

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



***CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE DEFENSINA-1 Y
ACTIVIDAD DE GLUCOSA OXIDASA EN MIEL COMO
INDICADORES DE LA INFECCIÓN POR NOSEMA CERANAE
EN ABEJAS.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y
Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

GONZALO FELIPE CEBRERO ACUÑA

Directores de tesis:

Dr. Edwar R. Fuentes Pérez

Dr. Mauricio A. Báez Larach

Santiago-Chile

ENERO 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

GONZALO FELIPE CEBRERO ACUÑA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes P. _____

Co-director de Tesis:

Dr. Mauricio Báez L. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. M^a Antonieta Valenzuela P. _____

Dra. M^a Estrella Báez C. _____

Dra. M^a Inés Becker C. _____

“Al final del viaje está el horizonte. Al final del viaje partiremos de nuevo. Al final del viaje comienza un camino, otro buen camino...”

Silvio Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a mi director de tesis Edwar por la oportunidad de desarrollar este trabajo, su apoyo, paciencia, comprensión y su rol en mi formación profesional que abarcó más que sólo el plano académico, sino también en mi desarrollo como persona. A él debo la consolidación de mi interés por la ciencia y el perseguir extender las fronteras del conocimiento. A mi co-director Mauricio por su buena disposición, contribución al desarrollo del trabajo logrado y por abrirme las puertas de su laboratorio donde tuve la oportunidad de ampliar más mis conocimientos en el campo de la ciencia.

A mi familia, al sacrificio y entrega de mi madre Verónica y al ejemplo de mi padre Sergio. A mis hermanos Carolina, Sergio y Estefanía, por estar presente cuando se necesitó y por su compañía a lo largo de mi vida. A mis abuelos, en especial a Carmen por su cariño y ayuda en momentos difíciles.

A mi compañera de tantos años y esposa Lorena, por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, en especial en los altos y bajos a lo largo de la carrera universitaria. A sus padres Noema y Eugenio, por su ayuda, sus enseñanzas y hacerme sentir uno más de su familia.

A los amigos que encontré durante la carrera, por tantas risas, alegrías, noches de estudio, penas y frustraciones que permitieron el desarrollo de un vínculo que espero se mantenga a lo largo de los años. A mis compañeros de laboratorio de LQA-COET, por su apoyo y compañerismo, y en especial algunas extenuantes jornadas de trabajo compartidas, donde primó la compañía, la colaboración y la amistad. Al grupo de trabajo de laboratorio de Bioquímica de nuestra facultad, por su asistencia técnica y buenos momentos compartidos. Al grupo de trabajo del laboratorio de Biomedicina de la UDD por acogerme en el marco del desarrollo de la tesis.

A todos los docentes que participaron en mi formación y al personal de apoyo que mantiene todo funcionando.

Gracias de todo corazón.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza (LQA-COET) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Biomedicina de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo. La tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1140328.

TABLA DE CONTENIDO

FINANCIAMIENTO.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
Polinización e Impacto Económico.....	1
Desorden del Colapso de Colonia.....	2
<i>Nosema ceranae</i>	3
Inmunidad en abejas.....	5
Abejas y Miel.....	7
Herramientas analíticas para caracterizar defensina-1 y actividad de GOX.....	9
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS GENERALES.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIALES.....	14
MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	23
1. Obtención de péptido antimicrobiano Defensina-1 de <i>Apis mellifera</i> puro.....	23
1.1 Diseño de secuencia de Defensina-1.....	23
1.2 Obtención Defensina-1.....	24
1.3 Análisis por MALDI-TOF/MS.....	25
2. Caracterización espectroscópica y determinación de la presencia de enlaces disulfuro en el péptido Defensina-1 recombinante.....	26
2.1 Caracterización espectroscópica.....	26
2.2 Cuantificación enlaces disulfuro.....	31

