

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/03/2020.

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

**PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DO TECIDO  
NERVOSO DE ABELHA *Apis mellifera* AFRICANIZADA**

**PATRICIA AZEVEDO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do *campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP  
Fevereiro  
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS –  
RIO CLARO



PATRICIA AZEVEDO

**PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DO TECIDO  
NERVOSO DE ABELHA *Apis mellifera* AFRICANIZADA**

Orientadora: Roberta C. F. Nocelli  
Co-Orientador: Osmar Malaspina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do *campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP  
Fevereiro  
2018

595.799 Azevedo, Patricia  
A994p Padronização do cultivo in vitro do tecido nervoso de  
abelha *Apis mellifera* africanizada / Patricia Azevedo. - Rio  
Claro, 2018  
73 f. : il., figs., tabs., quadros

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
Coorientador: Osmar Malaspina

1. Abelhas. 2. Corpo pedunculado. 3. Células de Kenyon.  
4. Meio de cultura Grace. 5. Meio de cultura Schneider. 6.  
Meio de cultura Leibovitzs. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

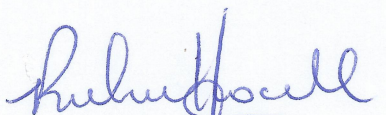
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO IN VITRO DO TECIDO NERVOSO DE ABELHA *Apis mellifera* AFRICANIZADA

**AUTORA: PATRICIA AZEVEDO**

**ORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI**

**COORIENTADOR: OSMAR MALASPINA**

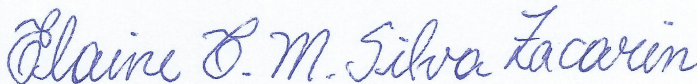
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI  
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar - ARARAS



Prof. Dr. FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA  
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista



Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN  
Departamento de Biologia / UFSCar - Sorocaba

Rio Claro, 06 de março de 2018

**Dedico este trabalho ao meu companheiro  
Luciano pelas incansáveis contribuições e a  
todos que fizeram parte dessa história, direta ou  
indiretamente, sem vocês a caminhada não seria  
tão significativa.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me apoiaram nas minhas escolhas e auxiliaram para que elas se concretizassem.

Aos meus avós e familiares pelo incentivo e, principalmente, à minha tia Alexandra que não mediu esforços para nos ajudar em todas as nossas andanças pelo estado.

Aos meus amigos Rodrigo, Erika, Maria Carolina e Nayla que me incentivaram e acreditaram em mim desde o princípio da minha jornada acadêmica. Obrigada pelo carinho e amizade e, mesmo com a distância, saibam que continuam sendo meus exemplos.

Às minhas amigas irmãs, as quais conheci na jornada acadêmica, Cristiane, Nicole e Paula. Obrigada por continuarem fazendo parte da minha vida, me visitarem sempre, ouvir meus desabafos, compartilhar leituras e sorrisos.

Ao Cesar, por ser nossa família em Rio Claro e dividir com a gente momentos bons e ruins, obrigado pelo companheirismo, por todas as séries e filmes compartilhados, comidas inventadas e reproduzidas, pelos auxílios nas manutenções da casa e pelas risadas.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos do LECA pelo companheirismo no laboratório e por compartilharem de seus conhecimentos. Ofereço ainda, um agradecimento especial a minha mais nova amiga, companheira de trabalho e fiel escudeira Nicole Butolo. Você sabe que sem sua ajuda metade disso não seria possível, obrigada por compartilhar da minha loucura. Ao Vitor que aprendeu me ajudando.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma pela concessão das instalações do laboratório para realização desse trabalho.

Aos excelentes educadores com quem tive o privilégio de aprender.

À minha professora e orientadora Roberta Nocelli, que tenho como exemplo de profissional e educadora. Obrigada pelos conhecimentos enriquecedores compartilhados, pela paciência e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Ao meu co-orientador Osmar Malaspina pelas contribuições.

Aos meus parceiros de profissão Elaine, Caio, Thaisa e Franco, com quem pude discutir muitas ideias e solucionar muitas dúvidas. E, principalmente a Hellen que auxiliou em todas as análises e deu diversas contribuições.

Aos técnicos Necis, Bibiana, Gerson, Sérgio e Cris pelo auxílio nas coletas, execução de técnicas e dúvidas em geral.

