
**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

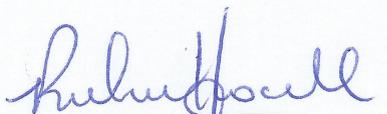
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO IN VITRO DO TECIDO NERVOSO DE ABELHA *Apis mellifera* AFRICANIZADA

AUTORA: PATRICIA AZEVEDO

ORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

COORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

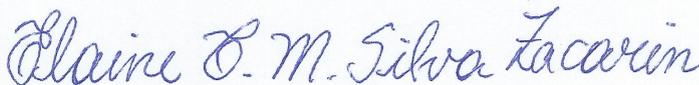
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar qual o melhor método para a manutenção do tecido nervoso de abelhas *A. mellifera* em cultura e padroniza-lo para posteriores estudos de toxicidade.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os meios Grace, Schneider e Leibovitz's L-15 para cultura de tecidos de abelhas quanto a sua executabilidade, tempo de manutenção do tecido e viabilidade celular;
- Avaliar as suplementações com Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, Insect Medium Supplement (IMS) 10% e Hank's Balance Salt Solution (HBSS) 40% testadas nos diferentes meios de cultura, empregadas individualmente e em conjunto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Abelhas recém-emergidas da espécie *A. mellifera* africanizada de três colônias diferentes foram coletadas diretamente dos favos no apiário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - *campus* de Rio Claro.

As mesmas foram marcadas com tinta atóxica no tórax, sendo que as colônias foram diferenciadas por cores no momento da marcação. Posteriormente, as abelhas foram devolvidas as suas respectivas colônias e, passados 21 dias, idade esta que corresponde à idade de forrageamento, foram coletadas diretamente da colmeia.

3.2 Dissecção e cultivo *in vitro* de tecido nervoso

Para a obtenção dos órgãos, as abelhas coletadas foram anestesiadas (1 minuto no freezer) e seus cérebros foram dissecados com auxílio de um estéreomicroscópio com luz fria, à temperatura ambiente e, posteriormente, foram transferidos para os diferentes meios de cultura de células de insetos, puros e suplementados, visando selecionar o meio em que o tecido nervoso permanecesse viável por mais tempo. Utilizaram-se duas abelhas de cada uma das três colônias para cada horário nos diferentes tratamentos do cultivo *in vitro*, totalizando seis abelhas por horário. Os tecidos nervosos foram coletados nos horários de 1, 6, 12 e 24 horas após a incubação em estufa de CO₂ umidificada a 32°C.

Como controle negativo, abelhas com 21 dias foram coletadas diretamente da colmeia e acondicionadas em potes plásticos descartáveis (250 mL), previamente furados nas laterais, contendo suprimento de água e alimento. Tais potes foram dispostos em BOD à 32°C. Posteriormente as mesmas foram retiradas da BOD e

dissecadas nos tempos de 1, 6, 12 e 24h. Tais tempos foram calculados após a coleta das mesmas no apiário. Como controle positivo o tecido nervoso foi transferido para placa de cultura contendo 1 mL/poço de solução salina para insetos (0,1M NaCl; 0,003M KCl; 0,002M CaCl₂; 0,002M NaHCO₃). Após a transferência as placas foram acondicionadas em estufa de CO₂ umidificada a 32°C. Os tecidos foram coletados com 1, 6, 12 e 24h.

Para avaliar a compatibilidade do tecido nervoso de *A. mellifera* com o meio de cultura mais satisfatório para a padronização do cultivo *in vitro* utilizaram-se os seguintes meios:

Grupo 1 - Grace (G) (SAFC Biosciences[®]);

Grupo 2 - Schneider (Sch) (Sigma-Aldrich[®]);

Grupo 3 - Leibovitz's (L-15) (Sigma-Aldrich[®]).

A composição de cada meio testado encontra-se no Quadro 1.

Além disso, uma suplementação inicial com 10% de SFB foi feita a fim de comparar a viabilidade e manutenção do tecido entre os meios de cultura com e sem soro, compondo os seguintes grupos:

Grupo 4 - Grace + 10% de SFB (G+S);

Grupo 5 - Schneider + 10% de SFB (Sch+S);

Grupo 6 - Leibovitz's + 10% de SFB (L-15+S).

Ainda, testaram-se as suplementações com Insect Medium Supplement (IMS) 10% e Hank's Balance Salt Solution (HBSS) 40% nos meios de cultura que se destacaram na avaliação inicial entre os três diferentes meios testados e os mesmos meios com SFB. Tais suplementações foram empregadas individualmente e em conjunto compondo os seguintes grupos:

Grupo 7 - Leibovitz's + HBSS (L15+H);

Grupo 8 - Leibovitz's + IMS (L15+I);

Grupo 9 - Leibovitz's + HBSS + IMS (L15+H+I);

Grupo 10 - Leibovitz's + HBSS + SFB (L15+H+S);

Grupo 11 - Leibovitz's + IMS + SFB (L15+I+S);

Grupo 12 - Leibovitz's + HBSS + IMS + SFB (L15+H+I+S).

Em todos os experimentos utilizaram-se placas de cultura celular de 12 poços contendo 1 mL do meio de cultura em cada poço. As mesmas foram acondicionadas em estufa de CO₂ umidificada à temperatura de 32°C e 5% de CO₂.

Todo material utilizado durante os experimentos foi devidamente esterilizado e os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Quadro 1. Comparação entre a composição e a quantidade dos meios Schneider (g/L), Grace (g/L) e Leibovitz's L-15 (g/L).

Componentes	Meio Schneider (g/L)	Meio Grace (g/L)	Meio L-15 (g/L)
Hidrogenofosfato dissódico	700	-	-
Sulfato de magnésio heptahidratado	3700	-	-
Cloreto de potássio	1600	2240	0.4
Dihidrogenofosfato de potássio	450	-	-
Cloreto de sódio	2100	-	8.0
Cloreto de magnésio anidro	-	1067,86	0.09366
Sulfato de magnésio anidro	-	1357,67	0.09767
Cloreto de cálcio anidro	-	-	0.1396
Fosfato de potássio monobásico anidro	-	-	0.06
Fosfato de sódio dibásico anidro	-	-	0.19
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	-	1013	-
Glicina	250	650	0.2
Hidrocloreto de L-arginina	483,81	700	0.5
Ácido L- aspártico	400	350	-
Hidrocloreto de L-cisteína	78	-	0.12
Dicloridrato de L-cistina	100	28,68	-
Ácido L- glutâmico	800	600	-
L- glutamina	1800	600	0.3
Hidrocloreto de L-histidina monohidratado	540	2500	0.25
L-isoleucina	150	50	0.125
L-Leucina	150	75	0.125

Hidrocloreto de L-lisina	1650	-	-
Monohidrocloreto de L-Lisina	-	625	0,0937
L-metionina	800	50	0,075
L-fenilalanina	150	150	0,125
L-prolina	1700	350	-
L-serina	250	1100	0,2
L-treonina	350	175	0,3
L-triptofano	100	100	0,02
L-tirosina sal dissódico	620	72,63	0,3
L-valina	300	100	0,1
β-alanina	500	200	-
L-alanina	-	225	0,225
L-asparagina monohidratada	-	397,73	0,25
Biotina	-	0,010	-
D- pantotenato de cálcio	-	0,020	-
Ácido fólico	-	0,020	0,001
Mio-inositol	-	0,020	0,002
Niacina	-	0,020	-
PABA (ácido paraminobenzóico)	-	0,020	-
Cloreto de colina	-	0,200	0,001
Piridoxina HCl	-	0,020	0,001
Riboflavina	-	0,020	-
Tiamina HCl	-	0,020	0,001
Mononucleotídeo de Flavina •Na	-	-	0,0001
Niacinamida	-	-	0,001
DL- ácido pantotênico (hemicálcio)	-	-	0,001
Ácido alfa cetoglutárico	200	-	-
D(+) Glicose	2000	-	-
D(+)-Trealose	2000	-	-
D-Galactose	-	-	0,9
Ácido fumárico	100	-	-
Ácido L-malático	100	-	-
Ácido succinico	100	-	-
Extrato de levedura	2000	-	-
Fenol red Na	-	-	0,011
Ácido pirúvico Na	-	-	0,55

3.3 Testes para evitar contaminação

As abelhas forrageiras, alvos do estudo, possuem alta carga microbiana por visitarem diversos locais que oferecem recursos, além daquela presente nas colônias. Devido a contaminações observadas nos experimentos iniciais, buscou-se testar alguns métodos de descontaminação das mesmas para evitar a proliferação de fungos e bactérias no meio de cultura, o que inviabilizaria o cultivo do tecido nervoso. Ademais,

a utilização de diferentes concentrações de antibiótico no meio de cultura também foi testada.

3.3.1 Assepsia da abelha

Teste 1:

Antes da dissecação as abelhas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, em seguida em hipoclorito de sódio 0,115%, posteriormente em água estéril, novamente em álcool 70% e, por último, em água estéril (MANDRIOLI et al., 2015). Só então o cérebro foi dissecado e colocado no meio de cultura.

Teste 2:

No segundo teste antes da dissecação as abelhas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70% e posteriormente em água estéril. Só então o cérebro foi dissecado e colocado no meio de cultura.

Para ambos os teste utilizou-se como controle o meio de cultura, o qual foi colocado em alguns poços da placa de cultura celular, sem nenhum tecido imerso. Além disso, algumas variações foram feitas como a dissecação com a lupa dentro e fora do fluxo laminar e a esterilização das pinças utilizadas na dissecação em lamparina. Vale ressaltar que para os testes de assepsia da abelha utilizou-se somente o meio Grace, devido a sua disponibilidade.

A avaliação foi feita visualmente, selecionando como viáveis os tratamentos que não apresentaram contaminação e inviáveis os tratamentos que apresentaram contaminação por fungos e/ou bactérias.

3.3.2 Padronização do antibiótico

Após a obtenção dos resultados dos testes de assepsia da abelha optou-se por utilizar o antibiótico gentamicina (SILVA-ZACARIN, 2016, comunicação pessoal) nos

meios de cultura. Foram feitos testes em diferentes concentrações do antibiótico buscando a utilização da menor quantidade possível de antibiótico na cultura. As concentrações foram: 0,1, 0,25, 0,5, 1 e 1,5%.

Sendo assim, as concentrações de antibiótico mencionadas acima foram adicionadas ao meio de cultura separadamente e os mesmos foram distribuídos individualmente em poços na placa de cultura celular. Cérebros de abelhas forrageiras *A. mellifera* africanizadas foram dissecados conforme descrito no item 3.2 e imergidos no meio de cultura contendo as diferentes concentrações de antibióticos. Vale ressaltar que para os testes de padronização do antibiótico utilizou-se somente o meio Grace, devido a sua disponibilidade.

A avaliação foi feita visualmente, selecionando como viáveis os tratamentos que não apresentaram contaminação e inviáveis os tratamentos que apresentaram contaminação por fungos e/ou bactérias.

3.4 Preparo dos meios de cultura

3.4.1 Preparo do meio de cultura para insetos Grace

Para o preparo de 1L de meio de cultura adicionou-se 44g do meio em pó seco em 900mL de água destilada a temperatura ambiente agitando-se vagarosamente até completa homogeneização. Posteriormente, adicionou-se 350mg de bicarbonato de sódio e 1% de gentamicina. O pH da solução foi ajustado para 6.2 ± 0.2 , conforme indicação do fabricante, e o meio completado com água destilada para o volume final. Para a esterilização realizou-se a filtração do meio com filtro de membrana de poro 0,22 μ m. No caso dos meios suplementados, a filtração ocorreu após a suplementação dos mesmos. O armazenamento dos meios prontos foi ao abrigo de luz e sob refrigeração (entre 2 e 8°C).

3.4.2 Preparo do meio de cultura para insetos Schneider

Para o preparo de 1L de meio de cultura adicionou-se 26,2g do meio em pó seco em 900mL de água destilada a temperatura ambiente agitando-se lentamente até completa homogeneização. Posteriormente, adicionou-se 0,4g de bicarbonato de sódio.

Inicialmente o pH foi ajustado para 9.2 ± 0.2 com hidróxido de sódio e aguardou-se 10 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado novamente para 6.7 ± 0.2 com ácido clorídrico. Posteriormente, uma solução de cloreto de cálcio (0,6g de cloreto de cálcio anidro em 50 mL de água) foi adicionada ao meio de cultura lentamente, para evitar precipitação. Finalmente, adicionou-se 1% de gentamicina. O pH foi ajustado novamente para 6.7 ± 0.2 , conforme o pH da hemolinfa de uma abelha adulta (HOSKINS; HARRISON, 1934), e o meio completado com água destilada para o volume final. Para a esterilização realizou-se a filtração do meio com filtro de membrana de poro 0,22 μ m. No caso dos meios suplementados, a filtração ocorreu após a suplementação dos mesmos. O armazenamento dos meios prontos foi ao abrigo de luz sob refrigeração (entre 2 e 8°C).

3.4.3 Preparo do meio de cultura para insetos Leibovitz's L-15

Para o preparo de 1L de meio de cultura adicionou-se 13,8g do meio em pó seco em 900mL de água destilada a temperatura ambiente agitando-se vagarosamente até completa homogeneização. Posteriormente adicionou-se 1% de gentamicina.

O pH da solução foi ajustado para 6.7 ± 0.2 , conforme o pH da hemolinfa de uma abelha adulta (HOSKINS; HARRISON, 1934), e o meio completado com água destilada para o volume final. Para a esterilização realizou-se a filtração do meio com filtro de membrana de poro 0,22 μ m. No caso dos meios suplementados, a filtração

ocorreu após a suplementação dos mesmos. O armazenamento dos meios prontos foi ao abrigo de luz sob refrigeração (entre 2 e 8°C).

3.5 Avaliação dos testes de assepsia da abelha e padronização do antibiótico para verificação de contaminação

A contaminação por agentes biológicos como fungos e bactérias nos meios de cultura celular é identificada, na maioria das vezes, visualmente, uma vez que tais contaminações causam efeitos visíveis sobre os meios de cultura.

Uma das características a serem avaliadas é a alteração na coloração do meio de cultura, já que a contaminação biológica tende a alterar o pH do meio modificando a coloração do mesmo.

Além disso, meios de cultura contaminados com bactérias comumente apresentam turbidez, opacidade e, nos casos em que a contaminação já está muito avançada, o meio apresenta uma película esbranquiçada ou amarelada no poço/garrafa contendo o meio de cultura. De acordo com LANNETTE et al. (1985) quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade ou turbidez do meio de cultura.

Já na contaminação por fungos, o micélio e/ou hifas do mesmo são facilmente identificados na superfície do meio de cultura podendo estes variar em cores e tamanhos.

3.6 Avaliação da morfologia e viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade dos tecidos, os mesmos foram coletados dos meios de cultura nos tempos de 1 hora, 6 horas, 12 horas e 24 horas e processados para análises morfológicas.

3.6.1 Análises Morfológicas

3.6.1.1 Inclusão em historresina e microtomia para coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

Após cada tempo de coleta os cérebros foram fixados em paraformaldeído 4% e, após 24 horas foram transferidos para tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Posteriormente, o material passou por desidratação lenta em um gradiente de soluções alcoólicas à 4°C com intervalo de 2 horas cada. No primeiro dia o material foi embebido em concentrações de 15, 50, 60 e 70%, na qual ficou *overnight*, para que no segundo dia fosse embebido nas concentrações de 85, 90 e 95%. Para finalizar, o material foi transferido para resina de embebição, onde ficou 7 dias (SILVA-ZACARIN, 2012).

Após a embebição, o material foi incluído em moldes plásticos contendo historresina Leica[®]. Os blocos foram mantidos em estufa a 37°C e, após a polimerização, foram colocados em suportes de madeira para microtomia com 6µm de espessura em micrótopo com navalha de tungstênio. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, previamente limpas, e submetidas à técnica descrita a seguir.

3.6.1.2 Avaliação da morfologia e viabilidade celular - Técnica Hematoxilina e Eosina (HE)

As lâminas contendo as secções do tecido nervoso foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA; 1983) para análise histológica do cérebro de *A. mellifera* africanizada. Vale ressaltar que dois indivíduos de cada tempo e de cada tratamento foram submetidos à avaliação de morfologia e viabilidade celular.

