

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL

ELYAB SILVEIRA FRANCO

Análise morfológica do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* após o
tratamento com NMDA

Ituiutaba - MG

2025

ELYAB SILVEIRA FRANCO

Análise morfológica do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* após o tratamento com NMDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria

Ituiutaba – MG

2025

ELYAB SILVEIRA FRANCO

Análise morfológica do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* após
o tratamento com NMDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do
Pontal da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba, 05 de maio de 2025.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Luciana Karen Calábria (UFU/ICENP)

Profa. Dra. Gabriela Lícia Santos Ferreira (UFU/ICENP)

Profa. Ms. Vanessa Suzuki Katagui (UFU/ICENP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço minha família - minha mãe, meu pai, minha irmã e meu irmão - por estarem comigo em todos os momentos e por sempre me apoiarem, cada um à sua maneira. Agradeço a disponibilidade em dedicar tempo para me levar até a faculdade e por me ouvir, inúmeras vezes, falando sobre os mais diversos assuntos. Ao meu irmão Samuel, em especial, agradeço por demonstrar verdadeiro interesse em me ouvir, mesmo nos dias em que estava de mau humor.

Aos meus amigos, sou grata por todos os momentos compartilhados ao longo da graduação, tanto os bons quanto os difíceis. Obrigada pelas risadas, pelas conversas, muitas vezes profundas, pelos conselhos e, principalmente, por me encorajarem nos momentos em que pensei em desistir.

Por fim, agradeço imensamente à professora e orientadora Luciana Calábria por ter aceitado me orientar, mesmo diante das minhas confusões e esquecimentos. Sou muito grata por sua paciência, generosidade e por sempre estar disponível quando necessário.

RESUMO

As abelhas são insetos eusociais tendo uma divisão de castas bem definida em rainha, zangões e operárias. As operárias se dividem em diferentes categorias de trabalho, incluindo campeira que sai da colmeia em busca de alimento e a nutridora que permanece na colmeia cuidando dos ovos e larvas, limpando e alimentando. Esses insetos garantiram seu sucesso adaptativo por possuírem um sistema sensorial eficiente baseado em um cérebro e cordão nervoso ventral. Seus sinais são transmitidos pelas mudanças do potencial elétrico através de suas membranas na presença de neurotransmissores, como NMDA. O efeito do NMDA na aprendizagem e memória ainda não está totalmente claro, porém estudos revelam que a transmissão glutamatérgica é uma parte integrante da memória da abelha, enquanto dados recentes indicam que o seu receptor promove a regulação do sono em *Drosophila melanogaster*. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito morfológico da injeção de NMDA no cérebro das abelhas operárias nutridora e campeira *Apis mellifera* utilizando a coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.) e impregnação metálica. Para isso, cortes de cérebros de abelhas doados pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, foram processados e as imagens digitalizadas e analisadas por microscopia de luz. A coloração H.E. e impregnação metálica são amplamente utilizadas no estudo de insetos, incluindo a abelhas *A. mellifera* e foram úteis na investigação morfológica e comparativa dos cérebros de operárias. Notou-se que o processamento dos cérebros, incluindo a dissecação, o fatiamento e a desidratação, resultaram em alterações estruturais e danos no tecido cerebral, provavelmente devido à extensa manipulação. As análises morfológicas permitiram identificar diferenças entre as regiões do cérebro das operárias nutridora e campeira tratadas e não tratadas com NMDA, as quais podem refletir em mudanças anatômicas e fisiológicas, bem como indicar a interferência da droga no aspecto cerebral, determinando ou não a função dessas abelhas na colmeia.

Palavras-chave: Hematoxilina & Eosina. Impregnação metálica. Inseto eusocial. *N*-metil-D- aspartato.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 Material biológico	15
3.2 Análise morfológica	15
<i>3.2.1 Hematoxilina e Eosina</i>	<i>15</i>
<i>3.2.2 Impregnação metálica</i>	<i>15</i>
3.3 Aquisição e Análise de imagens	16
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Estudos com abelhas *Apis mellifera* são importantes para a compreensão de processos biológicos sobre o desenvolvimento ontogenético, formação de casta, aprendizagem e memória, envelhecimento, transporte e motilidade celular, biossinalização, dentre outros (Huang; Robinson, 1992).

As abelhas são insetos eusociais tendo uma divisão de castas bem definida em rainha, zangões e operárias (Figura 1). As operárias se dividem em diferentes categorias de trabalho, incluindo campeira que é aquela abelha que sai da colmeia em busca de alimento e a nutridora que permanece na colmeia cuidando dos ovos e larvas, limpando e alimentando (Johnson, 2010).

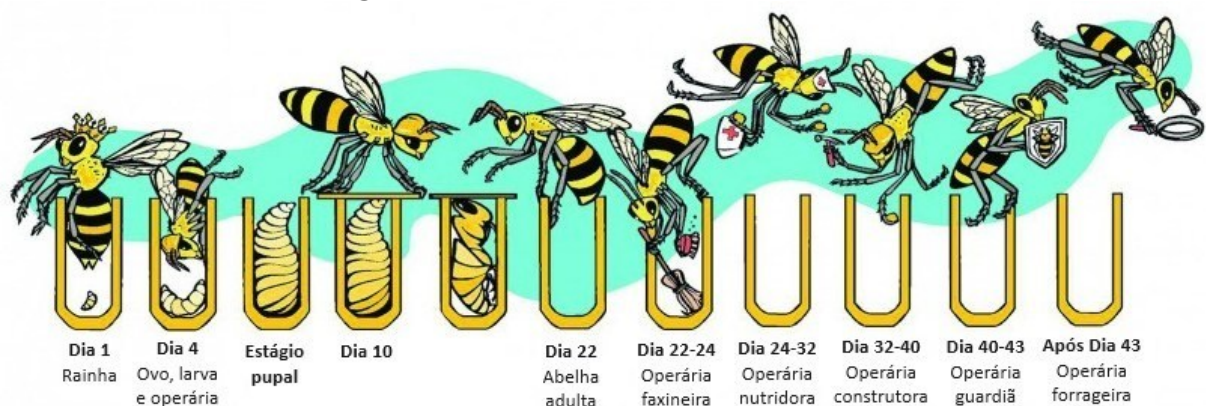
Figura 1 - Divisão de castas evidenciando operária (A), rainha (B) e zangão (C)



Fonte: Bonoan; Starks (2021).

Abelhas vivendo em colônias saudáveis na primavera e no verão passam por três transições de divisão de tarefas (Figura 2): limpadoras para nutridora, nutridora para meia-idade e meia-idade para forrageira (Beshers; Fewell, 2001; Amdam; Omholt, 2003).

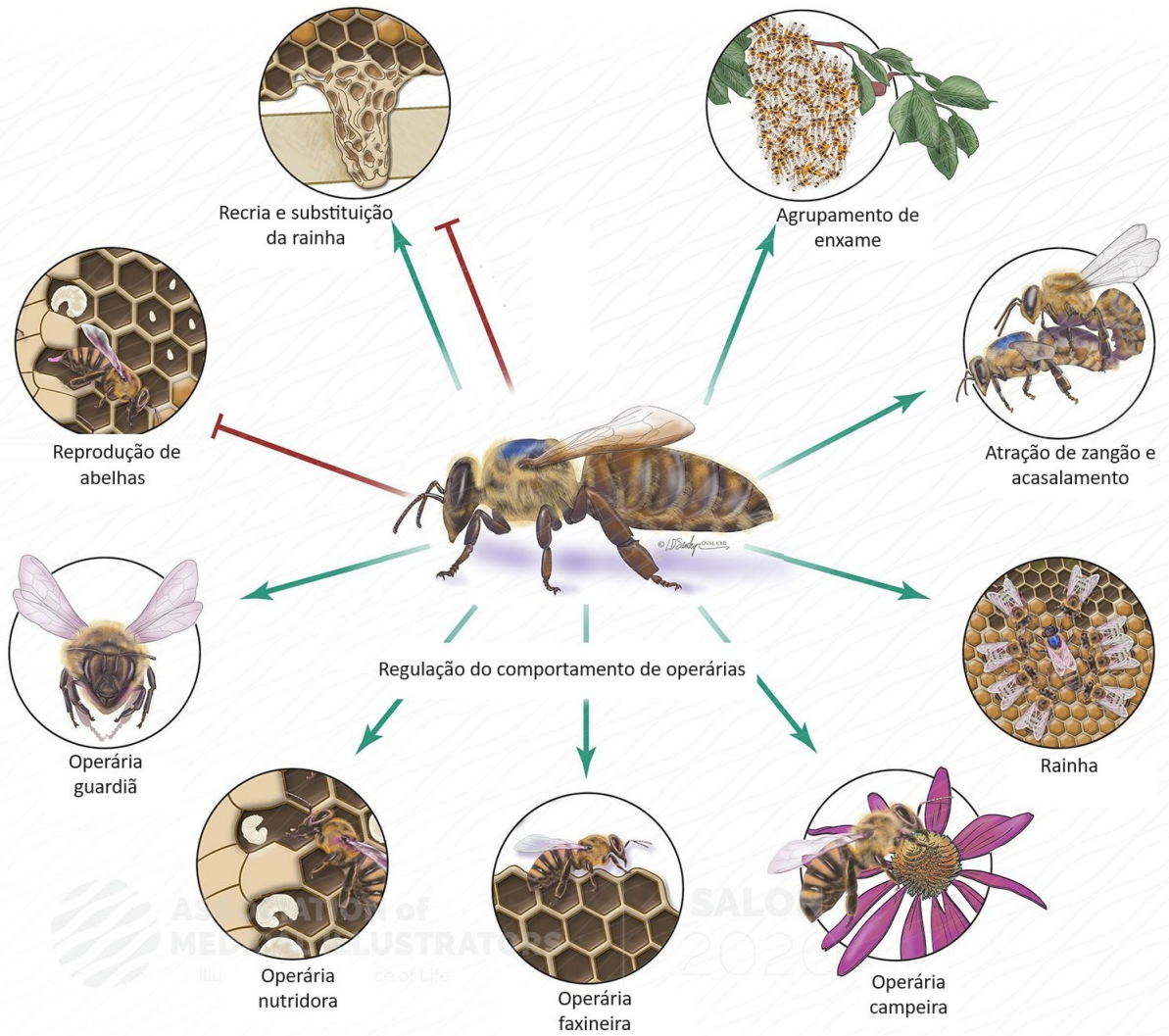
Figura 2 - Divisão de tarefas na colmeia



Fonte: Langley (2023).

