RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 21/01/2019.

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

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

EFEITOS COMBINADOS DE *Nosema ceranae* E DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA

HELLEN MARIA SOARES LIMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP
Junho/2017

HELLEN MARIA SOARES LIMA

EFEITOS COMBINADOS DE *Nosema ceranae* E DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Profª. Drª. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP

Junho/2017

595.799 Lima, Hellen Maria Soares
L732e Efeitos combinados de Nosema ceranae e do inseticida imidacloprido sobre abelhas Apis mellifera africanizada / Hellen Maria Soares Lima. - Rio Claro, 2017
144 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Abelha. 2. Ecotoxicologia e doenças em abelhas. 3. Concentração letal média. 4. Sinapsina. 5. HSP 70. 6. Morte celular. 7. Sistema imune. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS COMBINADOS DE Nosema ceranae E DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS Apis mellifera AFRICANIZADA

AUTORA: HELLEN MARIA SOARES LIMA
ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

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

Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / IB Rio Claro

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. MONICA JONES COSTA
Departamento de Biologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Profa. Dra. THAISA CRISTINA ROAT FABRI
CEIS / Unesp de Rio Claro

Rio Claro, 21 de junho de 2017

Àquele que me faz ser melhor a cada dia, meu marido Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo nº 2013/09555-5) pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina e à Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela amizade, orientação, atenção e paciência diante de minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Elaine Cristina da Silva Zacarin pela amizade, apoio e momentos bombásticos de debates de ideias.

Aos amigos e colaboradores Tatiane Grella, Adna Dorigo, Jéssica Araújo, Isabela Camargo, Caio Domingues, Thaisa Roat, Stephan Carvalho, Aline Catae, Priscila Friol, Daiana Tavares, Pâmela Décio, Franco Pereira e Rodrigo Barbosa pela convivência, companheirismo, auxílio, discussões e apoio. Sem a ajuda de cada um de vocês, esse trabalho não seria possível.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, ao Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de abelhas (LECA), ao Laboratório de Evolução Molecular (LEM) e ao Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) pelo apoio técnico fornecido.

Aos técnicos Sérgio Pascon, Gerson Mello Souza, Priscila Socolowski e Flávia Rodrigues pela disponibilidade em ajudar e pela gentileza com que atenderam as minhas necessidades.

À toda a minha família, principalmente à minha mãe, Maria Aparecida Lopes, pela confiança e pelo amor incondicional.

Ao Rodrigo Lima, amigo e marido, por sua constante ajuda e paciência com que acompanhou todas as etapas deste trabalho, por não ter permitido que eu me dobrasse as dificuldades, por dividir comigo os fracassos e os sucessos e pelo amor que compartilhamos.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e me ajudaram a ter sucesso nessa etapa.

Agradeço à Deus.

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são importantes polinizadores de plantas nativas ou cultivadas, porém o contato com os agroecossistemas pode expor esses insetos à substâncias tóxicas, como o inseticida imidacloprido. A sistemicidade desse composto pode levar a contaminação não só das abelhas forrageiras, mas também dos outros indivíduos da colônia, inclusive, das larvas por meio do consumo de pólen e néctar contendo resíduos de imidacloprido. Assim, a primeira etapa desse trabalho determinou a toxicidade do imidacloprido para larvas e abelhas adultas do híbrido *A. mellifera* africanizada. Os resultados mostraram que as larvas são mais tolerantes ao imidacloprido do que as abelhas recém-emergidas e que alterações no desenvolvimento larval só foram observadas em concentração oito vezes maior do que a concentração letal média estabelecida para as abelhas adultas. Visto que não só os inseticidas, como também as parasitoses, como a nosemose, podem enfraquecer as colônias e comprometer a viabilidade destas, este trabalho visou avaliar, ainda, os efeitos da exposição de operárias de *A. mellifera* africanizada ao inseticida imidacloprido e/ou da infecção das abelhas por *Nosema ceranae* e compreender como esses fatores atuam isolados e em conjunto sobre o organismo desses insetos. A sobrevivência das abelhas diminuiu quando estas foram expostas ao inseticida e/ou infectadas pelo parasita, sendo que a combinação destes dois estressores comprometeu ainda mais a longevidade delas. Tanto a *N. ceranae* quanto o imidacloprido, isolados ou em combinação levaram às células do intestino médio das abelhas ao estresse, evidenciado pela imunomarcação da chaperona HSP 70 e a morte celular, provavelmente por macroautofagia, indicada pela intensa vacuolização e pela diminuição na expressão gênica da caspase-3. No intestino, a atividade tecidual da glutationa-S-transferase não foi afetada, provavelmente, devido aos danos encontrados no epitélio que afetaram as funções de metabolização e biotransformação. Uma vez com o intestino comprometido, uma maior quantidade do inseticida poderia ter atingido a hemolinfa, levando as células dos túbulos de Malpighi, órgão responsável pela excreção de substâncias tóxicas do organismo, à morte celular. No cérebro, o inseticida alterou a atividade sináptica dos corpos pedunculados, conforme demonstrado pela imunomarcação da sinapsina, causou estresse celular e aumento de células gliais, que podem indicar injúria do tecido nervoso. A ação neurotóxica do inseticida provocou, ainda, aumento da atividade tecidual das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase na cabeça das abelhas. A atividade sináptica alterada e o aumento do estresse celular nos corpos pedunculados foram observados também nas abelhas infectadas apenas por *N. ceranae*, indicando resposta ao parasitismo. Adicionalmente, a combinação patógeno-

inseticida e os estressores, quando isolados, causaram imunossupressão, diminuindo o número de hemócitos circulantes na hemolinfa e transcrição de genes relacionados a resposta imune individual e social. A partir dos resultados deste trabalho, concluiu-se que a combinação entre *N. ceranae* e concentrações residuais do imidacloprido afetou a sobrevivência das abelhas não só pela ação do inseticida em seu órgão alvo, o cérebro, mas, também, pelo comprometimento das funções digestórias e excretoras e pela diminuição da imunidade das abelhas.

