



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESPUESTA CELULAR INMUNE DE ABEJAS (*Apis mellifera* L.)

A LA INFESTACIÓN DEL ÁCARO *Varroa destructor* A.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

KARLA MARIANA REYES QUINTANA



Asesores:

PhD Ernesto Guzmán Novoa
MVZ Adriana Correa Benítez

México, D.F.

Marzo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres, Ma. Irma Quintana Hernández y Carlos A. Reyes Gutiérrez por su eterno amor, apoyo e impulso; sin ustedes este sueño no se hubiera vuelto realidad; los amo.

A mi hermana Irma G. Reyes Quintana, por ser uno de los pilares en mi vida y un ejemplo a seguir; por tu amor, por tus consejos, por tu apoyo incondicional; te amo burri.

A mi cuñado, Anderson De Almeida Barros por tu apoyo.

A mis abuelos José Benito Quintana y Ramírez y Liduvina Hernández Alarcón por su inmenso cariño.

A toda mi familia, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y eterno agradecimiento a mi asesor principal, PhD. Ernesto Guzmán Novoa, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por creer y confiar en mí.

A la MVZ. Adriana Correa Benítez, por su apoyo y confianza desde el principio.

Al M en C. Daniel Prieto Merlos, por compartir tus conocimientos, anécdotas, experiencias, por tu apoyo incondicional, por tu amistad.

A la Dra. Laura Espinosa, por introducirme al bello mundo de las abejas, por el cariño, apoyo y consejos.

A los MVZ Sylvia Reyes, Ángel López, Angélica Gris, por ser parte de mi formación académica y por su amistad.

Al CEA “Acuexcomatl” y a la Universidad de Guelph, por el apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A Paul Kelly por el apoyo y cariño; fue todo un honor conocerte y un placer haber trabajado contigo.

Al Laboratorio de Vacunología y Constatación, y al Laboratorio de Virología por las facilidades prestadas.

A Ninnet, por tu apoyo durante este proyecto y por tu hermosa amistad; te quiero.

A mis amigas: Ariani, Elizabeth, Lorena, Natalia, Nelly, Susana y Valeria, por formar parte importante de mi vida a lo largo de estos años, por la amistad, los consejos y el apoyo; las quiero.

A la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la formación y el carácter forjado.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Antecedentes de la problemática por <i>Varroa destructor</i>	2
1.2 Sistema inmunológico de los insectos	4
1.3 Origen de los hemocitos	7
1.4 Órganos hematopoiéticos en los insectos	9
1.5 Resistencia relativa de abejas africanizadas a la infestación de <i>Varroa destructor</i>	11
1.6 JUSTIFICACIÓN	12
1.7 OBJETIVOS	12
1.8 HIPÓTESIS	13
2.0 MATERIAL Y MÉTODOS	14
2.1 Área de estudio	14
2.2 Establecimientos de grupos experimentales	14
2.3 Preparación de las colonias experimentales	15
2.4 Jaulas	16
2.5 Colección de ácaros	16
2.6 Obtención de abejas africanizadas y europeas recién emergidas	17
2.7 Macerado de Varroas	18
2.8 Preparación de grupos experimentales	18
2.9 Extracción de hemolinfa	20
2.10 Tinción de muestras de hemolinfa	21
2.11 Conteo de hemocitos	21
2.12 Cuantificación de número de hemocitos por μL de hemolinfa	22
2.13 Análisis de datos	23

3.0 RESULTADOS	24
3.1 Efecto Tratamiento	24
3.2 Genotipo x Tratamiento	24
3.3 Genotipo x Tiempo de encierro	25
3.4 Tratamiento x Tiempo en abejas africanizadas	25
3.5 Tratamiento x Tiempo en abejas europeas	26
4.0 DISCUSIÓN	28
5.0 REFERENCIAS	33
FIGURAS	38
CUADROS	55

RESUMEN

REYES QUINTANA KARLA MARIANA. Respuesta celular inmune de abejas (*Apis mellifera* L.) a la infestación del ácaro *Varroa destructor* A. (bajo la dirección del PhD Ernesto Guzmán Novoa y la MVZ Adriana Correa Benítez).

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la respuesta celular inmune de abejas africanizadas y europeas sometidas a distintos tratamientos; abejas: sanas (grupo testigo), inyectadas con macerado de *Varroa destructor*, inyectadas con solución Buffer, puncionadas con alfiler entomológico e infestadas artificialmente con el ácaro. Las muestras de hemolinfa de cada grupo experimental se colectaron a las 0, 2, 12, 24 y 48 h post tratamiento. Dichas muestras fueron teñidas con el *kit* "PROTOCOL Hema 3®" y los conteos de hemocitos se realizaron con microscopio de luz óptica. Los datos fueron transformados a logaritmos y analizados por ANDEVA. Los resultados mostraron que la inyección de macerado de varroas y la exposición artificial al ácaro provocaron una disminución significativa ($P < 0.0001$) en la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa alcanzando un nivel mínimo a las 12 h post tratamiento en ambos tipos de abejas. Las abejas africanizadas tuvieron un menor conteo hemocitario que las europeas. El encierro de las abejas africanizadas provocó una mayor disminución en la cantidad de hemocitos en las primeras 12 h. La punción de las abejas provocó un aumento significativo ($P < 0.0001$) en el número de hemocitos en la hemolinfa alcanzando un pico máximo a las 2 h tanto en abejas africanizadas como en europeas, para después volver a niveles normales en comparación con grupos testigo. No se encontraron diferencias entre las abejas que se inyectaron con buffer y las abejas testigo. Estos resultados sugieren que *Varroa destructor* inocula componentes que inhiben la respuesta celular inmune de las abejas melíferas.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes de la problemática por *Varroa destructor*

Uno de los problemas más devastadores que enfrenta la apicultura es la infestación por el ácaro *Varroa destructor* A. (Acari: Mesostigmata/Varroidae), el cual ha logrado distribuirse en la mayor parte del mundo por lo que es considerada una de las peores plagas que afectan a las abejas (*Apis mellifera* L.).

Esta ectoparasitosis es la enfermedad de mayor importancia económica pues al alcanzar niveles de infestación mayores al 5% por colmena¹, puede provocar problemas a nivel individual y a nivel de colonia causando la mortalidad de gran cantidad de abejas.²⁻³

Conocer el comportamiento reproductivo del ácaro es importante para comprender la dinámica de población del parásito y para la práctica de la apicultura ya que algunas fases de su ciclo biológico pueden ser clave para el desarrollo de métodos de testigo biológico. Comprender los factores que desencadenan la reproducción del ácaro pueden ser de ayuda para la crianza selectiva de abejas resistentes. Existen diversos bioensayos que demuestran que algunas fracciones de la cutícula larval, como los ésteres de metil y etil, son los que provocan la atracción del ácaro hacia la cría; otros compuestos como los alcoholes alifáticos y aldehídos de cadena larga que se encuentran en el capullo también parecen ser responsables de la infestación.⁴⁻⁷ Los ácaros hembra, se introducen en las celdas de larvas, previa operculación; esto ocurre unas 15 a 20 horas antes en las celdas de obreras y de 40 a 50 horas antes en las de los zánganos.

Dentro de la celda, los ácaros se desplazan sobre la pared para llegar al fondo de ésta y ubicarse dentro del alimento larval, comportamiento que le sirve para evitar su detección y remoción por parte de las abejas limpiadoras. Una vez consumido el alimento larval por parte de la cría de abejas, alrededor de 5 horas después de la operculación, el ácaro en su fase de ninfa comienza a alimentarse de la hemolinfa de la larva a través de un orificio en la cutícula a la altura del 5to segmento.⁸ Alrededor de 70 horas después de la operculación, el ácaro hembra ovoposita su primer huevo que dará lugar a un ácaro macho⁹⁻¹⁰, mientras que huevos subsecuentes darán origen a ácaros hembra que serán ovopositados a intervalos de 30 horas hasta que la abeja emerja como insecto adulto.³

Los estadios más afectados son las larvas y las pupas de abejas durante su desarrollo morfológico, ya que la pérdida de hemolinfa o sangre, fuente de alimentación para los ácaros, provoca una disminución en el peso de las abejas recién emergidas de aproximadamente 7% en obreras y de 11 a 19% en zánganos, así como una disminución en el volumen de hemolinfa y en el contenido de proteínas y carbohidratos.¹¹ En las abejas adultas recién emergidas provoca deformación de alas, debilidad, degeneración del tejido adiposo y poco desarrollo de las glándulas hipofaríngeas, lo que en conjunto conlleva a una disminución en su ciclo de vida y de su rendimiento.¹²⁻¹⁴

El ácaro tiene un gran impacto en las abejas ya que, adicionalmente a los daños físicos, las abejas se ven inmunosuprimidas en cuanto a la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos¹⁵, lo cual provoca que sean aún más susceptibles a otros padecimientos bacterianos (lo que americana por

Paenibacillus larvae y loque europea por *Melissococcus pluton*), virales (virus de las alas deformes) y fungales (cría de cal por *Ascospaera apis* y cría de piedra por *Aspergillus* spp).¹⁶

1.2 Sistema inmunológico de los insectos

El sistema inmune es el encargado de identificar dentro del organismo sustancias y/o elementos que le resulten extraños para inhibirlos o destruirlos. Estos elementos extraños pueden ser pesticidas, bacterias, hongos, parásitos, virus entre otros.¹⁷ La reacción inmunológica del organismo animal constituye el conjunto de procesos que se desencadenan a partir del contacto del cuerpo, tejido o célula blanco con un agente extraño. El propósito es protegerlo ante la agresión de su integridad, pasando por fases que abarcan desde el reconocimiento e identificación del agente nocivo, hasta la neutralización o destrucción del elemento agresor.¹⁸

El sistema inmune está conformado, a “grosso modo”, por dos mecanismos: a) el sistema inmune adquirido, basado en respuestas de defensa mediadas por células que producen anticuerpos que les permiten reconocer con gran especificidad a un antígeno y generar memoria mediante exposiciones previas a éste, para así responder con mayor eficacia ante una segunda exposición; y b) el sistema inmune innato constituido por 1) componentes celulares representado por células fagocíticas principalmente y 2) componentes humorales que están mediados por la síntesis de moléculas secretadas o intracelulares denominados péptidos antimicrobianos (PAM's). Los animales vertebrados cuentan con ambos tipos de

sistema inmunológico mientras que los insectos solo poseen un sistema inmune de tipo innato, el cual se encuentra muy evolucionado ya que es de acción inmediata y posee mecanismos de reconocimiento de patógenos inespecíficos.¹⁹⁻

21

Los insectos cuentan con un sistema eficiente y complejo de defensa contra patógenos y parásitos que involucra barreras físicas como el integumento y el intestino; reacciones coordinadas por poblaciones de hemocitos una vez que las barreras físicas han sido sobrepasadas y la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos y proteínas, principalmente por el tejido graso.¹⁸ La respuesta celular, activada inmediatamente después de la detección de una infección o ingreso de proteína extraña²², está mediada por los hemocitos o células sanguíneas que reconocen, controlan y eliminan proteínas y patógenos ya sea por fagocitosis o por cubrimiento mediante agregados hemocíticos para la formación de nódulos y cápsulas, así como por reacciones citotóxicas.¹⁸ Los hemocitos se encuentran en la hemolinfa de los insectos o formando poblaciones sésiles que se encuentran debajo de la epidermis en forma de racimos. De acuerdo a la etapa de desarrollo estos pueden cumplir funciones de remoción de detritus celulares y remodelación de tejidos, como en el caso del embrión y las pupas, o tener actividad inmunológica en larvas y adultos.²³⁻²⁵ Sin embargo, ante un reto inmunológico, estas células son las responsables de la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación y melanización de agentes patógenos.²⁶⁻²⁸