Os primeiros dias de vida de uma abelha são gastos para o desenvolvimento contínuo e aquisição das habilidades de voar e picar (Seeley, 1982). A tarefa de cuidados da nutridora normalmente dura cerca de uma semana, podendo variar esse tempo de quatro a doze dias (Ribbands, 1953; Seeley, 1982). Além de alimentar a ninhada, as nutridoras também transferem proteínas e secreções para as abelhas mais jovens e mais velhas no ninho e são, portanto, importantes para seu desenvolvimento e manutenção (Crailsheim, 1991; 1992). As nutridoras cuidam da rainha (Winston, 1987), regulando o comportamento desta casta (Figura 3) através da taxa de alimentação e agem como abelhas mensageiras, espalhando os feromônios da rainha pelo ninho (Velthuis, 1972; Seeley, 1979).

Figura 3 - Comunicação da rainha e seus efeitos na colmeia



Fonte: Adaptado de Sawchyn (2020).

As abelhas de meia-idade permanecem em sua casta pelo período de uma semana, dos doze aos vinte e um dias (Seeley, 1982; Johnson, 2008a). Suas tarefas são desde a construção e manutenção do ninho, até o recebimento e processamento de néctar, para proteger a entrada do ninho (Seeley, 1982; Trumbo; Huang; Robinson, 1997; Johnson 2003; 2008; 2008b). As abelhas de meia-idade podem ser divididas em duas categorias: as mais jovens gastam mais tempo na construção de favos e manutenção geral da colônia, enquanto as mais antigas fazem a transição para o processamento de néctar e outras tarefas, que as colocam mais perto da entrada do ninho (Seeley, 1995; Trumbo; Huang; Robinson, 1997). Enquanto isso, as campeiras coletam o néctar e o transferem para as abelhas de meia-idade próximas à entrada do ninho para processamento e armazenamento do mel (Seeley, 1956).

Uma vez feita a transição para a alimentação, as abelhas já não participam de tarefas internas (Winston, 1987; Seeley, 1995). Em vez disso, elas se concentram em procurar recursos que a colônia precisa: própolis, água, pólen e néctar (Robinson, 1992; Seeley, 1996; Calderone, 1998).

Esses insetos garantiram seu sucesso adaptativo por possuírem um sistema sensorial eficiente baseado em um sistema nervoso composto por cérebro e cordão nervoso ventral (Oleskevick; Clements; Srinivasan, 1997). O cérebro é dividido em três regiões, o protocérebro na anterior, compreendido pelos lobos ópticos e os corpos de cogumelo; o deutocérebro formado pelos lobos antenais; e o tritocérebro, abaixo do deutocérebro (Snodgrass, 1956), como pode ser visualizado na Figura 4.

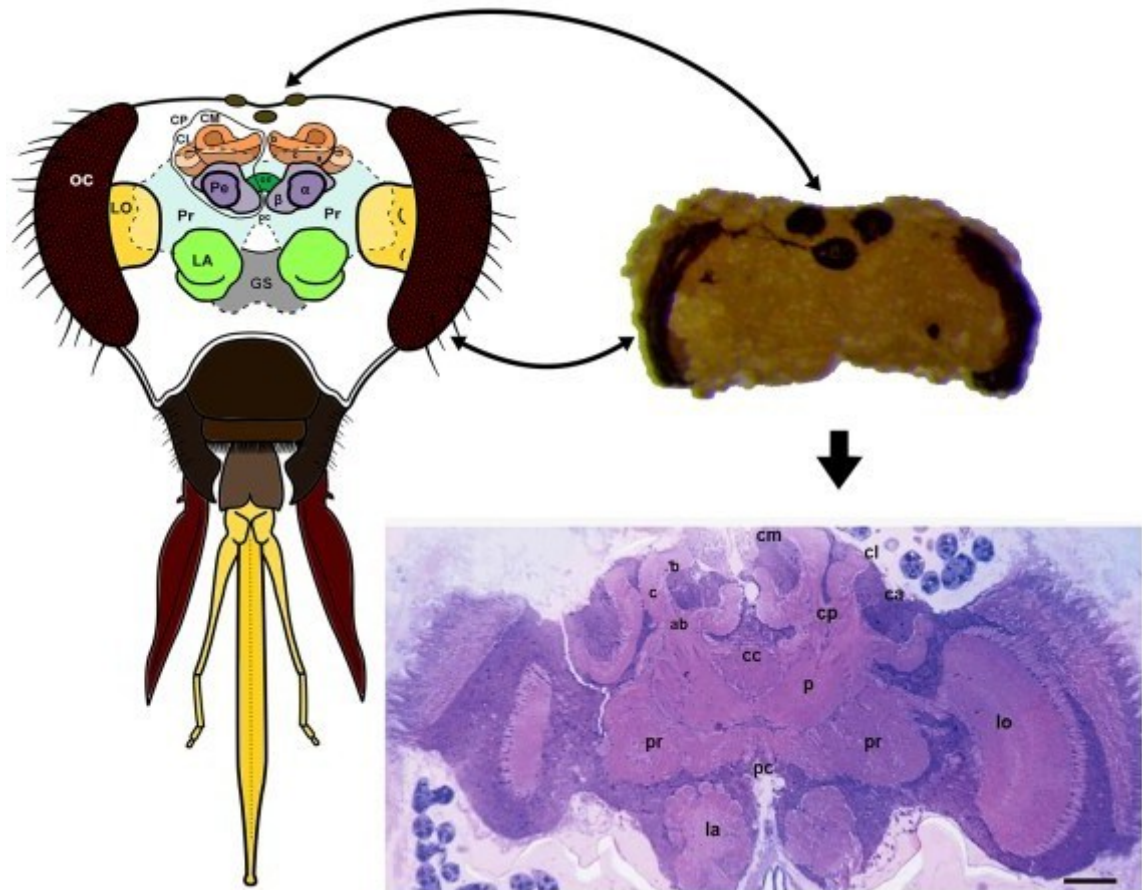
No cérebro da abelha *A. mellifera* os lobos antenais são responsáveis pelo processamento quimiossensorial, enquanto os lobos ópticos recebem e transmitem informações de fotorreceptores encontrados na retina (Pagy, 2013). Os corpos de cogumelo estão relacionados à aprendizagem e à memória da abelha (Hernández, 2009).

As regiões do cérebro que contém corpos celulares de neurônios são denominadas de somata e as regiões contendo os prolongamentos celulares são chamadas de neurópila (Schoter; Menzel, 2003; Brandt *et al.*, 2005). Os neurônios são classificados em sensoriais, motores e de associação, também denominados como interneurônios, já que se intercalam entre os dois primeiros tipos de neurônios (Banerjee; Bharadwaj, 1974; Rehder, 1989; Kloppenburg, 1995; Brandt *et al.*, 2005). Os interneurônios apresentam complexa organização e estão localizados principalmente nos corpos pedunculados, estruturas pertencentes ao protocérebro (Menzel; Giurfa, 2001).

O protocérebro é região central e de uma somata na região periférica formada por

arborizações sobrepostas de neurônios que partem dos lobos antenais, lobos ópticos e dos corpos pedunculados (Rybak, 2012).

Figura 4 - Diferentes estruturas morfológicas do cérebro da abelha *Apis mellifera*



a/ab, anel basal; b, borda; c, colar; ca, cálice; cc, corpo central; CL/cl, cálice lateral; CM/cm, cálice medial; CP/cp, corpo pedunculado; GS, gânglio subesofágico; LA/la, lobo antenal; LO/lo, lobo óptico; OC, olho composto; pc, ponte cerebral; Pe/p, pedúnculo; Pr/pr, protocérebro; α , pedúnculo externo; β , pedúnculo interno. Setas entre as imagens indicam correspondência dos ocelos e lobo óptico entre o esquema e o cérebro dissecado.

Fonte: Adaptado de Azevedo; Nocelli (2020).

A ponte cerebral é constituída por prolongamentos nervosos, uma massa de neurópila responsável pela conexão e comunicação entre os lobos esquerdo e direito do protocérebro (Cruz-Landim, 2009). Estes neurônios respondem ao estímulo da antena, de luz e a mecânicos no tórax ou no abdômen (Homberg, 1984).

Os corpos pedunculados, também conhecidos como corpo de cogumelo (do inglês *mushroom bodies*), são estruturas pares constituídas de massas de neurópilas em forma de cálice, de onde partem dois pedúnculos que se unem na base (Heisenberg, 1998), formados pelos lábios (borda do cálice), colar (parede do cálice) e o anel basal (fundo do cálice) (Strausfeld, 2002), de onde partem os pedúnculos β (mais externos) e α (mais

internos) (Menzel *et al.*, 1994). Os corpos pedunculados estão relacionados com a plasticidade comportamental das abelhas, porque são centros de integração e processamento de informações olfativas, visuais, gustativas e mecanossensorial (Komischke *et al.*, 2005; Kiya; Kunieda; Kubo, 2007).

Os cálices são preenchidos pelos corpos celulares de neurônios, chamados de células de Kenyon (Fahrbach, 2006; Roat; Cruz-Landim, 2010), aproximadamente dezessete mil em cada corpo pedunculado e quatorze mil fora de cada cálice (Fahrbach, 2006). A célula de Kenyon se estende em fibras finas que se dividem para formar um dendrito com arborizações no cálice e um ramo de axônios que se divide dando origem a novas arborizações que se separam em duas neurópilas, formando os lobos associados ao cérebro (Brandt *et al.*, 2005; Fahrbach, 2006).