Inicialmente as lâminas contendo as secções do tecido nervoso foram hidratadas em água destilada durante 1 minuto e coradas com hematoxilina durante 15 minutos.

Feito isso, as lâminas foram deixadas em água parada durante 5 minutos para a reação do corante e, em seguida foram lavadas três vezes em água destilada para retirada de excesso do mesmo. Posteriormente as lâminas foram coradas com eosina durante 5 minutos e, logo após lavadas três vezes em água para retirada do excesso de corante. Após secas, as lâminas foram montadas com DPX (Distrene Plasticiser Xylene), analisadas e fotodocumentadas sob microscópio de luz.

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmara digital adaptada ao microscópio e a um computador. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller[®]. Foram analisados 8 cortes não sequenciais (DOMINGUES et al., 2017) de cada um dos indivíduos (2 indivíduos) de cada tempo e tratamento já descritos anteriormente no item 3.2 (totalizando 12 tratamentos com 4 tempos cada mais 2 controles com 4 tempos cada) e, em cada corte, analisou-se 3 corpos pedunculados. Para uma análise mais representativa, em cada corpo pedunculado foram avaliados quatro parâmetros (Figura 1): distância entre células de Kenyon no interior do cálice do corpo pedunculado, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e a área de células fortemente coradas. Vale ressaltar que tais parâmetros foram selecionados para avaliação já que são características relacionadas a processos de morte celular no tecido nervoso, sendo que as células fortemente coradas indicam uma condensação cromatínica e, conseqüentemente a baixa atividade transcricional e os espaçamentos indicam o desarranjo tecidual ocasionado pela perda dos prolongamentos celulares.

Ainda, para cada parâmetro descrito acima fez-se duas medidas, sendo que para as distâncias procurou-se tomar como medida as maiores distâncias encontradas visando uma melhor representação do tecido analisado. Para a área de células fortemente

coradas, tomou-se como medida uma área no interior do corpo pedunculado de 20x20µm que incluísse células de Kenyon compactas externas e internas e uma área no exterior do corpo pedunculado (células de Kenyon compactas externas). Vale ressaltar que a área de células de Kenyon fortemente coradas é dada pela relação entre a área ocupada por elas e a área total ocupada pelas células de Kenyon. As estimativas, tanto das distâncias, quanto da área de células mais coradas foram realizadas com auxílio do software ImageJ (RASBAND, 1997-2006).

A comparação entre todas as medidas dos diferentes grupos experimentais e diferentes horários foram feitas utilizando o programa SigmaPlot 13 (Systat Software), Kruskal-Wallis, Tukey. Além disso, uma matriz de correlação entre os diferentes parâmetros analisados foi feita para determinar o quão correlacionados estavam os dados. Para isso utilizou-se o programa Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006). Ainda, uma tabela comparativa entre todos os tratamentos nos diferentes horários foi gerada, a fim de se obter uma melhor compreensão dos dados.

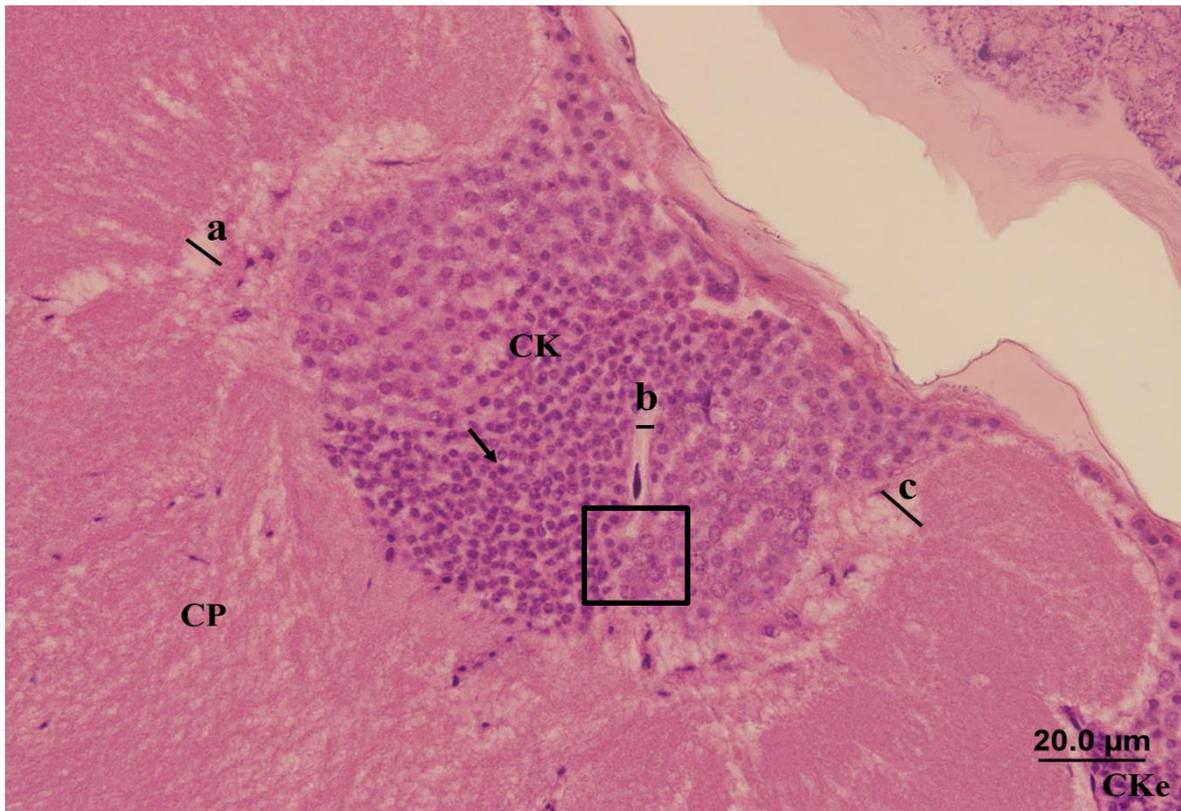


Figura 1. Corpo pedunculado de abelha *A. mellifera* africanizada corado com hematoxilina e eosina exemplificando os parâmetros avaliados para cada meio de cultura. (a) distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, (b) distância entre células de Kenyon e (c) distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CP- Corpo Pedunculado; CK- Células de Kenyon; CKe- Células de Kenyon Externas. O quadrado representa a área utilizada para contabilizar as células fortemente coradas. A seta indica uma célula fortemente corada.

4. RESULTADOS

4.1 Testes de contaminação e padronização do antibiótico

Com base nos testes de contaminação realizados padronizou-se a utilização do estereomicroscópio para dissecação no interior da câmara de fluxo laminar, devidamente higienizado com álcool 70% e submetido à luz ultravioleta por, no mínimo, 40 minutos, assim como os demais materiais utilizados na dissecação. Além disso, estipulou-se a utilização da concentração de 1% de antibiótico nos meios de cultura, uma vez que o meio de cultura com essa concentração de gentamicina se mostrou livre de contaminação durante duas semanas de incubação em estufa de CO₂. Todos os testes de assepsia das abelhas se mostraram inviáveis quando o meio de cultura sem o antibiótico foi utilizado, uma vez que todos apresentaram contaminação (Figura 2).

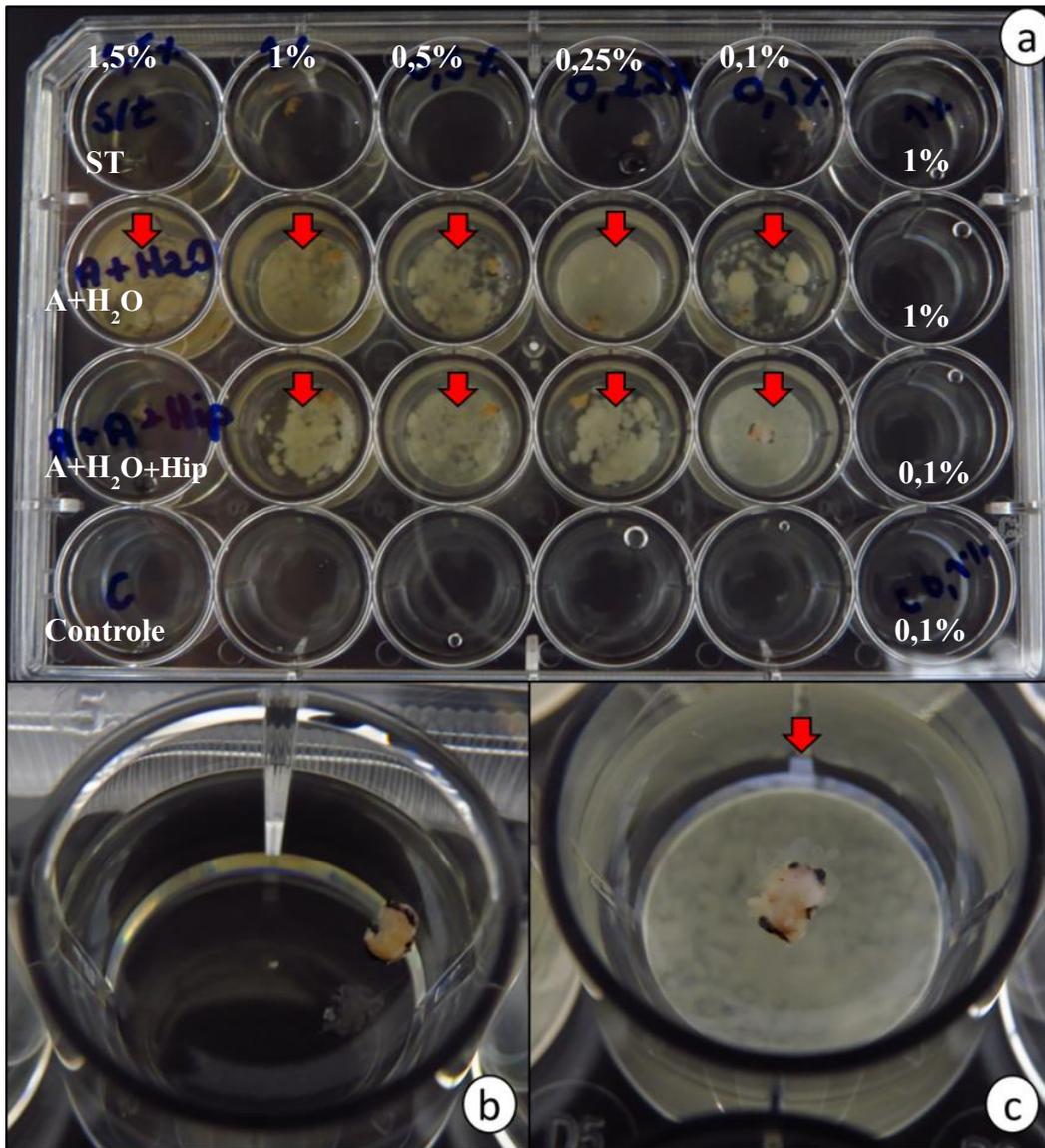


Figura 2. Testes de assepsia e padronização do antibiótico. Placa de cultura de 24 poços com experimento de padronização do antibiótico na primeira linha e última coluna da placa com indicações das porcentagens do antibiótico utilizada em cada meio de cultura/poço. ST-Abelhas Sem Tratamento de assepsia para o experimento de padronização do antibiótico. Experimento de assepsia nas segunda e terceira linhas, sendo que na segunda a assepsia foi feita com álcool 70% e água deionizada e na terceira com álcool 70%, hipoclorito 0,115% e água deionizada. A última linha da placa contém os controles (meio de cultura sem imersão de tecido) (a). Meio de cultura não contaminado (b). Meio de cultura contaminado (c). As setas indicam a contaminação do meio de cultura.

4.2 Avaliação da morfologia e viabilidade celular

A partir da técnica de coloração com hematoxilina e eosina foi possível avaliar as distâncias entre as células de Kenyon localizadas no interior do cálice do corpo pedunculado, entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado e entre os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado, como indicativos da viabilidade celular. Além disso, células fortemente coradas e que caracterizavam picnose foram observadas nos corpos pedunculados.

4.2.1 Tempo: 1 hora

As análises estatísticas para os grupos experimentais contendo os meios puros e para os grupos experimentais contendo os meios suplementados com SFB mostraram que, para o tempo de 1 hora, os meios Leibovitz's, Leibovitz's+SFB e Schneider apresentaram menores áreas de células picnóticas. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice dos corpos pedunculado, o meio Schneider apresentou as menores distâncias dentre os demais grupos analisados. No que diz respeito a distância entre as células de Kenyon internas pode-se destacar o meio Grace e o meio Scheneider como os que apresentaram as menores distâncias. Para as medidas das distâncias entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, o meio Leibovitz's diferiu estatisticamente do controle negativo por apresentar menores distâncias sendo, portanto, o melhor meio.

Já as análises estatísticas dos meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB, os quais se mostraram os melhores meios em uma análise prévia, em comparação com os grupos contendo as suplementações com HBSS e IMS empregadas individualmente ou em conjunto mostraram que, para o tempo de 1 hora, os meios Leibovitz's, Leibovitz's+SFB e Leibovitz's+HBSS+SFB foram os que apresentaram as menores

áreas de células picnóticas. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice dos corpos pedunculado, os meios Leibovitz's+HBSS+SFB e Leibovitz's+IMS+SFB apresentaram as menores distâncias dentre os demais grupos analisados. No que diz respeito a distância entre as células de Kenyon internas pode-se destacar o meio Leibovitz's+HBSS+SFB como o que apresentou as menores distâncias. Finalmente, para as medidas das distâncias entre os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado, o meio Leibovitz's+HBSS+SFB apresentou as menores distâncias sendo, portanto, o melhor meio.

As comparações estatísticas feitas para o tempo de 1 hora estão representadas nas Figuras 3 e 4. Fotomicrografias dos corpos pedunculados das abelhas *A. mellifera* africanizada coradas com HE para o tempo de 1 hora estão representadas da seguinte maneira: Controle Negativo (Figura 11 A), Controle Positivo (Figura 11 B), Meio Grace (Figura 13 A), Meio Grace+SFB (Figura 13 B), Meio Schneider (Figura 14 A), Meio Schneider+SFB (Figura 14 B), Meio Leibovitz's (Figura 16 A), Meio Leibovitz's+SFB (Figura 16 B), Meio Leibovitz's+HBSS (Figura 17 A), Meio Leibovitz's+HBSS+SFB (Figura 17 B), Meio Leibovitz's+IMS (Figura 18 A), Meio Leibovitz's+IMS+SFB (Figura 18 B), Meio Leibovitz's+HBSS+IMS (Figura 19 A) e Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB (Figura 19 B).