A pesar de que se mencionan dos mecanismos de inmunidad, el celular y el humoral, existe un traslape o superposición entre respuestas humorales y

celulares, ya que muchos factores humorales afectan la función de hemocitos y estos a su vez son fuente importante de muchas moléculas humorales.²⁹

Se han identificado diferentes tipos de hemocitos en diversos órdenes de insectos siendo los más estudiados en: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, y Collembola. Estas células han sido identificadas y clasificadas por características morfológicas, histoquímicas y funcionales, así como por el uso de marcadores moleculares y antígenos.¹⁸ Los hemocitos más comunes y reconocidos en la mayoría de las especies de insectos son prohemocitos, plasmocitos, granulocitos, coagulocitos, esferulocitos y oenocitoides. Cabe destacar que los plasmocitos, granulocitos y coagulocitos son los que participan en mayor grado en la respuesta inmune del insecto al participar en la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación y melanización contra agentes patógenos.³⁰

Dependiendo del insecto que se esté estudiando existen uno o varios tipos de hemocitos comunes a otras especies, o en su defecto, a su similar. Por ejemplo, en Lepidoptera, los granulocitos son los hemocitos más abundantes y actúan como fagocitos. En contraste, los plasmocitos son el principal hemocito en la formación de cápsulas para la eliminación de organismos invasores. Por otro lado, los oenocitoides no tienen la capacidad de adherirse a un agente extraño sin embargo, contienen componentes de la cascada de la fenoloxidasas (para la melanización), mientras que los esferulocitos son fuente potencial de componentes cuticulares. Algunos estudios reportan la presencia de prohemocitos tanto en Lepidoptera como en algunos Diptera como *Drosophila*, los cuales son

considerados células progenitoras de hemocitos.^{18,31-32} En el mosquito *Aedes aegypti* (Diptera) los principales hemocitos en circulación son: granulocitos, oenocitoides, adipohemocitos, y trombocitoides. En *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*, los granulocitos ocupan la mayor parte de la población hemocítica en ambas especies mientras que los oenocitoides y prohemocitos comprenden solo el 10% del total de hemocitos.³³⁻³⁴ En el Diptera, *Drosophila melanogaster*, las principales células son los plasmocitos, células cristalinas, y lamelocitos, los cuales son muy similares morfológicamente y funcionalmente a los granulocitos, oenocitoides y plasmocitos de Lepidoptera.³⁵⁻³⁶ Las abejas por su lado cuentan con prohemocitos, plasmocitos, granulocitos, oenocitoides y esferulocitos. La literatura no reporta datos sobre la proporción de estos en *Apis mellifera* sin embargo, los prohemocitos, plasmocitos y granulocitos son los más abundantes, ya que son los principales en participar en la respuesta celular inmune.³⁷⁻³⁸

1.3 Origen de los hemocitos

Los hemocitos embrionarios fueron descritos por primera vez por Dohrn en 1876, en embriones de *Bombyx mori*, quien consideró que se derivaban de las células de la yema del embrión. Posteriormente surgieron otras teorías sobre el origen de los hemocitos; se creía que seis grupos de células daban origen a los hemocitos embrionarios sin embargo, la aceptación general hasta la actualidad es que los hemocitos embrionarios se derivan del mesodermo medio durante la embriogénesis.^{24,39}

El modelo de estudio actual mayormente empleado para conocer el origen y desarrollo de los hemocitos en los insectos es *Drosophila melanogaster* (Diptera Drosophilidae). Existen dos etapas durante el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta en las que se originan los hemocitos embrionarios y los cuales posteriormente pueden diferenciarse en distintos tipos celulares. La primera población de estas células se establece en la región de la cabeza o mesodermo procefálico del embrión. Durante la embriogénesis los hemocitos embrionarios migran desde éste punto y se dispersan a todo lo largo del embrión por vías invariantes y programadas. Los primeros hemocitos salen de la cabeza e infiltran a la banda germinal del embrión. La retracción de ésta acarrea a los hemocitos hacia el extremo posterior, a medida que más células dejan la cabeza, y migran a lo largo del lado dorsal del embrión. Los hemocitos del extremo anterior y posterior migran hacia el lado contrario a lo largo del cordón neural ventral y del intestino en desarrollo, hasta que las poblaciones hemocíticas anteriores y posteriores se topan una con otra formando una línea continua a lo largo de la línea media ventral. Desde este punto hacia adelante, los hemocitos migran rápidamente lateralmente dejando la línea media y tomando posiciones que flanquean al cordón neural. Estas células circulantes son principalmente plasmocitos embrionarios y constituyen el 95% de todos los hemocitos en el embrión. Una segunda ola de hematopoyesis ocurre en las últimas etapas de la embriogénesis, cuando los precursores de las glándulas linfáticas se comienzan a formar en el mesodermo torácico dorsal y se unen para formar el primer par de lóbulos del órgano. Las células de las glándulas linfáticas se originan de una mezcla de células progenitoras unipotentes y una pequeña cantidad de progenitores

oligopotentes/pluripotentes conocidos como hemangioblastos dentro del mesodermo cardiogénico. Los hemangioblastos pueden dar origen a dos tipos de células hijas: unas que se diferencian en cardioblastos y dan origen a células del tubo cardial (corazón y la aorta), y otras células que se diferencian en células de las glándulas linfáticas y que a su vez dan origen a las células sanguíneas o hemocitos.^{25,40-41}

1.4 Órganos hemocitopoyéticos en los insectos

Las células sanguíneas de muchos animales mayores se forman en tejidos denominados hemocitopoyéticos o hemopoyéticos. Su función es la producción de diferentes líneas de células sanguíneas y su deposición en la sangre, así como la producción de células especializadas involucradas en la respuesta inmunológica. En los insectos Lepidopteros, los órganos hemocitopoyéticos son estructuras pareadas localizadas en el mesotórax y metatórax (4 en total) en proximidad a los discos imaginales de las alas. Los órganos hemocitopoyéticos en *Drosophila melanogaster* se encuentran a lo largo de la parte anterior y a ambos lados del vaso dorsal durante la embriogénesis y en el estado larval se distinguen de cuatro a seis pares de lóbulos que se localizan laterales al vaso dorsal. Una vez que se forman los primeros lóbulos pareados de la glándula linfática, el órgano crece subsecuentemente por proliferación celular durante el primer y el segundo estadio larval y funciona como principal sitio de producción de hemocitos.⁴²⁻⁴³

En insectos y bajo condiciones normales de no inmunidad, los hemocitos de las glándulas linfáticas u órganos hemocitopoyéticos no entran a la circulación hasta el comienzo de la metamorfosis y permanecen dentro de éstos a lo largo de la etapa larval. Un porcentaje de estas células no circulan dentro de la larva y forman una población sésil que yace justo por debajo de la cutícula larval. Sin embargo, bajo condiciones de parasitismo, grandes cantidades de hemocitos son liberados hacia la circulación desde las glándulas linfáticas y de las poblaciones séviles que se encuentran justo debajo de la epidermis.⁴⁴ Por ejemplo en *Drosophila melanogaster* se da una rápida diferenciación de lamelocitos después de ser parasitadas por avispas y hay una reducción en la población de hemocitos séviles.²⁸ Estudios con diferentes especies de insectos indican que el número de hemocitos en circulación puede cambiar rápidamente, no solo como respuesta a un agente extraño, sino también dependiendo del estado de desarrollo, estrés, o heridas; ya sea por diferenciación de los prohemocitos o por la movilización de hemocitos séviles hacia la circulación.^{30,43,45-48}

Los hemocitos circulantes, presentes en el estadio larval de *Drosophila melanogaster*, se originan de una división continua de células que se encuentran en circulación, mientras que la producción y liberación de hemocitos adicionales se da por parte de los órganos hemocitopoyéticos, sin embargo, los plasmocitos circulantes de origen embrionario continúan su proliferación durante el estadio larval del insecto.^{44,47,49} En Lepidoptera es igual, los órganos hemocitopoyéticos son una fuente importante de plasmocitos, principalmente en los últimos momentos del desarrollo larval, mientras que los hemocitos circulantes como

granulocitos, esferulocitos y oenocitoides derivan de hemocitos en circulación.⁵⁰⁻⁵² Las similitudes entre el Diptera *Drosophila* y Lepidoptera sugieren la posibilidad de un origen dual de hemocitos circulantes a partir de células progenitoras de origen embrionario y órganos hemocitopoyéticos larvales, indicando que puede ser una característica conservada en los insectos en general.¹⁹ Algunos autores reportan que las glándulas linfáticas liberan hemocitos exclusivamente durante la etapa final del tercer estadio larval y que al comenzar la metamorfosis se libera otra cantidad de hemocitos. Sin embargo, la glándula linfática no persiste a lo largo de la metamorfosis por lo que los hemocitos presentes durante el estado de pupa y el insecto adulto son aquellos que provienen de hemocitos de origen embrionario y de los órganos hemocitopoyéticos que pueden sufrir diferenciación.^{43,45,53}

1.5 Resistencia relativa de abejas africanizadas a la infestación de *Varroa destructor*

Las abejas cuentan con diferentes mecanismos de defensa que les permiten desarrollar resistencia a las enfermedades y limitar su impacto. Estos incluyen conductas como el comportamiento higiénico, que consiste en la habilidad de las obreras de desopercular celdas y remover larvas y pupas muertas por enfermedades de la cría. Las abejas también generan resistencia mediante el comportamiento de acicalamiento al detectar, morder y eliminar al ácaro *Varroa destructor* en su fase forética y removerlo de su cuerpo.⁵⁴⁻⁵⁵ Es bien sabido que las abejas africanizadas son significativamente menos susceptibles a ser infestadas,

que abejas europeas, pero no está totalmente claro a qué se debe esta resistencia.⁵⁶⁻⁵⁸

1.6 JUSTIFICACIÓN

Conocer la respuesta celular del sistema inmune de las abejas melíferas a la infestación con el ácaro *Varroa destructor* y hacer una comparación de esta respuesta inmune entre abejas africanizadas y europeas puede explicar la resistencia que manifiesta un genotipo ante la relativa susceptibilidad al ácaro del otro genotipo. Asimismo, de haber inmunosupresión a nivel celular en las abejas infestadas con *Varroa destructor*, es importante saber si este efecto se debe a la acción mecánica de la mordida y/o a algún componente presente en el ácaro. A la fecha, no se han llevado estudios de conteos hemocitarios en abejas africanizadas, ni se ha establecido el efecto que *Varroa destructor* tiene en la respuesta inmune celular a través del tiempo en abejas africanizadas o en europeas. Este es el primer estudio que genera dicha información.

1.7 OBJETIVOS

Determinar el número y variación de hemocitos presentes en la hemolinfa de abejas melíferas adultas africanizadas y europeas infestadas con el ácaro *Varroa destructor* en comparación a grupos testigo.

Conocer la variación de la respuesta celular en la hemolinfa de abejas a diferentes intervalos de tiempo de exposición al ácaro *Varroa destructor*.

Comprobar si existen diferencias en la respuesta de tipo celular en la hemolinfa entre abejas africanizadas y abejas europeas expuestas al ácaro *Varroa destructor*.

1.8 HIPÓTESIS

La exposición de abejas africanizadas y europeas al ácaro *Varroa destructor* provoca una variación en la cantidad de hemocitos presentes en su hemolinfa a distintos tiempos de exposición.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó en dos etapas, diferentes tanto en tiempo como en espacio. Una primera fase se llevó a cabo con abejas africanizadas en el mes de enero del 2011. Se utilizaron abejas provenientes del apiario del Centro de Educación Ambiental (CEA) "Acuexcomatl" localizado en el pueblo de San Luis Tlaxialtemalco de la Delegación Xochimilco en el Distrito Federal. En la segunda etapa se trabajó con abejas europeas en el mes de octubre del 2011 en el Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá (Figura 1).

