

# Informe final publicable de proyecto

## Efecto de la nutrición y división de tareas en la respuesta inmune de abejas *Apis mellifera*

Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2018\_1\_148431

04/07/2022

**BRANCHICCELA CORREA, Maria Belen** (Responsable Técnico - Científico)

**INVERNIZZI CASTILLO, Ciro** (Investigador)

**ZUNINO ABIRAD, Pablo** (Investigador)

**ANTÚNEZ CLAUSTRE, Karina** (Investigador)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"  
(Institución Proponente) \\

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"  
(Institución Proponente) \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\

FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE \\

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA

## Resumen del proyecto

Las abejas melíferas son organismos sociales y esta vida en sociedad implica división de tareas a distintos niveles. Uno de esos niveles se da en abejas obreras: abejas jóvenes realizan actividades de limpieza y cuidado del nido, mientras que las abejas mayores salen al campo en búsqueda de alimento. Uno de esos alimentos es el polen, principal fuente de proteínas y lípidos. Esta nutrición basada en el consumo de polen afecta la transición de tareas. Además, estudios basados en el consumo de polen demuestran su efecto sobre la inmunidad aunque otros factores presentes en el polen como su comunidad bacteriana o la presencia de pesticidas también tendrían efecto inmunomodulatorio. El objetivo del proyecto consistió en estudiar la relación entre la nutrición de las abejas, la transición de tareas y su sistema inmune. Tres grupos de colonias de abejas se alimentaron con una dieta sintética conteniendo los aminoácidos, aminoácidos y lípidos o se mantuvieron como control (sin suplementación). Todas las colonias se mantuvieron en carpas sin acceso al exterior para evitar el efecto de otras variables potencialmente asociadas a la modulación del sistema inmune y considerar únicamente el efecto de los aminoácidos y lípidos. Se analizó la expresión génica de abejas de 7 días y 14 días de edad, etapa promedio de transición dependiendo de la dieta recibida. En estas condiciones experimentales, el sistema inmune de las abejas no se vio afectado por la dieta recibida. Sin embargo, abejas que no recibieron suplementación nutricional mostraron una mayor expresión de genes vinculados a la transición de tareas, es decir que esas abejas estaban envejeciendo precozmente. Los resultados obtenidos contribuyen a comprender el efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas y constituyen un primer abordaje para considerar aquellos elementos necesarios a incluir en suplementos nutricionales diseñados para abejas.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Otros Tópicos Biológicos / Fisiología y nutrición**

**Palabras clave: Nutrición / división de tareas / Apis mellifera; respuesta inmune; transcriptómica /**

## Introducción

La abeja *Apis mellifera* es el principal organismo polinizador, favoreciendo la fecundación y fructificación de cultivos silvestres y comerciales [1,2]. De esta forma, cumple un rol clave en el mantenimiento de los ecosistemas naturales y contribuye significativamente a la producción agrícola [1,3–5]. Durante los últimos años, se han reportado episodios masivos de pérdida de colonias de abejas alrededor del mundo [6–9] y se ha planteado que la desnutrición de las mismas es un factor que contribuye sustancialmente a dichas pérdidas [7,10]. La desnutrición de las abejas está asociada al aumento de áreas de monocultivos, lo que determina una escasez de polen que en ocasiones no suministra todos los requerimientos nutricionales que la abeja precisa [10,11]. La nutrición de las abejas influye en su longevidad, transición de tareas y sistema inmune, entre otras variables [12–16]. Sin embargo, el mecanismo por el cual la nutrición afecta el sistema inmune no está aún dilucidado, ya que se ha reportado que una mejor nutrición activa o deprime la expresión de genes vinculados al sistema inmune, dependiendo de la variable analizada en los distintos estudios [12,16–18] (Corona, Branchiccela et al., en preparación; Branchiccela, en preparación). Además, se ha planteado que algunos de los mecanismos inmunológicos se asocian a cambios en el comportamiento de la abeja, el cual está influenciado por la nutrición [14,18] (Corona, Branchiccela et al., en preparación). De esta forma, el rol de la nutrición en el sistema inmune sería indirecto. En todos estos estudios se ha utilizado polen como fuente nutricional, el cual puede variar en su contenido de macro y micronutrientes [19,20], de patógenos infectivos [21], de pesticidas [22,23] y en sus comunidades microbianas asociadas [24], todos ellos con potencial efecto en el sistema inmune [25–30]. Además, es importante tener en cuenta que la fisiología de la abeja varía dependiendo de la época del año [31], por lo que todos estos factores deberían tenerse en cuenta a la hora de evaluar el rol de la nutrición en el sistema inmune.