3. Comparación de los perfiles de fluorescencia total de la fracción de miel entre 3 y 10 kDa de <i>Apis mellifera</i> infectadas con <i>Nosema ceranae</i> y sanas.....	32
3.1 Identificación de colmenas infectadas con <i>Nosema ceranae</i>	32
3.2 Caracterización espectroscópica.....	33
3.3 Cuantificación proteínas totales.....	38
3.4 Determinación puentes disulfuro.....	41
4. Evaluación la actividad de la enzima glucosa oxidasa en miel de abejas sanas e infectadas con <i>Nosema ceranae</i>	45
4.1 Actividad de Glucosa Oxidasa.....	45
5. Determinación de la actividad antimicrobiana de mieles sanas e infectadas con <i>N. ceranae</i>	48
5.1 Ensayos de concentración inhibitoria mínima.....	48
5.2 Actividad antimicrobiana contra Gram-positivas.....	49
5.3 Actividad antimicrobiana contra Gram-negativas.....	51
6. Análisis de componentes principales (PCA)	53
CONCLUSIÓN.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Propagación patógenos en abejas.....	3
Figura 2. Isoformas Defensina-1 de abeja.....	7
Figura 3. Representación esquemática de PARAFAC.....	10
Figura 4. Composición de Matrices desde información trilinear	11
Figura 5. Muestras de miel utilizadas en este trabajo.....	18
Figura 6. Diseño de la secuencia de ADN propuesta para expresar defensina-1.....	23
Figura 7. Secuencia de ADN correspondiente al producto de PCR mutagénico.....	24
Figura 8. Espectro de masa de Defensina-1 recombinante.....	26
Figura 9. Caracterización estructural de Defensina-1.....	27
Figura 10. Espectros de excitación-emisión.....	28
Figura 11. Análisis mediante Dicroísmo Circular Defensina-1.....	30

Figura 12. Curva calibración para cuantificar la cisteína.....	31
Figura 13. Espectros de excitación-emisión de las mieles de trabajo.....	34
Figura 14. Análisis de las concentraciones relativas de triptófano y tirosina.....	36
Figura 15. Correlación entre concentraciones relativas de tirosina y triptófano.....	37
Figura 16. Comparación de concentraciones relativas de aminoácidos aromáticos entre grupos de miel.....	38
Figura 17. Curva de Calibración para la cuantificación proteínas totales.....	39
Figura 18. Gráfico de proteínas totales muestras de miel.....	40
Figura 19. Comparación de concentraciones relativas normalizadas de triptófano entre grupos de miel.....	41
Figura 20. Análisis de concentración de cisteína en muestras de miel mediante reducción de 4-DTDP.....	42
Figura 21. Comparación estadística concentración de cisteína.....	43
Figura 22. Correlación entre cisteína y fluoróforos.....	44
Figura 23. Ecuaciones químicas para cuantificar actividad GOX.....	46
Figura 24. Análisis de concentraciones de peróxido de hidrógeno acumulado en 24 horas.....	47
Figura 25. Comparación estadística de la concentración de peróxido de hidrógeno.....	48
Figura 26. Análisis de componente principales.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos utilizados.....	14
Tabla 2. Códigos asignados a muestras y su localidad de origen.....	18
Tabla 3. Concentración de cisteína de defensina recombinante.....	32
Tabla 4. Identificación colmenas infectadas.....	32
Tabla 5. Concentraciones relativas fluoróforos.....	35
Tabla 6. Concentración de proteínas totales de las muestras de miel.....	40
Tabla 7. Concentraciones de cisteína de muestras de miel.....	42
Tabla 8. Resultados generación peróxido de hidrógeno de las muestras de miel.....	46

Tabla 9. Determinación actividad antimicrobiana con mieles de prueba.....	49
Tabla 10. Determinación actividad antimicrobiana de muestras de miel con bacterias Gram-positivas.....	50
Tabla 11. Determinación actividad antimicrobiana de muestras de miel con bacterias Gram-negativas.....	51
Tabla 12. Actividad Antimicrobiana Relativa de muestras de miel	52
Tabla 13. Presentación resultados sobre mieles estudiadas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
β -ME	β -Mercaptoetanol
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
DCC	Desorden de Colapso de Colonia
Def-1	Defensina-1
DO ₅₇₀	Densidad óptica a 570 nm.
EEM	Matriz de excitación-emisión
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida ligado a enzimas
GOX	Glucosa oxidasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
MALDI-TOF/MS	Espectrometría de masas asociada a desorción/ionización láser asistida por matriz
MCR	Resolución multivariada de curvas
MGO	Metilglioxal
MIC	Concentración inhibitoria mínima.
O-DN	o-dianisina
PARAFAC	Análisis paralelo de factores
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
RO-F	Royalisina-F
RO-K	Royalisina-K
SDS	Dodecil sulfato sódico.
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TRP	Triprófano
TYR	Tirosina
U-PLS/RBL	Mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización de residuos