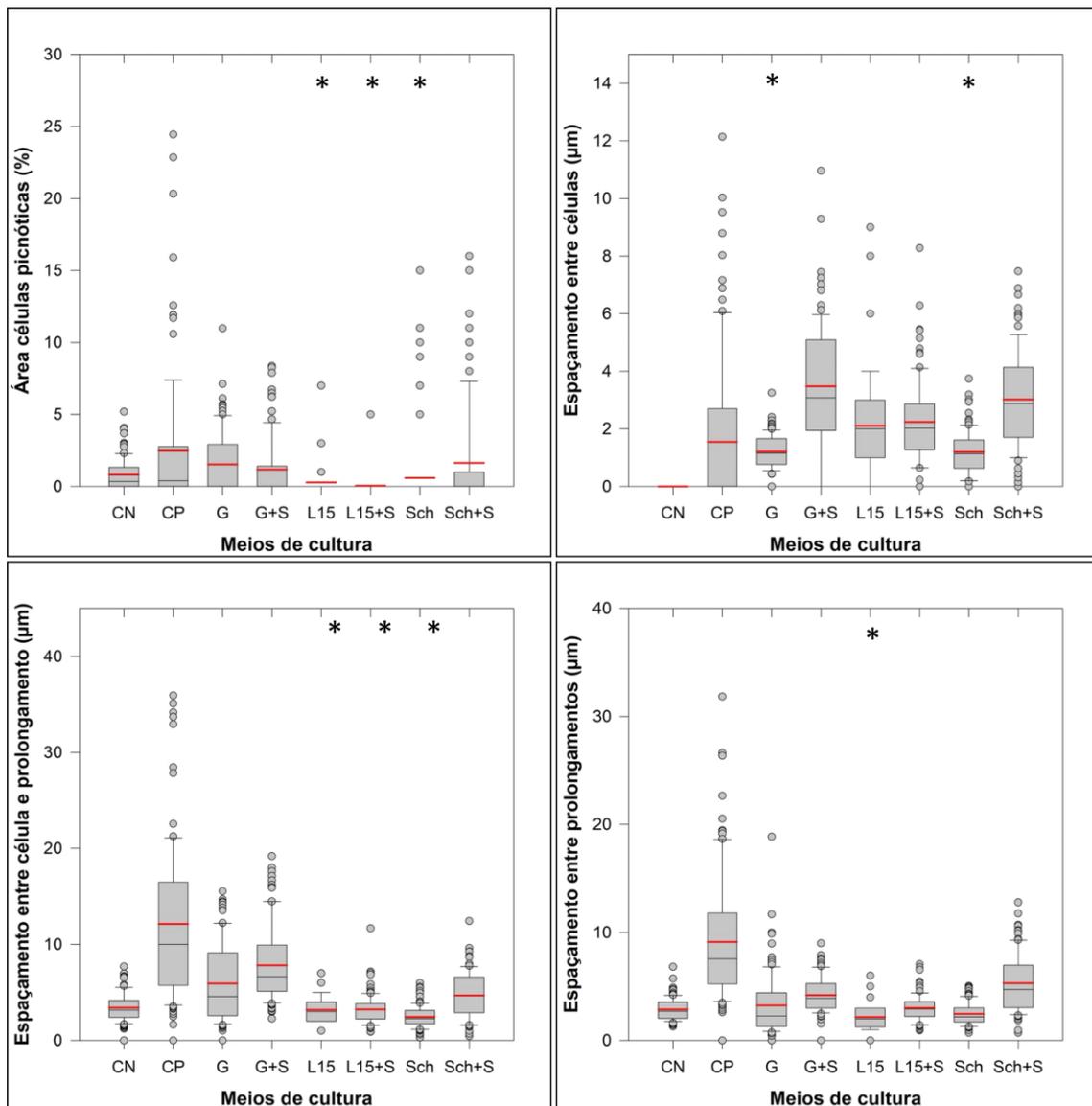


Figura 3. Boxplots dos grupos contendo os meios de cultura puros e suplementados com SFB mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 1 hora para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CN-Control Negativo; CP-Control Positivo; G-Meio Grace; G+S-Meio Grace+SFB; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; Sch-Meio Schneider; Sch+S-Meio Schneider+SFB. Boxplots seguidos por asterisco não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e apresentam os melhores resultados para o parâmetro avaliado.

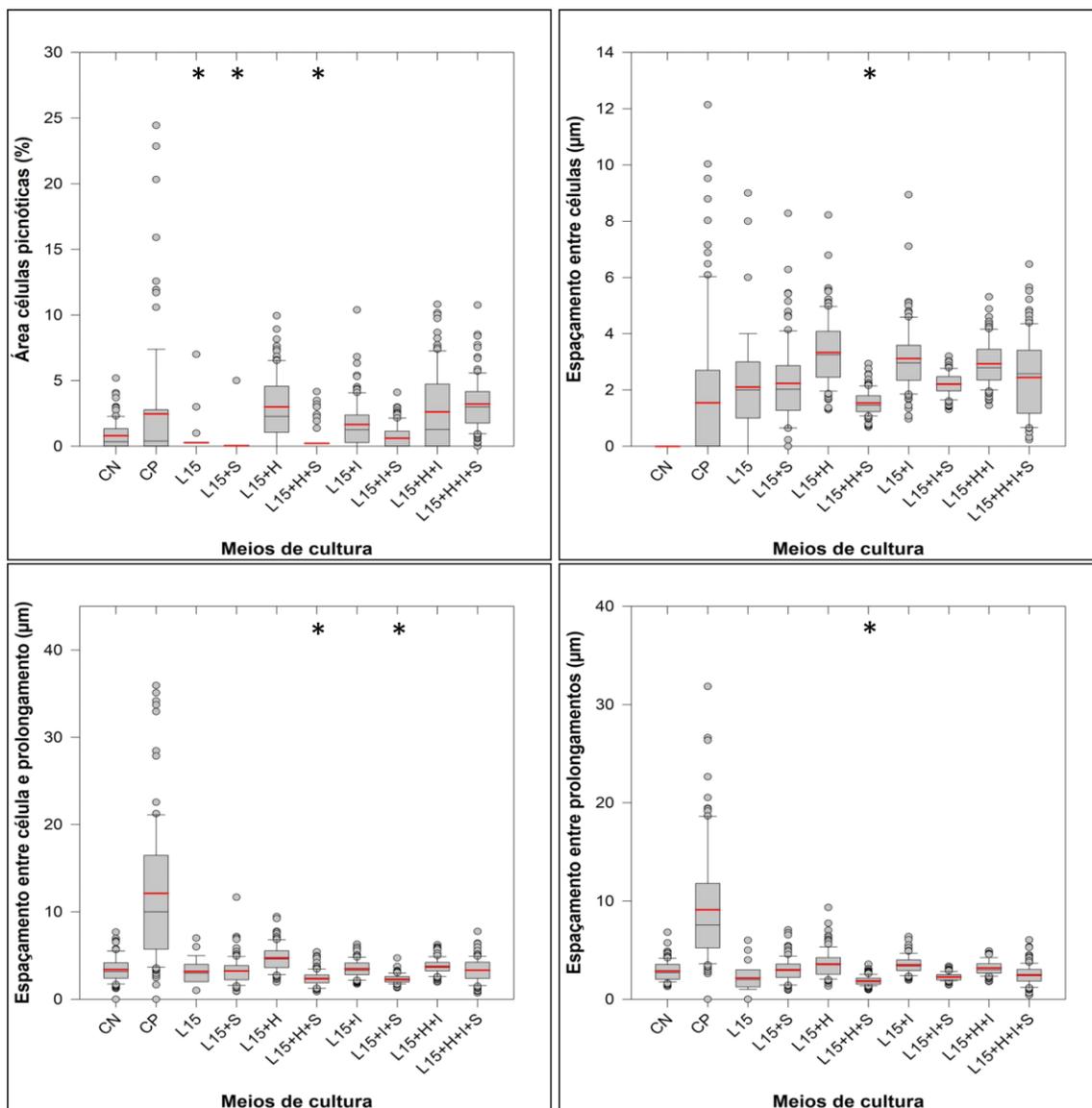


Figura 4. Boxplots dos grupos contendo os meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB suplementados com HBSS e IMS individualmente ou em conjunto mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 1 hora para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CN-Controlle Negativo; CP-Controlle Positivo; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; L15+H-Meio Leibovitz's+HBSS; L15+H+S-Meio Leibovitz's+HBSS+SFB; L15+I-Meio Leibovitz's+IMS; L15+I+S-Meio Leibovitz's+IMS+SFB; L15+H+I-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS; L15+H+I+S-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB. Boxplots seguidos por asterisco não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e apresentam os melhores resultados para o parâmetro avaliado.

4.2.2 Tempo: 6 horas

As análises estatísticas para os grupos experimentais contendo os meios puros e para os grupos experimentais contendo os meios suplementados com SFB mostraram que, para o tempo de 6 horas, os meios Grace e Grace+SFB apresentaram as menores áreas com células picnóticas dentre todos os meios analisados. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado podem-se destacar os meios Schneider e Leibovitz's como tendo as menores distâncias. No que diz respeito a distâncias entre as células de Kenyon localizadas no interior do cálice do corpo pedunculado pode-se destacar o meio Leibovitz's, o qual apresentou menores distâncias. Finalmente, para as medidas das distâncias entre os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado o meio Leibovitz's se mostrou melhor neste parâmetro, apresentando menores espaçamentos.

Já as análises estatísticas dos meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB, os quais se mostraram os melhores meios em uma análise prévia, em comparação com os grupos contendo as suplementações com HBSS e IMS empregadas individualmente ou em conjunto mostraram que, para o tempo de 6 horas, os meios Leibovitz's+HBSS e Leibovitz's+HBSS+IMS foram os que apresentaram as menores áreas de células picnóticas. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice dos corpos pedunculado, os meios Leibovitz's, Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+HBSS+SFB e Leibovitz's+IMS apresentaram os menores distâncias dentre os demais grupos analisados. No que diz respeito a distância entre as células de Kenyon internas pode-se destacar o meio Leibovitz's+HBSS como o que apresentou as menores distâncias. Para as medidas das distâncias entre os

prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, o meio Leibovitz's apresentou as menores distâncias sendo, portanto, o melhor meio.

Todas as comparações estatísticas feitas para o tempo de 6 horas estão representadas nas Figuras 5 e 6. Fotomicrografias dos corpos pedunculados das abelhas *A. mellifera* africanizada coradas com HE para o tempo de 6 horas estão representadas da seguinte maneira: Controle Negativo (Figura 11 C), Controle Positivo (Figura 11 D), Meio Grace (Figura 13 C), Meio Grace+SFB (Figura 13 D), Meio Schneider (Figura 14 C), Meio Schneider+SFB (Figura 14 D), Meio Leibovitz's (Figura 16 C), Meio Leibovitz's+SFB (Figura 16 D), Meio Leibovitz's+HBSS (Figura 17 C), Meio Leibovitz's+HBSS+SFB (Figura 17 D), Meio Leibovitz's+IMS (Figura 18 C), Meio Leibovitz's+IMS+SFB (Figura 18 D), Meio Leibovitz's+HBSS+IMS (Figura 19 C) e Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB (Figura 19 D).

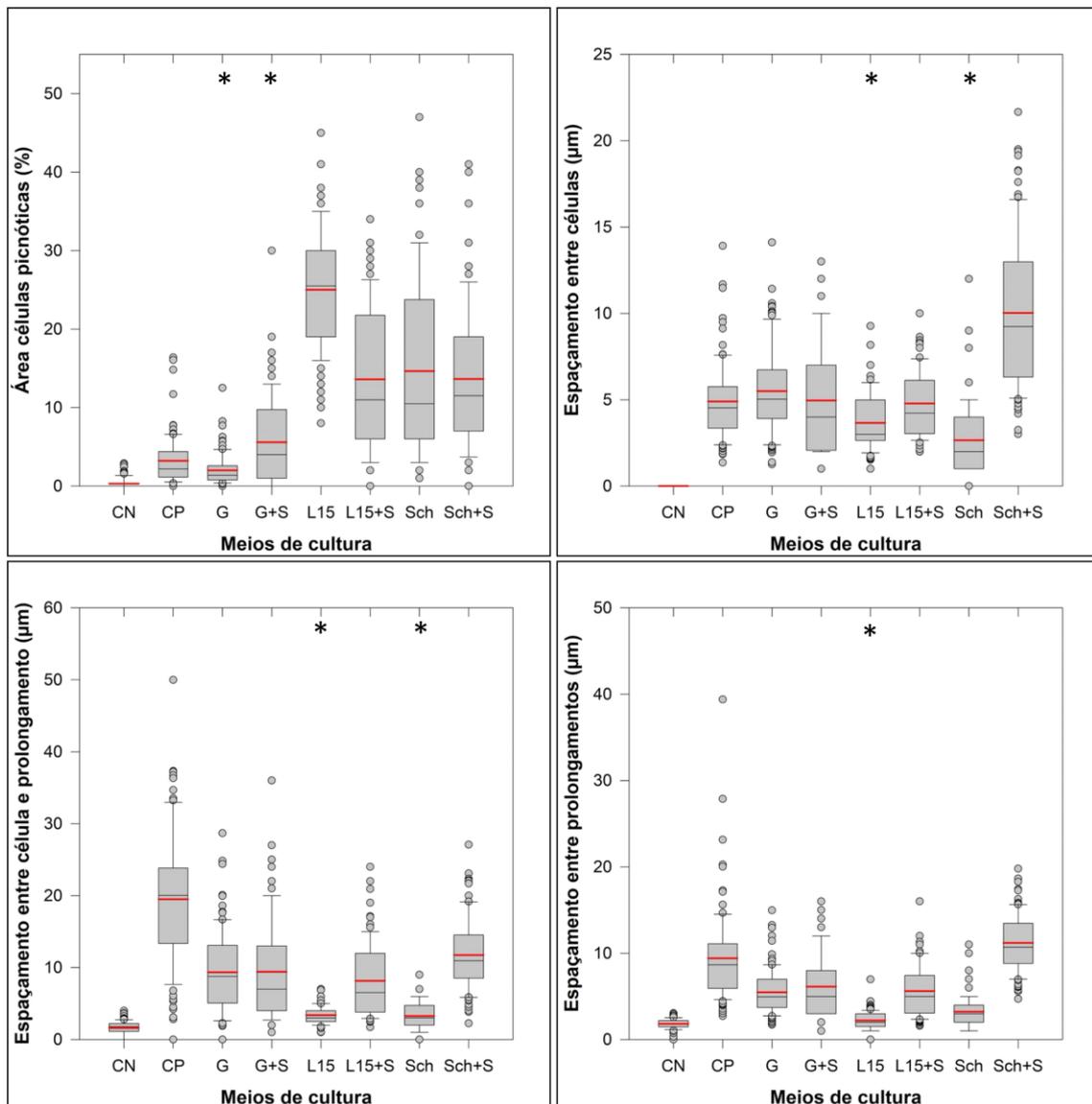


Figura 5. Boxplots dos grupos contendo os meios de cultura puros e suplementados com SFB mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 6 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CP-Controle Positivo; CN-Controle Negativo; G-Meio Grace; G+S-Meio Grace+SFB; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; Sch-Meio Schneider; Sch+S- Meio Schneider+SFB. Boxplots seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

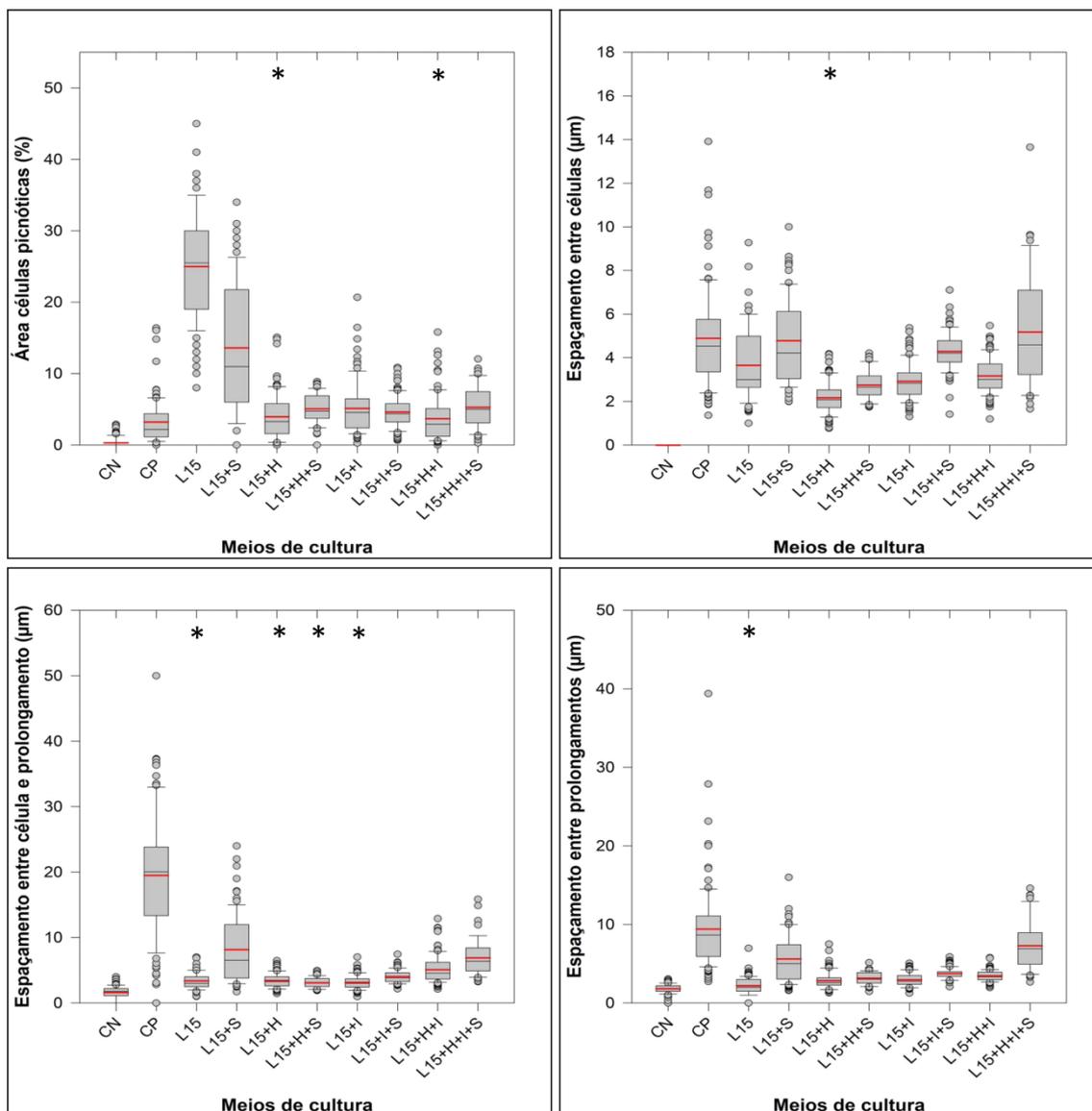


Figura 6. Boxplots dos grupos contendo os meios Leibovitz's e Leibovitz's+soro suplementados com HBSS e IMS individualmente ou em conjunto mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 6 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CN-Controlle Negativo; CP-Controlle Positivo; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; L15+H-Meio Leibovitz's+HBSS; L15+H+S-Meio Leibovitz's+HBSS+SFB; L15+I-Meio Leibovitz's+IMS; L15+I+S-Meio Leibovitz's+IMS+SFB; L15+H+I-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS; L15+H+I+S-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB. Boxplots seguidos por asterisco não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e apresentam os melhores resultados para o parâmetro avaliado.

