



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DE HEMOCITOS DE ABEJAS: SU EVALUACIÓN FRENTE A CAMBIOS TÉRMICOS

Andrea Porpatto

Laboratorio de Ecología de Enfermedades del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral
(LEcEN-ICiVet-Litoral-UNL-CONICET)

Directora: Dra. Celina Junges

Codirector: Lic. Exequiel Furlan

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Abejas, Hipertermia, Hemocitos

INTRODUCCIÓN

La cría de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) es estenotérmica, es decir, que tiene una alta sensibilidad a los cambios térmicos (Stabentheiner y col., 2010). Cuando la temperatura ronda los 36°C, las abejas obreras comienzan a mitigar el exceso de calor usando el comportamiento de ventilación, haciendo vibrar rápidamente sus alas. Una estrategia adicional para evitar el sobrecalentamiento es desalojar la colonia y agruparse fuera de la entrada de la colmena, mientras las abejas dentro de la colonia continúan con las tareas de ventilación. En vistas de evaluar escenarios climáticos futuros determinados por el actual fenómeno de cambio ambiental global (IPCC, 2021), resulta necesario estudiar cuál es el efecto en la cría de abejas melíferas de choques térmicos periódicos por encima de la temperatura de tolerancia mínima (hipertermia; según Tautz y col., 2003), ya que estos cambios podrían inhibir la propagación de hemocitos (células sanguíneas de *A. mellifera*) (Strand, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la variación de la respuesta celular en abejas melíferas (*Apis mellifera*) expuestas a hipertermia durante su desarrollo larval.

Objetivos específicos:

1. Describir la morfología y la morfometría de los principales componentes celulares (hemocitos) presentes en la hemolinfa (sangre de los insectos) de larvas de abejas melíferas.
2. Evaluar el impacto de la hipertermia sobre la modulación de células del sistema inmune de las abejas en su etapa larval.

Título del proyecto: Modulación de la condición fisiológica y de la función inmune en abejas melíferas expuestas a desafíos ambientales

Instrumento: PICT

Año convocatorio: 2019

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Dra. Junges, Celina



METODOLOGÍA

Se realizó un estudio experimental donde se expusieron larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro* a un incremento repentino de la temperatura de cría, el mismo se detalla a continuación y se esquematiza en la Figura 1:

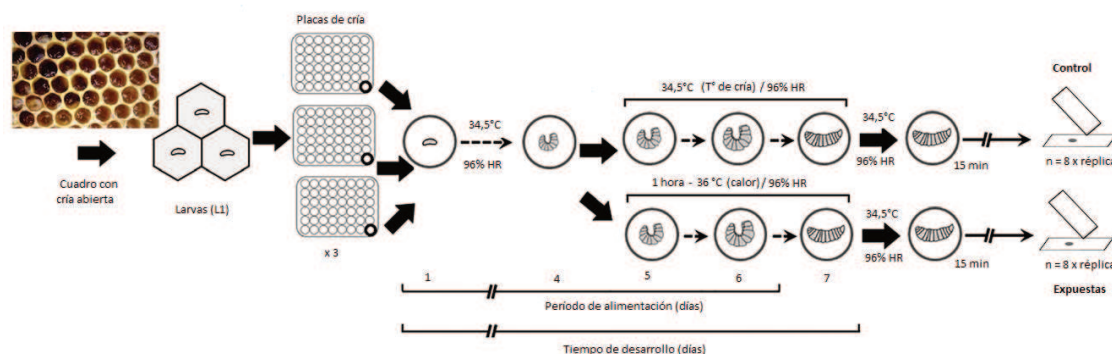


Figura 1: Diseño experimental.