Según los antecedentes planteados y teniendo en cuenta la importancia del sistema inmune individual y social para el mantenimiento de la homeostasis colonial, la hipótesis del presente proyecto postula que la nutrición afecta el comportamiento de la abeja y que el sistema inmune varía en asociación con estos cambios comportamentales. Además, los mecanismos inmunológicos se pueden comportar diferente al transitar de abeja nodriza a pecoreadora. Así, en abejas pecoreadoras algunos mecanismos se activan mientras que otras se deprimen. El objetivo general del proyecto fue analizar el rol de la nutrición sobre el sistema inmune de la abeja y su estado sanitario tomando las infecciones virales como marcadores. Para esto, tres grupos de colonias de abejas melíferas se mantuvieron en carpas sin acceso al exterior para evitar el ingreso de polen ambiental y el efecto de variables exógenas a los tratamientos. Todas las colonias recibieron una dieta base de polen de colza (*Brassica napus*), el cual es un polen rico nutricionalmente y necesario para

el mantenimiento de la homeostasis colonial en las condiciones del ensayo. Un grupo de colonias se alimentaron con una dieta sintética conteniendo los aminoácidos requeridos por la abeja, otro grupo se alimentó con aminoácidos y lípidos y el tercer grupo fue el control (sin suplementación proteica ni lipídica). Se comparó la expresión génica de abejas y los niveles de infección virales en abejas de 7 y 14 días de edad (etapa promedio de transición dependiendo de la dieta recibida), mediante RNAseq. El uso de la transcriptómica como herramienta para analizar el nivel de expresión génica permitió ampliar el espectro de vías de señalización asociadas a los mecanismos inmunológicos, nutricionales y de comportamiento, sin dirigir el estudio a variables específicas como sucede cuando se analizan las mismas por PCR en tiempo real.

Este proyecto permitió profundizar en los mecanismos por los cuales la nutrición afecta la fisiología de las abejas y constituyen un primer abordaje para considerar aquellos elementos necesarios a incluir en suplementos nutricionales diseñados para abejas.

## **Metodología/diseño del estudio**

### **1. Dietas empleadas**

Todas las colonias recibieron una dieta base de polen corbicular de colza (*Brassica napus*) colectado en agosto de 2020 durante el período de floración de este cultivo en INIA LE (Colonia, Uruguay). El polen se colectó a diario y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El origen botánico de este polen fue corroborado por análisis palinológicos [32] por la Dra. Estela Santos (Sección etología, Facultad de Ciencias, UdelaR). Además, se analizó su porcentaje de proteínas y lípidos mediante la técnica de Kejhdaal y Anchom Technology, respectivamente, en el Laboratorio de nutrición de INIA LE. El polen colectado se homogeneizó con jarabe de sacarosa en una proporción 15:1 (polen:jarabe) con el fin de obtener tortas homogéneas, se fraccionó en tortas de 100 gr y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Por otro lado, se utilizaron dos dietas diferentes de síntesis química: aminoácidos (A), aminoácidos y lípidos (AL), y una dieta control (C), que consistió en jarabe de sacarosa 1:1 azúcar y agua (vehículo de las dietas de A y AL). Las dietas de aminoácidos y lípidos

fueron diseñadas por el Dr. Miguel Corona (Bee Laboratory, USDA) quien las utiliza tanto a nivel de laboratorio como de campo para evaluar el efecto de la nutrición en distintas variables de las abejas. La diversidad y proporción de los componentes de la dieta se determinaron luego de estudios exhaustivos tanto teóricos como prácticos vinculados a las necesidades nutricionales que requieren las abejas y otros organismos afines [11,33]. La ventaja de utilizar estas dietas consiste en la posibilidad de controlar de forma precisa el contenido nutricional de las mismas y descartar el efecto de otros factores comúnmente encontrados en el polen y que pueden afectar el sistema inmune como potenciales patógenos, pesticidas y comunidades microbianas

### **2. Colonias de abejas melíferas**

Durante la primavera de 2020, se establecieron núcleos con reinas hermanas. En diciembre del mismo año, se seleccionaron 12 núcleos con nivel de postura homogénea y similar cantidad de abejas adultas. La población de abejas se determinó como cantidad de calles cubiertas por abeja asumiendo que en cada calle ambas caras de cuadro están cubiertos 100% por abejas. La cantidad de cría se estimó por el método subjetivo de porcentaje de cara de cuadro cubierto por cría, según el método descrito en el Beebook [34]. Se eliminaron las reservas de miel y polen de los núcleos.