Palavras-chave: concentração letal média, sinapsina, HSP 70, morte celular, sistema imune.

COMBINED EFFECTS OF *Nosema ceranae* AND IMIDACLOPRID INSECTICIDE ON AFRICANIZED HONEYBEES *Apis mellifera*

ABSTRACT

The *Apis mellifera* honeybees are importants pollinators both for native and cultivated plants. However, the contact with the agroecosystems may expose these insects to toxic substances, such as imidacloprid insecticide. Compound systemicity may lead to the contamination not only of forager honeybees, but also of other colony individuals, including larvae, through both pollen and nectar consumption containing imidacloprid residues. Thus, the first stage of this work evaluated the imidacloprid toxicity to both larvae and adult honeybees of hybrid Africanized *A. mellifera*. Results showed that larvae are more tolerant to imidacloprid than newly emerged honeybees, and alterations in larvae development were only observed at concentrations eight times higher than the average lethal concentration established for adult honeybees. Since not only insecticides, but also diseases such as nosemosis may weaken colonies and compromise its viability, the second stage of this work was the evaluation of the exposure effects of Africanized *A. mellifera* workers to imidacloprid insecticide and/or to honeybees infection by *Nosema ceranae* in order to understand how these factors act both isolated and together on organism of these insects. Honeybees survival decreased when they were exposed to insecticide and/or infected by parasite, and the combinations of these two stressors further compromised their longevity. Both *N. cenarae* as imidacloprid, either alone or in combination, led midgut cells of honeybees to stress, evidenced by HSP 70 chaperone immunostaining, and to cell death, probably by macroautophagy, as indicated by genic expression decrease of caspase-3. In the midgut, glutathione-S-transferase tissue activity was not altered, probably due to damage found on the epithelium that may affect both metabolization and biotransformation function. Once midgut was compromised, probably more quantity of insecticide reached hemolymph, leading cells from Malpighian tubules, organ responsible for toxic substances excretion from organism, to cell death. In the brain, the insecticide altered mushroom body synaptic activity, as verified by synapsin immunostaining, and it also caused cellular stress and increased of glial cells, which may indicate nerve tissue injury. Insecticide neurotoxic action also caused an increase in the activity of acetylcholinesterase and carboxylesterase enzymes in the heads of the honeybees. Altered synaptic activity and increased cellular stress in mushroom bodies were also observed for honeybees infected only by *N. ceranae*, indicating response to parasitism. Additionally, pathogen-insecticide combination and the stressors, when isolated, caused

immunosuppression, reducing both the hemocytes circulating number in hemolymph and transcription of genes related to individual and social immune response. Based on results from this work, we may conclude that combination between *N. ceranae* and residual concentrations of Imidacloprid affected honeybees survival, due to insecticide action on their target organ (brain), impairment on digestory and excretory functions and honeybees imunity decreased.

Keywords: lethal median concentration, synapsin, HSP 70, cell death, immune system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.i.	Active ingredient
AChE	Acetilcolinesterase
AIF	Fator indutor da apoptose
AKH	Hormônio adipocinético
Apaf-1	Fator ativador da protease apoptótica 1
Atg2	Gene relacionado à autogafia 2
BOD	Estufa de demanda química de oxigênio
CaE-3	Carboxielesterase-3
CCD	Distúbio no colapso de colônias (colony colapse disorder)
CCE	Carboxil colinesterase
CL100	Grupo experimental exposto ao imidacloprido na concentração de 0,075 ng/μL
CL1000	Grupo experimental exposto ao imidacloprido na concentração de 0,0075 ng/μL
CL_{50}	Concentração letal média
CL_{50}/100	Valor da concentração letal média divido por cem
CL_{50}/1000	Valor da concentração letal média dividido por mil

CT	Threshold cycle
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa-S-transferase
HSP	Proteína de choque térmico
i.a.	Ingrediente ativo
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LC_{50}	Lethal median concentration
N+CL100	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de *Nosema ceranae* e exposto ao imidacloprido na concentração de 0,075 ng/µL
N+CL1000	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de *Nosema ceranae* e exposto ao imidacloprido na concentração de 0,0075 ng/µL
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
Nosema	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de *Nosema ceranae*
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
P450	Citocromo P450 monooxigenase
PBS	Tampão fosfato de sódio
TL_{50}	Tempo letal médio
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 13

2. OBJETIVOS GERAIS 21

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21

4. CAPÍTULO 1 22

Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees

Abstract 23
Introduction 24
Materials and Methods 25
Results 27
Discussion 28
Conclusion 30
Additional files 31
Acknowledgments 32
References 32
Supplemental data 36

5. CAPÍTULO 2 40

Nosema ceranae e imidacloprido causam estresse e citotoxidade para abelhas *Apis mellifera* africanizada

Resumo 41
Introdução 42
Materiais e Métodos 44
Resultados 49
Discussão 60
Agradecimentos 66
Referências 66
Informações suplementares 75

6. CAPÍTULO 3 77

Abelhas têm resposta neural alterada após infecção por *Nosema ceranae* e exposição ao imidacloprido

Resumo 78
Introdução 79
Materiais e Métodos 82
Resultados 86
Discussão 94
Conclusões 98
Agradecimentos 98
Referências 98

7. CAPÍTULO 4 105

Expressão gênica e atividade enzimática em *Apis mellifera* africanizada após infecção por *Nosema ceranae* e exposição ao imidacloprido

Resumo 106
Introdução 107
Materiais e Métodos 109
Resultados 113
Discussão 114
Conclusões 118
Apêndices 120
Agradecimentos 123
Referências 123

8. DISCUSSÃO GERAL 131

9. CONCLUSÕES 136

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 137

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas *A. mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae), possuem capacidade de adaptação a diversos climas e por isso apresentam ampla distribuição geográfica. No Brasil, a maioria dos ninhos naturais encontrados correspondem às formas híbridas, denominadas *A. mellifera* africanizada, provenientes do cruzamento de diversas subespécies originárias da Europa e África (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1993; FRANCOY et al., 2012).