Ao Luciano, companheiro excepcional, obrigada pelo carinho e atenção, por aguentar minhas ansiedades e incertezas e não medir esforços para auxiliar no meu trabalho para que tudo saísse do meu jeito. Te amo! Ao meu filho de quatro patas Estopinha, por ser a alegria da nossa casa e da nossa família e por me tranquilizar nos momentos de ansiedade com seus lambeijos e suas brincadeiras.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos.



“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu  
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações  
E assim ter amigos contigo em todas as situações

A gente não pode ter tudo  
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?  
Por isso eu prefiro sorrisos  
E os presentes que a vida trouxe para perto de mim”

Ana Vilela

## **RESUMO**

As abelhas são importantes agentes polinizadores que auxiliam na manutenção da biodiversidade de plantas silvestres e cultivadas. Contudo, o uso exacerbado e indevido de agrotóxicos tem causado um desequilíbrio na população destes insetos que ao visitarem as flores para coleta de pólen e néctar, são expostos a diferentes substâncias químicas. Sendo assim, o presente estudo buscou padronizar um método de cultivo *in vitro* de tecido nervoso de abelha *Apis mellifera* africanizada. Para isso testaram-se os meios de cultura Grace, Schneider e Leibovitz's e suas suplementações com 10% de Soro Fetal Bovino, 40% de Hank's Balance Salt Solution e 10% de Insect Medium Supplement individualmente ou em conjunto. Os resultados obtidos mostraram que o meio Leibovitz's suplementado com 40% de Hank's Balance Salt Solution e o meio Leibovitz's suplementado com 40% de Hank's Balance Salt Solution e 10% de soro fetal bovino são potenciais meios para o cultivo de tecido nervoso uma vez que apresentaram um menor desarranjo tecidual, contudo tais meios apresentaram uma alta taxa de células fortemente coradas, indicando picnose e, portanto, morte celular. Sendo assim, posteriores suplementações são necessárias para a obtenção de um meio ideal para o cultivo de tecido nervoso de *A. mellifera* africanizada.

**Palavras-chave:** corpo pedunculado, células de Kenyon, meio de cultura Grace, meio de cultura Schneider, meio de cultura Leibovitz's L-15.

## **ABSTRACT**

Bees are important pollinators that help to maintain the biodiversity of wild and cultivated plants. However, the exacerbated and undue use of agrochemicals has caused an imbalance in the population of these insects that when visiting flowers for the collection of pollen and nectar, are exposed to different chemical substances. In addition, the toxicity tests used for the release and certificate of pesticides have been widely questioned by the scientific community due to the use of a large number of individuals (bees) for its accomplishment. Thus, the present study sought to standardize a method of *in vitro* culture of nervous tissue of *Apis mellifera*. For this the Grace, Schneider and Leibovitz's culture media and their supplements with 10% of fetal bovine serum, 40 % of Hank's Balance Salt Solution and 10 % of Insect Medium Supplement were tested individually or in combination. The results obtained showed that Leibovitz's media supplemented with 40 % of Hank's Balance Salt Solution and Leibovitz's medium supplemented with 40% of Hank's Balance Salt Solution and 10% of fetal bovine serum are potential media for the cultivation of nervous tissue since they presented a smaller tissue disarrangement, however such means presented a high rate of heavily stained cells, indicating pyknosis and thus cell death. Therefore, subsequent supplements are necessary to obtain an ideal medium for the cultivation of Africanized *A. mellifera* nerve tissue.