RESUMEN

Las abejas llevan a cabo el mayor porcentaje de polinizaciones, tanto de plantas silvestres como domésticas, lo que les otorga una función invaluable para el medio ambiente y los productores que se benefician de ellas. En los últimos años se ha visto disminuido notoriamente su número, representado por la cantidad de colonias perdidas después de la temporada de invierno. Las colonias están sufriendo un síndrome denominado Desorden de Colapso de Colmena (DCC) que consiste en el abandono repentino de la colmena por la mayoría de las abejas obreras. Hasta ahora no se ha podido describir ningún agente que por sí solo desencadene el síndrome, sin embargo, se ha atribuido relevancia a distintos factores que podrían tener influencia en este fenómeno. Algunos de estos factores son patógenos, parásitos y pesticidas. *Nosema ceranae* es un microsporidio que inicialmente se encontraba en la abeja melífera asiática (*Apis cerana*) y que en los últimos años ha infectado a la abeja melífera occidental (*Apis mellifera*). Estudios han relacionado la presencia de *N. ceranae* con colmenas afectadas por DCC, postulándolo como un factor importante en el desarrollo del síndrome. Individualmente, *N. ceranae* induce estrés metabólico e inmunosupresión en abejas melíferas, lo que finalmente podría afectar a la colmena comprometiendo así su inmunidad social. La inmunidad social corresponde al conjunto de respuestas que los organismos sociales presentan frente a un patógeno o amenaza, que comprende principalmente cambios en el comportamiento y secreciones en el alimento que producen (jalea real y miel). La miel, además de ser el alimento para las abejas de la colmena, posee actividad antimicrobiana debido a la presencia de peróxido de hidrógeno, generado por la enzima glucosa oxidasa (GOX), metilglioxal (en el caso de la miel de Manuka) y defensina-1, lo que contribuye a la inmunidad social de la colmena. Defensina-1 es un péptido con actividad antimicrobiana producido por distintos tejidos en la abeja melífera, incluyendo las glándulas hipofaríngeas y mandibulares, desde donde se secreta hacia la miel y la jalea real. En este estudio se propone que *N. ceranae* produce una inmunosupresión en abejas melíferas, lo que se traduciría en una menor generación de peróxido de hidrógeno y presencia de defensina-1 en la miel, indicando un compromiso de su inmunidad social. Dado lo anterior, la hipótesis propuesta es “La miel producida por abejas de la especie *Apis mellifera* infectadas con el

microsporidio *Nosema ceranae* contiene menor cantidad del péptido antimicrobiano defensina-1 y una actividad de glucosa oxidasa disminuida en relación a la producida por abejas no infectadas.” Los objetivos generales de la tesis fueron: A) Relacionar la presencia del péptido antimicrobiano defensina-1 y la actividad de glucosa oxidasa en miel con la infección por *Nosema ceranae* en abejas y; B) Contar con métodos de análisis simples para establecer la presencia de defensina-1 en miel basados en espectroscopía molecular. Para ello se obtuvo la fracción comprendida entre 3 y 10 kDa de muestras de miel obtenidas desde el valle central de la región de O’Higgins. Esta fracción se caracterizó mediante fluorescencia y resolución multivariada de curva (MCR), lo que permitió evidenciar la presencia de la defensina por detección del triptófano presente en el péptido. Además, en esta fracción se determinó la presencia de enlaces disulfuro, asociados a la estructura de la defensina, cuya concentración estuvo correlacionada con la concentración relativa de triptófano en la misma. En la miel no fraccionada se determinaron la actividad de GOX y la actividad antibacteriana, las que estuvieron relacionadas con el contenido relativo de defensina-1. Por otra parte, se expresó y purificó defensina-1 recombinante desde *E. coli* la que fue sometida a la misma caracterización y/o análisis de la miel fraccionada, permitiendo así tener un patrón de comparación. Paralelamente se determinó la presencia de *N. ceranae* en las abejas de las colmenas muestreadas mediante recuento de esporas en el microscopio y amplificación de su material genético a través de PCR en tiempo real. Al evaluar el conjunto de resultados se observó que la miel producida por abejas infectadas o que habían sufrido una reciente infección con *Nosema spp* contenía mayor cantidad de defensina-1 y mayor acumulación de peróxido de hidrógeno en relación a la producida por abejas no infectadas, lo que demuestra que la infección habría inducido una mayor producción del péptido y GOX siendo reflejado en la miel. Esto último se contrapone a la hipótesis planteada inicialmente. Sin embargo, las mieles que presentaron esta relación tienen además un origen geográfico y floral común; lo que igualmente podría ser la causa de la relación observada o que la defensina-1 y GOX se expresen constitutivamente en mayor cantidad en estas colonias, presentando así una ventaja genética sobre otras ante posibles infecciones.