4.2.3 Tempo: 12 horas

As análises estatísticas para o tempo de 12 horas evidenciaram expressivo aumento de células picnóticas tanto nos grupos com meios de cultura puros, quanto nos grupos com meios de cultura suplementados com SFB. Entretanto, dentre todos os meios analisados, os meios Grace e Leibovitz's foram os que apresentaram menores áreas de células picnóticas. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o corpo pedunculado constatou-se que os meios Grace+SFB, Leibovitz's e Leibovitz's+SFB foram os que apresentaram as menores distâncias. No que diz respeito ao espaçamento entre as células de Kenyon localizadas no interior do cálice do corpo pedunculado pode-se destacar o meio Leibovitz's+SFB como sendo o que apresentou as menores distâncias. Finalmente, para as medidas das distâncias entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado o meio Leibovitz's+SFB foi o que apresentou as menores distâncias dentre os demais meios analisados.

Já as análises estatísticas dos meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB, os quais se mostraram os melhores meios em uma análise prévia, em comparação com os grupos contendo as suplementações com HBSS e IMS empregadas individualmente ou em conjunto mostraram que, para o tempo de 12 horas, o meio Leibovitz's+SFB foi o que apresentou melhores resultados para as áreas de células picnóticas, não diferindo estatisticamente dos demais grupos testados mas destacando-se pela menor quantidade de outliers. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice dos corpos pedunculado, o meio Leibovitz's+HBSS apresentou as menores distâncias dentre os demais grupos analisados. No que diz respeito ao espaçamento entre as células de Kenyon internas destacaram-se os meios Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+HBSS+SFB e

Leibovitz's+IMS, os quais apresentaram as menores distâncias. Para as medidas das distâncias entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, os meios Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+HBSS+IMS, Leibovitz's+HBSS+SFB e Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB apresentaram as menores distâncias sendo, portanto, os melhores meios.

Todas as comparações estatísticas feitas para o tempo de 12 horas estão representadas nas Figuras 7 e 8. Fotomicrografias dos corpos pedunculados das abelhas *A. mellifera* africanizada coradas com HE para o tempo de 12 horas estão representadas da seguinte maneira: Controle Negativo (Figura 11 E), Controle Positivo (Figura 11 F), Meio Grace (Figura 13 E), Meio Grace+SFB (Figura 13 F), Meio Schneider (Figura 14 E), Meio Schneider+SFB (Figura 14 F), Meio Leibovitz's (Figura 16 E), Meio Leibovitz's+SFB (Figura 16 F), Meio Leibovitz's+HBSS (Figura 17 E), Meio Leibovitz's+HBSS+SFB (Figura 17 F), Meio Leibovitz's+IMS (Figura 18 E), Meio Leibovitz's+IMS+SFB (Figura 18 F), Meio Leibovitz's+HBSS+IMS (Figura 19 E) e Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB (Figura 19 F).

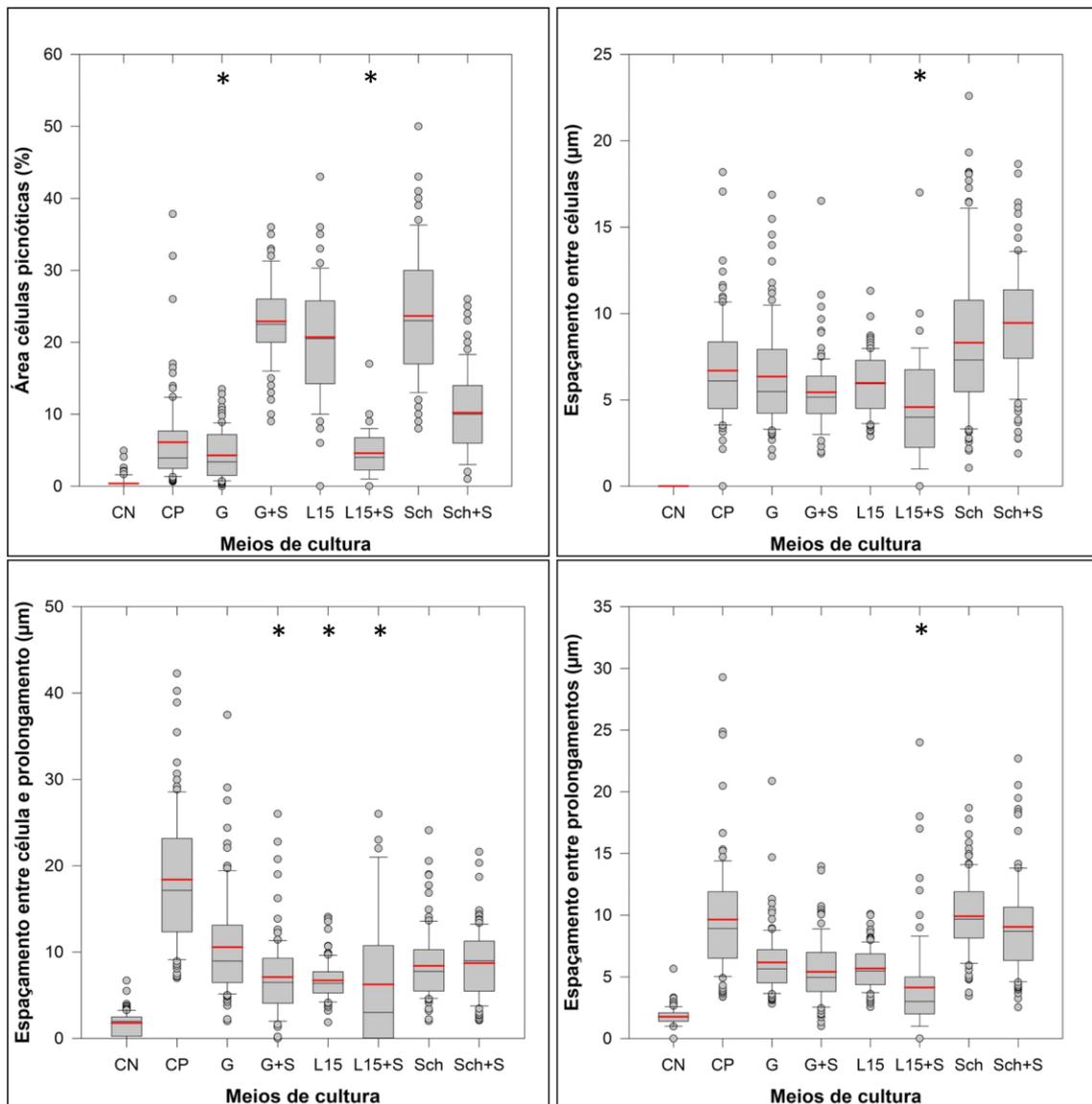


Figura 7. Boxplots dos grupos contendo os meios de cultura puros e suplementados com SFB mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 12 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CP-Controle Positivo; CN-Controle Negativo; G-Meio Grace; G+S-Meio Grace+SFB; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; Sch-Meio Schneider; Sch+S-Meio Schneider+SFB. Boxplots seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

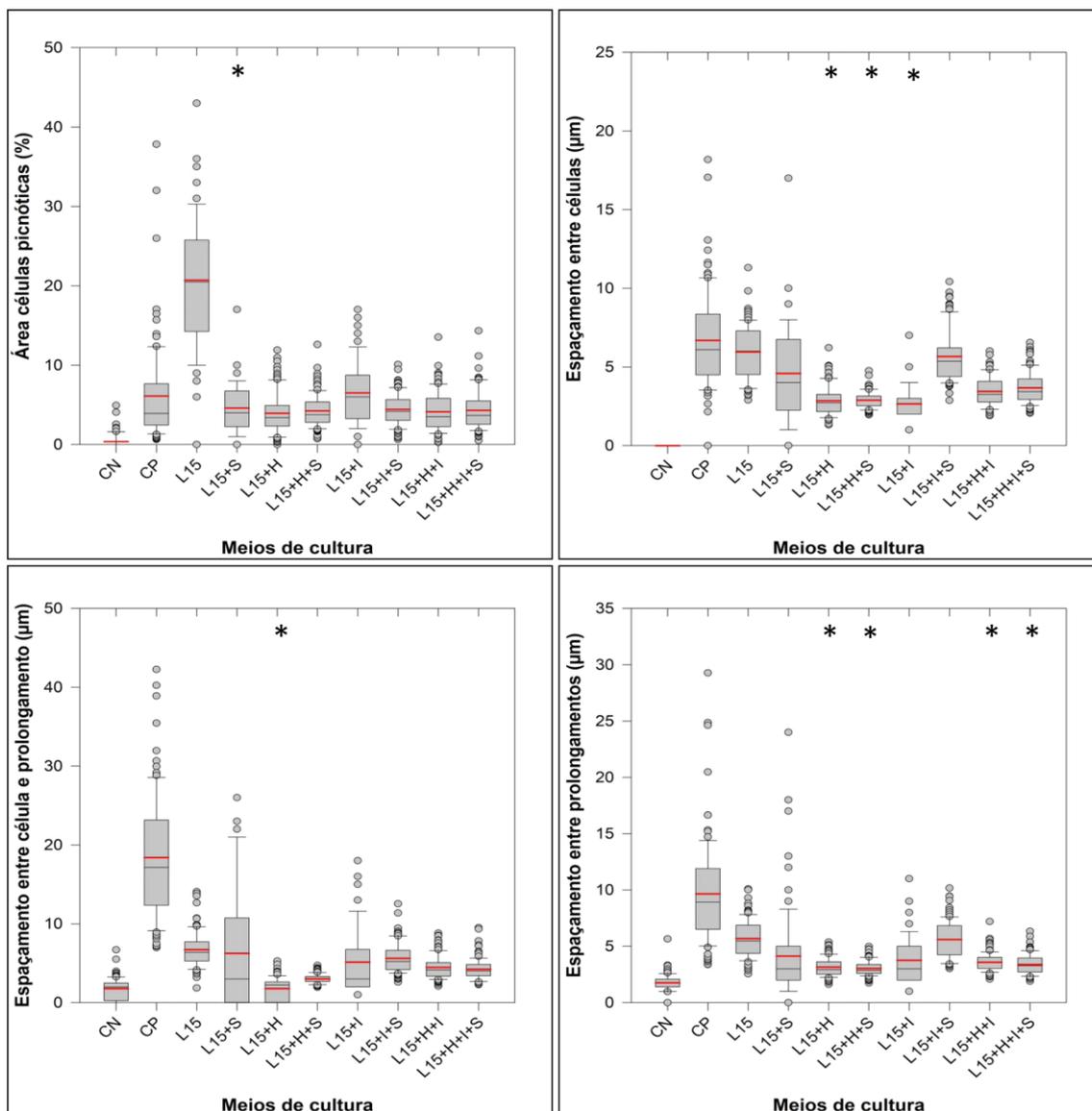


Figura 8. Boxplots dos grupos contendo os meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB suplementados com HBSS e IMS individualmente ou em conjunto mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 12 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CN-Controlle Negativo; CP-Controlle Positivo; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; L15+H-Meio Leibovitz's+HBSS; L15+H+S-Meio Leibovitz's+HBSS+SFB; L15+I-Meio Leibovitz's+IMS; L15+I+S-Meio Leibovitz's+IMS+SFB; L15+H+I-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS; L15+H+I+S-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB. Boxplots seguidos por asterisco não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e apresentam os melhores resultados para o parâmetro avaliado.

4.2.4 Tempo: 24 horas

As análises estatísticas para os grupos experimentais contendo os meios puros e para os grupos experimentais contendo os meios suplementados com SFB mostraram que, para o tempo de 24 horas, os meios Schneider+SFB e Grace foram os que apresentaram menores áreas com células picnóticas. Vale ressaltar que o controle negativo e o meio Schneider+SFB apresentaram estatisticamente uma menor área de células picnóticas do que a maioria dos tratamentos. Tal resultado reflete a diminuição do número de células de Kenyon tanto no corpo pedunculado como em todo o tecido nervoso (Fig 12d; Fig 13 ; Fig 17d e Fig 18). Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice do corpo pedunculado o meio Leibovitz's+SFB foi o que apresentou as menores distâncias. No que diz respeito distâncias entre as células de Kenyon localizadas no interior do cálice do corpo pedunculado o meio Leibovitz's+SFB foi o que apresentou as menores distâncias. Finalmente, para as medidas das distâncias entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado o meio Leibovitz's+SFB apresentou as menores distâncias.

Já as análises estatísticas dos meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB, os quais se mostraram os melhores meios em uma análise prévia, em comparação com os grupos contendo as suplementações com HBSS e IMS empregadas individualmente ou em conjunto mostraram que, para o tempo de 24 horas, os meios Leibovitz's+HBSS e Leibovitz's+IMS+SFB apresentaram as menores áreas com células picnóticas. Já para as medidas da distância entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o cálice dos corpos pedunculado, os meios Leibovitz's+HBSS e Leibovitz's+IMS apresentaram as menores distâncias dentre os demais grupos analisados. No que diz respeito à distância entre as células de Kenyon internas destacaram-se os meios Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+HBSS+SFB e Leibovitz's+IMS, os quais apresentaram

as menores distâncias. Para as medidas das distâncias entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado, os meios Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+IMS, Leibovitz's+HBSS+IMS e Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB apresentaram as menores distâncias sendo, portanto, os melhores meios.

Todas as comparações estatísticas feitas para o tempo de 24 horas estão representadas nas Figuras 9 e 10. Fotomicrografias dos corpos pedunculados das abelhas *A. mellifera* africanizada coradas com HE para o tempo de 24 horas estão representadas da seguinte maneira: Controle Negativo (Figura 11 G), Controle Positivo (Figura 11 H), Meio Grace (Figura 13 G), Meio Grace+SFB (Figura 13 H), Meio Schneider (Figura 14 G), Meio Schneider+SFB (Figura 14 H), Meio Leibovitz's (Figura 16 G), Meio Leibovitz's+SFB (Figura 16 H), Meio Leibovitz's+HBSS (Figura 17 G), Meio Leibovitz's+HBSS+SFB (Figura 17 H), Meio Leibovitz's+IMS (Figura 18 G), Meio Leibovitz's+IMS+SFB (Figura 18 H), Meio Leibovitz's+HBSS+IMS (Figura 19 G) e Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB (Figura 19 H).