**Keywords:** mushroom bodies, Kenyon cells, Grace culture medium, Schneider culture medium, Leibovitz's culture medium.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>3.1 Material Biológico</b> .....	18
<b>3.2 Dissecção e cultivo <i>in vitro</i> de tecido nervoso</b> .....	18
<b>3.3 Testes para evitar contaminação</b> .....	21
<b>3.3.1 Assepsia da abelha</b> .....	22
<b>3.3.2 Padronização do antibiótico</b> .....	22
<b>3.4 Preparo dos meios de cultura</b> .....	23
<b>3.4.1 Preparo do meio de cultura para insetos Grace</b> .....	23
<b>3.4.2 Preparo do meio de cultura para insetos Schneider</b> .....	24
<b>3.4.3 Preparo do meio de cultura para insetos Leibovitz's L-15</b> .....	24
<b>3.5 Avaliação dos testes de assepsia da abelha e padronização do antibiótico para verificação de contaminação</b> .....	25
<b>3.6 Avaliação da morfologia e viabilidade celular</b> .....	25
<b>3.6.1 Análises Morfológicas</b> .....	26
<b>3.6.1.1 Inclusão em historresina e microtomia para coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)</b> .....	26
<b>3.6.1.2 Avaliação da morfologia e viabilidade celular - Técnica Hematoxilina e Eosina (HE)</b> .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1 Testes de contaminação e padronização do antibiótico</b> .....	30
<b>4.2 Avaliação da morfologia e viabilidade celular</b> .....	32
<b>4.2.1 Tempo: 1 hora</b> .....	32
<b>4.2.2 Tempo: 6 horas</b> .....	36
<b>4.2.3 Tempo: 12 horas</b> .....	40
<b>4.2.4 Tempo: 24 horas</b> .....	44
<b>4.3 Análises de correlação e comparação entre os resultados obtidos</b> .....	57
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Os serviços realizados pelos polinizadores fazem-se essenciais à manutenção dos ecossistemas terrestres e são de crucial importância para a sociedade, uma vez que eles atuam na produção e manutenção de culturas agrícolas e na conservação da diversidade biológica. Os insetos são responsáveis pela polinização da grande maioria das espécies de plantas com flores do mundo, sendo as abelhas os principais representantes, somando aproximadamente 40% de todos os polinizadores existentes (IBAMA, 2012).

O fato de as abelhas somarem um elevado número de representantes dentre os polinizadores pode ser atribuído a sua elevada dependência das flores. Dentre os recursos florais utilizados pelas abelhas pode-se citar o néctar e o pólen diretamente relacionados à alimentação, resinas, ceras e lipídios florais para construção do ninho, sendo o último utilizado também como alimento, e as fragrâncias florais, utilizadas como atrativo para a cópula e para a demarcação de território. Vale ressaltar que o pólen é a principal fonte de proteínas das abelhas tornando-se imprescindível para o seu desenvolvimento e para a manutenção de suas colmeias (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES, 2007).

A riqueza e variedade de abelhas são notáveis, chegando a somar 20.000 espécies em todo o mundo. Destas, aproximadamente 2.500 espécies são encontradas no Brasil, onde estão distribuídas em cinco famílias, sendo que dentro de cada uma muitos gêneros e espécies são representados com características próprias e papéis na natureza de crucial importância (SILVA et al., 2014).

Um desses papéis é a manutenção da variabilidade genética dos vegetais por meio da reprodução sexuada. Este processo chamado de serviço ecossistêmico de polinização vem sendo muito valorizado atualmente, principalmente os prestados pelas abelhas no que diz respeito a plantas silvestres e cultivadas (CASTRO et al., 2006).

Um exemplo desse serviço é evidenciado pelo agronegócio, que atualmente é responsável por 21,3% de todo rendimento gerado pela economia brasileira, onde a contribuição econômica dos polinizadores nas principais culturas comercializadas, tanto para exportação, como para o mercado interno é substancialmente elevada (CEPEA, 2014). De acordo com Giannini (2015) de 141 culturas avaliadas no país, 85 delas dependem de polinizadores. Além disso, o valor atribuído a esse serviço ecossistêmico, prestado de forma gratuita é de U\$\$ 12 bilhões ao ano.

Devido a sua relevância como polinizadoras, as abelhas têm sido destaque nos estudos que avaliam o impacto causado pela intensificação agrícola e pelo uso de agrotóxicos. Tais práticas, somadas à ocupação intensiva de terras, acentuam a redução das fontes de alimentos e locais de nidificação desses polinizadores (EMBRAPA, 2015).

O uso exacerbado de agrotóxicos nos agroecossistemas pode ocasionar o desequilíbrio das populações de abelhas que visitam estes locais, ingerem néctar ou pólen contaminados ou absorvem esses compostos químicos através da cutícula ou espiráculos, prejudicando a manutenção da biodiversidade das próprias abelhas, além das plantas e todos os serviços essenciais prestados pelas mesmas. Tal desequilíbrio é potencializado quando o uso destes agrotóxicos é realizado de maneira inadequada. Dentre os agrotóxicos, merecem especial atenção os inseticidas, uma vez que as abelhas são insetos e, portanto, altamente vulneráveis. O Brasil é o maior consumidor mundial de inseticidas, sendo que os mesmos somaram 39,8% (US\$ 4,55 bilhões) das receitas totais de vendas no país em 2013 (FERREIRA, 2014).