SUMMARY

Honey bees are responsible of the highest percentage of pollination, including wild and domesticated plants, which gives them a priceless function for environment and producers who benefit from them. In recent years their number has been reduced, represented in the loss of colonies after winter season. Colonies are suffering a syndrome called Colony Collapse Disorder (CCD) which consists in the sudden abandonment of the colony by most of the worker bees. Until now there is no agent described that can trigger the syndrome by itself, however, several factors have been attributed to influence in this phenomenon. Some of these factors are pathogens, parasites and pesticides. *Nosema ceranae* is a microsporidian which was founded at first in the Asiatic honeybee (*Apis cerana*) and in the last years has infected the European honeybee (*Apis mellifera*). Studies have related de *N. ceranae* presence in bee hive affected by CCD, postulating it as an important factor in the development of this syndrome. Individually, *N. ceranae* induce metabolic stress and immunosuppression in honeybees, compromising the social immunity. Social immunity is the group of responses that social organisms have developed against a pathogen or threat, includes mainly behavior changes and secretions to the food produced (royal jelly and honey). The honey is the food for hive's bee and has antimicrobial activity due to the presence of hydrogen peroxide, generated by glucose oxidase enzyme (GOX), methylglyoxal (in manuka honey) and defensin-1, which contributes to the social immunity of the hive. Defensin-1 is a peptide with antimicrobial activity produced by several cell types in the honey bee, including hypopharyngeal and mandibular glands, from where it is secreted towards honey and royal jelly. In this study, it is proposed that *N. ceranae* produces an immunosuppression in honey bees, which would result in a lower generation of hydrogen peroxide and the presence of defensin-1 in honey, indicating a compromise of their social immunity. Given the last, the proposed hypothesis is "The honey produced by bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae* contains less antimicrobial peptide defensin-1 and decreased glucose oxidase activity in relation to that produced by non-infected bees." The general objectives of the project are: A) To relate the presence of the antimicrobial peptide defensin-1 and the activity of glucose oxidase in honey with the infection by *Nosema ceranae* in bees and; B) Have simple analysis methods to establish the presence of defensin-1 in honey based on molecular spectroscopy. For this, the fraction

comprised between 3 and 10 kDa of honey samples from the central valley of the O'Higgins region was obtained. This fraction was characterized by fluorescence and multivariate curve resolution (MCR), which allowed to demonstrate the presence of the defensin by detection of tryptophan present in the peptide. In addition, in this fraction the presence of disulfide bridges, associated with the structure of the defensin, whose concentration was correlated with the relative concentration of tryptophan in it, was determined. In the unfractionated honey, GOX activity and antibacterial activity were determined, which were related to the relative content of defensin-1. On the other hand, recombinant defensin-1 was expressed and purified from *E. coli* which was subjected to the same characterization and/or analysis of the fractionated honey, thus allowing to have a comparison pattern. In parallel, the presence of *N. ceranae* in the bees of the sampled hives was determined by counting the spores in the microscope and amplifying their genetic material through real-time PCR. When evaluating the set of results, it was observed that the honey produced by bees infected or that had suffered a recent infection with *Nosema* spp contained a greater amount of defensin-1 and a greater accumulation of hydrogen peroxide in relation to that produced by non-infected bees. Results show that the infection would have induced a higher production of the peptide and GOX being reflected in the honey. These results are the opposite of the proposed hypothesis. However, the honeys that presented this relationship also have a common geographical and floral origin; what could equally be the cause of the observed relationship or that defensin-1 and GOX are constitutively expressed in greater quantity in these colonies, thus presenting a genetic advantage over others in the face of possible infections.