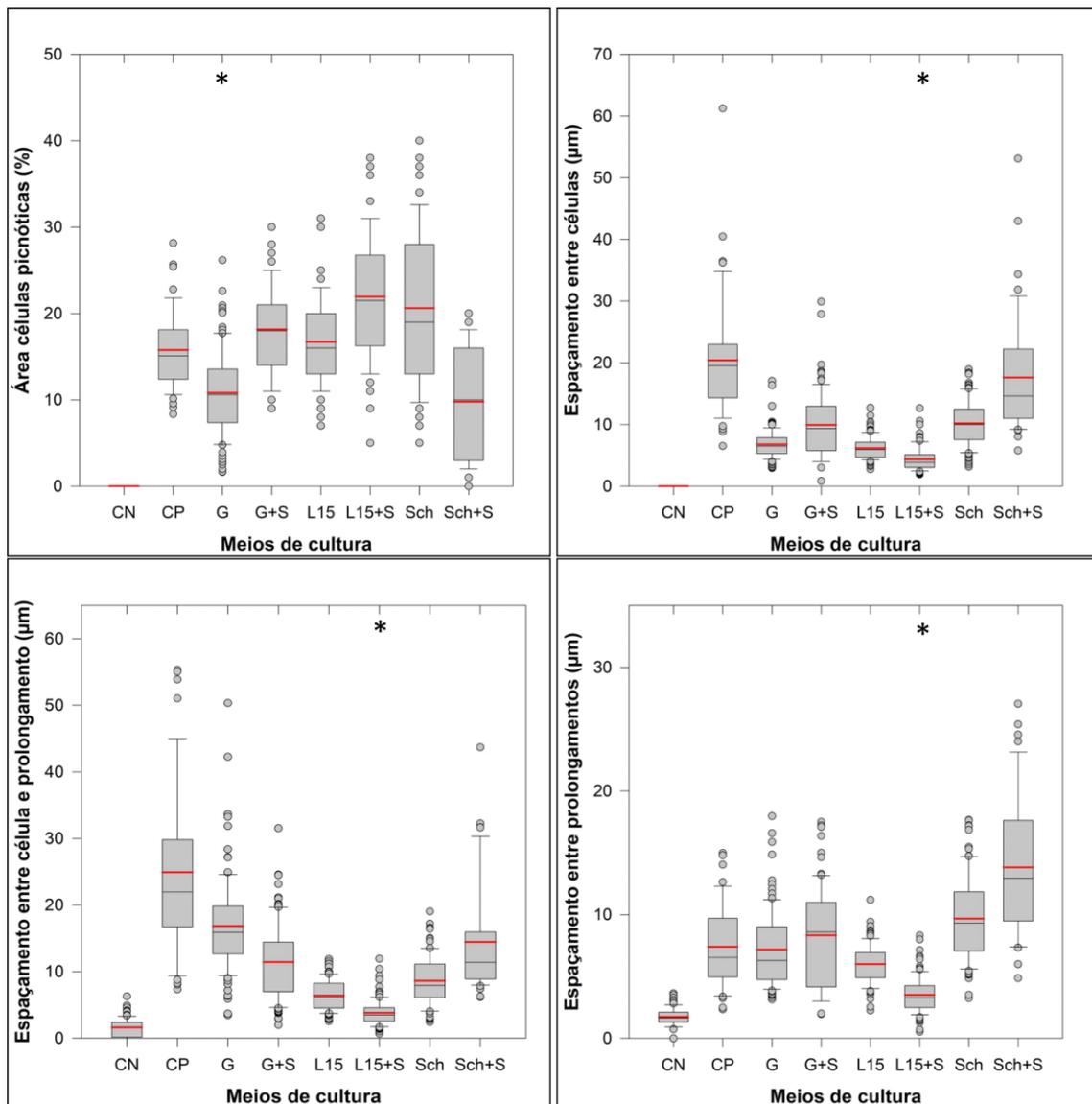


Figura 9. Boxplots dos grupos contendo os meios de cultura puros e suplementados com SFB mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 24 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CP-Controle Positivo; CN-Controle Negativo; G-Meio Grace; G+S-Meio Grace+SFB; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; Sch-Meio Schneider; Sch+S- Meio Schneider+SFB. Boxplots seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

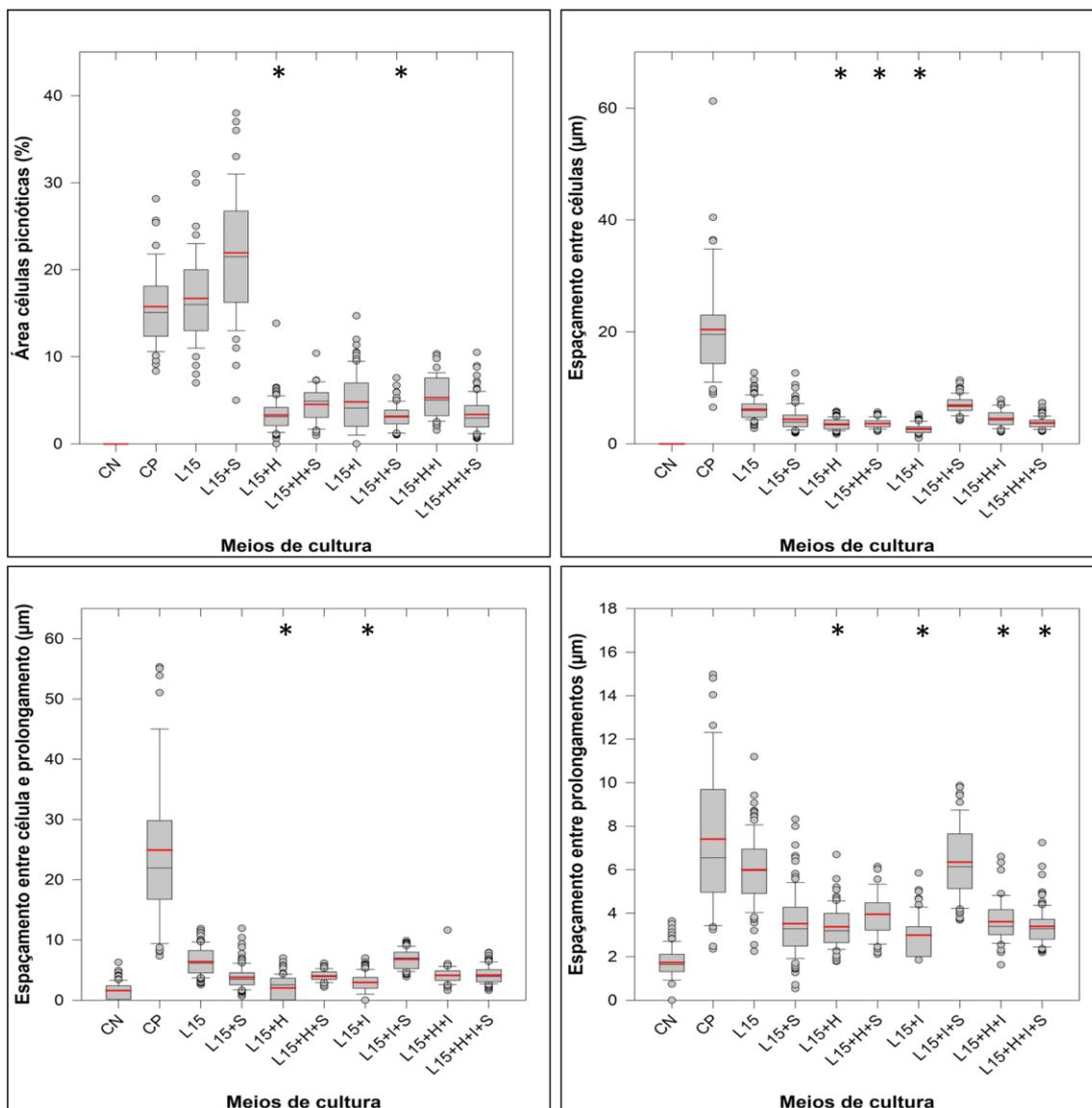


Figura 10. Boxplots dos grupos contendo os meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB suplementados com HBSS e IMS individualmente ou em conjunto mostrando as avaliações dos corpos pedunculados no tempo de 24 horas para os seguintes parâmetros: área de células picnóticas, distância entre células de Kenyon, distância entre células de Kenyon e os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado e distância entre os prolongamentos do cálice do corpo pedunculado. CN-Controlle Negativo; CP-Controlle Positivo; L15-Meio Leibovitz's; L15+S-Meio Leibovitz's+SFB; L15+H-Meio Leibovitz's+HBSS; L15+H+S-Meio Leibovitz's+HBSS+SFB; L15+I-Meio Leibovitz's+IMS; L15+I+S-Meio Leibovitz's+IMS+SFB; L15+H+I-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS; L15+H+I+S-Meio Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB. Boxplots seguidos por asterisco não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e apresentam os melhores resultados para o parâmetro avaliado.

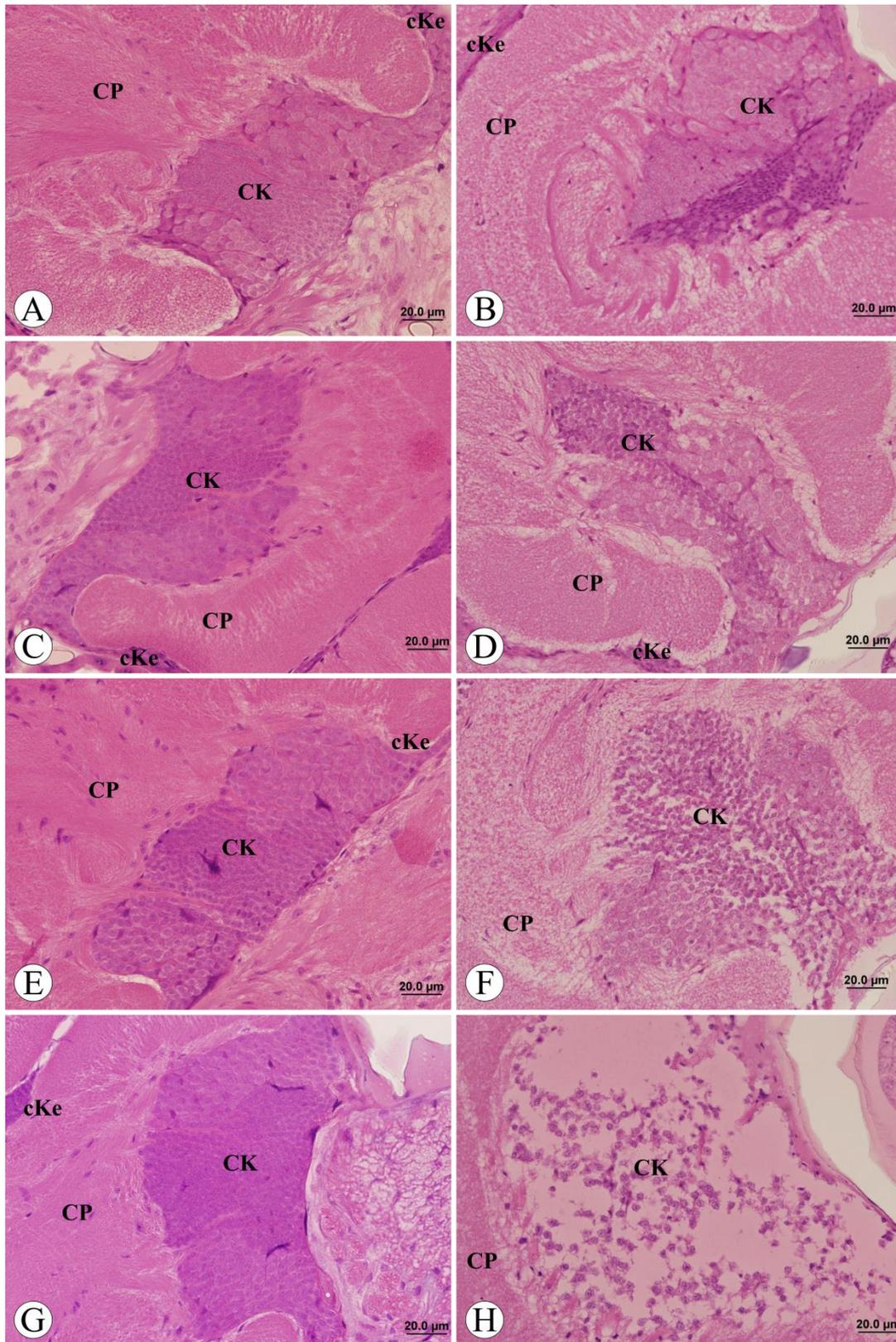


Figura 11. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Controle Negativo 1 hora, (B) Controle Positivo 1 hora, (C) Controle Negativo 6 horas, (D) Controle Positivo 6 horas, (E) Controle Negativo 12 horas, (F) Controle Positivo 12 horas, (G) Controle Negativo 24 horas e (H) Controle Positivo 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

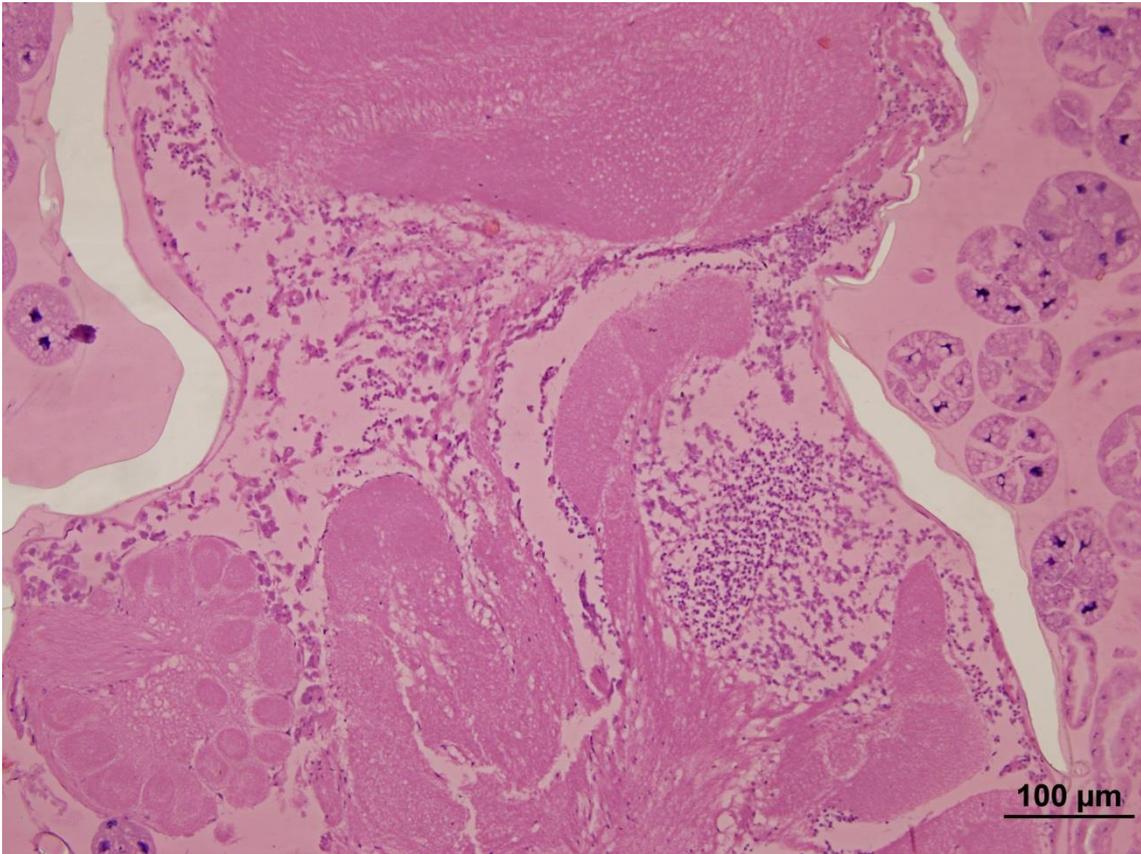


Figura 12. Fotomicrografia do cérebro de *A. mellifera* africanizada corada com hematoxilina e eosina. Controle positivo no tempo de cultivo *in vitro* de 24 horas evidenciando a diminuição das Células de Kenyon (coradas fortemente em roxo) e o desarranjo tecidual.