A maioria dos inseticidas utilizados atualmente tem como principal alvo de ação o Sistema Nervoso Central e Periférico (SNC e SNP), sendo considerados neurotóxicos. Eles apresentam diferentes mecanismos de ação, mas o resultado final basicamente é o

mesmo: hiperexcitação, paralisia e conseqüente morte do inseto. Para doses ou concentrações subletais, as quais não causam a morte imediata, mas sim alterações na morfofisiologia dos insetos, os efeitos também se mostram danosos para a população de abelhas, assim como para a manutenção de suas colônias, uma vez que causam alterações comportamentais, de aprendizagem e de orientação que podem ter efeito a longo prazo para tais indivíduos (LEWIS et al., 2007). Tais alterações morfofisiológicas ocorrem principalmente no SNC das abelhas, mais especificamente no cérebro, uma vez que o cérebro é o principal centro de associação do corpo, já que recebe estímulos sensoriais dos órgãos dos sentidos e, por meio de neurônios ascendentes, recebe estímulos a partir dos gânglios posteriores localizados ao longo do sistema nervoso (CHAPMAN, 1998).

Nas abelhas o cérebro é bilobado e composto de um protocérebro com o qual se relaciona a estrutura dos olhos e onde se localizam os corpos pedunculados, um deutocérebro que está relacionado ao processamento das informações colhidas pelas antenas e um tritocérebro que conecta o SNC ao Sistema Nervoso Visceral pelo gânglio frontal (RUPPERT et al., 1996; KLOWDEN, 2007). Os corpos pedunculados localizados no protocérebro merecem especial atenção, uma vez que recebem informações de diferentes áreas do cérebro, como do lobo antenal e do lobo óptico, e são estruturas essenciais para a associação e integração das informações recebidas (HAMMER; MENZEL, 1995). Os elementos básicos dos corpos pedunculados são as células de Kenyon, os cálices e os pedúnculos, sendo que destes as células de Kenyon são elementos centrais na estrutura e fisiologia do corpo pedunculado (HEISEMBERG, 1998). Há evidências de que os corpos pedunculados do cérebro dos insetos sejam equivalentes ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem temporal (CAPALDI et al., 1999).

Sendo assim, é imprescindível desenvolver novos métodos de estudo que possam permitir o entendimento dos mecanismos de ação dos agrotóxicos, seus impactos sobre as abelhas e seu metabolismo, visando à criação de moléculas mais seletivas ao inseto alvo, evitando assim a morte desses polinizadores e permitindo produções agrícolas mais sustentáveis.

A alta mortalidade das abelhas, associada aos efeitos neurotóxicos dos inseticidas, sugere estudos mais aprofundados em nível celular. Alguns estudos recentes têm avaliado alterações morfológicas que acontecem no cérebro de abelhas em função da intoxicação por agrotóxicos. Uma alteração que merece destaque é a presença de células condensadas ou células contendo um núcleo com cromatina condensada, uma vez que tal característica pode ocorrer nos estágios finais de morte celular sugerindo a presença de células autofágicas ou apoptóticas (ALMEIDA ROSSI et al., 2013).

Tais alterações foram confirmadas nos estudos de Almeida Rossi et al. (2013), o qual avaliou o efeito do inseticida imidacloprido no cérebro de *Apis mellifera*, de Oliveira et al. (2014), o qual avaliou o efeito de diferentes doses de tiametoxam também sobre o cérebro de *A. mellifera* e de Jacob et al. (2015), que avaliou o efeito do fipronil no cérebro de abelhas *Scaptotrigona postica*. Essas alterações morfológicas têm sido relacionadas às perdas na capacidade de orientação, memória, aprendizagem e comunicação das abelhas, uma vez que as células nervosas presentes no cérebro destes insetos são responsáveis pela integração de informações (DECORTYE et al., 2005; DECORTYE et al., 2009).