INTRODUCCIÓN

Polinización e Impacto Económico

La mayoría de especies de la taxa angiospermas depende de la polinización para su fertilización, la cual tiene dos orígenes: biótico y abiótico (Ackerman, 2000; Howard & Barrows, 2014). La polinización abiótica depende principalmente de corrientes de aire y representa aproximadamente un 10% de la polinización en esta taxa (Ackerman, 2000). La polinización biótica es un mutualismo ecológico en el cual la planta es capaz de conseguir el éxito reproductivo al dispersar polen mediante un vector animal, el cual es retribuido, por ejemplo, con néctar (Mitchell *et al.*, 2009). Entre los vectores animales de la polinización se considera aves, murciélagos, marsupiales y principalmente insectos, grupo en el cual se encuentran especies domesticadas como la abeja melífera (*Apis mellifera*), así como también especies salvajes como la abeja silvestre, el abejorro, las mariposas y los sírfidos (Klein *et al.*, 2007). Este último tipo de polinización es responsable de la reproducción sexual de distintos tipos de plantas domésticas, así como de la mayoría de las plantas silvestres (Kearns *et al.* 1998; Larson y Barrett, 2000; Ashman *et al.*, 2004), por lo que los polinizadores juegan un rol importante al proveer un servicio de ecosistema clave para la preservar tanto las comunidades vegetales silvestres como aumentar la producción agrícola (Aguilar *et al.*, 2006; Ricketts *et al.*, 2008). Los insectos son responsables de polinizar entre el 80-85% de los cultivos comerciales, incluyendo frutas, verduras, legumbres, follaje, entre otros (Richards, 2001), lo que representa el 35% de la producción global de alimentos (The White House, 2014). Sólo en Estados Unidos, la abeja melífera genera 15 billones de dólares, principalmente por su función como polinizador (The White House, 2014).

Las poblaciones de abeja melífera a han ido disminuyendo en el último tiempo. Según datos del gobierno de EE. UU, desde el año 2006 las pérdidas de colonias han aumentado hasta un promedio de 30% cada invierno, más del doble de las tasas de pérdida de colonias histórica que varía entre un 10-15% (The White House, 2014). En Europa se ha reportado una pérdida de hasta un 33.6% de colonias en la temporada 2012/2013, donde se estudiaron las pérdidas de colonias de 17 países (Chauzat *et al.*, 2014). Estos antecedentes

demuestran en números la disminución de colmenas de abeja melíferas en los últimos años, otorgándole un carácter global al problema.

Desorden del Colapso de Colonia

En la temporada 2006/2007 de cosecha de miel en Norte América se produjo un evento inusual, un elevado número de colonias se perdieron después del invierno y todas presentaban los mismos síntomas: 1) Una rápida disminución de abejas trabajadoras adultas y un exceso proporcional de crías respecto a las adultas, evidencias de una colmena débil o muerta; 2) Falta de cuerpos muertos de abeja en los alrededores de la colmena y; 3) No existían evidencias de ataque de pestes en la colmena (como el escarabajo *Aethina tumida* o la polilla de la cera *Galleria mellonella*). Sin embargo, se observó un ataque tardío de pestes post-colapso. A este síndrome se le denominó Desorden del Colapso de Colonia (DCC o *Colony Collapse Disorder CCD*) (Olroyd, 2007; van Engelsdorp *et al.*, 2009). Estudios indicaron que DCC involucra una interacción de patógenos y factores de estrés que afectan a la colmena y la debilitan, pero no se pudo asociar ninguna condición que por sí sola desencadenara el síndrome (van Engelsdorp *et al.*, 2009).