De acordo com Paulk; Gronenberg (2008), as células nervosas responsáveis pela transmissão de sinais visuais aos corpos pedunculados são capazes de captar sinais de cores e informações de movimentos, e sinalizar aspectos temporais dos estímulos, expandindo o repertório funcional dos corpos pedunculados (Azevedo; Nocelli, 2020).

Os lobos ópticos são constituídos de uma complexa estrutura de elementos nervosos e celulares como, por exemplo, os omatídeos que são as células com formato hexagonal que constituem os olhos, possuindo células fotorreceptoras para curto, médio e longo alcance de comprimentos de onda (Mota *et al.*, 2011).

O deutocérebro é o segundo gânglio do cérebro e localiza-se ventralmente na região central, sendo constituído por dois lobos antenais responsáveis pelo processamento quimiossensorial. Eles são estruturas esféricas formadas por prolongamentos de neurônios sensitivos que recebem estímulos olfatórios captados pelos corpos celulares presentes nas antenas e nas estruturas da boca (Galizia; Rössler, 2010; Rybak, 2012).

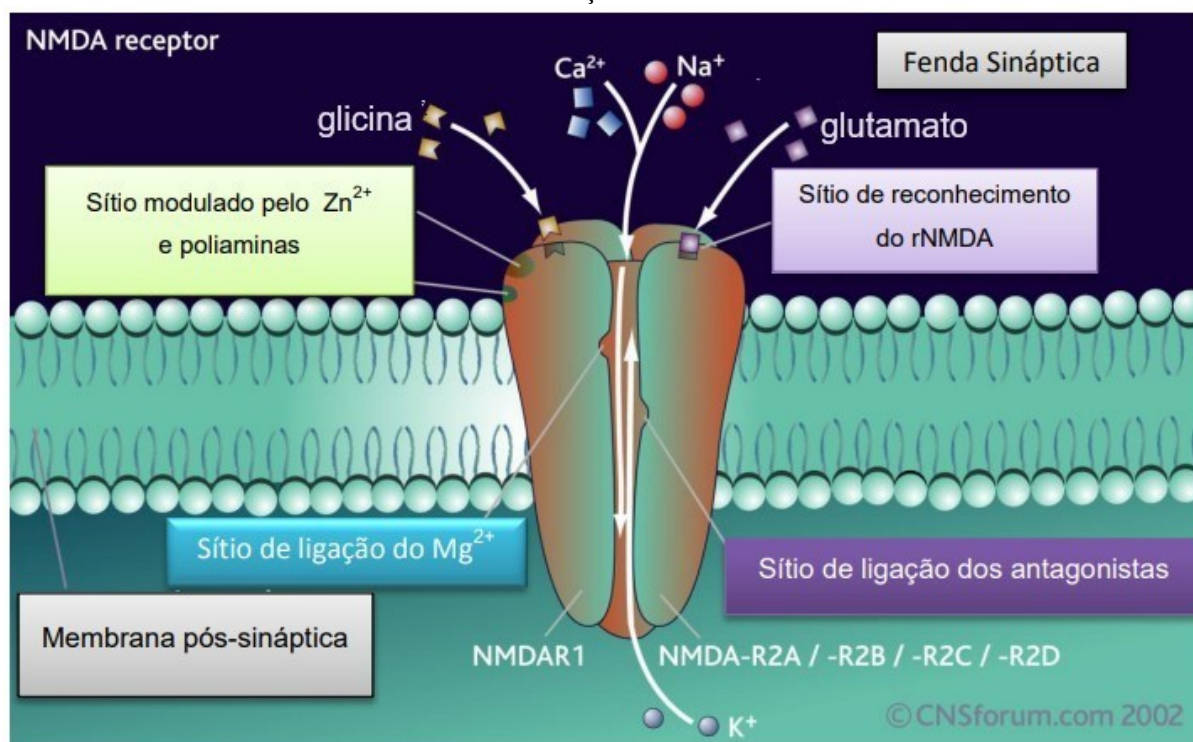
O sistema nervoso consiste em neurônios, que transmitem sinais, e outras células de sustentação. Os sinais são transmitidos pelas mudanças do potencial elétrico através de suas membranas. A sinalização requer a liberação de neurotransmissores que, quando ligados ao seu receptor específico, iniciam um sinal elétrico na célula-alvo ou receptora. Os neurotransmissores são divididos em duas categorias, moléculas pequenas contendo nitrogênio (glutamato, ácido γ -aminobutírico - GABA, glicina, acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina, adrenalina, aspartato e óxido nítrico) e neuropeptídeos (endorfinas, hormônio do crescimento e hormônio estimulante da tireoide) (Smith; Marks; Lieberman, 2007).

O glutamato é um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso, levando à

despolarização de neurônios, sendo geralmente sintetizado pela glicose e os intermediários do ciclo do ácido cítrico. Ele é armazenado em vesículas e sua liberação é dependente de íons cálcio, sendo removido da fenda sináptica pelos sistemas de captação de alta afinidade (Smith; Marks; Liberman, 2007).

O receptor de NMDA (*N*-metil-D-aspartato) é ionotrópico para glutamato e a sua ativação resulta na abertura de canais iônicos não seletivos para cátions (Figura 5). Esse receptor é dependente tanto da ligação de um íon quanto de alterações da voltagem. Uma mudança positiva no potencial transmembrânico causa a abertura do canal iônico do receptor de NMDA através da eliminação de íons Mg^{2+} que bloqueiam o canal para o meio externo. Essa propriedade é fundamental para a função do receptor na memória e aprendizagem (Bressan; Pilowsky, 2003).

Figura 5 - Esquema representativo do receptor NMDA, seus sítios de ligação e mecanismos de ativação



Fonte: Adaptado de CNSforum.com.

O envolvimento de glutamato em funções cerebrais específicas em insetos e outros invertebrados é pouco compreendido e controverso (Kucharski *et al.*, 2000; Maleszka, 2000; Sinakevitch; Farris; Strausfeld, 2001). No entanto, já se sabe que concentrações de glutamato mudam de acordo com a idade das abelhas (Fuchs *et al.*, 1989) e a injeção de um inibidor do transportador de glutamato e do receptor NMDA

pode ser prejudicial para a sua memória (Maleszka; Helliwell; Kucharski, 2000; Müßig *et al.*, 2010).

O efeito do NMDA na aprendizagem e memória ainda não está totalmente claro. Contudo, estudo de Si; Helliwell; Maleszka (2004) revelou que a transmissão glutamatérgica é uma parte integrante da memória da abelha, enquanto dados recentes de Tomita *et al.* (2015) e Nakagawa *et al.* (2022) indicam que o receptor de NMDA promove a regulação do sono em *Drosophila melanogaster*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito morfológico da injeção de NMDA no cérebro das abelhas operárias nutridora e campeira *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as células e estruturas das regiões do cérebro (lobo óptico, lobo antenal e corpos de cogumelo) a partir da coloração com hematoxilina e eosina;
- Descrever as diferenças neuronais após impregnação metálica com nitrato de prata;
- Analisar a morfologia do cérebro após o tratamento com NMDA.

3 METODOLOGIA

3.1 Material biológico

Neste estudo utilizou-se lâminas prontas montadas a partir de cérebro de abelhas operárias campeiras e nutridoras *Apis mellifera* doadas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espindola. Os quatro cérebros de cada operária haviam sido tratados com 0,1 μ L de NMDA diluído em salina na concentração de 0,04 nmol/ μ L durante 1 hora, tendo a salina (NaCl 0,9%) como controle, dissecados e mantidos em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% por 1 hora e 30 minutos, seguido de desidratação em álcool etílico absoluto por uma hora e uma hora no xilol, e emblocados em parafina líquida. Dez cortes de 5 μ m montados em lâmina pré- tratada com gelatina 0,2% por Oliveira-Silva (2008) foram utilizados nesse estudo para cada operária.

3.2 Análise morfológica

3.2.1 Hematoxilina e Eosina

Os cortes foram desparafinizados em 3 banhos de xilol e hidratados em álcool etílico (100%, 95%, 85% e 70%), água corrente e água destilada. As secções foram imersas em Hematoxilina-Harris por 2 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram imersos na solução de Eosina por 1 minuto e lavados rapidamente em água destilada. Os cortes passaram por uma bateria de álcool etílico (70%, 85%, 95% e 3 vezes 100%) e xilol 3 vezes por 30 segundos cada. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Entelan e lamínula. Segundo a técnica, os núcleos foram corados em azul e o citoplasma em róseo.

3.2.2 Impregnação metálica

Após desparafinização e hidratação seguindo o mesmo protocolo inicial descrito para Hematoxilina e Eosina, as secções foram incubadas em solução contendo 120 mM tampão citrato, 36% goma arábica, 100 mM hidroquinona e 0,08% nitrato de prata por 30 minutos a 35°C. Após o tempo vencido, os cortes foram lavados durante 30 minutos em água corrente, desidratados em bateria de álcool etílico (70%, 85%, 95% e 3 vezes 100%) e xilol 3 vezes por 30 segundos cada. As lâminas foram montadas com Entelan e lamínula. Segundo dados da literatura (Behmer; Tolosa; Freitas Neto, 1986; Babb *et al.*, 1991;

Mello *et al.*, 1993; Calábria *et al.*, 2010; Calábria *et al.*, 2011), esperaria como resultado a coloração em preto nas células nervosas, em marrom nas neurofibrilas e terminações nervosas, em amarelo nos axônios mielinizados e em amarelo pálido nos endoneurônios.

3.3 Aquisição e Análise de imagens

As imagens foram obtidas a partir da análise dos cortes com o auxílio de microscópio óptico de luz. As imagens foram capturadas e armazenadas em arquivo do tipo “jpeg” por meio de adaptador de celular acoplado à lente ocular do microscópio. Para cada corte foram obtidas fotomicrografias randômicas utilizando as objetivas de 40x e 100x. A partir das imagens digitalizadas, realizou-se a análise morfológica das regiões do cérebro e das células neuronais.