2.2 Establecimiento de grupos experimentales

En ambos apiarios se trabajó con cinco grupos experimentales:

a) abejas (africanizadas o europeas) recién emergidas sin ningún tratamiento como grupo testigo

b) abejas (africanizadas o europeas) recién emergidas inoculadas con macerado de varroas

c) abejas (africanizadas o europeas) recién emergidas inyectadas con solución Buffer

d) abejas (africanizadas o europeas) recién emergidas puncionadas asépticamente con un alfiler entomológico

e) abejas (africanizadas o europeas) recién emergidas que se infestaron artificialmente con el ácaro *Varroa destructor* en su fase forética.

Se realizaron un total de 3 repeticiones por experimento.

2.3 Preparación de las colonias experimentales

Para seleccionar colonias experimentales de abejas africanizadas, las colmenas del apiario del Centro de Educación Ambiental Acuexcomatl se muestrearon, tomando 30 abejas en etanol al 70%, a las cuales se les midió la longitud del ala anterior mediante el método FABIS I (*Fast Africanized Bee Identification System I* por sus siglas en inglés)⁵⁹, para determinar su morfotipo (europeo o africanizado). De acuerdo a los resultados, se seleccionaron aquellas colonias cuyas obreras tuvieron una medición de ala promedio menor a 8.790 mm, ya que se sabe que las alas de abejas de origen africano son de menor tamaño que las de origen europeo. A su vez, a las abejas de estas colonias se les determinó el tipo de ADN mitocondrial (ADNmt), mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para corroborar su genotipo africano.⁶⁰ Del total de colonias muestreadas, se seleccionaron ocho cuyas obreras tenían ADNmt africano, las cuales se aislaron y medicaron con el acaricida flumetrina (Bayvarol® de Bayer) (Figura 2) por seis semanas para que estuvieran libres de ácaros previo a los experimentos. Estas colmenas utilizadas estaban previamente identificadas como Ac, Al, Aj, A, K, P, S y T en el apiario del CEA. Por otro lado las colmenas utilizadas en el Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph

estaban identificadas con los numero 289, 100, 273, 79 y fueron medicadas con tiras de Apistan® cuyo principio activo es el fluvalinato.

Posteriormente, a otras colmenas dentro del mismo apiario del CEA se les diagnosticó el nivel de infestación de *Varroa destructor* usando la metodología descrita por De Jong (1982) y se seleccionaron aquellas que presentaban altos niveles de infestación para que sirvieran como fuente de ácaros para la preparación del macerado, así como para infestar artificialmente a las abejas adultas recién emergidas. Las colmenas que sirvieron como fuente de abastecimiento de ácaros en Guelph fueron prestadas por un apicultor de la región, las cuales presentaban altos niveles de infestación.

2.4 Jaulas

Como parte del material utilizado se fabricaron ocho jaulas para emerger abejas (Figura 3), ocho jaulas de encierro o “*Hoarding Cages*” de madera (12.7 cm x 8.5 cm x 14.5 cm) con una malla criba de 3 mm y una ventana de vidrio (Figura 4) y se prepararon 80 jaulas tipo Benton.

2.5 Colección de ácaros

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron colonias altamente infestadas con el ácaro *Varroa destructor*, de las cuales se colectaron los ácaros necesarios para los experimentos. Para la obtención de los ácaros se utilizó una cubeta

plástica de 19 L con malla criba de 4 mm, 20 cm por encima de su fondo. Entre el fondo del contenedor y la malla, se colocó un vial con 30 ml de éter al 95% (Figura 5). Se sacudieron bastidores (Figura 6) con abejas obreras dentro de la cubeta y después se cerró por un periodo de 15 a 20 min para anestesiarse a las abejas y permitir que los ácaros se desprendieran del cuerpo de éstas. Finalmente se colectaron los ácaros del fondo de la cubeta utilizando un pincel de cerdas finas para recopilarlos en una caja de Petri (Figuras 7 y 8).

Para la preparación del macerado, los ácaros se utilizaron inmediatamente después de su colección, sin embargo, para la infestación de abejas adultas recién emergidas se esperó a que éstos se recuperaran de la anestesia para colectar únicamente ácaros vivos.

2.6 Obtención de abejas africanizadas y europeas recién emergidas

De las colonias con ADNmt africano y europeo, tratadas con acaricida, se escogieron bastidores con cría a punto de emerger que se introdujeron en jaulas con malla. Las jaulas se colocaron en una incubadora a una temperatura de 32 a 35°C y 60% humedad relativa por uno o dos días, dependiendo de la cantidad de abejas a necesitar y de la cría disponible por bastidor.

2.7 Macerado de Varroas

Una vez colectados, se contó el número total de ácaros obtenidos, se colocaron en un mortero estéril al cuál se le agregaron 5 μ L de solución PBS (*Phosphate Buffer Saline*; por sus siglas en inglés) o solución Buffer, por ácaro y se maceraron con el pistilo del mortero (Figura 9). Posteriormente el macerado se colectó con una micropipeta y se depositó en un microtubo para ser centrifugado a 10,000 rpm por 10 min. Al cabo de este tiempo se transfirió la fase líquida (sobrenadante) del macerado a un tubo nuevo (Figura 10). La solución del macerado de varroas se conservó en congelación a -20°C hasta ser usada.

2.8 Preparación de grupos experimentales

Como ya se mencionó anteriormente, se usaron cinco grupos experimentales de abejas (africanizadas o europeas) las cuales fueron tratadas de la siguiente manera:

a) Abejas recién emergidas sin tratamiento (testigo)

En este grupo solo se colectó hemolinfa a los diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 12, 24, y 48 h post tratamiento). Se manejaron dos grupos testigo: en uno se mantuvieron las abejas en jaulas de encierro o “Hoarding cages” y en el otro las abejas se colocaron en jaulas tipo Benton. Número total de abejas por jaula: 30 en jaulas de encierro y 7 en jaulas tipo Benton.

b) Abejas recién emergidas inyectadas con macerado de *Varroa destructor*

Este grupo experimental fue tratado con inyecciones de 2.5 μ L de macerado de varroas por abeja, aplicando la inyección entre el segundo y tercer tergito abdominal, mediante una microjeringa Hamilton con capacidad para 25 μ L (Figura 11). Número total de abejas por jaula: 30.

c) Abejas recién emergidas inyectadas con solución Buffer

Se inyectaron 2.5 μ L de solución PBS por abeja entre el segundo y tercer tergito abdominal con la jeringa anteriormente mencionada. Número total de abejas por jaula: 30.

d) Abejas recién emergidas puncionadas con alfiler entomológico

Se puncionaron abejas recién emergidas con alfiler entomológico entre el segundo y tercer tergito del abdomen. Número de abejas por jaula: 30.

e) Abejas recién emergidas infestadas artificialmente con varroas

En jaulas tipo Benton se introdujeron siete abejas por jaula a las cuales, con la ayuda de un pincel fino, se les introdujo dos ácaros por abeja (Figura 12). A cada jaula se le anexó una porción de “Candy” (pasta de azúcar pulverizada con glucosa) para que las abejas pudieran alimentarse por período de 48 h y proporcionándoles agua dos veces al día.

Las abejas de los grupos a), b), c) y d) se mantuvieron en jaulas de encierro o “*Harding cages*”, con alimentadores para agua y jarabe de agua y azúcar al 70%. Estas jaulas se mantuvieron en la incubadora a 32°C y 60% humedad relativa (Figura 13) por un período máximo de 48 h para cubrir los intervalos de tiempo de colección de hemolinfa de 0, 2, 12, 24 y 48 h post tratamiento. Las jaulas del grupo e) se mantuvieron a temperatura ambiente fuera de la incubadora (Figura 14).

2.9 Extracción de hemolinfa

La colección de la hemolinfa de las abejas experimentales se realizó a los intervalos de tiempo arriba mencionados. Para la manipulación y extracción de hemolinfa cada abeja se sostuvo del tórax entre los dedos pulgar e índice de una mano y con la otra se punccionó con una aguja estéril o un alfiler entomológico entre el segundo y tercer tergito de su abdomen hasta penetrar la membrana (Figura 15). Después se presionó ligeramente el abdomen de la abeja, hasta visualizar una pequeña gota de hemolinfa para luego coleccionar 4 μL de ésta, usando una micropipeta (Figura 16). Cada muestra de hemolinfa fue colocada en porta objetos de vidrio esmerilado de 25 mm x 75 mm (Figura 17), previamente rotulados e identificadas para su respectivo grupo experimental e intervalo de tiempo de colección. Se coleccionaron cuatro muestras de hemolinfa (una por abeja) por intervalo de tiempo y por tratamiento en cada repetición del experimento.

2.10 Tinción de muestras de hemolinfa

Una vez colectada la hemolinfa se depositó sobre un portaobjetos, se dejó secar al aire y se fijó con metanol al 95% para finalmente teñir la muestra con el *kit* “PROTOCOL Hema 3®”, solución I y II (Laboratorios Fisher Scientific; cat.23-122-937 y 23-122-952), tinción que es equivalente a la de Giemsa (Figura 18). El protocolo de tinción que se siguió fue el siguiente: una vez fijada la muestra de hemolinfa se procedió a sumergir la laminilla en las soluciones I y II del kit, cinco veces (un segundo por vez). Entre cada solución se eliminó el exceso por escurrimiento y al final se enjuagó la laminilla con agua destilada. Cabe mencionar que se hizo una dilución de la solución II con agua destilada (1:1) ya que en pruebas preliminares se observó que de dicha solución teñía con intensidad a los hemocitos dificultando su identificación. Cada muestra de hemolinfa fue colocada en un portaobjetos al cual se le dibujaron, en la parte posterior a donde se colocó la muestra, dos cuadros primarios de 1 cm² con un plumón permanente, los cuales a su vez fueron divididos en cuatro cuadros secundarios de 0.5 cm² cada uno (Figura 19). Esto se hizo con la finalidad de facilitar el conteo de los hemocitos.

2.11 Conteo de células

Dentro de cada cuadro secundario dibujado en el porta objetos, se seleccionaron dos áreas para el conteo de células; estas fueron la parte central de cada cuadro secundario, así como el área correspondiente a la parte central del cuadro primario. Por lo tanto se contaron dos secciones por cada cuadro secundario

dando un total de ocho secciones (ocho conteos en total) por muestra de hemolinfa dentro del cuadro primario (Figura 20).

Para el conteo de hemocitos se utilizó un microscopio óptico de luz Leica CME® con un ocular de 10x y objetivo de 40x así como un lente para ocular con gradilla de 10 mm x 10 mm con cuadros de 1 mm (100 cuadros en total) (Figura 21) cada uno para facilitar el conteo por secciones. Se empezó el conteo en el cuadro superior izquierdo y hacia abajo y pasando a la siguiente fila a la derecha en forma de zigzag hasta contar los 100 cuadros (Figura 22). Se contaron todas aquellas células que estuvieron dentro del cuadro exceptuando aquellas que se encontraran cruzando las líneas superior e izquierda del mismo. La identificación de los hemocitos se llevó a cabo de acuerdo a la morfología que se reporta en la literatura.

2.12 Cuantificación de número de hemocitos por μL de hemolinfa

Para tener un dato lo más preciso posible de la cantidad de hemocitos presentes en un μL de hemolinfa de abejas sin tratar, se realizó un conteo de las células totales utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se colectó 1 μL de hemolinfa y se diluyó con 3 μl de solución (16.2g de NaH_2PO_4 , 4.2 g de NaOH , 1 g de azul de metileno en 0.1 l de formalina y 0.9 l de H_2O destilada). La dilución se colocó en el hemocitómetro y se contaron el número de células totales en cinco cuadros (cuatro cuadros de las esquinas y el cuadro central) (Figura 23). La cuadrícula cada uno de estos cuadros está dividida en grupos de 16 cuadros y

cada grupo está enmarcado por líneas dobles. Se contaron todos los hemocitos enmarcados en las líneas dobles, incluyendo en el conteo a todos aquellos que toquen las líneas dobles del lado izquierdo y superiores de cada bloque, pero no a las que toquen las líneas dobles inferiores y a las del lado derecho del bloque. En total se realizaron ocho conteos de la hemolinfa de ocho abejas diferentes y se siguió la siguiente ecuación: $\sum/8 \times 200 =$ No. de células/ μ L de hemolinfa.