### **3. Diseño experimental**

Los 12 núcleos se dividieron al azar en 3 grupos de 4 núcleos cada uno ( $N=4$  núcleos por grupo). Todos recibieron la dieta base, y a su vez las colonias de esos 3 grupos recibieron una dieta diferente: A (aminoácidos), AL (aminoácidos+lípidos) o C (control). Los núcleos se dispusieron en 4 carpas (60 mt<sup>3</sup> aproximadamente cada una), colocando un núcleo de cada grupo por carpa (Figura 1). Este diseño contempla el "efecto carpa" que pudiera haber. Experimentos previos han demostrado que en estas condiciones los núcleos mantienen su población sin que se verifique deriva de abejas de unos a otros [35]. Dichas carpas evitan que las abejas salgan a pecorear al campo e ingresen polen a los núcleos. En el centro de cada carpa se dispusieron alimentadores para abejas conteniendo agua. También en cada carpa se colgaron alimentadores de colibrí conteniendo jarabe de sacarosa (proporción 2:1 de azúcar y agua). Estos alimentadores tienen pequeños orificios donde las abejas colectan el jarabe y su diseño evita que se genere pillaje. Tanto el agua como el jarabe se recambió cada 24 hs. El día previo al inicio del ensayo se tomaron cuadros de abejas emergiendo de cada núcleo, se identificaron y se incubaron toda la noche a  $34^{\circ}\text{C}$  y 60-70% de humedad [36]. Las abejas recién emergidas se marcaron en el tórax con pintura apta para tal fin (Uni-Posca 1.8-2.5 mm) y cada grupo se identificó con un color diferente [37]. Se marcaron 8 veces más abejas de las necesarias para asegurar la disponibilidad de estas en los muestreos. Las abejas marcadas se reintrodujeron en sus respectivas colmenas (día 0). En cada núcleo se administró 250 ml cada 24 hs de la

dieta correspondiente en alimentador. A los siete días de comenzado el ensayo se colectaron abejas marcadas con comportamiento de nodrizas (al menos N=30 por núcleo) y a los 14 días se colectaron abejas marcadas ubicadas en el sitio más alejado al nido de cría (al menos N=30 por núcleo). El objetivo inicial era que en esta segunda colecta se colectaran abejas pecoreadoras, pero a los 14 días las abejas aún no habían comenzado a pecorear y debido a las condiciones de confinamiento y la consecuente disminución de actividad de pecoreo, se corría riesgo que la dinámica colonial se alterara demasiado con el transcurrir de los días. Las abejas llegaron vivas al laboratorio y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación del ARN.

#### 4. Análisis de expresión génica y niveles de infección virales

##### 4.1. Procesamiento de abejas y extracción de ARN

En primer lugar, se seleccionaron tres núcleos por grupo eliminando aquel núcleo que mostró un comportamiento diferencial con respecto al resto de su grupo. Posteriormente, con el objetivo de analizar la expresión génica y los niveles de infección virales en la cabeza y en el tórax+abdomen, se separaron ambas regiones de cada abeja. Esto se debe a que, si bien se buscaba analizar la expresión de todos los genes de la abeja, se hizo especial énfasis en los vinculados a la inmunidad. Se esperaba que aquellos genes asociados a la inmunidad social se expresaran principalmente a nivel del sistema nervioso central, mientras que los mecanismos vinculados a la producción de péptidos antimicrobianos y respuesta celular se expresaran principalmente en el tórax y abdomen. Se tomaron 12 cabezas y 12 tórax+abdomen pertenecientes a las abejas de cada núcleo se homogenizaron en Trizol (Invitrogen). El homogeneizado obtenido se utilizó para la extracción de ARN utilizando el Purelink RNA minikit (Invitrogen) incluyendo cloroformo en el procedimiento, según las indicaciones del fabricante.