4 RESULTADOS

Dentre os corantes mais utilizados em procedimentos histológicos estão a Hematoxilina e a Eosina. A hematoxilina é uma base capaz de corar componentes celulares que sejam ácidos em um tom de azul escuro, como o DNA e o RNA no núcleo eucariótico. Já a eosina é um ácido capaz de corar estruturas celulares básicas das células em tom rosa, como o citosol e organelas (Gartner; Hiatt, 1999).

A primeira vez que a combinação de Hematoxilina e a Eosina foi usada como coloração histológica foi pelo químico Wissozky, em 1877, em estudo com hemoglobina (Cook, 1997).

Por outro lado, a impregnação metálica foi uma invenção em 1873 creditada a Camillo Golgi, médico e histologista italiano, para visualização de neurônios (Oliveira, 2025).

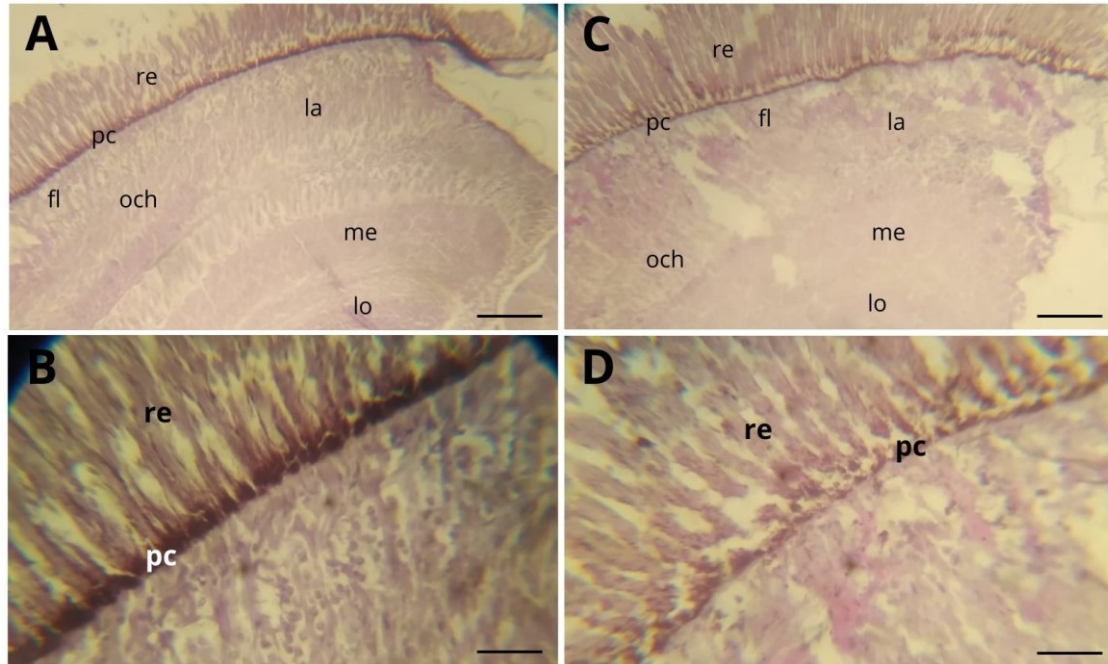
Tanto a coloração com Hematoxilina e Eosina quanto a impregnação metálica são amplamente utilizadas em pesquisas com insetos, incluindo a abelhas *A. mellifera*. No nosso estudo, elas também foram úteis na investigação morfológica e comparativa dos cérebros de abelhas operária e nutridora.

Uma limitação encontrada no nosso estudo foi a integridade dos cortes utilizados. A pesquisa inicial da injeção de NMDA se deu por Oliveira-Silva em 2008. Assim, após a coloração com Hematoxilina e Eosina e a impregnação metálica, os cortes não se encontravam bem preservados, muitas vezes dobrados ou com o campo de visualização ruim, desfavorecendo o cumprimento do objetivo inicial que era comparativo entre as abelhas estudadas.

Abaixo segue a descrição morfológica geral dos cérebros de abelha sem tratamento observada após a coloração com Hematoxilina e Eosina e a impregnação metálica, sendo dividida nas principais regiões, como lobo óptico (Figuras 6 e 8), corpos de cogumelo (Figuras 7 e 9).

Na figura 6A nota-se que o lobo óptico da abelha campeira tem as regiões preservadas, como retina, camada pigmentada, lóbulo, camada fenestrada e medula. Comparando campeira e nutridora observa-se que, para os cortes analisados, a retina da campeira (Figura 6A) é menor do que a retina da nutridora (Figura 6C). Além disso, a campeira parece ter maior número de neurônios na lâmina (6B).

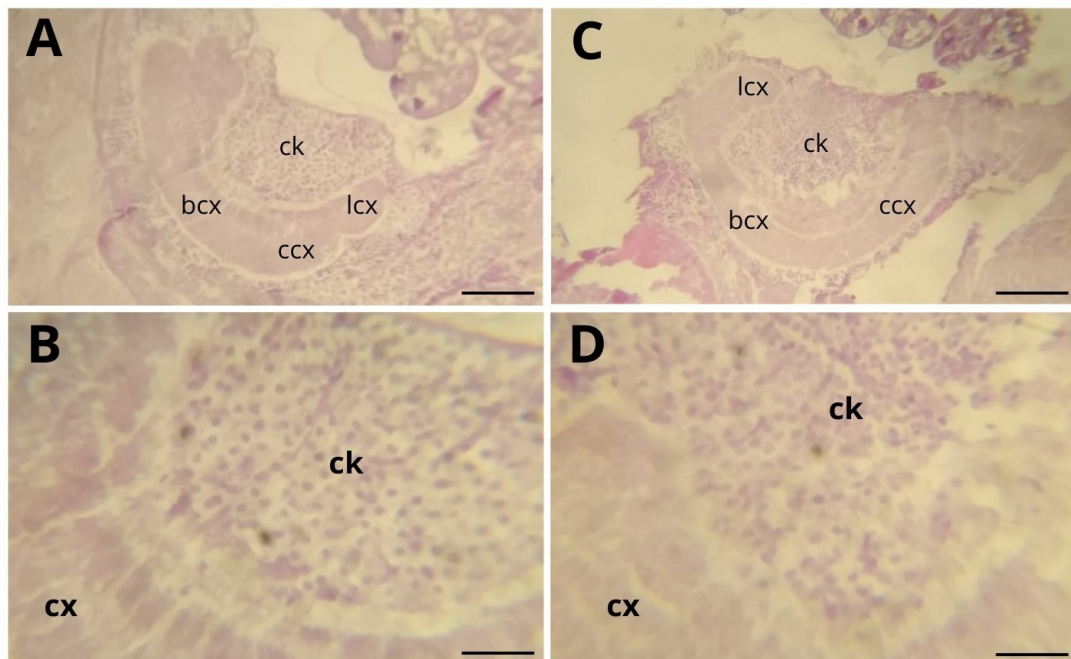
Figura 6 - Fotomicrografias do lobo óptico do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* corado com Hematoxilina e Eosina. A e B (campeira), C e D (nutridora)



Lâmina (la), quiasma externo (och), camada fenestrada (fl), medula (me), retina (re), camada pigmentada (pc) e lóbula (lo). Bar = 600 μm (A e C) e 400 μm (B e D).

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Fotomicrografias do corpo de cogumelo do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* corado com Hematoxilina e Eosina. A e B (campeira), C e D (nutridora)

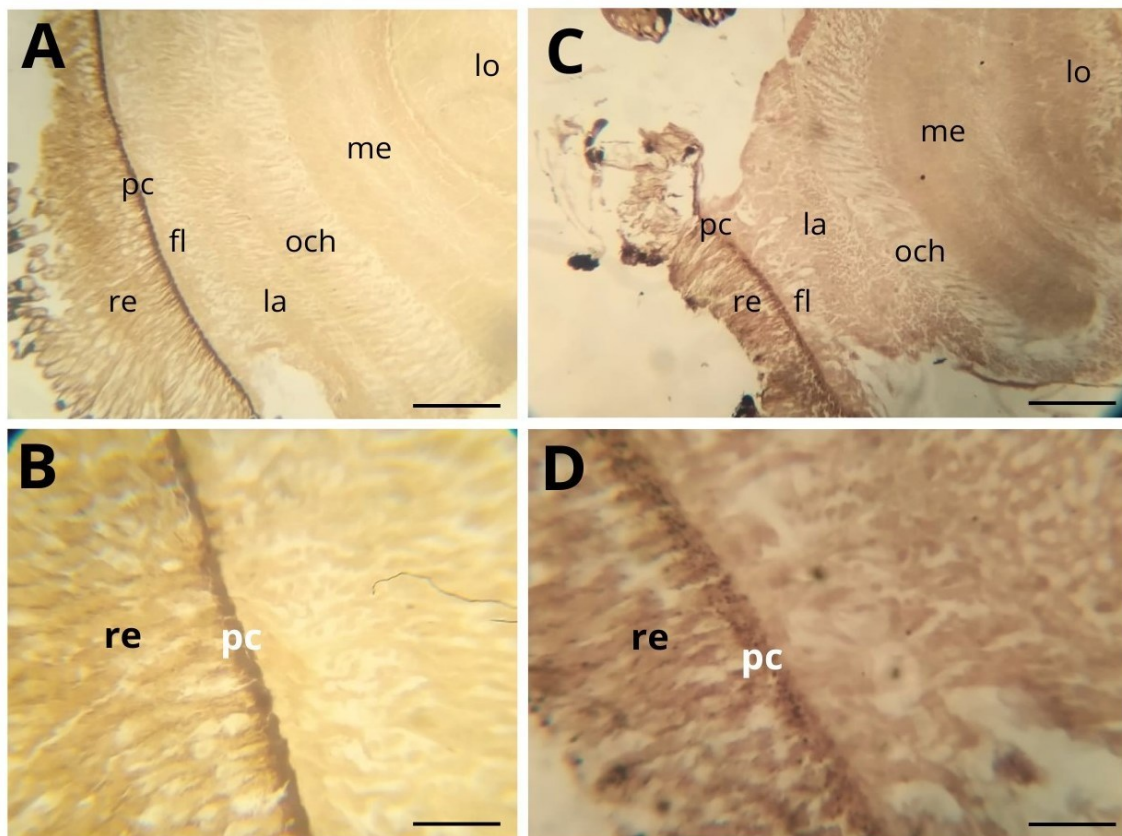


Células Kenyon (ck); cálice (cx); colar do cálice (ccx), região basal do cálice (bcx); lábio do cálice (lcx). Bar = 600 μm (A e C) e 400 μm (B e D).

