROOQUI, T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*, v.62, p. 122-136, 2013.
- HADDAD, D. et al. NMR imaging of the honeybee brain. *Journal of Insect Science*, v. 4, 2004.
- HALBERSTADT, K. Über die Proteine der Hypopharynxdrüse der Bienenarbeiterin. I. Elektrophoretischer Vergleich von Sommer-, Winter- und gekäfigten Bienen. *Ann. Abeille*, v. 9, p. 153-163, 1966.
- HALBERSTADT, K. Elektrophoretische Untersuchungen zur Sekretionstätigkeit der Hypopharynxdrüse der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, v. 27, p. 61-77, 1980.
- HE, L. M. et al. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. D.M. Whitacre (Ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York, NY, p. 71-91, 2008.
- IWAMA, A.; SHIBUYA, T. Physiology and morphology of olfactory neurons associating with the protocerebral lobe of the honeybee brain. *Journal of Insect Physiology*, v. 44, p. 1191-1204, 1998.
- IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, v.23, p.371-378, 2004.
- JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell and Tissue Research* v.261, p.431-443, 1990.
- JOHNSON, R. Honey bee colony collapse disorder. Washington: Congressional Research Service, 2010.

- KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human & Experimental Toxicology*, v. 30, p. 1119-1140, 2011.
- KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; POSYNIAK, A. Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science*, v. 60, p. 5-24, 2016.
- KLEIN, A. M.; et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, v.274, p.303-313, 2007.
- LIAO, C. H. et al. 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*, v. 75, p. 59-65, 2018.
- NAKATSUGAWA, T.; MORELLI, M. A. Microsomal oxidation and insecticide metabolism. C. F. Wilkinson (Ed.), *Insecticide biochemistry and Physiology*. Springer, Boston, MA, p. 61-114, 1976
- PILLING, E. D. et al. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 51, p. 1-11, 1995.
- PINTO, Fábio de Assis et al. Parasitic effects of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) on hypopharyngeal glands of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* v. 58, p. 769-778, 2011.
- PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.51, p.422-442, 2016.
- POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, v.25, p.345-353, 2010.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v.17, p.208-212, 1963.
- RAY, D. E.; RICHARDS, P. G. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*, v.120, p.343-351, 2001.
- ROTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, v.36, p. 71-83, 2005.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretroides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.18, p. 339-349, 2007.

- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* v.83, p.229-235, 1995.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*, v.17, p.1-6, 1996.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *Journal of Apicultural Research*, v.39, p. 9-17, 2000.
- SILVA DE MORAES, R. L. M.; BOWEN, I. D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biology International*, v. 24, p. 737-743, 2000.
- SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science Research*, v.22, p. 5-34, 2015.
- SIMS, N. R.; MUYDERMAN, H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, v. 1802, p. 80-91, 2010.
- SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, v. 171, p. 3-59, 2002.
- SOUTHWICK E. E.; SOUTHWICK L, JR. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology*, v.85, p.621–633, 1992.
- STANLEY, D. A. et al. Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. *Nature*, v. 528, p. 548, 2015.
- STEFANINI, M., DE MARTINO, C., ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, v.216, p.173–174, 1967.
- VAN ENGELSDORP, D. et al. Fall-Dwindle Disease: A preliminary report. CCD Working Group, 2006. Disponível em: <<http://maarec.cas.psu.edu/ColonyCollapseDisorderInfo.html>>. Acesso em: 26. jun. 2018.
- VAN ENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. *Plos One*, v.4, e6481, 2009.
- VAN ENGELSDORP, D.; MAIXNER M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.103, p.80-95, 2010.
- VAN ENGELSDORP, D., TRAYNOR, K.S., ANDREE, M., et al. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *Plos One*, v. 12, p. 1-23, 2017.

WANG, Der-I.; MOELLER, F. E. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 17, p. 308-320, 1971.

WANG, X.; CHEN, X. J.. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature*, v. 524, p. 481, 2015.

WILLIAMS, I. H. Insect pollination and crop production: a European perspective. *Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Ministry of Environment, Brasilia, p.59-65, 2002.