##### 4.2. Secuenciación de ARN

El ARN obtenido (al menos  $1\mu\text{g}$ ) se envió en hielo seco al servicio de secuenciación de Genewiz LTD (Estados Unidos), donde se digirió el ADN, se prepararon las librerías y se secuenciaron de forma pareada fragmentos de 150 pb aproximadamente en un

equipo Illumina Hi-Seq. La profundidad del análisis fue de 30 millones de lecturas por muestra aproximadamente. Dicha profundidad se estableció teniendo en cuenta los resultados de porcentaje de cobertura del genoma de la abeja según el número de lecturas obtenido en estudios previos [28,38].

##### 4.3. Análisis de expresión génica

El procesamiento primario de las lecturas obtenidas consistió en un análisis de calidad mediante el programa FASTQC y su corte y filtrado de secuencias de baja calidad utilizando el programa Trimmomatic. El tamaño mínimo de lecturas aceptado fue de 40 pb y las lecturas no pareadas fueron eliminadas. Una vez filtrados las lecturas fueron mapeadas al genoma de referencia de *Apis mellifera* (Amel\_HAV3.1) disponible públicamente en la base de datos genómico del NCBI con el programa HISAT2. La determinación de las lecturas encontradas para cada gen se realizó con el programa featureCounts, sobre CDS, genes y exones, descartando la opción de alineamiento múltiple. Con esta información, se determinaron los genes diferencialmente expresados para cada condición (Dieta \* Tiempo) con el programa DESeq2. En este punto los análisis para cada una de las regiones (cabeza o tórax+abdomen) se realizaron por separado ya que se determinó que los sets de datos eran extremadamente diferentes y eso podría llevar a una subestimación del aporte del resto de las condiciones a los distintos perfiles de expresión génica (Fig. 2). Una vez establecidas las listas de expresión diferencial, se analizaron los procesos biológicos enriquecidos como consecuencia de los tratamientos administrados mediante ontología génica, utilizando la herramienta disponible en la base de datos de la HymenopteraMine V1.5 (<https://hymenopteramine.rnet.missouri.edu/>).

##### 4.4. Efecto de las dietas sobre los niveles de infección virales

Si bien se utilizaron núcleos en buen estado sanitario en relación con *V. destructor* y *Nosema* spp., y las posibilidades de contagio de patógenos se minimizaron debido al diseño experimental planteado, las abejas suelen emerger con ciertos niveles de virus ARN. Por tal motivo, se evaluó los efectos de las distintas dietas en los niveles de infección con los principales virus que afectan a las abejas melíferas: Virus de la parálisis aguda (ABPV), Virus de las celdas reales negras (BQCV), Virus de las alas deformes (DWV), Virus de la parálisis crónica (CBPV), el Virus Kashmir (KBV), el Virus de la parálisis israelí (IAPV) y el Virus de la cría en sacada (SBV). Para esto, se utilizaron los mismos datos filtrados pero el mapeo se realizó sobre un 'pseudogenoma' que se construyó mediante una concatenación de los genomas los 7 virus antes mencionados obtenidos de las bases de datos públicas. Buscando los mismos mecanismos de normalización de la expresión génica, los datos de los recuentos de genes virales se agregaron a la tabla de expresión génica del hospedero y se realizó el mismo procesamiento con el programa DESeq2.

## Resultados, análisis y discusión

## Dieta base

Con el fin que las colmenas mantuvieran su homeostasis colonial en las condiciones de confinamiento, todas ellas recibieron una dieta base de polen de colza (*Brassica napus*). Su porcentaje de proteína cruda fue de 29,8% y su contenido de lípidos de 7,42%. Ambos porcentajes demuestran que se trata de un polen rico nutricionalmente y provee los valores necesarios de ambos parámetros para permitir el desarrollo colonial [33,39].

## Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas

Se construyeron tres librerías de cada uno de los grupos experimentales: A (abejas de colonias suplementadas con aminoácidos), AL (abejas de colonias suplementadas con aminoácidos y lípidos) y C (abejas de colonias que no recibieron suplementación, control). En promedio, se obtuvieron unos 34 millones lecturas por cada librería. Las lecturas de baja calidad se filtraron, obteniéndose en promedio un 94,7% de lecturas limpias para mapear con el genoma de *A. mellifera* (94% de las secuencias de buena calidad).