Em uma colônia de *A. mellifera* existem diferenças anatômicas, fisiológicas e comportamentais entre os indivíduos que resultam numa divisão de trabalho. Enquanto a rainha e o zangão possuem função reprodutiva, as operárias são responsáveis pela realização de atividades para a manutenção do ninho. Elas exercem preferencialmente uma determinada tarefa, de acordo com a idade, desenvolvimento glandular e necessidade da colônia. A partir de 21 dias de idade, as operárias realizam atividades de forrageamento e coleta, podendo atuar, assim, como agentes polinizadores (FREE, 1980).

Devido ao hábito generalista na utilização dos recursos florais, as abelhas melíferas são consideradas polinizadores em potencial de plantas nativas e cultivadas. A interação entre abelhas e plantas garante às primeiras o desenvolvimento da colônia, pois o pólen e o néctar são as principais fontes de proteínas e carboidratos destes insetos, e aos vegetais sucesso na reprodução cruzada, aumento na variabilidade genética e, consequentemente, a otimização na produção de frutos e sementes (KEARNS; INOUYE, 1997; BRITTAIN; POTTS, 2011).

A agricultura é cada vez mais dependente do uso de produtos químicos para controlar pragas e assegurar a produtividade (DESNEUX et al., 2007). A aplicação dos agrotóxicos reduz a presença dos polinizadores, como as abelhas, nos agroecossistemas (ALLEN-WARDELL et al., 1998), pois os produtos utilizados para combater as pragas são também potencialmente prejudiciais para a fauna benéfica.

Ao forragearem em áreas agrícolas, as abelhas podem ser contaminadas pelo contato direto com os agrotóxicos, principalmente na época de florada das culturas, quando esses insetos intensificam suas visitas (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Outro fato preocupante é a deriva, ocasionada pelas correntes de vento, que pode levar os agrotóxicos para apiários, meliponários ou colônias silvestres próximos aos locais de aplicação destes compostos (KERR et al., 2001).

Agrotóxicos, como o inseticida neonicotinoide imidacloprido, que são utilizados no combate de afídeos e outros insetos sugadores de seiva, possuem característica sistêmica, ou seja, têm capacidade de translocação, pela seiva, de uma parte da planta para outra

(MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002) sendo detectados em todos os tecidos vegetais (SCHMUCK et al., 2001; BONMATIN et al., 2003; SUR; STORK, 2003). Assim, não só as abelhas que realizam o forrageamento entram em contato com as substâncias tóxicas presentes no ambiente, como também aquelas que fazem atividades intracoloniais e as larvas que podem se alimentar de pólen e néctar contaminados com inseticidas. Cresswell (2011) estimou, a partir de dados disponíveis na literatura, que a concentração realística encontrada em campo do imidacloprido seria de 0,7 a 10 ppb para o néctar floral.

Autores relataram a presença do imidacloprido, seus metabólitos (olefina e 5-hidroxiimidacloprido) e outros neonicotinoides (tiametoxam, clotianidina, acetamiprido, tiacloprido e dinotefuram) no pólen e néctar de culturas tratadas com formulações comerciais destes inseticidas por diferentes métodos de aplicação (solo, semente ou foliar) (SCHMUCK et al., 2001; DIVELY; KAMEL, 2012; POHORECKA et al., 2012; STONER; EITZER, 2012; BYRNE et al., 2014). No quadro 1 estão descritas as quantidades de imidacloprido encontradas no pólen e néctar, as culturas nas quais o inseticida foi detectado e a localização dessas.

Quadro 1 - Concentrações de imidacloprido encontradas no pólen e néctar.

Imidacloprido (ng/g ou ppb)		**Culturas/ Região**	**Fontes**
Pólen	**Néctar**		
3,3 (± 1)	1,9 (± 1)	Girassol (*Helianthus annuus*), Alemanha	Schmuck et al. (2001)
4,9 a 80,2	0,4 a 11,2	Abóbora (*Curcubita pepo)*, Maryland – EUA	Dively e Kamel (2012)
0	0,6	Canola (*Brassica napus*), Polônia	Pohorecka et al. (2012)
14 (± 8)	10 (± 3)	Abóbora (*Curcubita pepo)*, EUA	Stoner e Eitzer (2012)
5,15	2,9 a 39,4	*Citrus*, California –EUA	Byrne et al. (2014)

Desenvolvidos nos anos 90, os neonicotinoides são uma forma sintética derivada da estrutura da nicotina e atualmente estão registrados para a utilização em uma grande variedade de culturas (FAIRBROTHER et al., 2014). Esses inseticidas são neurotóxicos e atuam como agonistas da acetilcolina nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (nAChRs), localizados nos neurônios pós-sinápticos (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente. Portanto, os impulsos nervosos são

transmitidos de forma contínua e levam à hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (GALLO et al., 2002).