Fonte: Autoria própria.

Esse dado só poderia ser comprovado a partir da morfometria, porém não existia número suficiente de cortes para este fim. As abelhas que cuidam da colmeia (nutridoras) e as que saem para buscar comida (campeiras) passam por mudanças nas retinas conforme envelhecem. No começo da vida, a retina está se desenvolvendo, mas à medida que as abelhas crescem e começam a sair da colmeia, tem uma diminuição da espessura da retina para melhor visualização do ambiente fora da colmeia, como um ajuste do sistema de visão para a nova função a ser desempenhada (Lichtenstein; Grübel; Spaethe, 2018).

Figura 8 - Fotomicrografias do lobo óptico do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* impregnado em prata. A e B (campeira), C e D (nutridora)

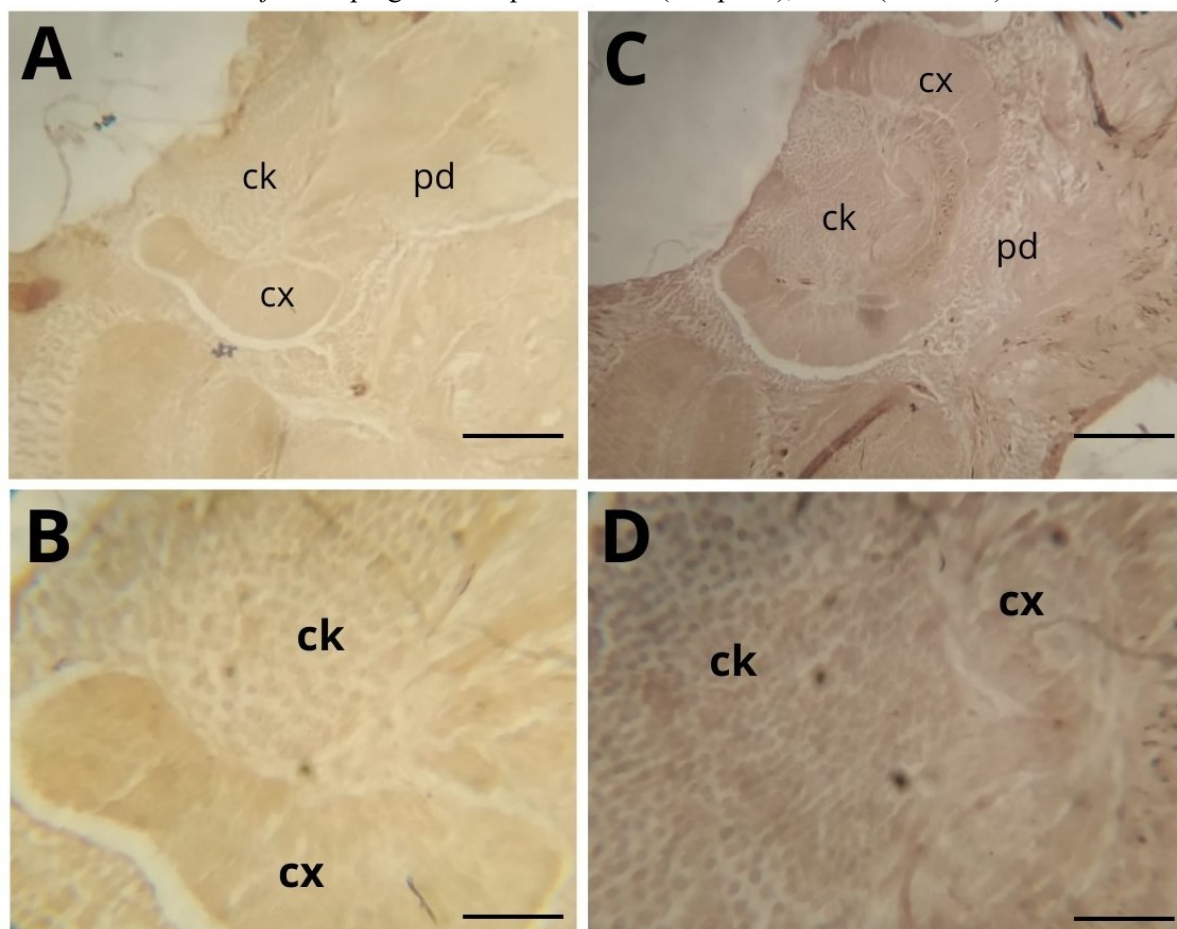


Lâmina (la), quiasma externo (och), camada fenestrada (fl), medula (me), retina (re), camada pigmentada (pc) e lóbulo (lo). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).

Fonte: Autoria própria.

Ainda na figura 6A pode-se observar nitidamente as camadas diferenciais do lobo óptico do cérebro da abelha campeira em comparação ao da nutridora (Figura 6C), no qual as camadas estão bem delimitadas, levando a maior dificuldade de visualização e análise. Em detalhe (Figuras 6B e 6D), é possível visualizar os neurônios da retina e da camada pigmentada, mais bem diferenciados no cérebro da abelha campeira.

Figura 9 - Fotomicrografias do corpo de cogumelo do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* impregnado em prata. A e B (campeira), C e D (nutridora)



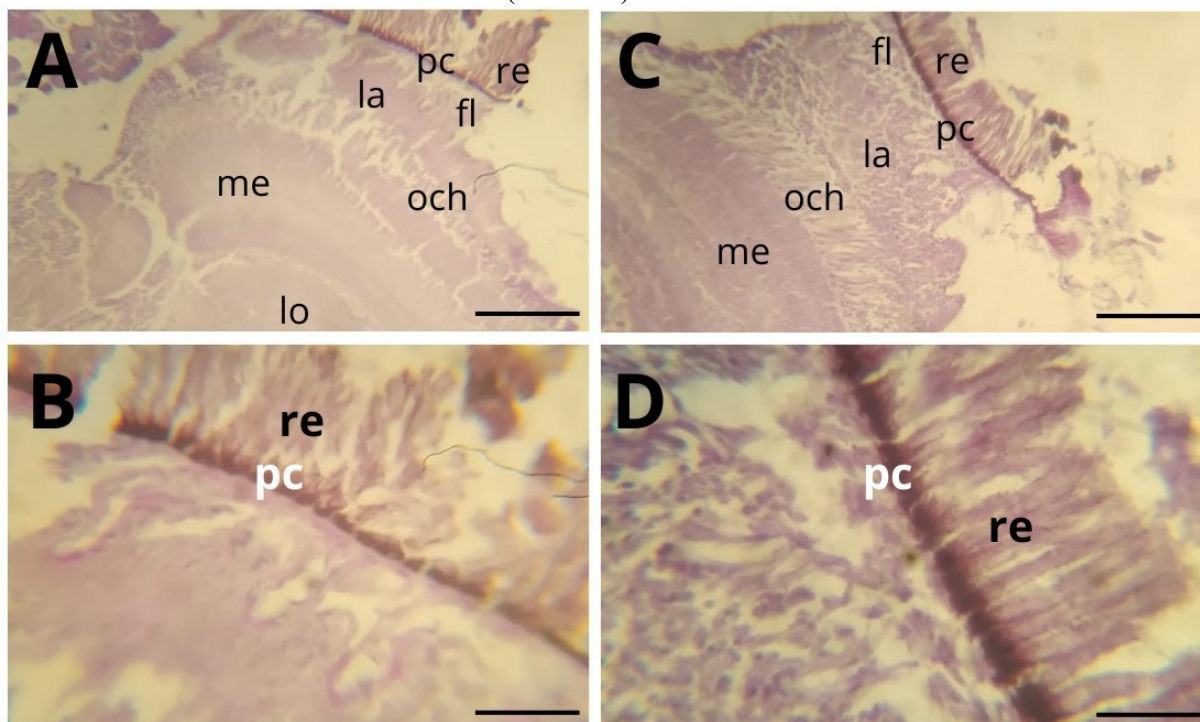
Células Kenyon (ck); cálice (cx); pedúnculo (pd). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).
Fonte: Autoria própria.

Na figura 7 observa-se os corpos de cogumelo das abelhas campeira e nutridora *A. mellifera*. Em ambos os cortes (Figura 7A e 7C) é possível visualizar o cálice e suas subregiões, como o colar, a região basal e o lábio. Na figura 7, o corpo de cogumelo da abelha campeira (Figura 7B) parece ser menor e com menos células Kenyon em comparação com a figura 7D correspondente à operária nutridora. Esse dado também só poderia ser confirmado a partir da morfometria desta região, considerando cortes seriados, o que não foi possível realizar.

A partir da impregnação metálica, apesar de ser específica para prolongamento de neurônios, todos os cortes apresentaram coloração amarelo dourado e, algumas vezes, marrom, incluindo o corpo neuronal, mesmo não sendo possível a visualização de neurônios do lobo óptico em nenhum dos cortes. Nas figuras 8C e 8D de cérebro de nutridora observa-se a coloração mais escura quando comparada com a de campeira (Figuras 8A e 8B), onde é possível ter uma melhor visualização das subregiões do lobo

óptico, principalmente pela preservação do corte. A diferença de coloração no lobo pode ter sido pela distribuição da solução no banho e das lâminas durante a impregnação ou pela distribuição não uniforme da temperatura no banho, mesmo as lâminas tendo sido processadas juntas e em uma mesma condição.