Um método que se mostra bastante promissor no que diz respeito à especificidade nas análises em nível celular é o cultivo *in vitro* de células ou tecidos, o qual propõe ampliar a compreensão da biologia e fisiologia do inseto sem que haja a necessidade da realização de estudos em campo. Linhagens de células de insetos



isoladas e cultivadas *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para diversos fins como produção de proteínas recombinantes (SMITH et al., 1985; HINK et al., 1991; OGONAH et al., 1996; IKONOMOU et al., 2001; IKONOMOU et al., 2003) e em estudos fisiológicos (PATEL et al., 2003; YUAN et al., 2007).

O comportamento social e a capacidade de aprendizagem e memória fizeram das abelhas insetos de grande interesse para estudos neurobiológicos (ROAT, 2011). Abelhas forrageiras, por exemplo, aprendem cores, odores, a posição de flores ricas em néctar e usam essas informações para aperfeiçoar sua colheita (GALIZIA, 2007). Contudo, embora existam mais de 500 linhagens de células de insetos pré-estabelecidas (LYNN, 2001) não há nenhum relato de cultura de células de abelhas imortalizadas.

Entretanto, vários são os relatos sobre a manutenção de culturas de células do sistema nervoso de abelhas *in vitro* em curto prazo. Um dos primeiros estudos disponíveis na literatura foi com células do lobo antenal de *A. mellifera*, onde as mesmas foram mantidas em cultura por até 4 semanas (GASCUEL et al., 1991). Em 1992, Kreissl e Bicker conseguiram isolar e cultivar as células de Kenyon, células provenientes dos corpos pedunculados. Em 1999 foi a vez das células motoras antenais serem isoladas e cultivadas (KLOPPENBURG et al., 1999).

Tais protocolos de cultivo celular permitiram uma nova gama de estudos como, por exemplo, estudos com neurotransmissores (GOLDBERG et al., 1999; WÜSTENBERG; GRÜNEWALD, 2004), com receptores olfativos (LAURENT et al., 2002; GISSELMANN et al., 2003; BARBARA et al., 2005; BARBARA et al., 2008), com a neurogênese em células de Kenyon (MALUN et al., 2003) e até mesmo o isolamento de novas células como fez Grünewald (2003) com as projeções celulares dos lobos antenais.

No entanto, essas culturas permaneceram viáveis durante um curto período de tempo e apenas experimentos limitados puderam ser feitos. O primeiro trabalho que descreve a manutenção em longo prazo de células embrionárias de abelhas foi publicado por Bergem et al. (2006) onde um protocolo de cultivo celular foi estabelecido utilizando o meio de cultura Grace enriquecido com L-aminoácidos e suplementado com 15% de soro fetal bovino, o qual manteve a cultura estável por mais de três meses. Além disso, em outro trabalho realizado com células epiteliais do intestino médio de *Apis cerana* as mesmas mantiveram-se viáveis em cultivo *in vitro* por mais de 20 semanas em meio Grace enriquecido com 20% de soro fetal bovino (ZHANG et al., 2009).

Recentemente, uma linhagem de células proveniente de larvas de *A. mellifera* transfectadas com o proto-oncogene *c-myc* sobreviveu por cerca de 8 meses até a publicação do referido trabalho, sugerindo o possível estabelecimento de uma linhagem celular de abelhas imortal. Os proto-oncogenes da família *c-myc* são caracterizados por terem a atividade celular imortal (KITAGISHI et al., 2011).

Embora os trabalhos com cultura de células de abelhas sejam numerosos e promissores, não existem relatos sobre o cultivo de tecido nervoso de abelhas que se fazem eficientes e viáveis para posteriores utilidades. Sendo assim, este trabalho buscou padronizar métodos confiáveis de cultura de tecidos em condições controladas através dos modelos de estudo *in vitro*, utilizando-se o híbrido africanizado existente no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que:

- 1- O meio Leibovitz's+HBSS e o meio Leibovitz's+HBSS suplementado com SFB, dentre todos os meios testados obtiveram melhores resultados no que diz respeito à desorganização do tecido nervoso de *A. mellifera* africanizada e, portanto, foram selecionados como os melhores meios.
- 2- Embora o meio Leibovitz's+HBSS e o meio Leibovitz's+HBSS suplementado com SFB tenham apresentado estatisticamente os menores espaçamentos dentre os parâmetros analisados, posteriores experimentos de suplementação desses meios devem ser realizados a fim de diminuir o número de células picnóticas no tecido nervoso.
- 3- Estudos mais aprofundados sobre os diferentes tipos de morte celular bem como o funcionamento da barreira hematoencefálica em abelhas são necessários para que se obtenha uma compreensão mais ampla dos processos que envolvem o cultivo de tecidos *in vitro*.
- 4- Testes mais específicos de viabilidade celular podem ser realizados a fim de confirmar os resultados obtidos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J et al. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, London, v. 7, n. 1, p. 41-53, 2006.
- ALMEIDA ROSSI, C. de et al. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p. 234-243, 2013.
- BARBARA, G. S. et al. Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. **Invertebrate neuroscience: IN**, Sheffield, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2008.
- BARBARA, G. S. et al. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, Hudson, v. 191, n. 9, p. 823-836, 2005.
- BATISTA, F. R. X. **Desenvolvimento de meio de cultura para células de inseto e avaliação do potencial de replicação do baculovírus**. 2003. 244 f. Dissertação de Mestrado em desenvolvimento de processos biotecnológicos - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- BANERJEE, S.; BHAT, M. A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 30, p. 235-258, 2007.
- BERGEM, M. et al. Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. **BMC developmental biology**, London, v. 6, n. 1, p. 17, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais – IBAMA. **Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres do Brasil**. Brasília, 2012. 88p.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5 ed. Nova York: Cambridge university press, 2013, 929 p.
- CAPALDI, E. A. et al. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. **Annual Review of Psychology**, Palo Alto, v. 50, p. 651-682, 1999.
- CASTRO, M. S. et al. Stingless bee. In: **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, p. 75-83, 2006.
- CARLSON, S. D. et al. Blood barriers of the insect. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 151-174, 2000.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Relatório PIB Agro-Brasil**, 2014. Disponível em: <[http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea\\_PIB\\_BR\\_dez14.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_dez14.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2015.

DEBNATH, J. et al. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**. Michigan, v.1, p. 66-74, 2005.

DECOURTYE, A. et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.48, p.242-250. 2005.

DECOURTYE, A. et al. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group**. 2009.

DEL PADRE, G. A. **Estudo da Cinética de crescimento de células de insetos sf21 e infecção por bavulovírus Anticarsian gemmatalis (AgMNPV) para produção de bioinseticida**. 2016. 127p. Dissertação de mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo – Escola Politécnica, São Paulo, 2016.

DOMINGUES, C. E. C. et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, Oxford, v. 186, p. 994-1005, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **As abelhas e a polinização**. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/polinizacao.php>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FERREIRA R. R. P. T. et al. Defensivos Agrícolas: Comercialização recorde em 2013 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2014. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 9, n. 8, 2014.

GALIZIA, C. G. Brainwashing, honeybeestyle. **Science**, Washington, v. 317, p. 326-327, 2007.

GASCUEL, J. et al. The morphology and ultrastructure of antennal lobe cells from pupal honeybees (*Apis mellifera*) growing in culture. **Tissue & cell**, Edinburgh, v. 23, n.4, p. 547-559, 1991.

GIANNINI, T. C. et al. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of economic entomology**, College Park MD, p. 1-9, 2015.

GISSELMANN, G. et al. Characterization of recombinant and native  $I_h$ -channels from *Apis mellifera*. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1123-1134, 2003.

GOLDBERG, F. et al. Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. **The Journal of Physiology**, London, v. 514, n. 3, p. 759-768, 1999.

GRÜNEWALD, B. Differential expression of voltage-sensitive  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in neurons of the honeybee olfactory pathway. **Journal of experimental biology**, Histon, v. 206, n. 1, p. 117-129, 2003.

GUMBINER, B. M. Cell Adhesion : The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. **Cell**, v. 84, p. 345–357, 1996.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v.301, n.1, p. 5-17, 2000.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Learning and memory in the honeybee. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 15, n. 3, p. 1617-1630, 1995.

HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, Published online, v. 5, n. 1, p. 1-10, 1998.

HINK, W. F. et al. Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines. **Biotechnology progress**, New York, v. 7, n. 1, p. 9-14, 1991.