- **Obtención de las larvas.** Se generaron cohortes homogéneas de cría confinando la reina en un marco excluidor durante un día para la postura de huevos en un cuadro identificado. Al tercer día, el cuadro fue trasladado al laboratorio y las larvas en estadio L1 fueron transferidas a celdas de plástico ubicadas dentro de pocillos de placas de cultivo. Las placas con larvas se alojaron en incubadoras frío-calor (Ingelab, I-121 PH) a temperatura constante ($34,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (HR, $\sim 96\%$) desde el día 1 y hasta el día 7 (estadio LV) (Crailsheim y col., 2013). Durante el período de alimentación, las larvas recibieron la dieta básica de Aupinel y col. (2005). Estas condiciones de crianza son óptimas para el desarrollo y la supervivencia de las abejas *in vitro*, motivo por el cual, estos organismos fueron considerados como pertenecientes al grupo control.
- **Exposición aguda.** Con el fin de estudiar los efectos termorregulatorios sin comprometer la supervivencia de las unidades experimentales, grupos de larvas criadas *in vitro* (como se indicó anteriormente) fueron sometidas el día 7 (estadio V) a un aumento de $1,5^{\circ}\text{C}$ de la temperatura de cría durante 1 hora ($36 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), para luego regresar a la temperatura óptima de incubación ($34,5^{\circ}\text{C}$) durante 15 minutos. El experimento fue realizado por triplicado.
- **Parámetros indicadores de salud.** Transcurrida la exposición, se obtuvo hemolinfa de las abejas pinchando la cutícula blanda del abdomen con una pinza de punta fina esterilizada (Butolo y col., 2013) y con $3 \mu\text{l}$ se realizaron extendidos sanguíneos que fueron coloreados con May Grünwald-Giemsa, y evaluados bajo microscopio óptico (100X, Leica DM500). Con el fin de evaluar la inversión de la inmunidad celular se realizaron recuentos diferenciales de hemocitos de larvas provenientes de ambos grupos (control y expuestas), considerando las características morfológicas descritas por Richardson y col. (2018). Además, se realizó un análisis de la morfometría de las células inmunes a partir de fotografías tomadas de los extendidos con una cámara digital adaptada al microscopio (Leica ICC50W). Las mediciones se realizaron utilizando el programa ImageJ, y se extrajeron los siguientes parámetros morfológicos de las células: área total, área del núcleo y relación núcleo/célula.

Se aplicaron modelos lineales generalizados para indagar la influencia de la hipertermia sobre las variables morfométricas evaluadas en cada tipo celular. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar las proporciones de cada tipo celular entre tratamientos. Los cálculos se efectuaron utilizando el paquete estadístico R.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Morfología y morfometría de células inmunes: Se diferenciaron dos tipos celulares: plasmocitos y granulocitos. Estos últimos fueron los más predominantes y se reconocieron por ser células grandes y redondeadas, con presencia de gránulos de gran tamaño y tinción fuertemente basófila; núcleo pequeño, con una cromatina de aspecto laxo; citoplasma que se tiñe moderadamente basófilo (Figura 2-A). Los plasmocitos se identificaron por no presentar gránulos; con un núcleo central, de gran tamaño y con la cromatina condensada (Figura 2-B).

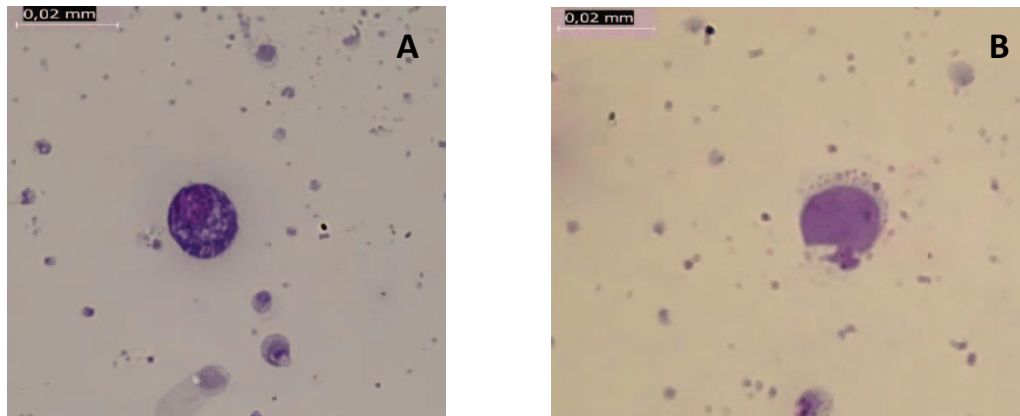


Figura 2: Células de respuesta inmune de *A. mellifera*. (A) Granulocito, (B) Plasmocito.

En promedio, sin discriminar por tratamiento, los granulocitos fueron ligeramente más pequeños que los plasmocitos, contrario a lo que encontró Richardson y col. (2018) en abejas adultas (Tabla 1).

Tabla 1: Medidas morfométricas de las células inmunes de la hemolinfa de *A. mellifera*.