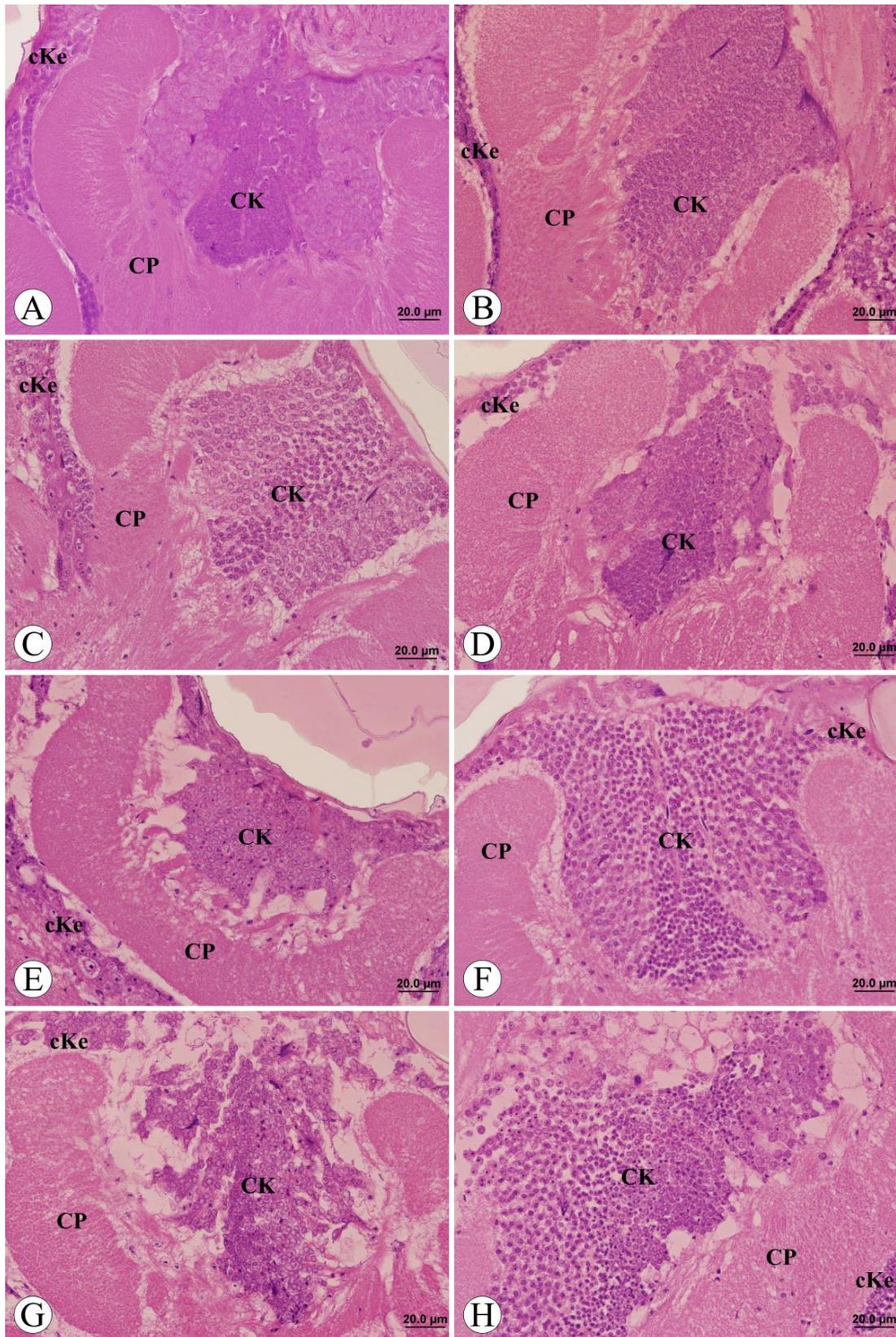


Figura 13. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Grace 1 hora, (B) Meio Grace + SFB 1 hora, (C) Meio Grace 6 horas, (D) Meio Grace + SFB 6 horas, (E) Meio Grace 12 horas, (F) Meio Grace + SFB 12 horas, (G) Meio Grace 24 horas e (H) Meio Grace + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

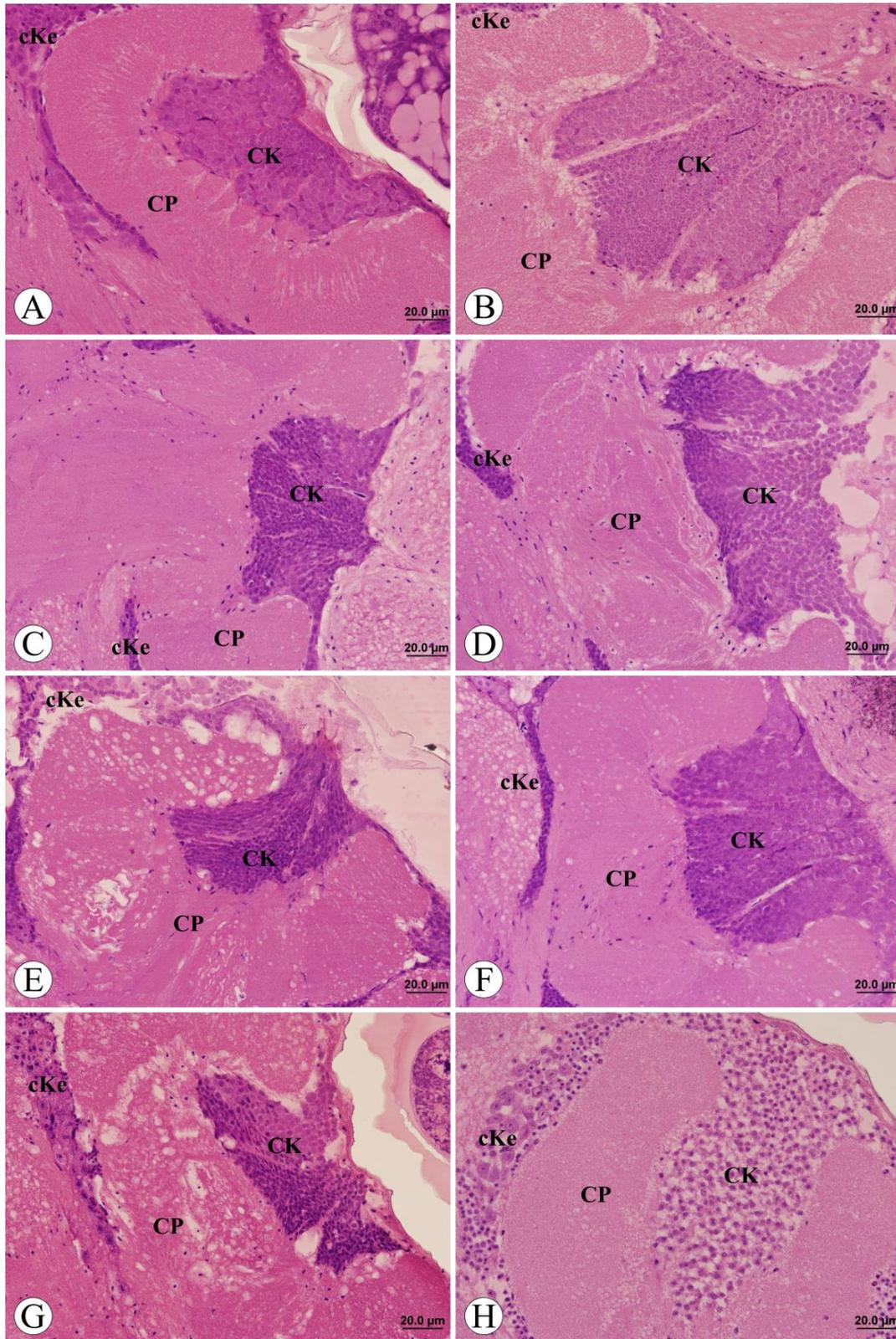


Figura 14. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Schneider 1 hora, (B) Meio Schneider + SFB 1 hora, (C) Meio Schneider 6 horas, (D) Meio Schneider + SFB 6 horas, (E) Meio Schneider 12 horas, (F) Meio Schneider + SFB 12 horas, (G) Meio Schneider 24 horas e (H) Meio Schneider + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

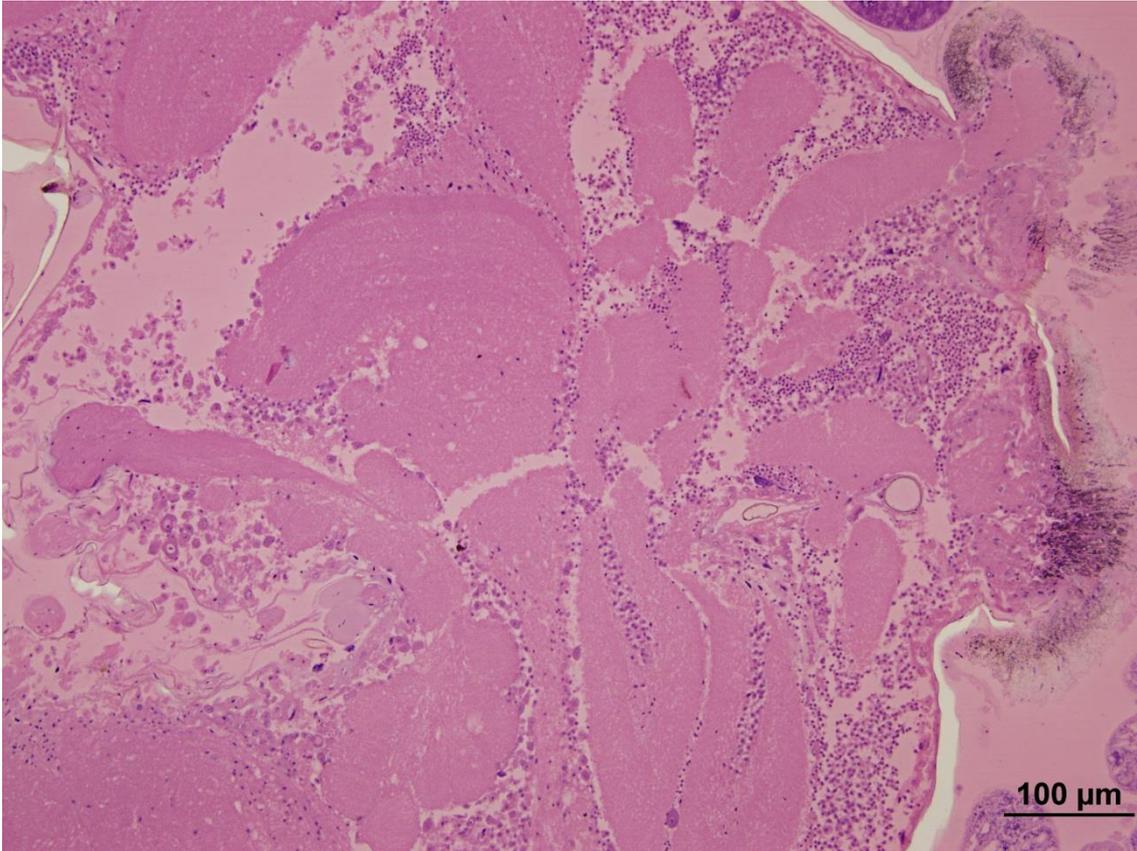


Figura 15. Fotomicrografia do cérebro de *A. mellifera* africanizada corada com hematoxilina e eosina. Meio Schneider + SFB no tempo de cultivo *in vitro* de 24 horas evidenciando a diminuição das Células de Kenyon (coradas fortemente em roxo) e o desarranjo tecidual.

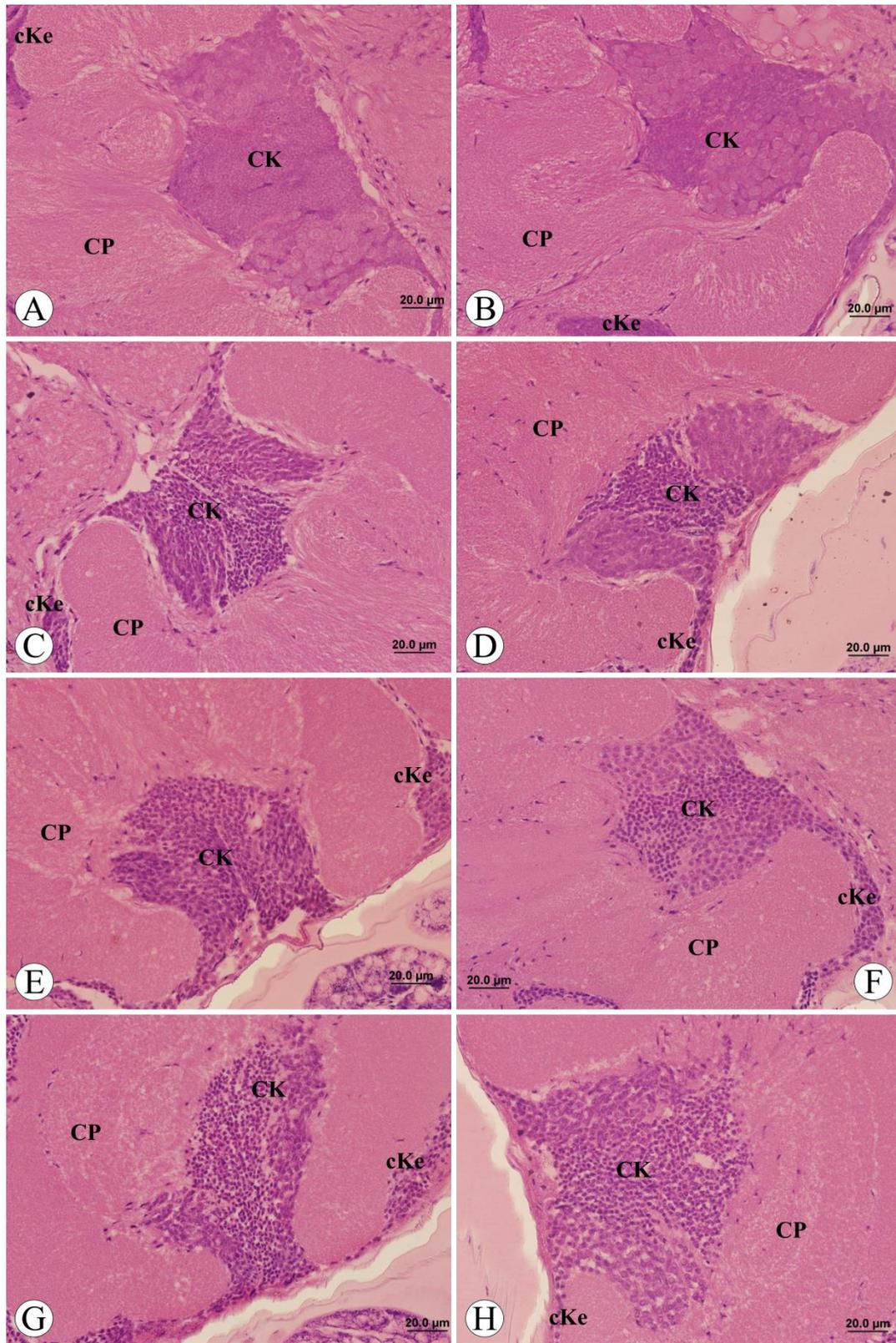


Figura 16. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Leibovitz's 1 hora, (B) Meio Leibovitz's + SFB 1 hora, (C) Meio Leibovitz's 6 horas, (D) Meio Leibovitz's + SFB 6 horas, (E) Meio Leibovitz's 12 horas, (F) Meio Leibovitz's + SFB 12 horas, (G) Meio Leibovitz's 24 horas e (H) Meio Leibovitz's + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