Figura 10 - Fotomicrografias do lobo óptico do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* tratado com NMDA e corado com Hematoxilina e Eosina. A e B (campeira), C e D (nutridora)



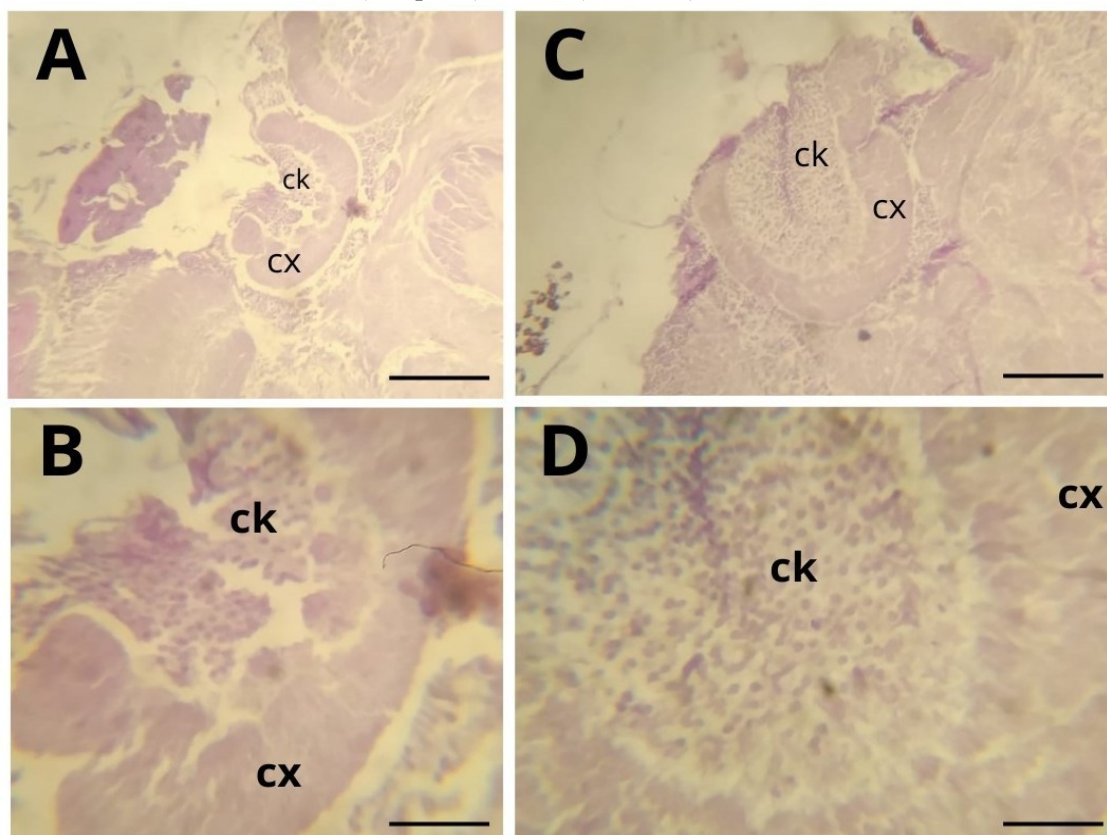
Lâmina (la), quiasma externo (och), camada fenestrada (fl), medula (me), retina (re), camada pigmentada (pc) e lóbula (lo). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).

Fonte: Autoria própria.

Nos corpos de cogumelo, a impregnação metálica também revelou uma coloração mais escura nos cortes de operária nutridora quando comparada com a de campeira, porém com visualização de neurônios nas figuras 9B e 9D.

Os cortes de cérebros tratados com NMDA, apesar de não estarem totalmente preservados, revelam as subdivisões melhor delimitadas. Nas figuras 10A e 10B, observa-se a coloração dos neurônios e suas terminações no cérebro da abelha campeira, mas é no cérebro da operária nutridora que a retina e a camada pigmentada estão mais preservadas. O estado geral do lobo óptico nos cortes da figura 10 pode ser resultado do processamento do tecido, mas também do tratamento com o NMDA. Devido a existências das duas possibilidades, não podemos concluir que as alterações morfológicas são em decorrência da droga injetada.

Figura 11 - Fotomicrografias do corpo de cogumelo do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* tratado com NMDA e corado com Hematoxilina e Eosina. A e B (campeira), C e D (nutridora)



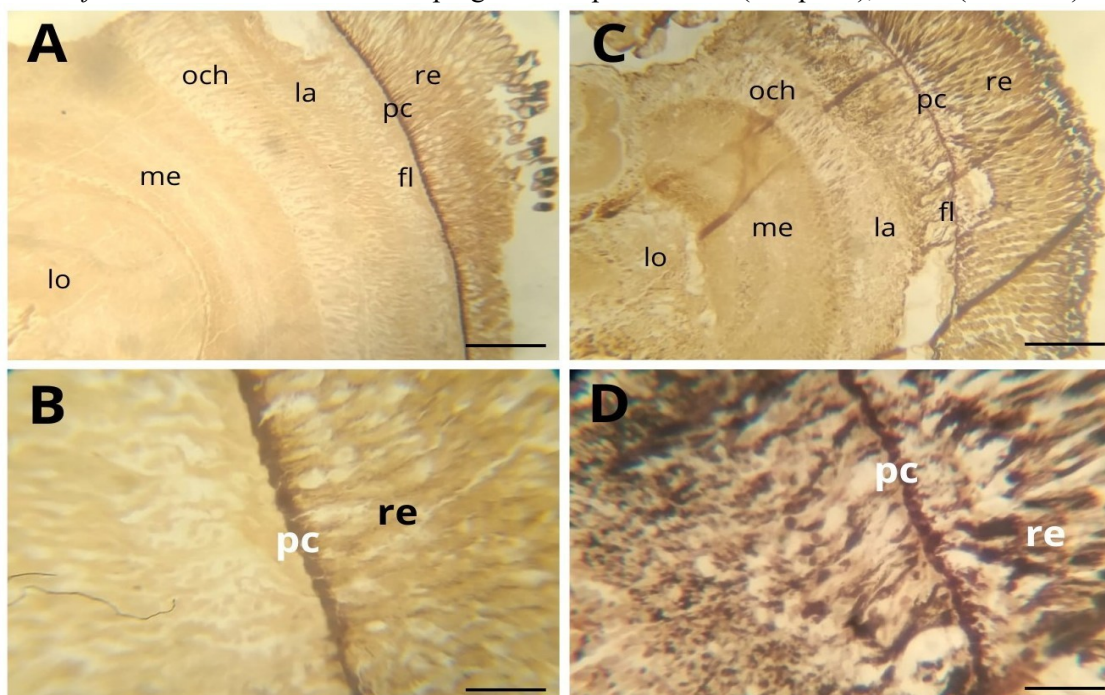
Células Kenyon (ck); cálice (cx). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).
Fonte: Autoria própria.

Na figura 11 os corpos de cogumelo estão preservados, com a delimitação do cálice e suas subregiões, além das células Kenyon. Visualmente os neurônios nesta região estão em maior número no cérebro da abelha nutridora (Figuras 11C e 11D). Comparando os cortes dos cérebros tratados (Figura 11) e não tratados com NMDA (Figura 7), aparentemente houve neurogênese no cérebro das operárias nutridora. Porém, esses dados só podem ser confirmados por meio da análise morfométrica.

A impregnação metálica dos cortes de cérebros tratados com NMDA revelou hiperpigmentação pela prata, sem diferença entre as abelhas (Figura 12), exceto na subregião da camada pigmentada e na retina da abelha nutridora por estarem mais escuras, dificultando a visualização das estruturas (Figuras 12C e 12D).

Na figura 13 é possível visualizar os corpos de cogumelo e células Kenyon com boa impregnação metálica, e isso deve ser destacado porque essa técnica é destinada a diferenciação de fibras nervosa e corpo neuronal, sendo apenas o primeiro impregnado. Esse resultado não foi alcançado para os cortes de cérebros de abelhas.

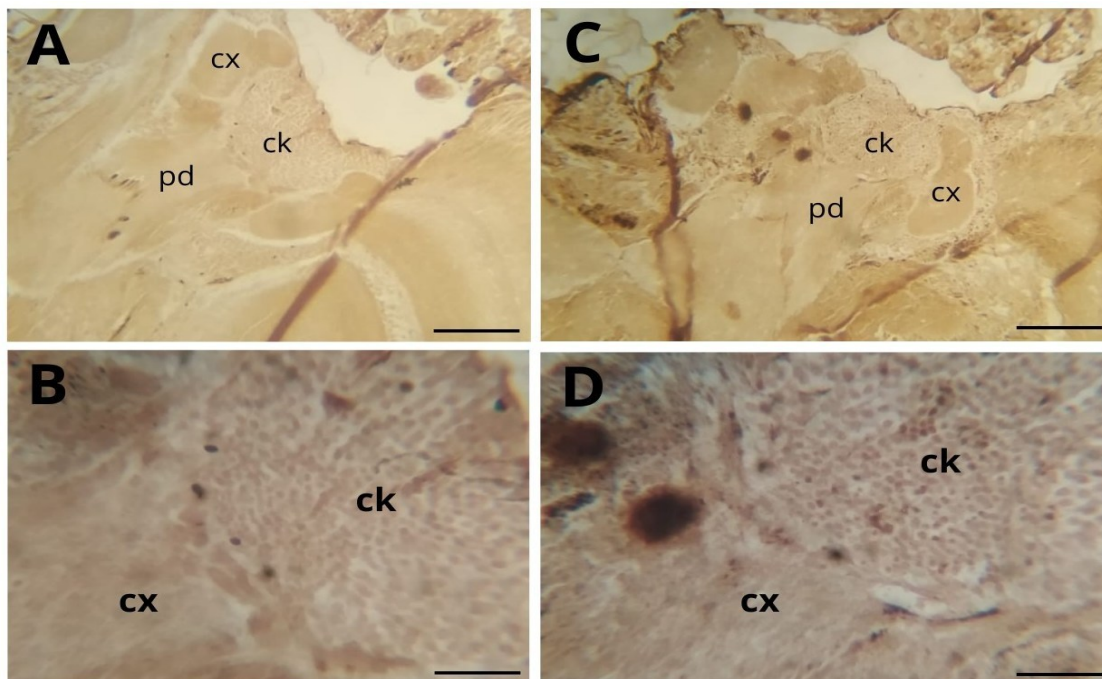
Figura 12 - Fotomicrografias do lobo óptico do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* tratado com NMDA e impregnado em prata. A e B (campeira), C e D (nutridora)



Lâmina (la), quiasma externo (och), camada fenestrada (fl), medula (me), retina (re), camada pigmentada (pc) e lóbula (lo). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).

Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Fotomicrografias do corpo de cogumelo do cérebro de abelhas campeira e nutridora *Apis mellifera* tratado com NMDA e impregnado em prata. A e B (campeira), C e D (nutridora)



Células Kenyon (ck); cálice (cx); pedúnculo (pd). Bar = 600 μ m (A e C) e 400 μ m (B e D).

Fonte: Autoria própria.

5 DISCUSSÃO

De acordo com Barbosa *et al.* (2013), o uso da coloração de Broadhurstpalley revela vantagens em comparação à coloração Hematoxilina e Eosina, quanto a facilidade no processamento dos cortes, já que se restringe a uma única passagem no corante, seguido de lavagem em água e análise, diminuindo o tempo. Por outro lado, a técnica de coloração com a Hematoxilina e Eosina exige repetidas passagens nos corantes, além da bateria de álcool, xilol e montagem com a lamínula, aumentando a probabilidade de erros. Além disso, nesta técnica há a necessidade de duplicatas, levando ao aumento do tempo e materiais gastos (Benites; Melville; Costa, 2001).

Nos estudos realizados com cortes histológicos de cérebros de abelha é notável a obtenção de cérebros intactos (Soares, 2009). Essa condição é garantida pela boa dissecação do cérebro e a forma delicada de manuseio durante todo o processo de coloração, evitando assim danos no tecido e cortes, melhorando a visualização das estruturas morfológicas.

Vale destacar que o processamento de métodos histológicos em cérebros de abelha inclui a dissecação, o fatiamento e a desidratação, podendo resultar em alterações estruturais e danos no tecido cerebral, devido à extensa manipulação (Metscher, 2009, Silva *et al.*, 2015). A fixação pode melhorar consideravelmente a resistência mecânica do tecido, fazendo com que os danos durante o procedimento histológico sejam mínimos (Thavarajah *et al.*, 2012).

A técnica de impregnação metálica é altamente utilizada em estudos com cérebro de abelha, sendo conhecida por ser um método simples e confiável com menor complexidade quando comparado com os tradicionais para a mesma finalidade (Wigglesworth, 1957).

No estudo de Calábria (2004), a coloração com Hematoxilina e Eosina e a impregnação metálica se mostraram importantes ferramentas na análise histológica do cérebro de abelha operária campeira, servindo como base para investigação em imunohistoquímica; enquanto Santos (2007) utilizou com êxito as mesmas técnicas para comparação morfológica do cérebro de zangão, rainha e operárias de *A. mellifera*.

Oliveira-Silva (2008) investigou a ação da injeção intracerebral de NMDA em abelhas operárias *A. mellifera* e revelou um perfil de proteínas alterado em resposta a esse tratamento, com polipeptídeos diferencialmente expressos, mas também uma morfologia do cérebro alterada, apresentando principalmente degradação celular. Desta maneira, é

possível que as diferenças encontradas entre as operárias nutridora e campeira podem não ser somente pela preservação deficitária dos cortes ou dificuldades na padronização das técnicas, mas também em relação ao tratamento realizado.

Considerando que a injeção de NMDA levou a diferenças nos níveis de expressão de miosina-Va, uma proteína motora encontrada na membrana de vesículas sinápticas, no cérebro de abelhas operárias, estando mais altos (+67%) em nutridoras 2 a 3 horas após a sua administração em comparação com o controle, é possível que alterações morfológicas observadas, comparando campeira e nutridora, sejam em decorrência da ação da droga agonista de canais iônicos (Calábria *et al.*, 2011).

Considerando as regiões do cérebro das abelhas operárias, destacam-se os estudos que mostram mudança no volume dos corpos de cogumelo no cérebro das abelhas *A. mellifera* ao longo da vida do indivíduo (Durst; Eichmuller; Menzel, 1994; Farris; Robinson; Fahrbach, 2001; Krofczik *et al.*, 2008).

De acordo com estudo de Stuart e colaboradores (2024), diferentes tipos de células são encontrados no cérebro de insetos eussociais e compartilhados na abelha subsocial. A proporção de neurônios ligados a neurotransmissores específicos é semelhante ou igual entre os insetos. Além disso, similaridades foram encontradas entre os neurônios e células gliais do cérebro de *Ceratina calcarata*, uma pequena abelha carpinteira subsocial, com tipos celulares do cérebro de outros insetos (Pyenson *et al.*, 2024).

Sobre a divisão de tarefas na colônia, Stuart e colaboradores (2024) revelaram os efeitos causais de miRNA específicos na expressão gênica do cérebro, afetando vias moleculares conhecidas. Embora a divisão do trabalho envolva mudanças coordenadas na fisiologia e no comportamento das abelhas, elas não são reguladas da mesma forma. Ainda nesse estudo, as alterações na expressão gênica do cérebro incluíram genes que codificam fatores de transcrição previamente implicados na maturação comportamental, podendo determinar a função da abelha na colmeia.

Por fim, os cérebros das abelhas operárias campeira e nutridora, especialmente na região dos corpos de cogumelo, apresentam diferenças em vários sistemas de neurotransmissores, componentes envolvidos na transmissão sináptica e em vias de sinalização que são importantes para o aprendizado e a memória (Chakroborty *et al.*, 2024).

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo comparativo foi possível observar as diversas regiões existentes no cérebro de abelhas operárias *A. mellifera*, a partir da utilização de diferentes métodos de coloração (H.E e impregnação metálica). As análises observacionais morfológicas que foram feitas permitiram identificar diferenças existentes entre as operárias nutridora e campeira, as quais podem refletir em mudanças anatômicas e fisiológicas, determinando a função dessas operárias na colmeia.

O tratamento com NMDA resultou em células neuronais mais aparentes, diferente do que foi observado nos cérebros não tratados, podendo indicar a interferência da droga no aspecto fisiológico cerebral das abelhas analisadas.

Além disso, conclui-se que novos estudos devem ser realizados a partir de cortes seriados para análises morfométricas que comprovem as observações registradas, tendo as técnicas H.E. e impregnação metálica padronizada para o cérebro da abelha *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS

- AMDAM, G. V.; OMHOLT, S. W. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 223, n. 4, p. 451–464, 2003. DOI: 10.1016/s0022-5193(03)00121-8.
- AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v. 20, n. 1, p. 10-20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1984-5154.v20p10-20>.
- BABB, T. L.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; CRANDALL, P. H.; LEVESQUE, M. F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 351–363, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90380-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90380-7).
- BANERJEE, S. K.; BHARADWAJ, R. K. The nervous system and muscle innervations of *Apis cerana indica* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Natural History**, v. 8, n. 1, p. 19-28, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222937400770031>.
- BARBOSA, D. A.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; GOMES, V.; AZEDO, M. R.; SOUZA, F. N.; BENITES, N. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o Broadhurst-palley e a hematoxilina-eosina. **Ciência Animal**, v. 22, n. 3, p. 17-23, 2012.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnica para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1986, 132p.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. C. F. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina, **Napgama**, v. 4, n. 3, p. 6-9, 2001.
- BESHES, S. N.; FEWELL, J. H. Models of division of labor in social insects. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 413-440, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.413>.
- BONOAN, R. E.; STARKS, P. T. Western honey bee (*Apis mellifera*). In: STARR, C. K. (Ed.) *Encyclopedia of social insects*. Cham: Springer, Cham. p. 1021-1027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-28102-1>.
- BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H.; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 1, p. 1–19, 2005. DOI: 10.1002/cne.20644.
- BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 177-183, 2003.

CALÁBRIA, L. K. **Análises bioquímica e morfológica do cérebro da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) com enfoque na miosina-V**, 2004. 102f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

CALÁBRIA, L. K.; PEIXOTO, P. M. V.; LIMA, A. B. P.; PEIXOTO, L. G.; MORAES, V. R. A.; TEIXEIRA, R. R.; SANTOS, C. T.; SILVA, L. O.; SILVA, M. F. R.; SANTOS, A. A. D.; GARCIA-CAIRASCO, N.; MARTINS, A. R.; ESPREAFICO, E. M.; ESPINDOLA, F. S. Myosins and DYNLL1/LC8 in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 9, p. 1300-1311, 2011. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.06.005.

CALÁBRIA, L. K.; TEIXEIRA, R. R.; MORAES, V. R. A.; SANTOS, A. A. D.; ESPINDOLA, F. S. A metallic impregnation technique adapted to study the honeybee *Apis mellifera* L. brain. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 720-724, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500008>.

CALDERONE, N. W. Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v. 29, n. 1-2, p. 127-158, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19980108>.

CHAKROBORTY, N. K.; LEBOULLE, G.; EINSPANIER, R.; MENZEL, R.; Behavioral and genetic correlates of heterogeneity in learning performance in individual honeybees, *Apis mellifera*. **Plos One**, v. 19, n. 10, p. 1-30, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304563>.

COOK, H. C. Origins of... Tinctorial methods in histology, **Journal of Clinical Pathology**, v. 50, p. 716-720, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.50.9.716>.
CRAILSHEIM, K. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 1, p. 55-60, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00258746>.

_____. The flow of jelly within a honeybee colony. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 162, n. 1, p. 681-689, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00301617>.

CRUZ LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Rio Claro: Editora Unesp, 2009. 408p. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788539304301>.

DURST, C.; EICHMULLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behavioral and Neural Biology**, v. 62, n. 3, p. 259-263, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(05\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(05)80025-1).

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 209-232, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150954>.