As abelhas possuem um menor número de genes (11000) que codificam proteínas quando comparadas a outros insetos como, por exemplo, *Drosophila melagogaster* (13500) e *Anopheles gambiae* (14000). As diferenças mais marcantes ocorrem em genes que codificam três superfamílias de enzimas de detoxificação a xenobióticos. As abelhas possuem uma deficiência de genes da glutationa-S-transferases (GST), citocromo P450 monooxigenase (P450) e carboxil colinesterases (CCE), associados à aquisição de resistência à inseticidas. Assim sendo, a sensibilidade das abelhas aos inseticidas poderia estar diretamente ligada ao déficit de enzimas de detoxificação (CLAUDIANOS et al., 2006). Se as abelhas não podem adquirir resistência aos produtos aplicados nas áreas de cultivo como as pragas, o aumento no uso dos inseticidas ou a combinação entre produtos químicos com a finalidade de eliminar pragas mais resistentes poderia ter grande impacto para as populações de abelhas.

O fenômeno do sumiço das abelhas *A. mellifera*, denominado de distúrbio no colapso de colônias (CCD), tem sido relatado na Europa (ELLIS et al., 2010) e nos Estados Unidos (STOKSTAD, 2007; NEUMANN; CARRECK, 2010) e caracteriza-se pela diminuição no número de indivíduos nas colônias, sem que sejam notadas abelhas mortas nas proximidades (VANENGELSDORP et al., 2009). Entre as possíveis causas da CCD estão o uso de inseticidas neonicotinoides, as doenças, como a nosemose, a redução das fontes de alimento, as mudanças climáticas, a urbanização, os desmatamentos e a ocupação intensiva das terras (CHAUZAT et al., 2006; HO; CUMMINS, 2007; OLDROYD, 2007; YANG et al., 2008; HIGES et al., 2008; HIGES et al., 2009; VANENGELSDORP et al., 2009; BROMENSHENK et al., 2010). Apesar de casos específicos de CCD serem raros no Brasil, o impacto dos agentes causadores são amplamente conhecidos sobre as populações de abelhas (PIRES et al., 2016).

Duas espécies descritas do gênero *Nosema*, *N. apis* e *N. ceranae*, causam a nosemose em abelhas *A. mellifera* (CHEN et al., 2008; WATANABE, 2008). Os microsporídios *N. apis* e *N. ceranae* são endoparasitas de abelhas adultas, cuja principal via de transmissão é oral-fecal. Milhões de esporos desses microsporídios são encontrados no epitélio do ventrículo das abelhas infectadas, podendo danificar o aparelho digestório e deixar as abelhas mais susceptíveis à infecção por bactérias e vírus (WATANABE, 2008).

A nosemose leva o hospedeiro a um estresse energético ou nutricional, uma vez que os microsporídios não possuem mitocôndrias e são dependentes do ATP produzido pelo

hospedeiro, principalmente na fase de germinação dos esporos, que tem elevada demanda energética (CORNMAM et al., 2009).

Devido a degeneração do epitélio ventricular e a diminuição da secreção de enzimas digestórias, a infecção por *Nosema* sp. resulta em hiperfagia, que pode ter implicações na epidemiologia da doença. O aumento da fome pode levar à uma maior incidência do comportamento de trofalaxis elevando, assim, a disseminação via oral-oral do patógeno dentro da colônia (MAYACK; NAUG, 2009; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2011). A transmissão horizontal da nosemose pelas flores também seria potencializada, pois a fome leva ao aumento do forrageamento (COLLA et al., 2006).

Diferente do que foi relatado para a *N. apis*, abelhas infectadas por esporos de *N. ceranae* podem ser encontradas em qualquer época do ano (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007). Juntamente com a ausência de sazonalidade, a reprodução possível dentro de uma maior amplitude térmica faz com a *N. ceranae* seja um agente patogênico com uma maior capacidade de propagação do que a *N. apis* (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2009).

O ciclo biológico dos microsporídios causadores da nosemose é dependente da temperatura. A temperatura ótima para a reprodução dos esporos tanto de *N. apis* quanto de *N. ceranae* é de 33 ºC, a qual representa também a temperatura interna das colônias de abelhas. Em 25 ºC e 37 ºC, a *N. ceranae* foi capaz de parasitar um maior número de células do que a *N. apis*, sendo a temperatura de 37 ºC a menos favorável para ambas (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2009).

O processo de africanização das abelhas no Brasil fez com que a doença causada pela *N. apis* desaparecesse e, dessa forma, o microsporídio causador da nosemose há 34 anos no país tem sido *N. ceranae* (TEIXEIRA et al., 2013).

Pettis et al. (2013) identificaram maior probabilidade de infecção por *Nosema* sp. em abelhas que consumiam pólen com resíduos de fungicidas e inseticidas. A interação entre a infecção por *N. ceranae* e a exposição a agrotóxicos, como imidacloprido, tiacloprido e fipronil, aumentaram a mortalidade, comprometeram a longevidade, enfraqueceram as colônias e alteraram a carga de esporos no intestino, quando comparada a exposição das abelhas a estes estressores de forma isolada (ALAUX et al., 2010; VIDAU et al., 2011; AUFAUVRE et al., 2012; PETTIS et al., 2012).

Aufauvre et al. (2014) avaliaram as respostas moleculares da interação patógeno-inseticida e mostraram que, em linhas gerais, os estressores acometeram o sistema imunológico e afetaram a expressão de proteínas que compõem a cutícula, barreira física de defesa do organismo.

Abelhas que tiveram o sistema imunológico comprometido mostraram diminuição de suas funções cognitivas, evidenciada pela redução na capacidade se associar um odor à recompensa alimentar (MALLON et al., 2003). Além disso, a expressão de genes no cérebro, principalmente daqueles relacionados com a resposta imune ou antioxidante, como defensina-1, peroxidase, esterase e glucose-oxidase, foi alterada por parasitas, como *Varroa destructor* ou *N. ceranae*, como também por inseticidas (MCDONNELL et al., 2013; ROAT et al., 2014).