2.13 Análisis de datos

Los datos ajustados a número de hemocitos por μ L de hemolinfa se transformaron a logaritmos, ya que no tenían una distribución normal. Después de ser transformados, fueron analizados por análisis de varianza (ANDEVA). Cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, éstas se separaron por medio de la prueba de medias de los mínimos cuadrados de "Fisher". El programa estadístico que se utilizó fue Stateview® de la compañía Abacus.

3.0 RESULTADOS

3.1 Efecto Tratamiento

Hubo diferencias significativas entre los tratamientos para el número de hemocitos por μL de hemolinfa de las abejas, considerando todos los datos sumados tanto los de abejas europeas como los de las africanizadas (Cuadro 1).

Las abejas inyectadas con Buffer no mostraron diferencias en cuanto al número de hemocitos con ninguno de los dos tratamientos testigo, ni tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos testigo. Sin embargo, tanto la inoculación de macerado de *Varroa destructor*, como la exposición artificial al ácaro provocó una disminución significativa en el número de hemocitos de las abejas tratadas. En contraposición, a este resultado, las abejas perforadas con un alfiler entomológico, mostraron un incremento significativo en el número de hemocitos en relación a las abejas testigo (Figura 24).

3.2 Genotipo x Tratamiento

Hubo diferencias significativas entre genotipos y entre tratamientos para el número de hemocitos en la hemolinfa de abejas africanizadas y europeas, así como una interacción entre genotipos y tratamientos (Cuadro 2).

Se observó una disminución significativa en el número de hemocitos en abejas africanizadas y europeas inyectadas con macerado de varroas en comparación al

grupo testigo. La cantidad de hemocitos en abejas africanizadas infestadas artificialmente con *Varroa destructor* mostraron una disminución significativa en comparación con las abejas europeas sometidas al mismo tratamiento, sin embargo éstas últimas no mostraron diferencia con el grupo testigo. La herida causada por la punción con alfiler entomológico provocó un aumento significativo en el número de hemocitos en la hemolinfa de ambos genotipos, mientras que las abejas que fueron inyectadas con Buffer no difirieron en cuanto a número de hemocitos en relación al tratamiento testigo en los dos genotipos (Figura 25).

3.3 Genotipo X Tiempo de encierro

Se encontraron efectos significativos del genotipo de las abejas para el número de hemocitos en la hemolinfa, pero no hubo efectos de tiempo de encierro ni de interacción entre genotipos y tiempo de encierro (Cuadro 3). Las abejas africanizadas tuvieron conteos significativos menores de hemocitos que las europeas a las 2 y 12 h de encierro pero no a las 0 h, 24 h y 48 h de encierro (Figura 26).

3.4 Tratamiento x Tiempo en abejas africanizadas

Hubo efectos significativos de tratamiento y de tiempo de exposición al tratamiento; también se encontró interacción significativa entre tratamiento y tiempo de exposición al mismo en abejas africanizadas (Cuadro 4). La aplicación de Buffer no tuvo efecto ya que las abejas inyectadas con esta solución no

difirieron de las abejas testigo en los conteos hemocitarios a lo largo de las mediciones temporales. Sin embargo, la punción causó un rápido y significativo incremento en el número de hemocitos en la hemolinfa de las abejas, cuyo pico se alcanzó a las 2 h post tratamiento. Después se observó una caída gradual en el número de hemocitos de las abejas sometidas a este tratamiento, no difiriendo del testigo a las 12, 24 y 48 h post tratamiento. Las abejas inoculadas con macerado de *Varroa destructor* o que se infestaron artificialmente con el ácaro, mostraron una disminución gradual y significativa en el número de hemocitos, cuyo nivel mínimo se manifestó a las 12 h post tratamiento. Posteriormente hubo un ligero incremento en el conteo hemocitario pero los niveles de hemocitos continuaron siendo significativamente inferiores a los de las abejas testigo a las 24 y 48 h post tratamiento (Figura 27).

3.5 Tratamiento x Tiempo en abejas europeas

Hubo efectos significativos de tratamiento y de tiempo de exposición a los tratamientos; también se encontró interacción significativa entre tratamiento y tiempo de exposición a los mismos en abejas europeas (Cuadro 5). La aplicación de Buffer no tuvo efecto, ya que las abejas inyectadas con esta solución no difirieron de las abejas testigo en conteos hemocitarios. Sin embargo, al igual que en el caso de las abejas africanizadas, la punción provocó un rápido y significativo incremento en el número de hemocitos en la hemolinfa de abejas, cuyo pico se alcanzó a las dos horas post tratamiento. Después se observó una disminución gradual en el número de hemocitos de las abejas sometidas a este tratamiento, no

difiendo del testigo a las 12, 24 y 48 h post tratamiento. Las abejas inoculadas con un macerado de *Varroa destructor* o que se infestaron artificialmente con el ácaro, mostraron una disminución gradual y significativa en el número de hemocitos, cuyo nivel mínimo se manifestó a las 12 h post tratamiento. Posteriormente hubo un incremento en el conteo hemocitario y no se encontraron diferencias significativas en los niveles de hemocitos en relación a las abejas testigo, a las 24 y 48 h post tratamiento (Figura 28).

4.0 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que el número de hemocitos en la hemolinfa de abejas disminuyó cuando éstas estuvieron expuestas ya sea al macerado de varroas o a la infestación artificial con los ácaros. En un estudio por Papadopoulou-Karabela *et al.*⁶¹ se infectaron abejas adultas, *Apis mellifera macedonica*, de menos de 24 horas de emergidas con *Pseudomona aeruginosa* y se realizaron conteos hemocitarios totales (CHT) así como conteos hemocitarios diferenciales (CHD). Los resultados reportaron una disminución significativa en CHT ($P < 0.05$) en abejas enfermas de 10 a 15 h post infección, pero no se encontraron diferencias en los CHT de abejas infectadas comparadas con abejas testigo o entre los dos grupos testigo a mayores intervalos de tiempo post exposición.⁶¹ El resultado anterior sugiere que *Varroa destructor* pudiera inocular algún agente patógeno (virus o bacterias) que a su vez podrían ser los responsables de la baja en el número de hemocitos de los tratamientos con varroas o con macerado de varroas encontrado en este estudio.

Por otro lado, las abejas que fueron sometidas a punción séptica mostraron un incremento en el número de hemocitos, lo cual se puede explicar debido a que existe liberación de hemocitos de las poblaciones sésiles dentro del hemocelo del insecto para ser reclutados al sitio de la herida y así evitar una pérdida de la hemolinfa y como parte de la restauración de la misma. Como se mencionó anteriormente, las poblaciones de hemocitos sésiles son grupos de células, generalmente dispuestas en racimos, que se localizan por debajo de la epidermis

de los insectos o a las fibras musculares y al tejido graso y que pueden ser movilizados cuando sea necesario. Debido a que los insectos cuentan con un sistema circulatorio de tipo abierto, es importante que ante una herida establezcan una matriz que detenga la pérdida de hemolinfa; la reparación de una herida va de la mano con la respuesta de coagulación. Se pueden observar cuatro pasos para esto:

1) degranulación de hemocitos, subpoblación de granulocitos/coagulocitos, lleva al establecimiento de agregados extracelulares que incluye hemocitos, detritos celulares y matriz extracelular que sellan la herida.

2) activación de la cascada de la profenoloxidasa que forma un coagulo más resistente.

3) adhesión de plasmocitos que se esparcen a lo largo del coagulo y lo sellan por dentro del hemocelo.

4) la regeneración de la epidermis que crece a lo largo de la herida y va reemplazando a la costra previamente formada.^{19,62-64}

Algunos estudios sugieren que las abejas africanizadas son más resistentes que las abejas de origen europeo a la infestación del ácaro *Varroa destructor*. Aunque no se sabe con certeza a qué se debe dicha resistencia, Moretto *et al.*⁶⁵ comunicaron que en Brasil las abejas africanizadas fueron siete veces más eficientes que las abejas de origen italiano en la remoción del ácaro de sus cuerpos. Dicha característica parece tener un índice de heredabilidad alto por lo que puede ser considerada una característica a seleccionar para criar abejas resistentes.⁶⁵⁻⁶⁶ Esto contrasta con los resultados reportados en este estudio en

donde las abejas africanizadas que fueron infestadas artificialmente con el ácaro *Varroa destructor*, las cuales experimentan una mayor disminución en la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa sugiriendo un mayor impacto en su sistema inmunológico.

Por otro lado, el característico comportamiento nervioso de las abejas africanizadas podría explicar también la disminución en hemocitos durante las primeras 12 h de encierro, lo cual sugiere que requieren de un periodo de tiempo mayor que las abejas europeas para adaptarse a la jaula y estabilizar su estrés por ambiente.^{17,19,67}

Se debe tener en cuenta que la aparente disminución en el número de hemocitos presentes tanto en insectos sanos como en aquellos inmunológicamente desafiados, puede verse influido por el volumen de hemolinfa, el cual puede variar por la disponibilidad de agua y alimento, el estado fisiológico, el estado de desarrollo y la actividad física. Esto quiere decir que el volumen de hemolinfa puede aumentar sin generarse cambios en la cantidad de hemocitos (aumento o disminución). La cantidad de hemocitos tiene que ver con el volumen de hemolinfa presente en el insecto, que en estado juvenil es mayor mientras que en estado adulto mayor, debido a la madurez sexual y a la acumulación de grasa y masa muscular, presenta un menor volumen de hemolinfa.⁶⁸

Szymas *et al.* y Sawsan *et al.*⁶⁹⁻⁷⁰ comunicaron que el tipo y calidad de la dieta de las abejas influye en la composición de la hemolinfa. El tipo de dieta muestra tener un efecto en la proporción de los diferentes tipos de hemocitos presentes en la

hemolinfa lo cual repercute en la capacidad de la respuesta inmune de tipo celular, ya que dependiendo de la disponibilidad en cuanto a cantidad y tipo de hemocitos presentes, la respuesta inmune será exitosa o no. Un alimento proteínico natural es un factor vital para el buen funcionamiento del sistema celular de la hemolinfa de la abeja; su ausencia o deficiencia provoca cambios considerables en la función y estructura de los hemocitos. En la hemolinfa de abejas alimentadas con dietas no proteínicas se observó una tendencia en el incremento de CHT. También se observó un incremento significativo en el porcentaje de granulocitos y una cantidad significativamente menor en otros tipos de hemocitos, así como un menor índice de actividad metabólica de los hemocitos en comparación con la hemolinfa de abejas alimentadas con polen o sustituto de polen. En contraste en las abejas alimentadas con sustituto de polen, hubo un menor CHT, pero un porcentaje significativamente mayor en plasmocitos y una disminución de granulocitos y de la actividad metabólica de los hemocitos en comparación a abejas alimentadas con polen. Mientras que en abejas con una dieta a base de azúcar hubo un porcentaje menor de otros tipos de hemocitos y un incremento de los granulocitos, sugiriendo una disminución en la diferenciación de los hemocitos y una posible movilización de granulocitos primarios que pudieran actuar como células de reserva.⁶⁹⁻⁷⁰