Se han descrito diversos factores que son capaces de atacar y debilitar a los individuos de la colmena. Entre ellos se cuentan virus, como el de la parálisis crónica de la abeja (CBPV), parálisis aguda de la abeja (ABPV), virus celular de reina negra (BQCV), virus Y de abeja (BVY), virus Kashmir y virus de alas deformes (Genersch & Aubert, 2010). Las abejas pueden igualmente ser parasitadas por ácaros, como *Varroa destructor* y *Acarapis woodi* (Olroyd, 1999; Villa & Rinderer, 2008). Exposición a contaminantes ambientales como pesticidas que contienen arsénico, cadmio o selenio, o también insecticidas neonicotinoides como el imidacaloprid (Alaux *et al.*, 2010; Johnson, 2015). Los organismos sociales agrupados en colonias presentan una elevada oportunidad de infección para organismos patógenos o parásitos, debido a la alta densidad poblacional y constante contacto entre los individuos, así como también un patrón genético similar que los hace vulnerables a los mismos tipos de ataque (Figura 1) (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991; Cremer *et al.*, 2007).

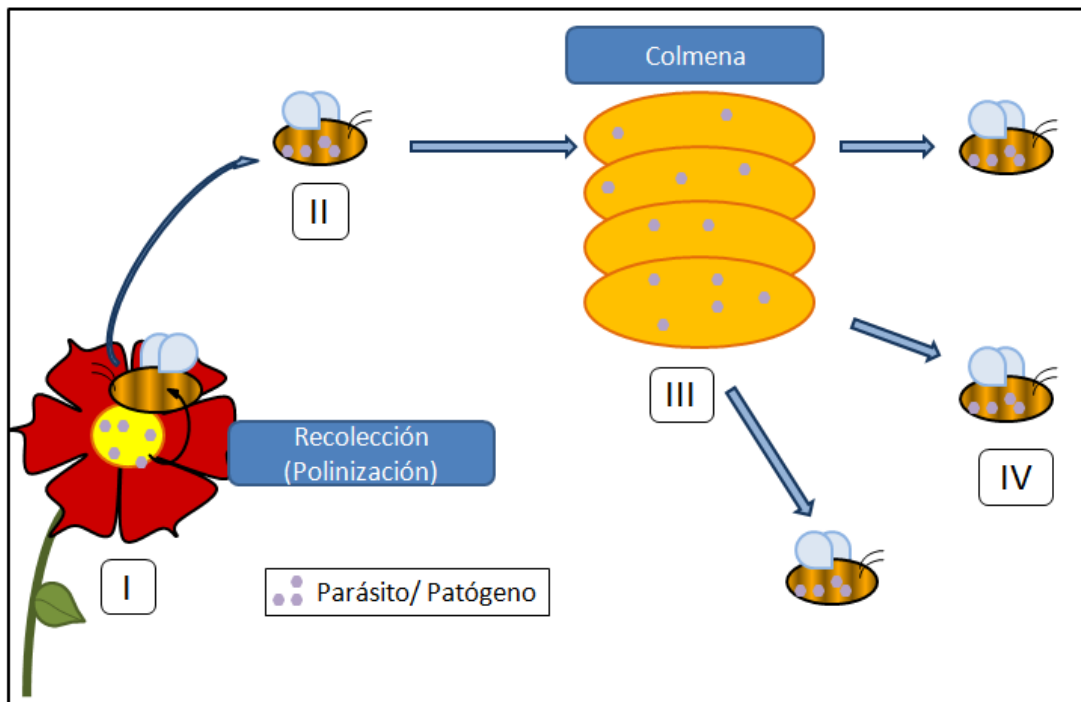


Figura 1. Propagación de patógenos en abejas. Representación esquemática de la propagación de un parásito o patógeno entre los individuos de la colmena. I. Infección durante polinización desde especies vegetales. II. Abeja infectada ingresa el agente infeccioso a la colmena. III. Propagación del agente infeccioso dentro de la colmena. IV. Infección masiva de los individuos de la colmena y abandono de la misma

Nosema ceranae

Algunos patógenos, como los microsporidios, son particularmente severos con sus hospederos al inducir un estrés energético debido a que carecen de mitocondrias y metabólicamente son muy limitados (Sprague *et al.*, 1992; Agnew y Koella, 1997). La microsporidiosis (enfermedad de nosema) es una enfermedad importante que afecta frecuentemente a las abejas melíferas y tiene diversos efectos negativos en su productividad, especialmente en climas templados, y es causada por dos especies descritas: *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Chen *et al.*, 2008).