Como se mencionó previamente, los tórax+abdomen y cabezas mostraron un patrón de expresión génica extremadamente diferencial con el componente principal explicando el 95% de la variabilidad observada (Fig. 2). Además, la mayor cantidad de genes cuya expresión varió como consecuencia de los suplementos administrados fue en las cabezas, principalmente a los 14 días de edad. A continuación, se describen los cambios más significativos observados a nivel de expresión génica, de acuerdo con los objetivos del proyecto.

A los 7 días de edad, no se observaron diferencias en la expresión génica de las abejas como consecuencia de los suplementos administrados ni en las cabezas ni en los abdómenes. Únicamente, once genes estuvieron sobre expresados en las cabezas de las abejas del grupo A con respecto a las del grupo AL, pero se trata de genes no caracterizados o genes cuya función no resulta de interés según los objetivos del proyecto.

A los 14 días de edad, se dieron los mayores cambios en la fisiología de las abejas. En las cabezas, la expresión de 317 genes se vio afectada al comparar abejas de los grupos A y C y 81 transcritos se expresaron diferencialmente al comparar abejas de los grupos AL y C. Las abejas del grupo C fueron las que presentaron mayor cantidad de genes sobre expresados en ambas comparaciones, 239 genes estuvieron sobre expresados en relación con las abejas del grupo A y 64 genes sobre expresados en relación con las abejas del grupo AL. Ninguno de estos genes está vinculado a efectores del sistema inmune o son característicos de las distintas vías que determinan la expresión de efectores claves de la inmunidad de las abejas [40]. Con el objetivo de realizar un abordaje funcional, se hizo un estudio de ontología génica, y para profundizar en el posible efecto de los suplementos administrados en la transición de tareas, se seleccionaron aquellos procesos vinculados a la memoria, aprendizaje y cognición, al comportamiento y a la locomoción, ya que es esperable que se den cambios sustanciales en estas funciones como consecuencia de un cambio de comportamiento. Dentro estas funciones, se compartieron genes como el receptor de ecdisona (*Ecr*), el factor de transcripción tipo *blk1* (*Mblk1*), *bruchpilot* (*bro*) y el gen que codifica para la proteína *Foxp* (*Foxp*). Todos ellos están asociados a la regulación de la transición de tareas [41,42], comprobando el rol que tiene la nutrición basada en proteínas y lípidos en este parámetro.

Por otro lado, 78 genes estuvieron sobre expresados en abejas del grupo A y 17 genes en el grupo AL en relación con el grupo C. En este caso, tampoco se observó una relación entre las suplementaciones administradas y genes vinculados al sistema inmune ni tampoco se identificaron procesos biológicos enriquecidos. Dentro de los genes sobre expresados en abejas de los grupos A y AL, se destacan algunos genes vinculados a la vía del citocromo p450. Esta es una de las tres vías asociadas a la detoxificación en abejas, y es especialmente sensible a su estado nutricional [43]. Sus funciones se asocian a la detoxificación de una amplia gama de compuestos presentes en la naturaleza provenientes de la miel y el polen, y compuestos sintéticos como neonicotinoides y acaricidas comúnmente utilizados en la apicultura [43]. Por último, no se observaron diferencias en la expresión génica de las cabezas entre abejas de los grupos A y AL.

A nivel de los tórax+abdomen, no se observaron diferencias en la expresión génica entre las abejas de los tres grupos a los 7 días de edad. A los 14 días de edad, 11 transcritos se encontraron diferencialmente expresados al comparar abejas de los grupos AL y C. De estos 11 transcritos, 7 estaban sobre expresados en abejas del grupo C y 4 en abejas del grupo AL. Es relevante destacar, que dentro de los genes sobre expresados en abejas que recibieron suplementación con aminoácidos y lípidos (AL), se encontró una mayor expresión del gen que codifica para la vitelogenina. Esta proteína tiene efectos pleiotrópicos. Se sintetiza en los cuerpos grasos del abdomen en asociación a la ingesta de proteínas y lípidos, y es liberada a la hemolinfa, siendo el principal transportador de estos nutrientes por el cuerpo de la abeja [44,45]. Promueve la síntesis de jalea real, disminuye el estrés oxidativo y está asociada a la regulación de la transición de tareas, mostrando altos niveles de *vg* en abejas en etapa de nodriza, y bajos niveles en etapa de pecoreadora [44,46,47].