Al no haberse encontrado diferencias significativas en cuanto al número de hemocitos en la hemolinfa de las abejas inyectadas con Buffer y en las abejas del grupo testigo, se puede concluir que es posible que algún tipo de sustancia (ej. proteína) pudiera estar presente en el ácaro, lo que posiblemente sería la causa de la variación a la baja en el número de hemocitos presentes en la hemolinfa

como respuesta del sistema inmune hacia el agente patógeno. Richards *et al.*⁷¹ sugieren que *Varroa destructor*, pudiera introducir factores bioactivos que son sintetizados en las glándulas salivales del ácaro y que son introducidos vía salival al momento de lesionar la cutícula de la abeja por mordida. Mediante procedimientos *in vitro* se colectaron secreciones provenientes de las glándulas salivales de *Varroa destructor*.⁷¹ Al emplear electroforesis en gel de poliacrilamida se observaron bandas de proteínas con pesos moleculares estimados de 130kDa a <7kDa. Posteriormente se realizó una incubación de una proteína, tratada con policarpina, con hemocitos de larva de *L. oleracea*, lo cual demostró que hubo un daño en estos causando su desintegración e inhibiendo su habilidad para formar agregados celulares. En contraste con las secreciones salivales del ácaro, al utilizar un homogenado del cuerpo entero del ácaro demostró tener poca actividad anti aglutinante. Sin embargo, no está claro si los efectos del homogenado se deben al bajo nivel de las proteínas presentes en la saliva o a enzimas liberadas por otras células durante la homogeneización (ej. enzimas digestivas). Todo lo anterior sugiere que la o las proteínas inoculadas por el ácaro vía saliva al momento de la mordida pudiera ser las responsables de afectar el sistema inmune celular de las abejas, así como para facilitar la habilidad del ácaro para alimentarse repetidamente al evitar la restauración de la herida por la participación de los hemocitos.⁷¹

5.0 REFERENCIAS

1. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Varroasis de las Abejas publicada en el Diario Oficial de la Federación de fecha 20 de diciembre de 2005 tercera sección, pag 40.
2. ELLIS A, DELAPLANE K. Effects of nest invaders on honey bee (*Apis mellifera*) pollination efficacy. *Agric Ecosyst Environ* 2008;127:201–206.
3. ROSENKRANZ P, AUMEIER P, ZIEGELMAN B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 2010;103:96–119.
4. LE CONTE Y, ARNOLD G, *et al.* Attraction of the parasitic mite of *Varroa* to the drone larvae of the honeybees by simple aliphatic esters. *Science* 1989; 245:638-639.
5. TROUILLER J, ARNOLD G, CHAPPE B, *et al.* Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by *Varroa jacobsoni*. *J Chem Ecol* 1992;18(11):2041-2053.
6. DONZÉ G, SCHNEYDER-CANDRIAN S, BOGDANOV, *et al.* Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behavior in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 1998;37,129-145.
7. CALDERONE NW, LIN S. Arrestment activity of extracts of honey bee worker and drone larvae, cocoons and brood food on female *Varroa destructor*. *Physiol Entomol* 2001;26:341-350.
8. KANBAR G, ENGELS W.. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitol Res* 2003;90(5):349-354.
9. IFTANDIS MD. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. *J Apic Res* 1983;22, 200-206.
10. STEINER J, DITTMAN F, ROSENKRAZ P. *et al.* The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebr Reprod Dev* 1994;25:175-183.
11. DUAY P, DE JONG D, ENGELS W. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 2003;34, 61-65.
12. DE JONG P, GONCALVES LS. Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res* 1982;21: 161-167.
13. WEINBERG KP, MADEL G. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honeybee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 1985;16:421-436.
14. BOWEN-WALKER PL, GUNN A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomol Exp Appl* 2001;101:207-217.

15. YANG X, COX-FOSTER DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005;102, 7470–7475.
16. YANG X, COX-FOSTER D. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence microbial challenge. *Parasitology* 2006;134:405-412.
17. GILLESPI JP, KANOST MR, TRENCZEK T. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 1997;42:611-643.
18. LAVINE MD, STRAND MS. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Molec Biol* 2002;32:1295-1309.
19. JIRAVANICHPAISAL P, LEE BL, SODERHALL K. Cell mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 2006;211:213-236.
20. IMLER J-L, BULET P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*, structures, activities and gene regulation. *Mech Epithelial Defense* 2005;86:1-21.
21. SIVA-JOTY MT, MORET Y, ROLFF J. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Adv Insect Physiol* 2005;32:1-48.
22. DUNN PE, DRAKE DR. Fate of bacteria injected into naïve and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Inverteb Pathol* 1983;41:77-85.
23. ABRAMS JM, WHITE K, FESSLER LI, *et al.* Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993;117:29-43.
24. FRANC NC, DIMARCQ JL, LAGUEUX M, *et al.* Croquemort, A novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 1996;4:431-443.
25. TEPASS U, FESSLER LI, AZIZ A, *et al.* Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 1994;120:1829-1837.
26. BRAUN A., HOFFMANN JA, MEISTER M. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;14337-14342.
27. RAMET M, MANFRUELLI P, PEARSON A, *et al.* Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 2002;416:644-648.
28. SORRENTINO RP, CARTON Y, GOVIND S. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* 2002;243:65-80.
29. ELROD-ERICKSON M, MISHRA S, SCHNEIDER D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* 2000;10:781-784.
30. FELDTHAR H, GROSS R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes Infec* 2008;10:1082-1088.
31. JONES JC. Current concepts concerning insect hemocytes. *Am Zool* 1962;2:209-246.

32. RIBEIRO C, BREHELIN M. Insect hemocytes: what type of cell is what?. *J Insect Physiol* 2006;52:417-429.
33. HILLYER JF, CHRISTENSEN BM. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol* 2002;117:431-440.
34. CASTILLO JC, ROBERTSON AE, STRAND MR. Carachterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Molec* 2006;36:891-903.
35. MESTER M, LAGUEX M. *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 2003;5(9):573-580.
36. WILLIAMS M. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 2007;178:4711-4716.
37. SAPCALIU A, PAVEL C, CAUIA E, *et al.* Morpho-cytometric investigaction on haemolymph collected from honey bees originated from south Rumania. *B UASVM Animal Sci Biotech* 2009;66:1-2.
38. GUPTA AP. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In *Insect Hemocytes*, ed. AP Gupta, pp. 85–128. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 1979
39. WILSON-RICH N, DRESS TS, STARKS P. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 2008;54:1392-1398.
40. FAUVARQUE M, WILLIAMS MJ. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci* 2011;124:1373-1382.
41. MANDAL L, BANERJEE U, HARTENSTEIN V. Evidence of a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* 2004;36:1019–1023.
42. HOLZ A, BOSSINGER B, STRASSER T, *et al.* The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 2003;130:4955–4962.
43. LANOT R, ZACHARY D, HOLDER F. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 2001;230:243–257.
44. JUNG SH, EVANS CJ, UEMURA C.*et al.* The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 2005;132:2521–2533.
45. RATCLIFFE NA, ROWLEY AF, FITZGERALD SW. *et al.* Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytol* 1985;97:186-350.
46. NARDI JB, UJHELYI E, PILAS B, *et al.* Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Dev Genes Evol* 2003;213:477-491.
47. GARDINER EMM, STARND MR. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem* 2000;43:147-164.
48. ELROD-ERICKSON M, MISHRA S, SCHNEIDER D. Interaction between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* 2000;10:781-784.

49. SHRESTHA R, GATEFF E. Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. Dev Growth Differ 1982;24(1):66-82.
50. AKAI H, SATO S. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol 1971;17:1665-1676.
51. ARNOLD JW, HINKS CF Haemopoiesis in *Lepidoptera*. I. the multiplication of circulating hemocytes. Canadian Journal of Zoology 1976;54:1003-1012.
52. HINKS CE, ARNOLD JW. Haemopoiesis in *Lepidoptera*. II. The role of haemopoietic organs. Can J Zool 1977;55:1740-1755.
53. ROBERTSON CW. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. J Morphol 1936;59:351-399.
54. ROTHENBUHLER WC. Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. Am Zool 1964;4:111-123.
55. ARANEDA X, PÉREZ R, CASTILLO C, et al. Evaluación del comportamiento higiénico de *Apis mellifera* en relación al nivel de infestación de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. IDESIA 2008;26(2):59-6.
56. MORETTO G, GONÇALVES LS, DE JONG D. Heredability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. Braz J Genet 1993;16:71-77.
57. ARECHAVALETA ME, GUZMÁN NOVOA E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 2001;32:157-174.
58. MONDRAGÓN L, SPIVAK M, VANDAME R. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie 2005;36:345-358.
59. SYLVESTER HA, RINDERER TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS). Am Bee J 1987;127:511-516.
60. NIELSEN DI, EBERT PR, HUNT GJ, et al. Identification of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) incorporating morphometrics and an improve PCR mitotyping procedure. Ann Entomol Soc Am 1999;92:167-174.
61. PAPADOPOULOU-KARABELA K, ILIADIS N, LIAKOS VQ. Haemocyte changes in honeybee (*Apis mellifera* L) artificially infected by *Pseudomonas aeruginosae*. Apidologie 1993;24(1):81-86.
62. FISHER WS. Structure and functions of oyster hemocytes. En "Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions". Springer-Verlg Berlin Heidelberg New York. 1986
63. HOSE JE, MARTIN GG, GERARD AS. A decapods hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. The Biological Bulletin 1990;178:33-45
Tomado de Effect of sulfated carrageenan on the cellular responses of the lobster *Panulirus interruptus*.

64. IWANAGA S, LEE B. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:128-150.
65. MORETTO G, GONÇALVES LS, DE JONG D, *et al.* The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. *Apidologie* 1991;22:197-203.
66. MORETTO G, GONÇALVES, LS, DE JONG D, *et al.* Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Braz J Genet* 1993;16:71-77.
67. TRUSCOTT R, WHITE KN. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct Ecol* 1990;4,455–461.
68. ROLFF J. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata: Lestidae) from a wild population. *Can J Zool* 2001;79:2176-2180.
69. SZYMAS B, JEDRUSZUK A. The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* 2003;34:97-102.
70. SAWSAN S, EMAD AN, ASMAA MF. Effect of different diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 2010;3(1):213-220.
71. RICHARDS EH, JONES B, BOWMAN A. Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*. Effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology* 2011;138:602-608.