Uma vez que o inseticida imidacloprido é neurotóxico e que o parasitismo por *N. ceranae* pode alterar as funções do sistema nervoso, um dos órgãos utilizados neste trabalho para a avaliação dos efeitos isolados ou combinados desses estressores foi o cérebro, especialmente a região dos corpos pedunculados.

A estrutura geral do sistema nervoso da abelha adulta é essencialmente a mesma do sistema nervoso larval, sendo que, algumas modificações ocorrem durante a pupação, como o cérebro que, devido ao desenvolvimento dos lobos antenais e ópticos, aumenta de tamanho (CRUZ-LANDIM, 2009).

O cérebro das abelhas é dividido em protocérebro, deutocérebro e tritocérebro e constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominadas de somata, e as regiões que contêm os prolongamentos celulares, chamadas de neurólipas (CHAPMAN, 1998; BRANDT et al., 2005).

No protocérebro estão localizados os corpos pedunculados, que são centros de integração multimodal e recebem informações olfativas, visuais, gustatórias e mecanossensoriais e, por isso, estão relacionados com a plasticidade comportamental das abelhas (KOMISCHKE et al., 2005; KIYA et al., 2007).

Os corpos pedunculados, também conhecidos como corpos de cogumelo, são estruturas pares constituídas de neurópilas em forma de cálice, dos quais partem pedúnculos em direção ao lobo alfa (região que processa toda a informação proveniente das outras regiões do cérebro) (RYBAK; MENZEL, 1993; FARRIS et al.,1999). Os cálices são preenchidos com os corpos celulares de neurônios, chamados de células de Kenyon. As células de Kenyon são diferenciadas em compactas internas, não compactas e compactas externas, de acordo com a sua localização e quantidade de citoplasma em relação ao núcleo (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; FAHRBACH, 2006).

O cálice dos corpos pedunculados pode ser subdividido em lábio, colar e anel basal. O lábio recebe aferências dos lobos antenais e o colar dos lobos ópticos, enquanto que o anel basal possui fibras de entrada de ambos e, assim, recebe os estímulos olfativos e visuais. Os

estímulos visuais são bilaterais no cérebro dos himenópteros, em contraste, os olfativos são sempre unilaterais (GRONENBERG, 2001).

Em trabalho com os corpos pedunculados de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica* expostas ao imidacloprido, Soares (2012) identificou compactação cromatínica, comprometimento da estrutura tecidual e da adesão célula-célula e perda de eletrondensidade e rompimento mitocondriais, mostrando que este inseticida causa alterações celulares que culminam na morte das células de Kenyon. A morte dos neurônios dos corpos pedunculados, estruturas relacionadas com a formação de memória e aprendizagem, compromete o comportamento das abelhas e, dependendo do número de indivíduos afetados, toda a colônia pode ser inviabilizada.

Estudos toxicológicos têm analisado também a ação dos inseticidas no sistema digestório, principalmente na região do ventrículo, por ser importante rota de entrada destes compostos no organismo das abelhas (KAKAMAND et al., 2008; CRUZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, esse órgão constitui modelo interessante para avaliações patógeno-hospedeiro, principalmente quando se trata de patógenos que utilizam as células intestinais para completar seu ciclo de vida, como *Nosema* sp. (DUSSAUBAT et al., 2012).

Nas larvas, os órgãos envolvidos na ingestão, digestão e armazenamento de nutrientes estão entre os mais desenvolvidos, sendo que, durante a pupação, o trato digestório é reorganizado em função da conformação adquirida pelo corpo do inseto adulto e das atividades que as operárias terão que executar para manutenção da colônia, como a alimentação das crias e a trofalaxia (CRUZ-LANDIM, 2009).

O sistema digestório dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. No intestino médio, também designado de mesentério ou ventrículo, ocorre a maior parte da digestão e absorção das substâncias ingeridas (ZERBO, 2003).

A parede do ventrículo é formada pelo epitélio e por fibras musculares viscerais. Dois tipos celulares constituem a parte básica e funcional do epitélio: as células principais, digestórias ou enterócitos, responsáveis pela secreção de enzimas digestórias e absorção de nutrientes, e as células regenerativas, destinadas a produzir novas células para substituir as células principais que são eliminadas por desgaste (CRUZ-LANDIM et al., 1996). Na porção apical das células principais, recobrindo as microvilosidades, encontra-se a membrana peritrófica que consiste em uma camada acelular que protege o epitélio contra o atrito com o alimento (SNODGRASS, 1935; TERRA; FERREIRA, 1981; CHAPMAN, 1998; TERRA,

2001). Segundo Jimenez e Gilliam (1990) são as células da região anterior do ventrículo que secretam a maior parte da membrana peritrófica.

Estudos sobre os efeitos do ácido bórico e do fipronil no organismo de larvas de *A. mellifera* (CRUZ et al., 2010) e sobre os efeitos da deltametrina, malation e tiametoxam para operárias adultas desta mesma espécie (KAKAMAND et al., 2008), mostraram que os compostos avaliados provocaram alterações morfológicas no epitélio do ventrículo que poderiam comprometer a alimentação e hidratação das abelhas.

Catae et al. (2014) avaliaram os efeitos do tiametoxam no intestino e nos túbulos de Malpighi de abelhas recém-emergidas expostas a uma concentração considerada subletal. No intestino, o inseticida levou a desorganização no retículo endoplasmático liso, alterações nucleares e mitocondriais e aumento de vacúolos citoplasmáticos, porém, após oito dias, houve uma recuperação do órgão. Os autores discutem que a recuperação do intestino pode ter relação direta com uma provável tentativa de desintoxicação e excreção do composto pelos túbulos de Malpighi, evidenciada pelo aumento do retículo endoplasmático liso e alterações no labirinto basal e nas microvilosidades.