Por otro lado, 7 transcritos estuvieron diferencialmente expresados al comparar abejas de los grupos A y C. En este caso, solamente 2 de ellos estuvieron sobre expresados en las abejas del grupo C. Uno de ellos es el gen *PDK1*. *PDK1* es un efector clave en la cascada de señalización de insulina/IGF, la cual coordina el crecimiento celular en respuesta a señales endócrinas y nutricionales, jugando un rol clave en la regulación del crecimiento [48]. Los restantes 5 genes

estuvieron sobre expresados en abejas del grupo A. Ninguno de estos genes se asocian al sistema inmune o a la transición de tareas.

Por último, nueve genes estuvieron diferencialmente expresados entre abejas de los grupos A y AL: cuatro de ellos mostraron una mayor expresión en las abejas del grupo A y cinco de ellos en las abejas del grupo AL. Dos genes aún no anotados (LOC102655202 y LOC100577825) están también sobre expresados en abejas del grupo C en comparación a AL, sugiriendo que sus expresiones son sensibles a la falta de lípidos. Por último, dentro de los genes sobre expresados en abejas del grupo AL se encuentra el precursor 3 de la apidermina, gen cuya expresión depende de la dieta, y en particular a la fracción lipídica del polen [49].

#### Nivel de infección viral

De los siete virus analizados, los únicos detectados fueron el BQCV y DWV. No se observaron diferencias en los niveles de infección del BQCV entre las abejas de los distintos grupos considerando las cabezas o el tórax+ abdomen. Por otro lado, los niveles de infección con el DWV fueron mayores a los 7 y 14 días de edad en abejas alimentadas con aminoácidos y lípidos (AL) en comparación a las alimentadas con dieta base (C). Estos resultados coinciden con los observados en estudios previos a nivel laboratorio [28] para el DWV y de campo en el cual se observó mayores niveles de infección con el DWV, ABPV y SBV en colonias suplementadas con polen en comparación a colonias bajo estrés nutricional, no observándose dicha relación para el BQCV [50]. Teniendo en cuenta que se tratan de patógenos intracelulares obligados cuya replicación depende de forma estricta de los recursos celulares, una mayor maquinaria celular podría estar favoreciendo la replicación viral, aunque esto también beneficiaría a las abejas a resistir a esas infecciones virales.

En resumen, en las condiciones experimentales, la suplementación con proteínas o proteínas y lípidos no tuvieron un efecto sobre el sistema inmune de la abeja. Este resultado era inesperado. Sin embargo, es importante considerar que el mantenimiento del sistema inmune es energéticamente costoso [51] y por lo tanto, también es esperable que la magnitud de la respuesta asociada a la nutrición de las abejas se despliegue frente a una situación necesaria, como la infección con un patógeno. En este sentido, se deberían realizar estudios complementarios en los que, con un diseño experimental similar, se desafíen las colonias con distintos patógenos. El resultado previamente mencionado deja abierto un abanico de posibilidades vinculadas a los factores que afectan la respuesta inmune individual y social de las abejas. Por un lado, es posible que la microbiota asociada al polen o la microbiota intestinal de las abejas, sean el principal factor que afecta la inmunidad. En este sentido, se han identificado bacterias con efectos inmunomodulatorios [25]. Por otro lado, es posible también, que las diferentes respuestas inmunes observadas en los trabajos previos se debiera a la presencia y niveles de pesticidas presentes en el polen utilizado y/o de patógenos infectivos, con o sin asociación a la calidad nutricional de los pólenes administrados. Por último, también es posible que esas respuestas inmunes diferenciales respondan simplemente a una inmunocompetencia asociada la fisiología de la abeja según la época del año y/o la alimentación recibida durante su etapa larval. El estudio de todas estas variables es relevante a la hora de profundizar en los factores que afectan el sistema inmune con la nutrición jugando un rol predominante dentro de estos factores. Por otro lado, los resultados demuestran un claro efecto de la suplementación proteica y lipídica sobre mecanismos vinculados a la regulación de transición de tareas. Abejas alimentadas con dietas ricas transicionan más tarde a abejas pecoreadoras y por lo tanto, tienen una mayor expectativa de vida. Además, una mayor inversión en etapa de nodriza, podría mejorar las características nutricionales de las futuras generaciones de abejas debido a una mayor capacidad de alimentación y cuidado parental. Teniendo en cuenta que se ha planteado el estrés nutricional como un factor asociado a las pérdidas de colmenas, estos resultados demuestran cuáles serían los mecanismos fisiológicos involucrados.