FARRIS, S. M; ROBINSON, G. E; FAHRBACH, S. E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee.

The Journal of Neuroscience, v. 21, n. 16, 6395-404, 2001. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-06395.2001.

FUCHS, E.; DUSTMANN, J. H.; STADLER, H.; SCHÜRMANN, F. W. Neuroactive compounds in the brain of the honeybee during imaginal life. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 92, n. 2, p. 337-342, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90065-0).

GALIZIA, C. G.; RÖSSLER, W. Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 399-420, 2010. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085442.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC311238/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

HERNÁNDEZ, L. G. **Análise proteômica aplicada à ontogenia, comportamento e aprendizagem em abelhas**. 2009. 81f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009. Disponível em: http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/4574/1/2009_LiudyGarciaHernandez.pdf. Acesso em: 21 set. 2023.

HOMBERG, U. Processing of antennal information in extrinsic mushroom body neurons of the bee brain. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 154, n. 6, p. 825-836, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00610683>.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 11726-11729, 1992.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, n. 3, p. 305-316, 2010. DOI: 10.1007/s00265-009-0874-7.

_____. Global information sampling in the honey bee. **The Science of Nature**, v. 95, n. 6, p. 523-530, 2008b. DOI: 10.1007/s00114-008-0354-3.

_____. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. **Proceedings Biological Sciences**, v. 270, n. 1511, p. 147- 152, 2003. DOI: 10.1098/rspb.2002.2207.

_____. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 5, p. 777-784, 2008a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0503-2>.

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body

neuron subtype in the brains of forager honeybees. **PloS One**, v. 2, n. 4, p. 1-9, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000371.

KLOPPENBURG, P. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 363, n. 2, p. 333-343, 1995. DOI: 10.1002/cne.903630213.

KOMISCHKE, B.; SANDOZ, J. C.; MALUN, D.; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **The European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 477-485, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03879.x>.

KROFCZIK, S; KHOJASTEH, U; IBARRA, N. H; MENZEL, R. Adaptation of microglomerular complexes in the honeybee mushroom body lip to manipulations of behavioral maturation and sensory experience. **Developmental Neurobiology**, v. 68, n. 8, p. 1007-1017, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/dneu.20640>.

KUCHARSKI, R.; BALL, E. E.; HAYWARD, D. C.; MALESZKA, R. Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. **Gene**, v. 242, n. 1-2, p. 399-405, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00503-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00503-X).

LANGLEY, E. Worker bee's lifecycle. **St Ives community orchard e penbeagle nature reserve**, 2023. Disponível em: <https://www.stivesorchard.co.uk/bee-lifecycle/>. Acesso em: 19 out. 2023.

LICHTENSTEIN, L.; GRÜBEL, K.; SPAETHE, J. Opsin expression patterns coincide with photoreceptor development during pupal development in the honey bee, *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1186/s12861-018-0162-8.

MALESZKA R. Molecules to behaviour in the honeybee - the emergence of comparative neurogenomics. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 513-514, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01671-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01671-4).

MALESZKA, R.; HELLIWELL, P.; KUCHARSKI, R. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. **Behavioural Brain Research**, v. 115, n. 1, p. 49-53, 2000. DOI: 10.1016/s0166-4328(00)00235-7.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; BABB, T. L.; FINCH, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: Cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-995, 1993. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1993.tb02123.x.

MENZEL, R. GIURFA, M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 5, n. 2, p. 62-71, 2001. DOI: 10.1016/s1364-6613(00)01601-6.

MENZEL, R.; DURST, C.; ERBER, J.; EICHBAUM, S. The mushroom bodies in the

honeybee: from molecules to behaviour. **Fortschritte der Zoologie**, v. 39, p. 81-81, 1994.

METSCHER, B. D. MicroCT para biologia do desenvolvimento: Uma ferramenta versátil para imagens 3D de alto contraste em resoluções histológicas. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 3, p. 632-640, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/dvdy.21857>.

MOTA, T.; YAMAGATA, N.; GIURFA, M.; GRONENBERG, W.; SANDOZ, J-C. Neural organization and visual processing in the anterior optic tubercle of the honeybee brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 32, p. 11443–11456, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0995-11.2011.

MÜBIG, L.; RICHLITZKI, A.; RÖBLER, R.; EISENHARDT, D.; MENZEL, R.; LEBoulLE, G. Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 23, p. 7817- 7825, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5543-09.2010.

NAKAGAWA, H.; NAKANE, S.; BAN, G.; TOMITA, J.; KUME, K. Effects of D-amino acids on sleep in *Drosophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 589, p. 180–185, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.107>.

OLESKEVICH, S.; CLEMENTS, J. D.; SRINIVASAN, M. V. Long-term synaptic plasticity in the honeybee. **Journal of Neurophysiology**, v. 78, n. 1, p. 528-532, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.1.528>.

OLIVEIRA, I. C. Complexo de Golgi. **Atlas Interativo de Biologia Celular**. Disponível em: <https://atin.icb.usp.br/inicio/topicos/golgi/>. Acesso em: 02 abr. 2025.

OLIVEIRA-SILVA, L. **Análises bioquímica e morfológica do cérebro das abelhas *Apis mellifera* frente a neuromoduladores e antagonistas de calmodulina**. 2008, 70 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

PAGY, M. D. **Organização neural do complexo central no cérebro da abelha: um estudo comparativo**. 2013. 51f. Monografia (Especialização em Neurociências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9HCMCE/1/monografia_matheus_diniz_pagy.pdf. Acesso em: 21 set. 2023.

PAULK, A. C.; GRONENBERG, W. Higher order visual input to the mushroom bodies in the bee, *Bombus impatiens*. **Arthropod Structure & Development**, v. 37, n. 6, p. 443-458, 2008. DOI: 10.1016/j.asd.2008.03.002.

PYENSON, B. C.; HUISKEN, J. L.; GRUPTA, N.; REHAN, S. M.; The brain atlas of a subsocial bee reflects that of eusocial Hymenoptera. **Genes, Brain and Behavior**, v. 23, n. 6, p. 1-14, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/gbb.70007>.

REHDER, V. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. **Journal of Comparative Neurology**, v.

279, n. 3, p. 499-513, 1989. DOI: 10.1002/cne.902790313.

RIBBANDS, C. R. **The behaviour and social life of honeybees**. [s.l.] Bee Research Association, 1953.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 382-389, 2010. DOI: 10.1016/j.micron.2010.01.003

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 637-665, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>.

RYBAK, J. **The digital honey bee brain atlas**. In: GALIZIA, C.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.) Honeybee neurobiology and behavior. Dordrecht: Springer, p. 125-140. 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2099-2_11.

SANTOS, C. T. **Estudo de miosina-V e CaMKII no cérebro da abelha *Apis mellifera*: Comparação entre zangão, rainha e operárias**. 2007, 45f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

SAWCHYN, L. Queen honey bee pheromone communication and effects on the hive. **Ami 2020 webinar series**, 2020. Disponível em: <https://meetingarchive.ami.org/2020/project/queen-honey-bee-pheromone-communication-and-effects-on-the-hive/>. Acesso em: 19 out. 2023.

SCHRÖTER, U.; MENZEL, R. A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 465, p. 168-178, 2003. DOI: 10.1002/cne.10843.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, n. 4, p. 287-293, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00299306>.

_____. Queen substance dispersal by messenger workers in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 5, n. 4, p. 391-415, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00292527>.

_____. The social behavior of honeybees. **Scientific American**, v. 195, n. 6, p. 96- 102, 1956.

_____. **The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies**. Cambridge: Harvard University Press, 1995.

SI, A.; HELLIWELL, P.; MALESZKA, R. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 191-197, 2004. DOI: 10.1016/j.pbb.2003.09.023.

SILVA, J. M. S.; ZANETTE, I; NOEL, P. B; CARDOSO, M. B; KIMM, M. A; PFEIFFER,

F. Three-dimensional non-destructive soft-tissue visualization with X-ray staining micro- tomography. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep14088>.

SINAKEVITCH, I.; FARRIS, S. M.; STRAUSFELD, N. J. Taurine-, aspartate- and glutamate-like immunoreactivity identifies chemically distinct subdivisions of Kenyon cells in the cockroach mushroom body. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 439, n. 3, p. 352-367, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.1355>.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks**, 2ed., Porto Alegre: Artmed, 2007, 992p.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the honey bee**. Ithaca: Cornell University Press, 1956.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do imidaclopride sobre o sistema nervoso de *Apis mellifera* africanizada através da expressão de proteína FOS**. 2009. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

STRAUSFELD, N. J. Organization of the honey bee mushroom body: Representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 450, n. 1, p. 4-33, 2002. DOI: [10.1002/cne.10285](https://doi.org/10.1002/cne.10285).

STUART, H. S; AHMED, A. C. C; KILIKEVICIUS, L; ROBINSON, G. E. Effects of microRNA-305 knockdown on brain gene expression associated with division of labor in honey bee colonies (*Apis mellifera*). **Journal of Experimental Biology**, v. 227, n. 8, p. 1-16, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.246785>.

THAVARAJAH, R.; MUDIMBAIMANNAR, V. K; ELIZABETH, J; RAO, U. K; RANGANATHAN, K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, n. 3, p. 400-405, 2012. DOI: [10.4103/0973-029X.102496](https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496).

TOMITA, J.; UENO, T.; MITSUYOSHI, M.; KUME, S.; KUME, K. The NMDA receptor promotes sleep in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0128101](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128101).

TRUMBO, S. T.; HUANG, Z.-Y.; ROBINSON, G. E. Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 41, n. 3, p. 151-163, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002650050374>.

VELTHUIS, H. H. W. Observations on the transmission of queen substances in the honey bee colony by the attendants of the queen. **Behaviour**, v. 41, n. 1-2, p. 105-128, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1163/156853972X00239>.

WIGGLESWORTH, V. B. The use of osmium in the fixation and staining of tissues. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 147, n. 927, p. 185-199, 1957. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0043>.

WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee.** Harvard University Press, Cambridge, 1987.