Na região de transição entre os intestinos médios e posterior, o piloro, desembocam os túbulos de Malpighi, estruturas que compõem o sistema excretor das abelhas e são os responsáveis pela manutenção da homeostase hídrica e eliminação de produtos potencialmente tóxicos do organismo (BERRIDGE, 1969; CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM, 2009).

A passagem dos túbulos de Malpighi para o intestino encontra-se fechada nas larvas e, assim, os produtos de excreção acumulam-se na luz dos túbulos durante toda fase larval. Quando a passagem se abre, no final do 5º ínstar, os túbulos colapsam, após liberação de seu conteúdo, e são destruídos para que novos túbulos possam ser formados durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009).

Nas abelhas adultas, os túbulos são formados por uma camada de células epiteliais e ao longo de seu comprimento a forma das células e o conteúdo da luz mudam mas. de uma maneira geral, a região apical das células é constituída por microvilosidades, enquanto a região basal apresenta numerosas invaginações (BRADLEY, 1985; CRUZ-LANDIM, 1998).

As substâncias a serem excretadas acumulam-se inicialmente na porção basal das células dos túbulos de Malpighi formando vesículas que, posteriormente, serão exocitadas na porção apical e eliminadas na luz do túbulo (SNODGRASS, 1935). O produto de excreção produzido pelo túbulo de Malpighi flui para o intestino e fica acumulado no reto. Esse produto de excreção é constituído de resíduos, como uratos, compostos orgânicos, água e

íons. Parte dessas substâncias, principalmente a água, é reabsorvida no percurso até o reto e nas papilas retais (DOW, 1981; CRUZ- LANDIM, 2009).

Uma vez que tanto os neonicotinoides quanto a nosemose podem afetar a sobrevivência das abelhas e comprometer a viabilidade das colônias sendo, assim, apontados como possíveis causadores da CCD, este trabalho visou avaliar se a exposição de operárias de *A. mellifera* africanizada ao inseticida imidacloprido interfere na infecção das abelhas por *N. ceranae* e compreender como esses fatores atuam no organismo desses insetos.

9. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Larvas são mais tolerantes ao imidacloprido do que as abelhas recém-emergidas da mesma espécie, provavelmente devido ao corpo gorduroso mais desenvolvido das larvas e/ou a presença de subtipos diferentes de receptores nicotínicos, alvos do inseticida, no cérebro das larvas e das abelhas adultas;
- A exposição das abelhas recém-emergidas ao imidacloprido em concentrações residuais aumentou a infecção desses insetos pela *N. ceranae* e favoreceu a replicação do parasita nas suas células intestinais;
- Em comparação com a infecção por *N. ceranae* ou com a exposição ao imidacloprido, isoladamente, a combinação inseticida-microsporídio agravou os efeitos provocados por esses estressores sobre o intestino, cérebro e túbulos de Malpighi das abelhas e, consequentemente, diminuiu ainda mais a sobrevivência das mesmas;
- Ambos os estressores comprometeram a imunidade individual, diminuindo as respostas imune celular e humoral, e provavelmente a imunidade social das abelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHMITCHAN, S.; COUSIN, M.; BRILLARD, J.; BALDY, A.; BELZUNCES, L.P.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 774-82, mar. 2010.

ALLEN-WARDELL, G; BENHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANE, J.; COX, P.A.; DALTON, V.; FEINSINGER, P.; INGRAM, M.; INOUYE, D.; JONES, C. E.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOOPOWITZ, H.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G. P. The potential consequences of pollinator declines of the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 8-17, feb. 1998.

AUFAUVRE, J.; BIRON, D. G; VIDAU, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUÈS, B.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F.; BLOT, N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Scientific Reports**, London, v. 2, n. 326, p. 1-7, mar. 2012.

AUFAUVRE, J.; MISME-AUCOUTURIER, B.; VIGUÈS, B.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; BLOT, N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-12, mar. 2014.

BERRIDGE, M. J.; OSCHMANN, J. L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 1, n. 2, p. 247-272, 1969.

BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; FLECHE, C.; COLIN, M. E.; BENGSCH, E. R. A. LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2027-2033, may 2003.

BRADLEY, T. J. **The excretory system: structure and physiology**. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemestry and pharmacology**. London: Pergamon. 1985. p. 421-465. v. 4.

BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J. R.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H. C.; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 492, p. 1–19, nov. 2005.

BRITTAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 12, n. 4, p. 321 – 331, june 2011.

BROMENSHENK, J. J.; HENDERSON, C. B.; WICK, C. H.; STANFORD, M. F.; ZULICH, A. W.; JABBOUR, R. E.; DESHPANDE, S. V.; MCCUBBIN, P. E.; SECCOMB, R. A.; WELCH, P. M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D. R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M. M.; BILIMORIA, S. L.; GRESS, J.; WANNER, K. W.; CRAMER JR, R. A. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. 1-11, oct. 2010.

BUCKINGHAM, S. D.; LAPIED, B.; LE CORRONC, H.; GROLLEAU, F.; SATTELLE, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 200, p. 2685-2692, aug. 1997.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 351-366, feb. 1998.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, june-july 1999.

BYRNE, F. J; VISSCHER, P. K; LEIMKUEHLER, B; FISCHER, D; GRAFTON-CARDWELLA, E. E; MORSEA, J. G. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 3, p. 470–482, mar. 2014.