#### Conclusiones y recomendaciones

En las condiciones experimentales, la suplementación con proteínas o proteínas y lípidos no tuvieron un efecto sobre el sistema inmune de la abeja, sino que su principal efecto se observa mediante la regulación de la transición de tareas. Esto tiene especial implicancia en la expectativa de vida de las abejas y demuestran los procesos fisiológicos que se dan asociados al efecto de la nutrición sobre las pérdidas de colonias.

## Referencias bibliográficas

1. Morse R a, Calderone NW. The value of honey bees as pollinators of U . S . Crops. *Bee Cult.* 2000; 1–15.
2. Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks L V., et al. Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. UNEP/GRID Eur. Bonn, Germany: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services; 2016. doi:10.1007/s00442-010-1809-8
3. Santos E, Mendoza Y, Vera M, Carrasco-letelier L, Díaz S, Invernizzi C. Increase in Soybean (*Glycine max*) Production Using Honey Bees (*Apis mellifera*). *Agrociencia Uruguay.* 2013;17: 81–90.
4. Santos E, Mendoza Y, Díaz R, Harriet J, Campá J. Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. *Ser difusión INIA.* 2009;568: 25–28.
5. Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci.* 2007;274: 303–13. doi:10.1098/rspb.2006.3721
6. vanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol.* 2010;103: S80–S95. doi:10.1016/j.jip.2009.06.011
7. Carreck N, Neumann P. Honey bee colony losses. *J Apic Res.* 2010;49: 1. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.01
8. Potts SG, Roberts SPM, Dean R, Marris G, Brown MA, Jones R, et al. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J Apic Res.* 2010;49: 15–22. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.02
9. Moritz RFA, Erler S. Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agric Ecosyst Environ.* 2016;216: 44–50. doi:10.1016/j.agee.2015.09.027
10. Naug D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol Conserv.* 2009;142: 2369–2372. doi:10.1016/j.biocon.2009.04.007
11. De Groot AP. Protein and Amino Acids Requirements of the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiologia comparata et oecologia.* 1953. pp. 197–285.
12. DeGrandi-Hoffman G, Chen Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;10: 170–176. doi:10.1016/j.cois.2015.05.007
13. Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One.* 2013;8: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0072016
14. Ament SA, Wang Y, Robinson GE. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: Toward a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2: 566–576. doi:10.1002/wsbm.73
15. Corona M, Velarde R a, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes K a, et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 7128–7133. doi:10.1073/pnas.0701909104
16. Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett.* 2010;6: 562–565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986
17. Castelli L, Branchiccela B, Santos E, Zunino P, Antúnez K. Efecto de la nutrición en la inmunidad y la comunidad microbiana intestinal de abejas melíferas sanas. XI Encuentro Nacional de Microbiólogos. Montevideo; 2015.
18. Bull JC, Ryabov E V., Prince G, Mead A, Zhang C, Baxter LA, et al. A Strong Immune Response in Young Adult Honeybees Masks Their Increased Susceptibility to Infection Compared to Older Bees. *PLoS Pathog.* 2012;8: 11–14. doi:10.1371/journal.ppat.1003083
19. Brodschneider R, Crailsheim K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie.* 2010;41: 278–294. doi:10.1051/apido/2010012
20. Somerville DC. Nutritional value of bee collected pollens. *Rural Ind Res Dev Corp.* 2001; 1–166.
21. Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, Vanengelsdorp D, et al. RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One.* 2010;5: e14357. doi:10.1371/journal.pone.0014357
22. Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol.* 2006;99: 253–262. doi:10.1603/0022-0493-99.2.253
23. Porrini C, Mutinelli F, Bortolotti L, Granato A, Laurenson L, Roberts K, et al. The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. Nieh JC, editor. *PLoS One.* 2016;11: e0155411. doi:10.1371/journal.pone.0155411
24. Castelli L. Una aproximación al estudio de la comunidad microbiana de las abejas melíferas. Univerisdad de la Republica. 2017.

25. Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R Soc Open Sci.* 2017;4: 170003. doi:10.1098/rsos.170003
26. Garrido PM, Porrini MP, Antúnez K, Branchiccela B, Martínez-Noél GMA, Zunino P, et al. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Vet Res.* 2016;47: 1–9. doi:10.1186/s13567-016-0335-z
27. Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol.* 2009;11: 2284–2290. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
28. Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y. Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics.* 2011;12: 496. doi:10.1186/1471-2164-12-496
29. Evans JD, Lopez DL. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 2004;97: 752–6. doi:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2
30. Chan QW, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics.* 2009;10: 387. doi:10.1186/1471-2164-10-387
31. Steinmann N, Corona M, Neumann P, Dainat B. Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PLoS One.* 2015;10: e0129956. doi:10.1371/journal.pone.0129956
32. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of melissopalynology. *Bee World.* 1978;5: 139–153. doi:10.1080/0005772X.1978.11097714
33. Arien Y, Dag A, Yona S, Tietel Z, Lapidot Cohen T, Shafir S. Effect of diet lipids and omega-6:3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body composition. *J Insect Physiol.* 2020;124. doi:10.1016/j.jinsphys.2020.104074
34. Delaplane KS, Steen J Van Der, Guzman-novoa E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J Apic Res.* 2013;52: 1–12. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.03
35. Invernizzi C, Nogueira E, Juri P, Santos E, Arredondo D, Branchiccela B, et al. Epornemis cestri secretions in *Sebastiania schottiana* trees cause mass death of honey bee *Apis mellifera* larvae in Uruguay. *PLoS One.* 2018;13: 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0190697
36. Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet V, Eisenhardt D, et al. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J Apic Res.* 2013;52: 1–36. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.04
37. Scheiner R, Abramson CI, Brodschneider R, Crailsheim K, Farina WM, Fuchs S, et al. Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *J Apic Res.* 2013;52: 1–58. doi:10.3896/IBRA.1.52.4.04
38. Manfredini F, Brown MJF, Vergoz V, Oldroyd BP. RNA-sequencing elucidates the regulation of behavioural transitions associated with the mating process in honey bee queens. *BMC Genomics.* 2015;16: 563. doi:10.1186/s12864-015-1750-7
39. Kleinschmidt GJ, Kondos AC. Influence of crude protein levels on colony production. *Australas Beekeep.* 1976; 36–39.
40. Evans J, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol.* 2006;15: 645–656. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x
41. Barchuk AR, Bitondi MMG, Simões ZLP. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J Insect Sci.* 2002;2: 1–8. doi:10.1673/031.002.0101
42. Hartfelder K, Bitondi M, Santana WC, Hartfelder K, Bitondi MMG, Santana WC, et al. Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: Loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? . *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32: 211–216. doi:10.1016/S0965-1748(01)00100-X
43. Berenbaum MR, Johnson RM. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;10: 51–58. doi:10.1016/j.cois.2015.03.005
44. Amdam G V., Ihle KE, Page RE. Regulation of honeybee worker (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. *Horm Brain Behav Online.* 2010; 1003–1027. doi:10.1016/B978-008088783-8.00029-2
45. Cremonese TM, De Jong D, Bitondi MMG. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 1998;91: 1284–1289. doi:10.1093/jee/91.6.1284
46. Amdam GV, Omholt SW. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J Theor Biol.* 2002;216: 209–228. doi:10.1006/jtbi.2002.2545
47. Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam G V., Barchuk AR, Omholt S, Simões ZLP, et al. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett.* 2005;579: 4961–4965. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.085
48. Wang Y, Amdam G V., Rueppell O, Wallrichs MA, Fondrk MK, Kaftanoglu O, et al. PDK1 and HR46 Gene Homologs Tie Social Behavior to Ovary Signals. *PLoS One.* 2009;4: e4899. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0004899
49. Annoscia D, Zanni V, Galbraith D, Quirici A, Grozinger C, Bortolomeazzi R, et al. Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by *Varroa* mite ectoparasites. 2017 [cited 30 Jun 2022]. doi:10.1038/s41598-017-06488-2

50. Branchiccela B, Castelli L, Corona M, Díaz-Cetti S, Invernizzi C, Martínez de la Escalera G, et al. Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci Rep.* 2019;9: 10156. doi:10.1038/s41598-019-46453-9
51. Lochmiller RL, Deerenberg C. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos.* 2000;88: 87–98. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x

### **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)