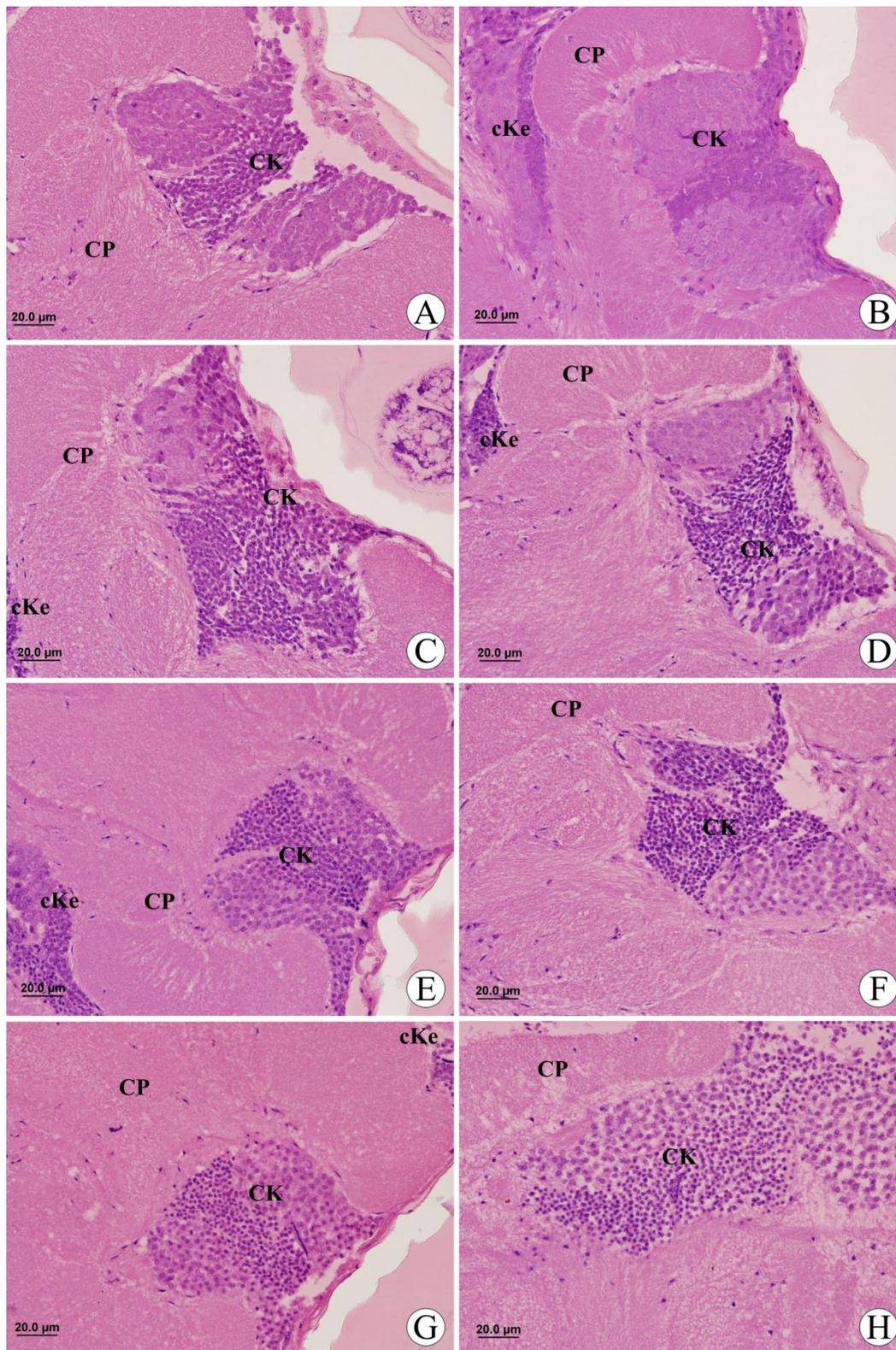


Figura 17. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Leibovitz's + HBSS 1 hora, (B) Meio Leibovitz's + HBSS + SFB 1 hora, (C) Meio Leibovitz's + HBSS 6 horas, (D) Meio Leibovitz's + HBSS + SFB 6 horas, (E) Meio Leibovitz's + HBSS 12 horas, (F) Meio Leibovitz's + HBSS + SFB 12 horas, (G) Meio Leibovitz's + HBSS 24 horas e (H) Meio Leibovitz's + HBSS + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

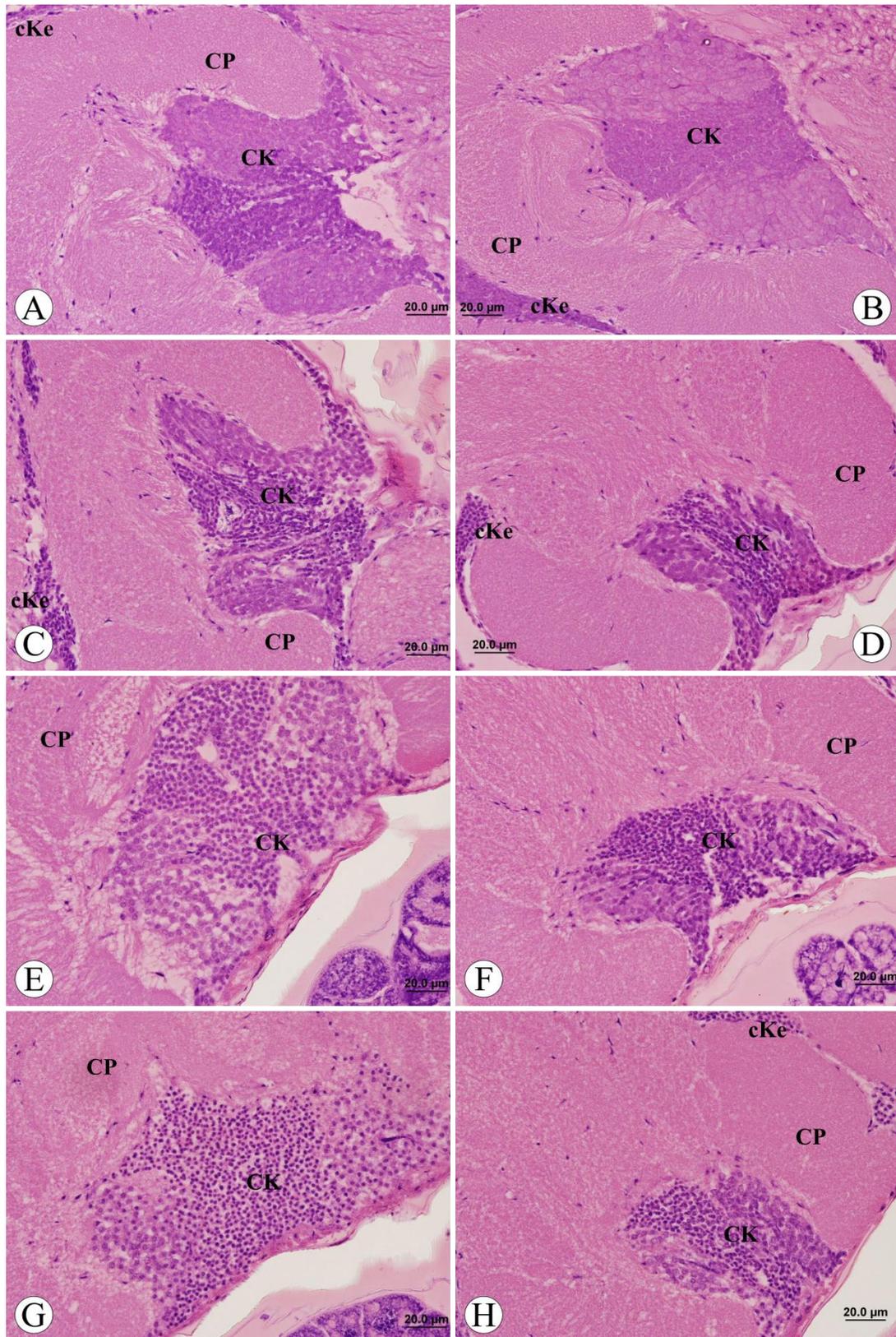


Figura 18. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Leibovitz's + IMS 1 hora, (B) Meio Leibovitz's + IMS + SFB 1 hora, (C) Meio Leibovitz's + IMS 6 horas, (D) Meio Leibovitz's + IMS + SFB 6 horas, (E) Meio Leibovitz's + IMS 12 horas, (F) Meio Leibovitz's + IMS + SFB 12 horas, (G) Meio Leibovitz's + IMS 24 horas e (H) Meio Leibovitz's + IMS + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

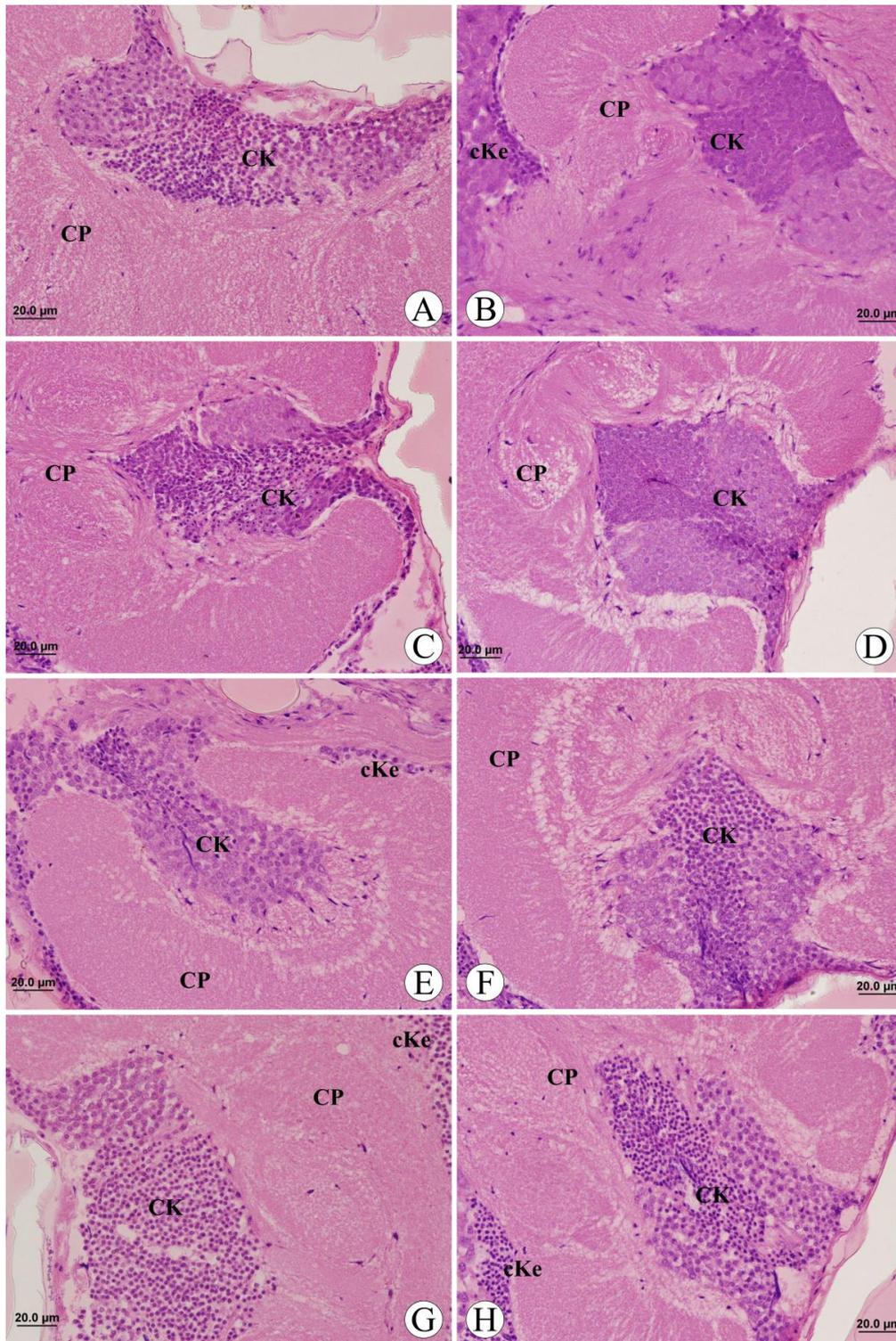


Figura 19. Fotomicrografia de corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizadas coradas com hematoxilina e eosina. (A) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS 1 hora, (B) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS + SFB 1 hora, (C) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS 6 horas, (D) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS + SFB 6 horas, (E) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS 12 horas, (F) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS + SFB 12 horas, (G) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS 24 horas e (H) Meio Leibovitz's + HBSS + IMS + SFB 24 horas. As siglas indicam: CP-Corpo Pedunculado, CK-Células de Kenyon e cKe-Células de Kenyon Externas.

4.3 Análises de correlação e comparação entre os resultados obtidos

Foi gerada uma matriz de correlação visando compreender o quão correlatos estavam os dados analisados (Tabela 1). Valores próximos a 1 indicam que as variáveis são diretamente correlacionadas, isto é, quando uma aumenta a outra aumenta proporcionalmente. Valores próximos a -1 indicam que as variáveis são inversamente correlacionadas, ou seja, quando uma aumenta a outra diminui.

Tabela 1. Matriz de correlação de parâmetros morfofisiológicos de tecido nervoso de *A. mellifera* africanizada cultivado *in vitro* em diferentes meios de cultura.

	PIC	CEL/CEL	CEL/PROL	PROL/PROL
PIC	1	0,9230	0,8990	0,0672
CEL/CEL	-	1	0,9955	0,4403
CEL/PROL	-	-	1	0,4974
PROL/PROL	-	-	-	1

PIC – Células picnóticas; CEL/CEL – Espaçamento entre células de Kenyon; CEL/PROL – Espaçamento entre as células de Kenyon e os prolongamentos do corpo pedunculado; PROL/PROL – Espaçamento entre os prolongamentos do corpo pedunculado.

De acordo com essa análise foi possível encontrar forte correlação entre células picnóticas e espaçamento entre células de Kenyon, bem como entre células picnóticas e espaçamentos entre células de Kenyon e prolongamentos do corpo pedunculado. Ainda, os espaçamentos entre células de Kenyon e os espaçamentos entre células de Kenyon e prolongamentos do corpo pedunculado também se mostraram fortemente correlacionadas. Os espaçamentos entre os prolongamentos do corpo pedunculado não estão correlacionados com nenhuma das outras variáveis.

A fim de facilitar a interpretação dos dados fizeram-se dois quadros de comparações (Quadro 2 e Quadro 3) entre todos os parâmetros obtidos em todos os tempos e tratamentos. Para tal obteve-se a razão entre as médias dos tratamentos (para cada tempo e parâmetro) e a média do grupo controle positivo, resultando na taxa de aumento ou redução da variável estudada. Quando a média do grupo controle foi zero

não se dividiu os valores, ou seja, utilizaram-se as médias dos tratamentos e quando a média a grupo controle foi inferior a média dos tratamentos a razão foi invertida, isto é, dividiu-se a média do controle positivo pela média do tratamento, obtendo assim, quantas vezes o tratamento foi superior ao grupo controle. Para determinar se houve aumento ou redução em comparação ao controle positivo utilizaram-se setas, sendo que para cima as médias foram superiores e para baixo inferiores ao controle positivo. As setas vermelhas indicam os melhores tratamentos obtidos para cada tratamento e parâmetro.

Nesses quadros (2 e 3) pode-se observar a quantidade de vezes que a média do parâmetro analisado em determinado tempo foi maior ou menor (de acordo com as setas) em relação ao controle positivo. Sendo assim, foi possível determinar que os meios Leibovitz's e Leibovitz's+SFB foram os meios que mais apresentaram setas vermelhas ao longo do tempo, para as análises prévias com meios puros e os mesmos meios suplementados com SFB, indicando serem promissores para a continuidade nos testes. Ainda, dentre os testes com os meios Leibovitz's e Leibovitz'+SFB suplementados com HBSS e IMS os meios que apresentaram mais setas vermelhas ao longo do tempo e, portanto, se mostraram melhores foram os meios Leibovitz'+HBSS e Leibovitz's+HBSS+SFB.

Quadro 2. Comparações entre a taxa de aumento das médias dos tratamentos em relação à média do controle negativo (em número de vezes) obtidas para cada parâmetro analisado nos diferentes tempos.