Medida morfométrica	Granulocitos	Plasmocitos
Área de la célula (μm^2)	1457,41 \pm 771,2	1682,17 \pm 1105,5
Área del núcleo (μm^2)	393,83 \pm 168,83	420,03 \pm 193,64
Relación núcleo/célula (%)	0,28 \pm 0,06	0,30 \pm 0,15

En los modelos lineales realizados para las diversas variables morfométricas evaluadas, solo se observaron diferencias significativas para la variable área del núcleo en los granulocitos entre las larvas del control y las expuestas (Tabla 2); en este sentido, el incremento de la temperatura aumentó el área de núcleo de los granulocitos respecto del tratamiento control (Figura 3). Este efecto de la temperatura sobre el área del núcleo de los granulocitos es la primera vez que se reporta.

Tabla 2: Medidas morfométricas de las células inmunes de la hemolinfa de *A. mellifera* por tratamiento.

	Granulocitos			Plasmocitos		
	Control	Tratamiento	<i>P</i>	Control	Tratamiento	<i>P</i>
N° de células	140	139	-	27	14	-
Área total (μm^2)	1348 \pm 777	1566 \pm 751	0,12	1545 \pm 1217	1945 \pm 827	0,41
Área del núcleo (μm^2)	354 \pm 158	432 \pm 168	0,01*	414 \pm 206	430 \pm 174	0,94
Relación núcleo/célula (%)	0,27 \pm 0,07	0,28 \pm 0,05	0,18	0,35 \pm 0,17	0,22 \pm 0,05	0,47

(*) indica diferencias significativas

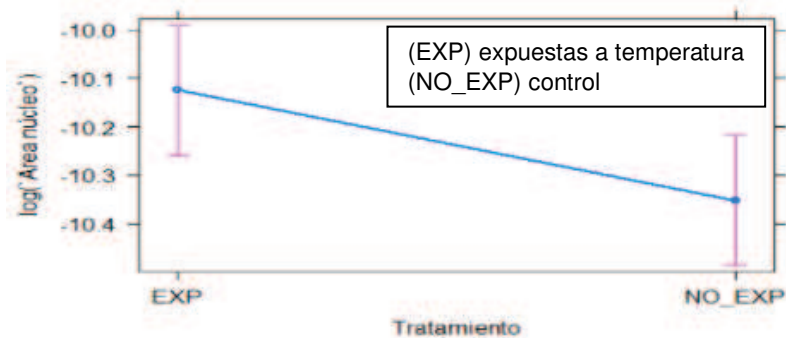


Figura 3: Efecto de la hipermetría en el área del núcleo de los granulocitos de *A. mellifera*.

Proporción de células inmunes: La proporción de granulocitos fue muy similar en abejas expuestas y no expuestas a condiciones de hipertermia (0.97 ± 0.04 y 0.98 ± 0.02 , respectivamente), al igual que la proporción de plasmocitos (0.02 ± 0.04 y 0.02 ± 0.02 , respectivamente). Por ende, no se observaron diferencias significativas entre los tipos celulares debido al efecto térmico ($p > 0.05$). Este resultado difiere del hallado por Şapcaliu y col. (2010), quienes encontraron un aumento significativo de los plasmocitos en la hemolinfa de las abejas adultas expuestas a 30°C durante 36 hs, baja humedad e insuficiente ventilación.

Como conclusión, se logró describir la morfología y la morfometría basal de los principales hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de abejas, y se analizó su variación frente a un agente estresor agudo. Resta aún complementar esta información con los recuentos celulares totales.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

- Butolo, N. P., Azevedo, P., Alencar, L. D. de, Domingues, C. E. C., Miotelo, L., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F.,** 2020. A high-quality method for hemolymph collection from honeybee larvae. *PLOS ONE*, 15(6), e0234637.
- Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.),** 2021. IPCC, 2021: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2391 pp.
- Stabentheiner, A., Kovac, H., Brodschneider, R.,** 2010. Honeybee colony thermoregulation--regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PloS one*, 5(1), e8967.
- Şapcaliu, A., Pavel, C. Ń., Savu, V., Uia, E. C. Ń., Matei, M., & Doi, I. R. Ń.,** 2010. Biochemical and cytological investigations on haemolymph of *Apis mellifera* Carpathica bee in stressful conditions. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca - Animal Science and Biotechnologies*, 67, 313–320.
- Tautz, J., S. Maier, C. Groh, W. Rössler, and A. Brockmann,** 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 7343–7347.