CARVALHO, S. M.; BELZUNCES, L. P.; CARVALHO, G. A.; BRUNET, J-L., BADIOU-BENETEAU A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A study of exposure of the honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, sep. 2013.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 77, n. 4, p. 274-281, apr. 2014.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5.ed. New York: Elsevier Publishing, 1998. 789p.

CHAUZAT, M.; FAUCON, J.; MARTEL, A.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 253-262, apr. 2006.

CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 97, n. 2, p. 186–188, feb. 2008.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615–636, oct. 2006.

COLLA, S. R.; OTTERSTATTER, M. C.; GEGEAR, R. J.; THOMSON, J. D. Plight of the bumblebee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. **Biological conservation**, Essex, v. 129, n. 4, p. 461-467, may 2006.

CORNMAN, R. S.; CHEN, Y. P.; SCHATZ, M. C.; STREET, C.; ZHAO, Y.; DESANY, B.; EGHOLM, M.; HUTCHISON, S.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I.; EVANS, J. D. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-14, june 2009.

CRESSWELL, J.E. A meta-analysis of experiments testing the Effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, London, v. 20, n. 1, p. 149-157, jan. 2011.

CRUZ, A. S.; SILVA- ZACARIN, E. C. M.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 165-179, apr. 2010.

CRUZ-LANDIM, C; SILVA DE MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultraestrutural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v. 1, p. 29-40, 1996.

CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Microscópica**, Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 81–106, jan. 2007.

DIVELY, G. P.; KAMEL, A. Insecticide residues in pollen and nectar of a *Cucurbit* crop and their potential exposure to pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 18, p. 4449−4456, mar.2012.

DOW, J. A. T. Ion and water transport in locust alimentary canal: evidence from in vivo electrochemical gradients. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 93, p. 167-179, 1981.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 31, p. 321-339, jan. 1986.

DUSSAUBAT, C.; BRUNET, J. L.; HIGES, M.; COLBOURNE, J. K.; LOPEZ, J.; CHOI, J. H.; HERNANDEZ, R. M.; BOTIAS, C.; COUSIN, M.; MCDONNELL, C.; BONNET, M.; BELZUNCES, L. P.; MORITZ, R. F. A.; LE CONTE, Y.; ALAUX, C. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-11, may 2012.

ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010.

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 209-232, jan. 2006.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELLK, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 33, n. 4, p.7 19-731, apr. 2014.

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; DAVIS, R. L.; FAHRBACH, S. E. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 414, n. 1, p. 97-113, nov. 1999.

FARRIS, S. M.; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Structure and Development**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 79-101, aug. 2003.

FRANCOY, T.M.; GONÇALVES, L.S.; DE JONG, D. Rapid morphological changes in populations of hybrids between Africanized and European honey bees. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.11, n.3, p.3349-3356, set. 2012.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980. 79p.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 282–298, mar. 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVEZ, S. B.; VENDRAMIM, J.

D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 576p.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. In situ localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera L.*) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. **Cell Biology International**, London, v. 23, n. 3, p. 211-218, mar. 1999.

GREGORC, A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CARVALHO, S. M.; KARAMBEGER, D.; TEIXEIRA E. W.; MALASPINA, O. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, Oxford, v. 147, p. 328-336, mar. 2016.

GRONENBERG, W. Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. **The Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 435, n. 4, p. 474-89, july 2001.

HIGES, M.; MARTIN-FERNANDEZ, R.; BOTIAS, C.; GARRIDO-BAILON, E.; GONZALEZ-PORTO, A. V.; BARRIOS, L.; DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIMENEZ, J. J.; PALENCIA, P. G.; MEANA, A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 2659-2669, july 2008.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MEANA, A.; DEL NOZAL, M. J.; MAYO, R.; BERNAL, J. L. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v.1, n. 2, p. 110-113, feb. 2009.

HIGES, M.; JUARRANZ, A.; DIAS-ALMEIDA, J.; LUCENA, S.; BOTIAS, C.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology Reports, v. 5, p. 530–536, apr 2013.

HILFIKER, S.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A. J.; KAO, H.; AUGUSTINE, G. J.; GREENGARD, P. Synapsin as regulators of neurotransmitter release. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 354, p. 269-279, feb. 1999.

HO, M. W.; CUMMINS, J. Mystery of disappearing honeybees. **Science Society,** v. 34, p. 35-36, 2007.

HUTTNER, W. B.; SCHIEBLER, W.; GREENGARD, P.; DE CAMILLI, P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-especific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 96, n.5, p. 1374–1388, may 1983.

ILYASOV, R.; GAIFULLINA, L.; SALTYKOVA, E.; POSKRYAKOV, A.; NIKOLENKO, A. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. **Journal of Apicultural Science**, Puławy, v. 56, n. 1, p. 115-124, apr. 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. **Abelhas sociais e flores – análise polínica como método de estudo**. In: PIRANI, J. R.; CORTOPASSI LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/ FAPESP. 1993. p. 17- 30.

JACOB, C. R. O; SOARES, H. M; NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O. 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, jan. 2015.

JIMENEZ, D. R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 261, n. 3, p. 431-443, may 1990.

KABAKOV, A. E.; BUDAGOVA, K. R.; LATCHMAN, D. S.; KAMPINGA, H. H. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 2, p. C521-C534, aug. 2002.

KAKAMAND, F. A. K. H.; MAHMOUD, T. T.; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Duhok University**, Duhok, v. 11, n.1, p.144-151, 2008.

KATO, K.; AWASAKI, T.; ITO, K. Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 51-59. 2009.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. Much remains to be learned about pollinators and plants. **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 5, p. 297–307, may 1997.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n. 12, p. 20 - 41, 2001.

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, San Francisco, v. 2, n. 4, p.e371, abr. 2007.