FIGURAS



Figura 1. Apiario experimental de la Universidad de Guelph. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 2. Colmena tratada con tiras de Bayvarol. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 3. Jaula para emerger abejas. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 4. Jaula de encierro o "Hoarding Cage". Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 5. Cubeta colectora para ácaros de *Varroa destructor*. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 6. Sacudido de bastidor con abejas para la colección de ácaros de *Varroa destructor*. Foto:

Reyes-Quintana KM



Figura 7. Recuperación de ácaros de *Varroa destructor*. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 8. Ácaros colectados en caja de Petri. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 9. Ácaros de *Varroa destructor* macerados en mortero. Foto: Reyes-Quintana KM

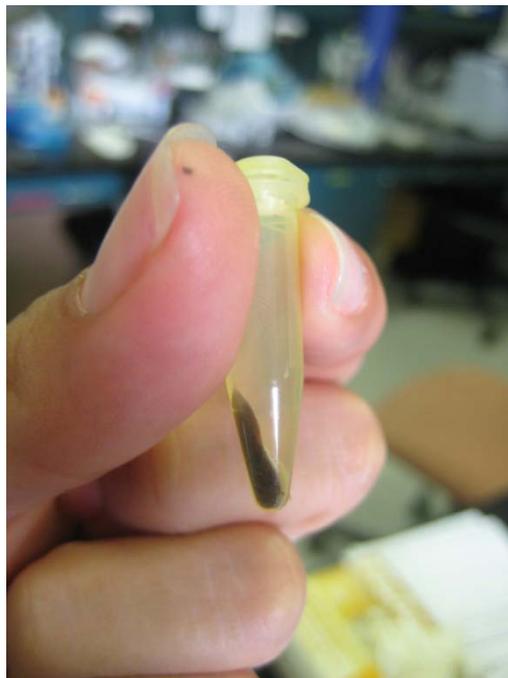


Figura 10. Macerado de ácaros de *Varroa destructor* después de centrifugado. Se observan dos fases, una sólida en el fondo y una líquida. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 11. Inyección de abejas adultas recién emergidas. Foto: Reyes-Quintana KM

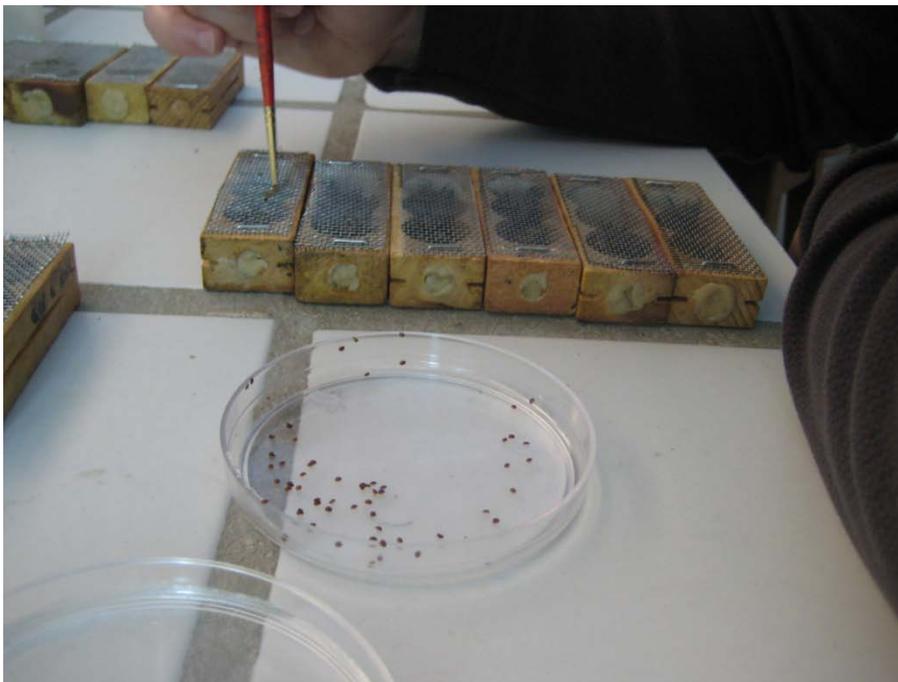


Figura 12. Infestación artificial de abejas adultas con ácaros *Varroa destructor*. Foto: Reyes-
Quintana KM



Figura 13. Incubadoras donde se guardaron las jaulas para emerger abejas y las jaulas de encierro o “Hoarding cages” de los diferentes grupos experimentales. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 14. Jaulas tipo Benton con abejas adultas infestadas artificialmente.

Foto: Reyes-Quintana KM

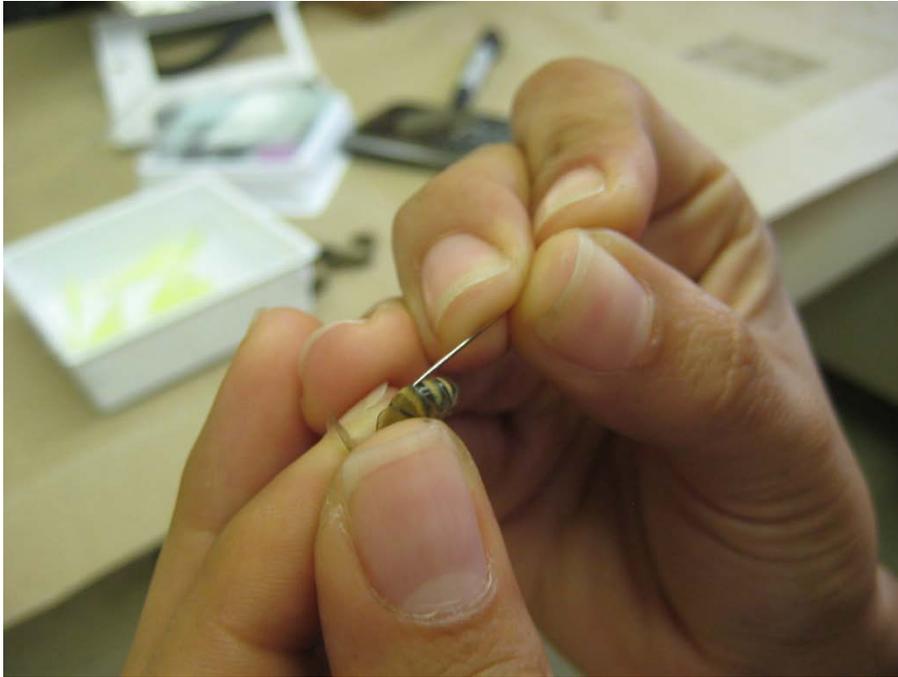


Figura 15. Punción de abeja adulta con alfiler entomológico para la colección de hemolinfa.

Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 16. Hemolinfa colectada con micropipeta. Foto: Reyes-Quintana KM

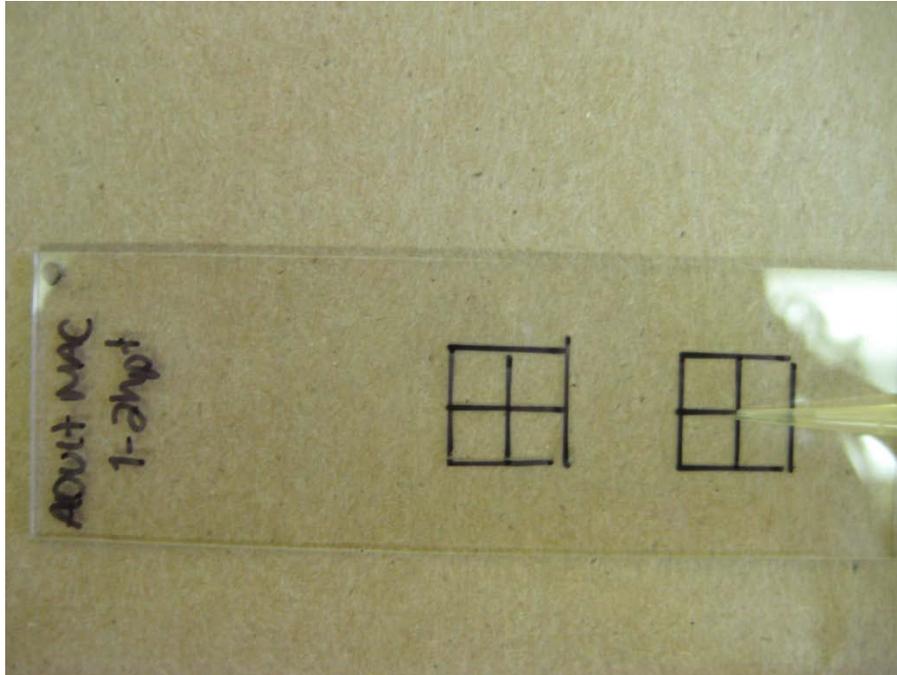


Figura 17. Colocación de hemolinfa en laminilla rotulada. Foto: Reyes-Quintana KM



Figura 18. Kit de tinción "PROTOCOL Hema 3" para muestras de hemolinfa. Foto: Reyes-Quintana

KM

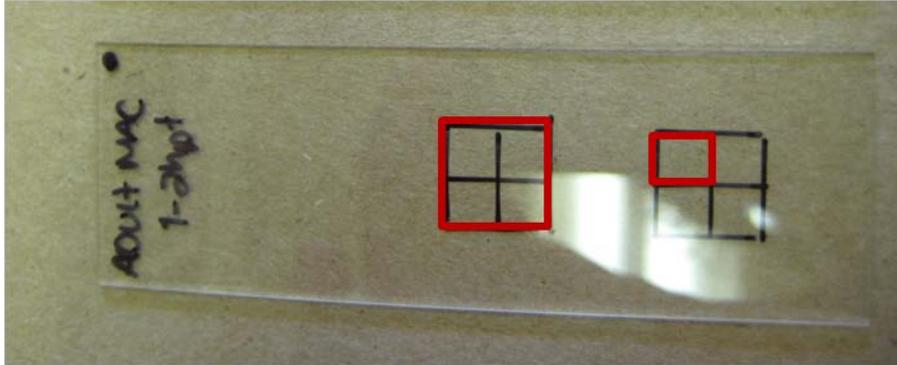


Figura 19. Cuadro primario y secundario en el portaobjetos para facilitar el conteo de hemocitos.

Foto: Reyes-Quintana KM

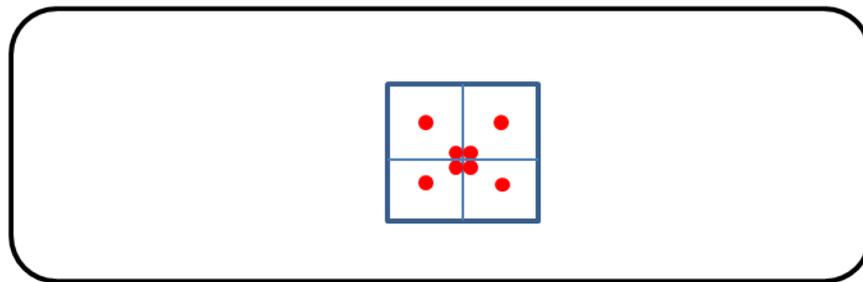


Figura 20. Esquema de las áreas donde se realizó el conteo de hemocitos.

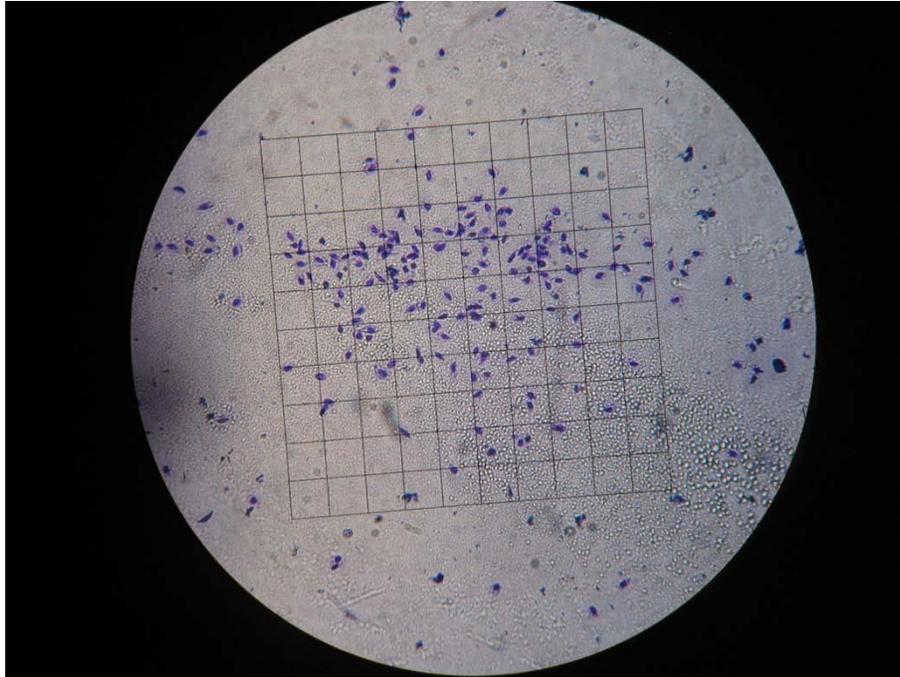


Figura 21. Lente con gradilla para facilitar el conteo de hemocitos. Foto: Reyes-Quintana KM