HOSKINS, W. M.; HARRISON, H. S. The buffering power of the contents of the ventriculus of the honeybee and its effect upon the toxicity of arsenic action. **Journal of economic entomology**, College Park MD, v. 27, p.924-942, 1934.

IKONOMOU, L et al. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2003.

IKONONOU, L. et al. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, Columbia, v. 37, n. 9, p. 549-559, 2001.

JACOB, C. R. O. et al. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest management science**, West Sussex, v. 71, n. 1, p. 114-122, 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, p.48-81, 1983.

KERR, J. F. R. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, London, v. 24, p. 239-257, 1972.

KITAGISHI, Y. et al. Long-term cultivation of in vitro *Apis mellifera* cells by gene transfer of human c-myc proto-oncogene. **In vitro cellular & developmental biology-Animal**, Columbia, v. 47, n. 7, p. 451-453, 2011.

KLODEN, M. J. **Physiological Systems in Insects**. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier: Academic Press, 2007, 688 p.

KLOPPENBURG, P. et al. Voltage-activated currents from adult honeybee (*Apis mellifera*) antennal motor neurons recorded in vitro and in situ. **Journal of Neurophysiology**, Bathesda, v. 81, n. 1, p. 39-48, 1999.

KREISSL, S.; BICKER, G. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. **Journal of Neurocytology**, London, v. 21, n. 8, p. 545-556, 1992.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v.16, p. 3–11, 2009.

LENNETTE, E. H. et al. Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**, D.C., 1985.

LAURENT, S. et al. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons: ionic currents, membrane excitability and odourant response in developing workerbee and drone. **The European journal of neuroscience**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 1139-1152, 2002.

LEWIS, G. et al. Pesticides and honeybees – the work of the ICP-BR Bee Protection Group Editorial. **Pest Management Science**, West Sussex, n. 63, p. 1047-1050, 2007.

LYNN, D. E. Novel techniques to establish new insect cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 37, n. 6, p. 319-321, 2001.

LYNN, D. E. et al. Development and characterization of insect cell lines. **Cytotechnology**, v. 40, n. 3, p. 348–351, 2002.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Columbia, v. 36, n. 12, p. 2405-2419, 2004.

MAIORELLA B., et al. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. **Nature Biotechnology**, New York, v 6, p. 1406-1410, 1988.

MANDRIOLI, M. et al. A practical guide to insect cell cultures: establishment and maintenance of primary cell cultures. **Halteres**, v. 6, n. November, p. 132–141, 2015.

MALUN, D. et al. 20-Hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of neurobiology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-14, 2003.

MOLINARO, E. M. et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010, 254p. Disponível em:< [http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol\\_2\[1\].pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2[1].pdf)>. Acesso em: 15 de out. de 2017.

**OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS**. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998a. 8p.

**OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS**. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, set. 1998b. 7p.

OGONAH, O. W. et al. Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 2, p. 197-202, 1996.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014.

PATEL, P. H. et al. Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. **Journal of Cell Science**, London, v. 116, n. 17, p. 3601-3610, 2003.

RASBAND, W.S., 1997-2016. **ImageJ**, U.S. Natl. Inst. Health. <https://imagej.nih.gov/ij>

ROAT, T. C.; LANDIM, C. C. Differentiation of the honey bee (*Apis mellifera* L.) antennal lobes during metamorphosis: a comparative study among castes and sexes. **Animal Biology**, Boston, v.61, p. 153-161, 2011.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996, 1028 p.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World congress on computers in agricultura, 4., 2006, Orlando. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SILVA, I. C. da et al. **Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil**. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, Co-Editor: Ministério do Meio Ambiente, 2014. 50p.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; TABOGA, S. R.; SILVA DE MORAES; R. L. M. Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands. **Micron**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 117-27, 2008.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. et al. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, p 696-703, 2012.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. VIII, n. 3, p. 1-7, 2007.

SMITH, G. E. et al. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, n. 24, p. 8404-8408, 1985.

WÜSTENBERG, D. G.; GRÜNEWALD, B. Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, Hudson, v. 190, n. 10, p. 807-821, 2004.

YUAN, Q. et al. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 948-955, 2007.



ZHANG, G. Z. et al. Establishment and Maintenance of in vitro Cultured Chinese Honeybee *Apis cerana* Midgut Epithelial Cells. **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 1, p. 5-18, 2009.