KOMISCHKE, B.; SANDOZ, J-C.; MALUN, D.; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. European. **Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 477-485, jan. 2005.

KRETZCHMAR, D.; PFLUGFELDER, G. O. Glia in development, function, and neurodegeneration of adult insect brain. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 57, n. 1, p. 121-131, jan. 2002.

LLINÁS, R.; McGUINNESS, T. L.; LEONARD, C. S.; SUGIMORI, M.; GREENGARD, P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 9, p. 3035-3039, may 1985.

MALLON, E. B.; BROCKMANN, A.; SCHMID-HEMPEL, P. Immune response inhibits associative learning in insects. **Proceedings of the Royal Society of London- Series B-Biological sciences**, London, v. 270, n. 1532, p. 2471–2473, dec. 2003.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 6.ed. São Paulo: Nobel. 1983. 305p. v. 1.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; HIGES, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6331-6338, oct. 2007.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARÍN, P.; BOTÍA, C.; GARRIDO-BAILÓN, E.; BARRIOS, L.; HIGES, M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 8, p. 2554-2557, abr. 2009.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTÍA, C.; BARRIOS, L.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; MEANA, A.; MAYACK, C.; HIGES, M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 605-612, mar. 2011.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 100, n. 3, p.185–188, mar. 2009.

MAYACK, C.; NATSOPOULOU, M. E.; MCMAHON, D. P. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 662-70. sep 2015.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular function and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 670, mar. 2005.

MCDONNELL, C. M.; ALAUX, C.; PARRINELLO, H.; DESVIGNES, J. P.; CRAUSER, D.; DURBESSON, E.; BESLAY, D.; LE CONTE, Y. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). **BMC Ecology**, London, v. 13, p. 25, july 2013.

NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, London, v. 132, n. 2, p. 288-295, june 2009.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 49, n. 1, p. 1-6, apr. 2010.

OLDROYD, B. P. What´s killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, june 2007.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-Effects of Thiamethoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenopptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133. oct. 2014.

PETTIS, J. S.; VAN ENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DIVELY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased level of the gut pathogen *Nosema*. **Naturwissenchaften**, v. 99, p. 153-158, jan. 2012.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides wich alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 98, n. 7, p.1-9, july 2013.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v. 51, n. 5, p.422-442, maio 2016.

POHORECKA, K.; SKUBIDA, P.; MISZCZAK, A.; SEMKIW, P.; SIKORSKI, P.; ZAGIBAJLO, K.; TEPER, D.; KOLTOWSKI, Z.; SKUBIDA, M.; ZDAŃSKA, D.; BOBER, A. Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape

crops and their effect on bee colonies. **Journal of Apicultural Science**, Puławy, v. 56, n. 2, p. 115-134, dec. 2012.

ROAT, T. C.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; MALASPINA, O; PALMA, M. S. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, London, v. 23, n. 9, p. 1659–1670, nov. 2014.

RYBAK, J.; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 334, n. 3, p. 444-465, aug. 1993.

SAWCZYN, T.; DOLOZYCH, B.; KLOSO, M.; AUGUSTYNIAK, M.; STYGAR, D.; BULDAK, R. J.; ZWIRSKA-KORCZALA, K. Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, Monticello, v. 47, n. 11, p. 1644-1651. jun. 2012.

SCHMUCK, R.; SCHONING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 3, p. 225-238, mar. 2001.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill Co., 1935. p.667.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 87p. 2012.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters,** Amsterdam, v.128,, n. 1-3, p. 215-228. mar. 2002.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, Washington, v. 316, n. 5827, p. 970-972, may 2007.

STONER, K. A; EITZER, B. D. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-5, june 2012.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera.* **Pest Management Science**, West Sussex. v. 60, n. 3, p. 291-296, mar. 2004.

SUR, R.; STORK, A. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n.1, p.35-40, 2003.

TAKAYAMA, S.; REED, J. C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, p. 9041-9047, 2003.

TEIXEIRA, E. W.; SANTOS L. G.; SATTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L. T. M. F.; MARTINS, M.F. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 114, n. 3, p. 250-254, nov. 2013.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrofic membrane and trehalose: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larval of *Rhynchosciara*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 325-331, 1981.

TERRA, W. R. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 47, n. 2, p. 47-61, june 2001.

THANY, S. H.; LENAERS, G.; CROZATIER, M.; ARMENGAUD, C.; GAUTHIER, M. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 255-262, jun. 2003.

THANY, S. H.; CROZATIER, M.; RAYMOND-DELPECH, V.; GAUTHIER, M.; LENAERS, G. Apisα2, Apisα7-1 and Apisα7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α-subunits in the honeybee brain. **Gene**, Amsterdam, v. 344, p. 125-132, 2005.

TISSOT, M; STOCKER, R.F; Metamorphosis in Drosophila and other insects: the fate of neurons throughout the stages. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v.62, n.1, p.89-111, 2000.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R. M.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-17, ago. 2009.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; ALAOUI, H. E.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-8, june 2011.

WATANABE, M. E. Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun. **BioScience**, Washington, v. 58, n. 5, p. 384-388, may 2008.

WONG, H. R.; MENENDEZ, I. Y.; RYAN, M. A.; DENENBERG, A. G.; WISPE, J. R. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 275, n. 4, p. 836-841, oct. 1998.

YANG, E. C.; CHANG, H. C.; WU, W. Y.; CHEN, Y. W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, nov. 2012.

YANG, E. C.; CHUANG, Y. C.; CHEN Y. L.; CHANG, L. H. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 6, p. 1743-1748, dec. 2008.

ZERBO, A. C. **Diferenciação morfológica e funcional do tubo digestivo de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 101p. 2003.