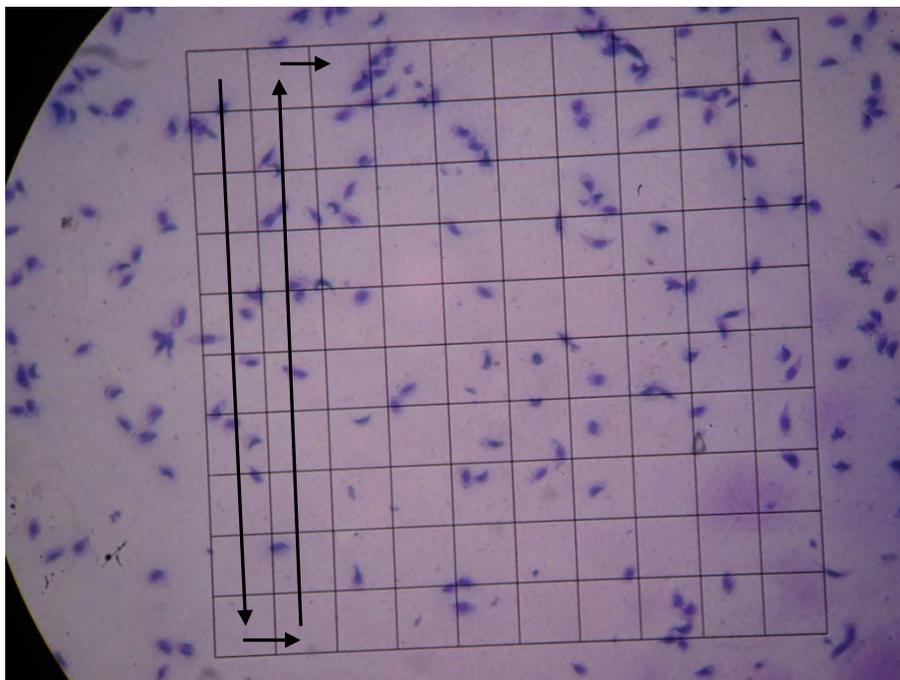


Figura 22. Patrón de conteo de hemocitos. Foto: Reyes-Quintana KM

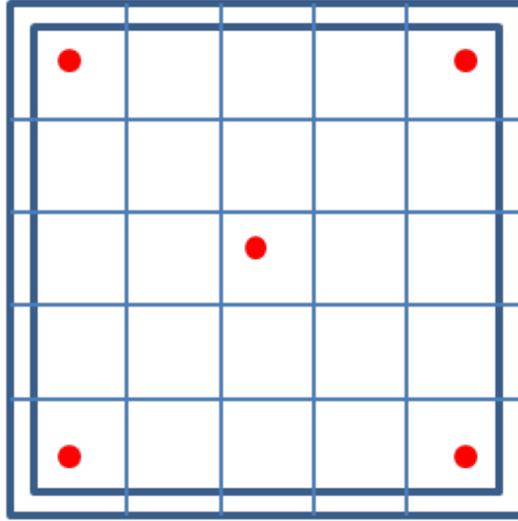
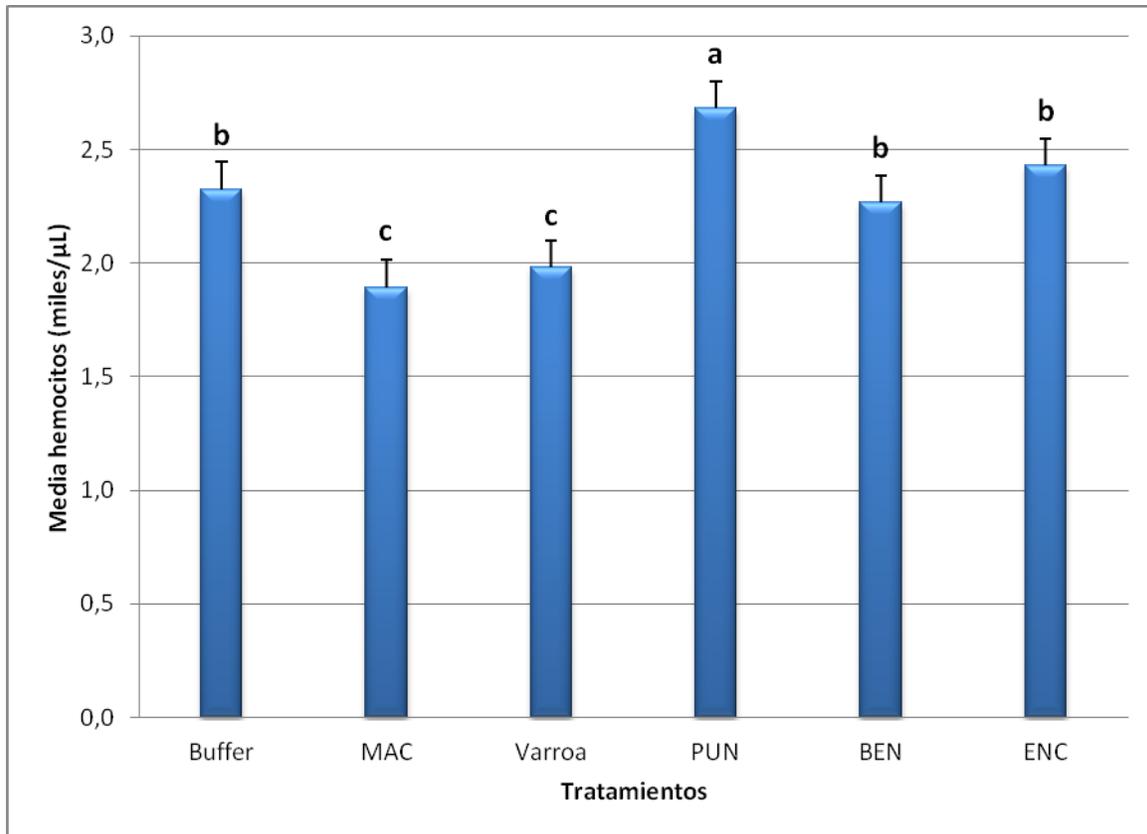


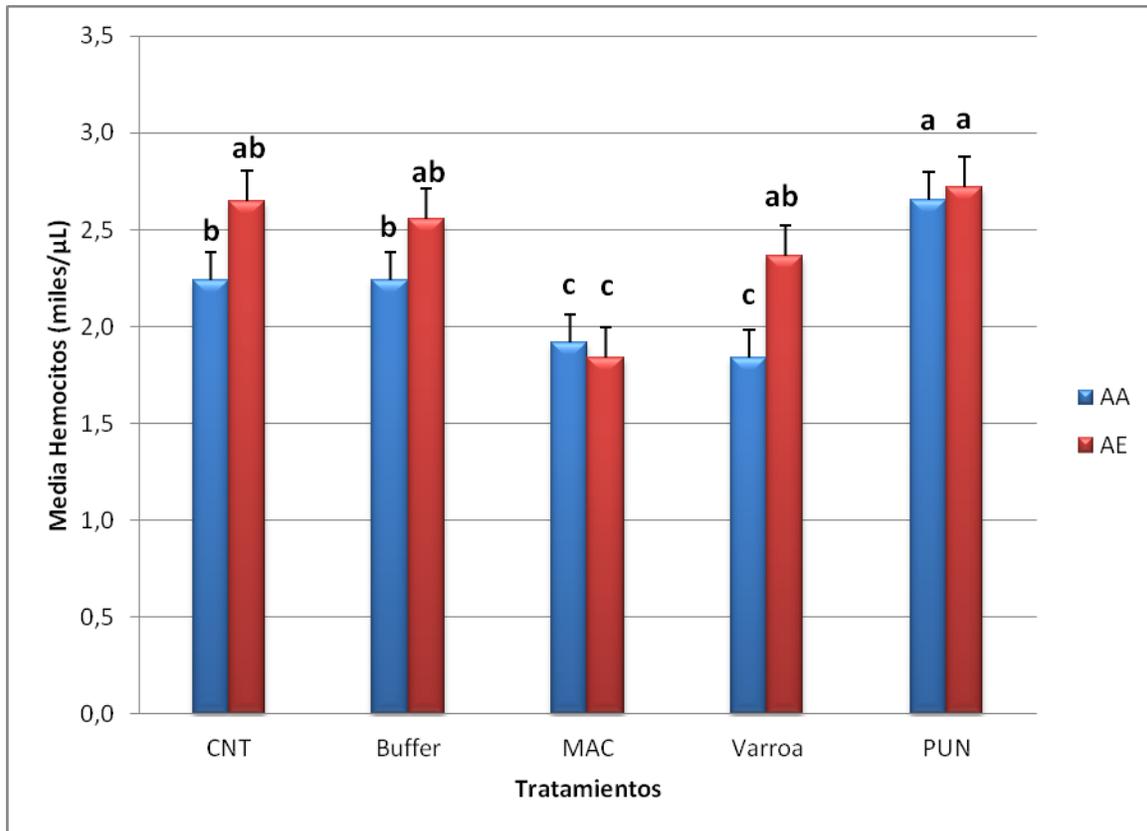
Figura 23. Esquema de las áreas de conteo de hemocitos en hemocitómetro.



Buffer: Buffer
MAC: Macerado de varroas
Varroa: Infestación artificial con el ácaro
PUN: Punción con alfiler entomológico
BEN: Jaulas tipo Benton
ENC: Jaulas de encierro o "Hoarding cages"

Figura 24. Número promedio de hemocitos/μL de hemolinfa (\pm EE) para abejas adultas africanizadas y europeas, inoculadas con solución salina (Buffer) o con un macerado de ácaros de *Varroa destructor*, y artificialmente infestadas con ácaros de *Varroa destructor* o puncionadas sépticamente con un alfiler entomológico. Las abejas testigo (sin tratamiento) se encerraron en jaulas de reina (BEN) o malla cribada (ENC).

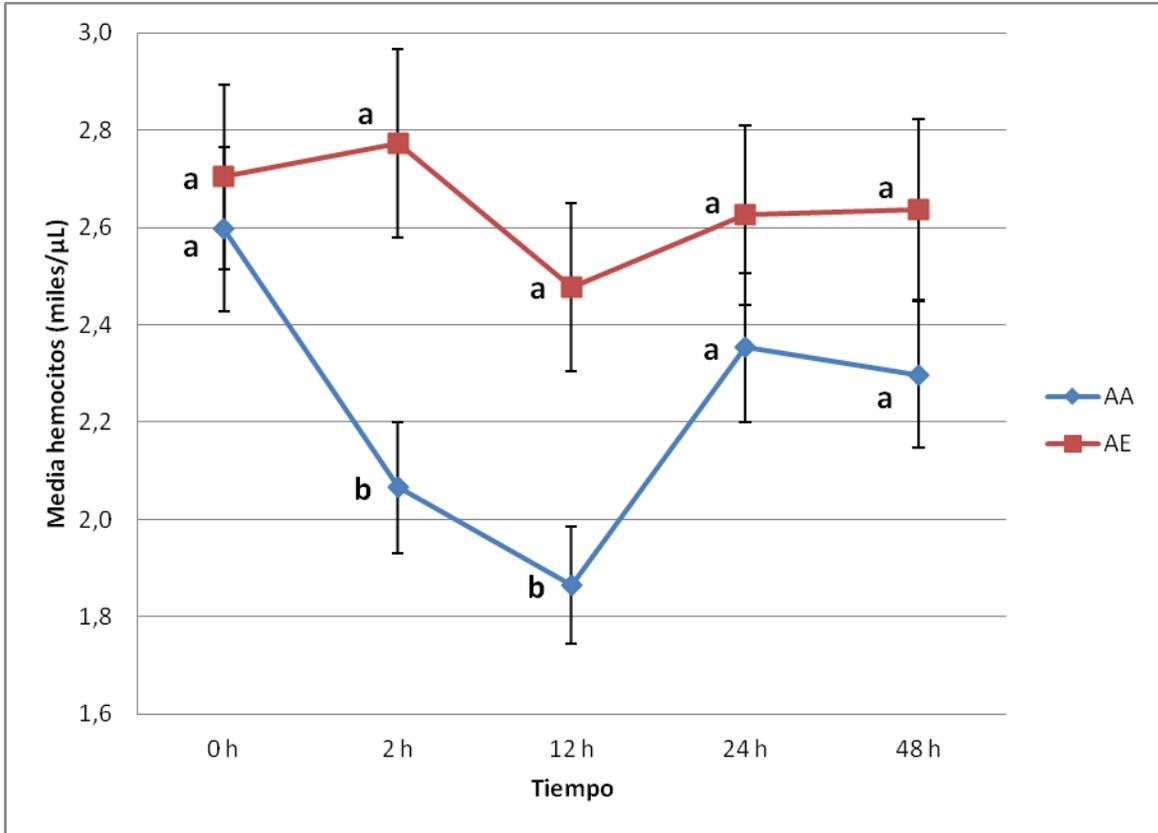
Literales diferentes indican diferencia estadística significativa.