Tempo	1 hora				6 horas				12 horas				24 horas			
	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL
Média do Controle Negativo	0,81	0	3,41	2,88	0,3	0	1,60	1,82	0,37	0	1,78	1,76	0	0	1,61	1,74
Controle Positivo	3,06 x ns ↑	1,55 x ** ↑	3,56 x ** ↑	3,17 x ** ↑	10,64 x ** ↑	4,89 x ** ↑	12,19 x ** ↑	5,17 x ** ↑	16,56 x ** ↑	6,69 x ** ↑	10,33 x ** ↑	5,48 x ** ↑	15,77 x ** ↑	20,4 x ** ↑	15,43 x ** ↑	4,26 x ** ↑
Meio Grace	1,89 x ns ↑	1,21 x ** ↑	1,74 x * ↑	1,13 x ns ↑	6,5 x ** ↑	5,5 x ** ↑	5,84 x ** ↑	3,01 x ** ↑	11,61 x ** ↑	6,35 x ** ↑	5,95 x ** ↑	3,51 x ** ↑	10,81 x ** ↑	6,78 x ** ↑	10,43 x ** ↑	4,13 x ** ↑
Meio Grace+soro	1,44 x ns ↑	3,48 x ** ↑	2,30 x ** ↑	1,46 x ** ↑	19,61 x ** ↑	5,41 x ** ↑	6,17 x ** ↑	3,62 x ** ↑	63,56 x ** ↑	5,55 x ** ↑	4,05 x ** ↑	3,15 x ** ↑	18,63 x ** ↑	10,08 x ** ↑	7,14 x ** ↑	4,89 x ** ↑
Meio Schneider	1,28 x ** ↓	1,20 x ** ↑	1,39 x * ↓	1,17 x ns ↓	50,01 x ** ↑	3,18 x ** ↑	2,36 x * ↑	2,07 x ** ↑	65,63 x ** ↑	8,31 x ** ↑	4,72 x ** ↑	5,64 x ** ↑	21,1 x ** ↑	10,19 x ** ↑	5,34 x ** ↑	5,57 x ** ↑
Meio Schneider+soro	2,18 x Ns ↑	7,29 x ** ↑	1,37 x * ↑	1,84 x ** ↑	46,60 x ** ↑	10,03 x ** ↑	7,33 x ** ↑	6,14 x ** ↑	29,04 x ** ↑	9,45 x ** ↑	4,90 x ** ↑	5,14 x ** ↑	10,28 x ** ↑	17,60 x ** ↑	8,95 x ** ↑	7,96 x ** ↑
Meio Leibovitz's	2,38 x ** ↓	2,55 x ** ↑	1,09 x Ns ↑	1,07 x * ↓	84,39 x ** ↑	3,98 x ** ↑	2,30 x ** ↑	1,39 x ns ↑	57,65 x ** ↑	5,95 x ** ↑	3,78 x ** ↑	3,23 x ** ↑	17,20 x ** ↑	6,17 x ** ↑	3,97 x ** ↑	3,46 x ** ↑
Meio Leibovitz's+soro	14,33 x ** ↓	2,24 x ** ↑	1,05 x ns ↓	1,04 x ns ↑	50,01 x ** ↑	4,98 x ** ↑	5,23 x ** ↑	3,18 x ** ↑	13,85 x ** ↑	5,10 x ** ↑	3,68 x ** ↑	2,64 x ** ↑	22,42 x ** ↑	4,38 x ** ↑	2,35 x * ↑	2,02 x ** ↑

** - Significativo ao nível de 1 % de probabilidade de erro ($P < 0,001$). * significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro ($0,001 < p < 0,05$). ns – Não significativo pelo teste de Tukey. ↑ Indicam aumento em relação à média do controle; ↓ - Indicam redução em relação à média do controle. **Setas vermelhas** indicam aqueles tratamentos que foram melhores ou que mais se aproximaram do grupo controle.

Quadro 3. Comparações entre a taxa de aumento das médias dos tratamentos em relação a média do controle negativo (em número de vezes) obtidas para cada parâmetro analisado nos diferentes tempos.

Parâmetro analisado	1 hora				6 horas				12 horas				24 horas			
	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL	CEL PIC	CEL/ CEL	CEL/ PROL	PROL/ PROL
Média do Controle Negativo	0,81	0	3,41	2,88	0,3	0	1,60	1,82	0,37	0	1,78	1,76	0	0	1,61	1,74
Controle Positivo	3,06 x **	1,55 x **	3,56 x **	3,17 x **	10,64 x **	4,89 x **	12,19 x **	5,17 x **	16,56 x **	6,69 x **	10,33 x **	5,48 x **	15,77 x **	20,4 x **	15,43 x **	4,26 x **
Leibovitz's	1,89 x **	1,21 x **	1,74 x ns	1,13 x **	6,5 x **	5,5 x **	5,84 x **	3,01 x ns	11,61 x **	6,35 x **	5,95 x **	3,51 x **	10,81 x **	6,78 x **	10,43 x **	4,13 x **
Leibovitz's+soro	1,44 x **	3,48 x **	2,30 x ns	1,46 x Ns	19,61 x **	5,41 x **	6,17 x **	3,62 x **	63,56 x **	5,55 x **	4,05 x **	3,15 x **	18,63 x **	10,08 x **	7,14 x **	4,89 x **
Leibovitz's+H	3,07 x **	3,33 x **	1,39 x **	1,25 x **	13,13 x **	2,16 x **	2,14 x **	1,57 x **	10,65 x **	2,84 x **	0,00 ns	1,79 x **	3,31 x **	3,50 x **	1,27 x **	1,94 x **
Leibovitz's+I	2,05 x ns	3,10 x **	0,02 x ns	1,18 x **	17,07 x **	2,92 x **	1,97 x **	1,63 x **	18,84 x **	3,12 x **	3,14 x **	2,41 x **	5,26 x **	2,93 x **	2,28 x **	1,95 x **
Leibovitz's+H+I	3,23 x ns	2,93 x **	0,01 x ns	1,01 x ns	12,30 x **	3,17 x **	3,19 x **	1,90 x **	11,13 x **	3,44 x **	2,50 x **	2,03 x **	5,30 x **	2,50 x **	2,58 x **	2,07 x **
Leibovitz's+H+S	0,52 x **	1,54 x **	1,43 x **	1,53x **	16,93 x **	2,75 x **	1,93 x **	1,74 x **	11,43 x **	2,89x **	1,69 x **	1,73 x **	4,53 x **	3,61 x **	2,50 x **	2,27 x **
Leibovitz's+I+S	0,30 x ns	2,21 x **	1,48 x **	0,27 x *	15,40 x **	4,29 x **	2,52 x **	2,07 x **	11,94 x **	5,66 x **	3,15 x **	3,18 x **	3,18 x **	6,91 x **	4,22 x **	3,65 x **
Leibovitz's+H+I+S	3,99 x **	2,44 x **	0,02 x ns	0,16x ns	17,60x **	5,17 x **	4,31 x **	4,00 x **	11,67 x **	3,67 x **	2,38 x **	1,92 x **	3,39 x **	3,74 x **	2,60 x **	1,95 x **

** - Significativo ao nível de 1 % de probabilidade de erro ($P < 0,001$). * significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro ($0,001 < p < 0,05$). ns – Não significativo pelo teste de Tukey. ↑ Indicam aumento em relação à média do controle; ↓ Indicam redução em relação à média do controle **Setas vermelhas** indicam aqueles tratamentos que foram melhores ou que mais se aproximaram do grupo controle.

5. DISCUSSÃO

De maneira geral, foi possível observar diferentes respostas morfofisiológicas dos tecidos nervosos de *A. mellifera* africanizada submetidos ao cultivo *in vitro* nos tempos de 1, 6, 12 e 24h. Uma dessas respostas foram células fortemente coradas pela técnica de HE decorrentes de uma diminuição em seu volume e indicando condensação cromatínica. Tal resposta pôde ser observada tanto nos controles negativos e positivos quanto em todos os tratamentos com os diferentes meios de cultura e suas suplementações com SFB, HBSS e IMS em todos os tempos, com maior ou menor intensidade (Quadro 2 e 3). Contudo, a compactação cromatínica foi estatisticamente maior para os meios Grace, Grace+SFB e Schneider no tempo de 1 hora, Grace e Grace+SFB no tempo de 6 horas, Grace+SFB, Leibovitz's e Schneider no tempo de 12 horas e Leibovitz'+SFB e Schneider no tempo de 24 horas dentre os grupos testados inicialmente com os meios puros e suplementados com SFB. Já para os testes realizados entre os meios previamente selecionados e suplementados individualmente ou conjuntamente com HBSS e IMS a compactação cromatínica foi estatisticamente maior para os meios Leibovitz's+HBSS, Leibovitz's+HBSS+IMS e Leibovitz's+HBSS+IMS+SFB no tempo de 1 hora, Leibovitz's+SFB no tempo de 6 horas, Leibovitz's no tempo de 12 horas e Leibovitz's e Leibovitz'+SFB no tempo de 24 horas.

A presença de células cujos núcleos apresentaram a cromatina condensada pode indicar uma baixa atividade transcricional e, portanto, indícios de processo de morte celular como, por exemplo, a apoptose (HÄCKER, 2000; SILVA-ZACARIN et al., 2008). A compactação celular, tanto do núcleo com a cromatina condensada quanto do citoplasma, são características desse tipo de morte celular. De acordo com Kroemer et al. (2009), o termo “apoptose” deve ser aplicado quando constatados pelo menos dois

eventos que caracterizam tal morte, dentre eles células normalmente mais arredondadas, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear seguida de fragmentação celular em corpos apoptóticos delimitados por membrana, os quais são fagocitados ou digeridos por fagócitos, não havendo extravasamento do conteúdo celular.

Outra característica morfofisiológica observada foi a diminuição do número de células dos indivíduos do controle negativo e do tratamento com meio Schneider+SFB nos tempos de 24h, tanto nos corpos pedunculados como no restante do tecido. Ainda, a medida da área de células picnóticas pra o controle negativo no tempo de 24 horas foi estatisticamente menor que os meios Grace+SFB, Schneider, Schneider+SFB, Leibovitz's e Leibovitz's+SFB, uma vez que o cálculo do número de células fortemente coradas por área refletiu a diminuição do número de células no tecido. Tal diminuição associada à morfologia do corpo pedunculado sugere morte celular por autofagia ou por necrose. De acordo com estudos na morte por autofagia há o engolfamento da célula morta por autofagossomas que, normalmente, se acumulam no citoplasma enquanto que, na morte celular necrótica há um aumento no volume celular, o inchaço de organelas, ruptura da membrana plasmática e conseqüentemente perda do conteúdo celular, ou seja, em ambos os casos sugere-se diminuição do número de células (KERR, 1972, DEBNATH et al., 2005, KROEMER et al., 2009).

Alguns trabalhos sobre o impacto de inseticidas em cérebros de abelhas sugerem a morte celular tanto por apoptose quanto por autofagia, cujas principais características identificadas são à presença de células condensadas, células contendo núcleo com a cromatina condensada e perfil picnótico (ALMEIDA ROSSI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; JACOB et al., 2015)

Outra resposta morfofisiológica observada no tecido nervoso de *A. mellifera* africanizada foi o aumento de espaçamentos entre células de Kenyon localizadas no interior do cálice do corpo pedunculado, entre as células de Kenyon e os prolongamentos que constituem o corpo pedunculado ou entre prolongamentos. Tais perdas de contato celular podem indicar uma característica da morte celular por apoptose. Segundo Häcker (2000) a morte por apoptose leva as células a reorganizarem seu limite externo mudando sua forma e rompendo o contato com células vizinhas do tecido. Além disso, algum mecanismo de contato que mantém a estrutura do tecido pode ter sido perturbado (GUMBINER, 1996). Ainda, a matriz de correlação entre as diferentes medidas realizadas nos corpos pedunculados, submetidos aos diferentes tratamentos, mostrou uma forte correlação das células picnóticas com os espaçamentos entre células de Kenyon e com os espaçamentos entre células de Kenyon e os prolongamentos do corpo pedunculado, isso confirma a evidência de que tais espaçamentos são características de morte celular e, conseqüentemente, desorganização tecidual.

Dentre as hipóteses que provocaram as diferentes alterações morfofisiológicas nos tecidos nervosos, cultivados nos diferentes meios de cultura e nos diferentes tempos, pode-se destacar a fase lag que consiste no período de adaptação das células ao meio de cultura. Tal fase tem como característica uma intensa atividade metabólica, com aumento na síntese de DNA, produção de proteínas estruturais e enzimas. Além disso, a duração da fase lag pode se estender de horas a alguns dias e apresentar uma diminuição na concentração celular (MOLINARO et al., 2010). Maiorella et al. (1988) observaram uma duração de 48 horas da fase lag em experimento de padronização de cultura celular de insetos em larga escala para a produção de proteína recombinante. Del Padre (2016), em estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21, também

observou uma duração de 48 horas da fase lag e, ainda, uma diminuição da concentração celular. Tais dados de duração da fase lag corroboram com a hipótese de adaptação e até possível morte das células submetidas aos diferentes meios de cultura.

Outra hipótese acerca das alterações celulares são as diferenças na composição dos meios de cultura utilizados (Quadro 1) bem como a suplementação de tais meios com SFB. O meio Leibovitz's puro ou suplementado com SFB, e HBSS apresentou, dentre todos os outros meios e suas suplementações, um menor espaçamento entre células de Kenyon, entre células de Kenyon e os prolongamentos do corpo pedunculado e entre os prolongamentos do corpo pedunculado evidenciando uma menor desorganização tecidual. Atrelado a isso, o meio Leibovitz's têm a menor concentração de componentes (sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros) em sua composição, suportando a hipótese de que as diferenças na composição dos meios de cultura podem auxiliar ou perturbar o metabolismo celular. De acordo com Batista, 2007 os meios de cultura devem oferecer nutrientes essenciais para a realização do metabolismo celular além de suportar funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como cofatores. Contudo, diversos são os meios de cultura para insetos com substâncias e concentrações diferentes entre si.

Lynn (2002) propõe que a maneira mais fácil de selecionar um meio de cultura é fazendo um teste de todos os meios de cultura disponíveis comercialmente. Entretanto, alguns metabólitos produzidos pelas células podem ter um efeito tóxico, como é o caso do lactato e o amônio (IKNOMOU et al., 2003; BATISTA, 2007). Além disso, o excesso ou a falta de nutrientes também podem levar a uma perturbação das condições ideais para a manutenção das células. De acordo com Debnath et al. (2005) a morte celular por autofagia pode ser um mecanismo de proteção da viabilidade celular, uma vez que tal morte pode impedir consequentes perturbações em um tecido, em casos, por

exemplo de limitação de nutrientes e energia. Corroborando tal suposição Lockshin e Zakeri (2004) discorrem sobre a degeneração celular por macroautofagia ou desencadeamento da apoptose quando submetidas a situação de estresse permanente. Contudo, tais suposições só poderiam ser comprovadas com análises mais aprofundadas como, por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão, visto que na morte por autofagia há o aparecimento de autofagossomas no citoplasma que fazem a digestão de organelas e das próprias células (DEBNATH et al., 2005).

Ainda, cogita-se a hipótese de a barreira hematoencefálica presente nos tecidos nervosos cultivados *in vitro* dificultar ou até mesmo impedir a chegada de nutrientes as células do tecido, uma vez que essa barreira consiste em uma interface entre o sistema nervoso central e o sistema circulatório que regula o microambiente das células neuronais (CARLSON et al., 2000; BENERJEE; BATH, 2007). De acordo com alguns autores (ABBOTT et al., 2006; BENERJEE; BATH, 2007) esse ambiente mantém as concentrações de íons de sódio, potássio e cálcio em níveis ótimos para o correto funcionamento das células além de restringir o tráfico de nutrientes e de outras moléculas.

De maneira geral, as análises estatísticas e a análise de correlação entre as diferentes avaliações permitiram que o meio mais promissor no que diz respeito ao cultivo de tecido nervo de *A. mellifera* africanizada fosse selecionado. O meio Leibovitz's+HBSS e o meio Leibovitz's+HBSS+SFB foram os que estatisticamente apresentaram os menores espaçamentos entre as células de Kenyon, entre células de Kenyon e o corpo pedunculado e entre prolongamentos do corpo pedunculado. Além disso, apesar de os meios Leibovitz's+HBSS e Leibovitz's+HBSS+SFB não serem os melhores meios em todos os tempos para a medida de área de células picnóticas, a matriz de correlação pôde indicar que tanto o espaçamento entre células de Kenyon

quanto o espaçamento entre as células de Kenyon e o corpo pedunculado estão fortemente correlacionadas com as células picnóticas sugerindo que tais espaçamentos podem ser analisados como sendo característica de morte celular. Sendo assim, tais meios obtiveram os menores espaçamentos analisados dentre todos os meios e, portanto, menor desorganização tecidual. Contudo, outros experimentos com suplementações desses meios precisam ser realizados para que haja uma diminuição de células picnóticas no tecido.

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-gial 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>. 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-nephrotoxic 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^a 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.