CNT: Testigo
Buffer: Buffer
MAC: Macerado de varroas
Varroa: Infestación artificial con el ácaro
PUN: Punción con alfiler entomológico

Figura 25. Número promedio de hemocitos/μL de hemolinfa (\pm EE) para abejas adultas africanizadas (AA) y europeas (AE) sin tratamiento (testigo), inyectadas con Buffer, o con un macerado de ácaros de *Varroa destructor*, o bien artificialmente infestadas con ácaros de *Varroa destructor* o perforadas con alfiler entomológico.

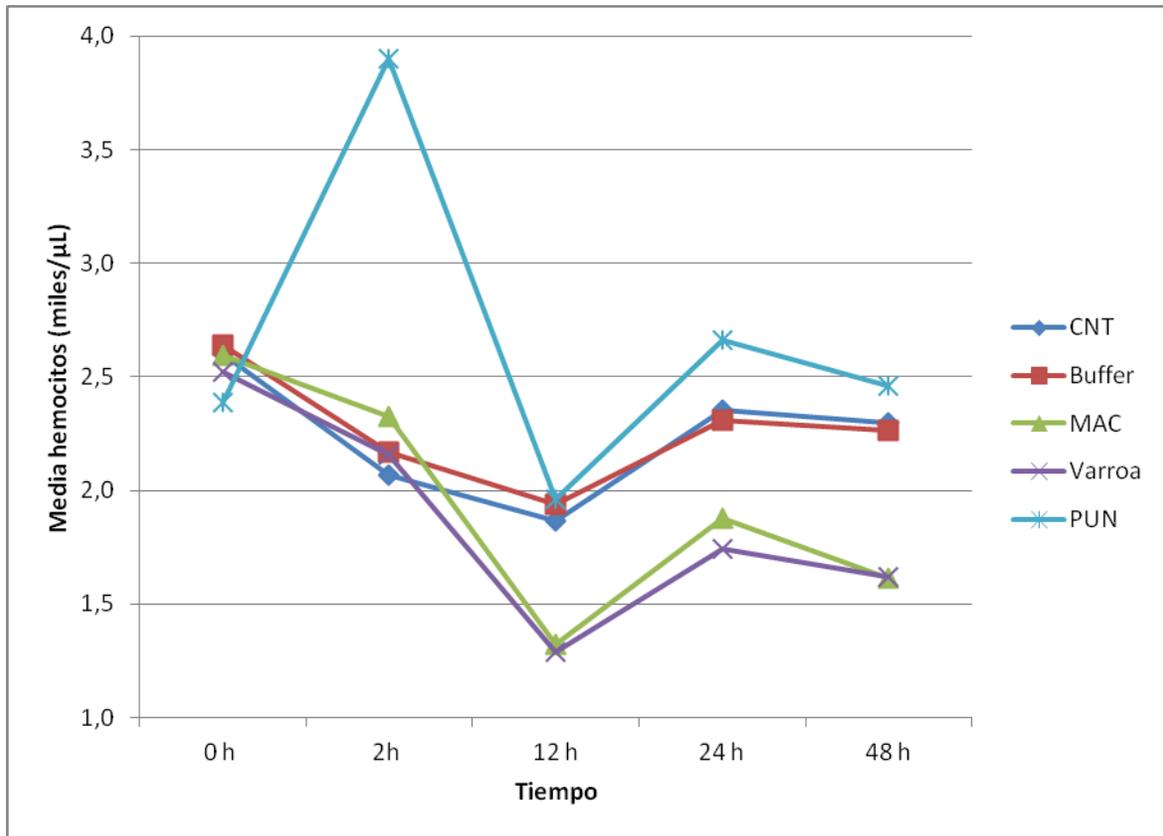
Literales diferentes indican diferencia estadística significativa



AA: Abejas africanizadas
AE: Abejas europeas

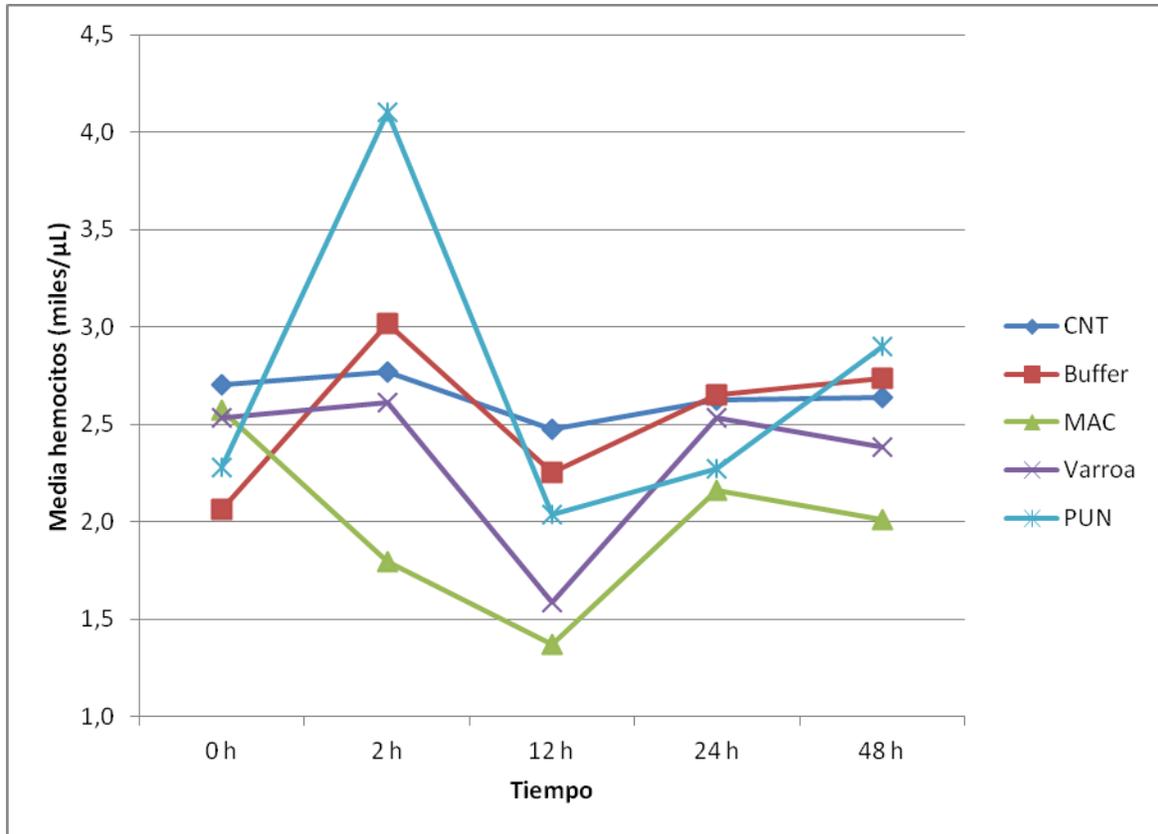
Figura 26. Efecto del genotipo y tiempo para el número promedio de hemocitos/μL de hemolinfa (\pm EE) para abejas africanizadas (AA) y europeas (AE) sin tratamiento (testigo) que fueron encerradas en jaulas durante 48 h en una incubadora.

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa



CNT: Testigo
Buffer: Buffer
MAC: Macerado de varroas
Varroa: infestación artificial con el ácaro
PUN: Punción con alfiler entomológico

Figura 27. Efecto de tratamiento y tiempo de exposición al tratamiento para el número promedio de hemocitos/μL de hemolinfa para abejas africanizadas que fueron encerradas en jaulas durante 48 h en una incubadora sin tratamiento (testigo), inyectadas con una solución salina buffer, o con un macerado de ácaros de *Varroa destructor* o bien infestadas artificialmente con ácaros de *Varroa destructor* o perforadas con un alfiler entomológico.



CNT: Testigo
Buffer: Buffer
MAC: Macerado de varroas
Varroa: infestación artificial con el ácaro
PUN: Punción con alfiler entomológico

Figura 28. Efecto de tratamiento y tiempo de exposición al tratamiento, para el número promedio de hemocitos/μL de hemolinfa para abejas europeas que fueron encerradas en jaulas durante 48 h en una incubadora sin tratamiento (testigo), inyectadas con una solución salina (buffer), o con un macerado de ácaros de *Varroa destructor*, o bien artificialmente infestadas con ácaros de *Varroa destructor*, o perforadas sépticamente con un alfiler entomológico.

CUADROS

Cuadro 1. Análisis de varianza de datos sometidos a transformación logarítmica para el efecto de tratamiento sobre el número de hemocitos/ μL en la hemolinfa de abejas adultas europeas y africanizadas.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Tratamiento	5	1737103669.700	347420733.940	12.007	<.0001
Error	1155	33450883129.854	28935829.550		

Cuadro 2. Análisis de la varianza de datos sometidos a transformación logarítmica para los efectos de genotipo, tratamiento, e interacción entre genotipos y tratamientos sobre el número de hemocitos/ μL en la hemolinfa de abejas europeas y africanizadas.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Genotipo	1	1.149	1.149	25.153	<.0001
Tratamiento	4	2.343	0.568	12.828	<.0001
Genotipo*Tratamiento	4	0.591	0.148	3.236	.0119
Error	1151	52.560	0.046		

Cuadro 3. Análisis de varianza de datos sometidos a transformación logarítmica para los efectos de genotipo, tiempo de encierro e interacción entre genotipo y tiempo de encierro sobre el número de hemocitos/ μL en la hemolinfa de abejas adultas europeas y africanizadas no sometidas a ningún tratamiento (testigo).

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Genotipo	1	0.895	0.895	23.524	<.0001
Tiempo	4	0.333	0.083	2.185	0.0699
Genotipo*Tiempo	4	0.206	0.051	1.353	0.2495
Error	421	16.021	0.038		

Cuadro 4. Análisis de varianza de datos sometidos a transformaciones logarítmicas para los efectos de tratamiento, tiempo de encierro e interacción entre tratamientos y tiempo de encierro sobre el número de hemocitos/ μL de hemolinfa en abejas africanizadas.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	4	1051865624.999	263966406.250	9.077	<.0001
Tiempo	4	1676175463.273	419043865.818	14.464	<.0001
Tratamientos*Tiempo	16	1224050092.971	76503130.811	2.641	.0005
Error	801	23206397453.707	28971782.090		

Cuadro 5. Análisis de varianza de datos sometidos a transformación logarítmica para los efectos de tratamiento, tiempo de encierro e interacción entre tratamiento y tiempo de encierro sobre el número de hemocitos/ μ L de hemolinfa en abejas adultas europeas.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	4	445204767.686	111301191.922	6.241	<.0001
Tiempo	4	675143315.830	168785828.957	9.464	<.0001
Tratamientos*Tiempo	16	824661901.846	51541368.865	2.890	.0002
Error	310	5528700059.993	17834516.323		