N. apis y *N. ceranae* son patógenos intracelulares que infectan el intestino medio de la abeja melífera, absorbiendo nutrientes y causando un estrés energético. Hasta el año

1990 se conocía que *N. apis* sólo infectaba *Apis mellifera*, las abejas occidentales; mientras que *N. ceranae* sólo infectaba *Apis cerana*, las abejas asiáticas. Sin embargo, se ha demostrado que esta preferencia de hospederos por estos patógenos no presenta exclusividad. Es así como a partir de aquel año se reportaron casos de infección con *N. ceranae* en *Apis mellifera* en países como Estados Unidos, España, Taiwán y Uruguay (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009). Un estudio describió que las colonias infectadas con *N. ceranae* tienen un riesgo seis veces mayor a sufrir DCC respecto a colonias no infectadas (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Adicionalmente, otro estudio encontró un 100% de presencia de *N. ceranae* en colmenas colapsadas en regiones de España (Cepero *et al.*, 2014), lo que muestra la importancia que tendría este patógeno en el despoblamiento de la colmena. En el caso de Chile, se han registrado casos de infección de colmenas por *N. ceranae*, llegando a un 85% de mortalidad de colmenas con presencia del microsporidio confirmada (Ministerio de Agricultura, 2010). También se ha descrito la incidencia de *N. ceranae* en la disminución de producción de miel y debilidad en la colmena, desencadenado la muerte de la colmena si no se trata a tiempo (Botías *et al.*, 2013). Es por esto que el desarrollo de técnicas diagnósticas para este tipo de patógeno (y otros) toma una posición prioritaria, de esta manera se puede prevenir la pérdida de la colonia antes de que llegue a un punto sin retorno durante la infección.

La infección de *Apis mellifera* por parte de *Nosema ceranae* produce una importante alteración del metabolismo de la abeja. Abejas infectadas con *Nosema* demostraron en la hemolinfa un mayor nivel de D-glucosa, ácido fosfórico, ácido L-aspártico, entre otros; y una disminución en los niveles de D-fructosa, ácido D-glucónico, glicerol y aminoácidos como prolina, serina, valina, fenilalanina, glutamina, entre otros (Aliferis *et al.*, 2012). También se ha visto inmunosupresión de abejas infectadas con *N. ceranae*, al disminuir el nivel de transcrito de los péptidos antimicrobianos abecina, hymenoptaecina, apidaecina y defensina luego de 3, 6 y 12 días post-infección (Chaimanee *et al.*, 2012), confirmando la supresión inmune generada descrita anteriormente (Antúnez *et al.*, 2009).

Inmunidad en Abejas

Para prevenir los ataques, tanto de bacterias como de eucariontes patógenos, los insectos poseen un complejo y eficiente sistema de defensa, permitiendo que sólo un limitado número de encuentros resulten en una infección. Este sistema posee tres principales líneas de defensa: 1) el tegumento como barrera física de infección, incluyendo el tracto intestinal; 2) la respuesta coordinada de distintos tipos de hemocitos cuando las barreras físicas son atravesadas; y 3) la síntesis inducida de péptidos y proteínas antimicrobianas sintetizados por el cuerpo graso (Gillespie *et al.*, 1997). El cuerpo graso es el tejido equivalente al hígado en mamíferos y es capaz de sintetizar distintos tipos de péptidos antimicrobianos que, al sumar los péptidos producidos por la hemolinfa, actúan en sinergia para proveer una potente defensa en contra de patógenos dañinos como bacterias, hongos y protozoos (Bulet *et al.*, 1999). El primero de estos péptidos en ser identificado fue la cecropina, que fue aislada de la pupa de la especie de polilla *Hyalophora cecropia*, donde se aislaron dos péptidos con potente actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y otras especies Gram-negativas (Steiner *et al.*, 1981). Desde entonces se han encontrado centenares de péptidos o polipeptidos con actividad antimicrobiana en insectos, los cuales comparten características similares, como un peso molecular igual o inferior a 5 kDa y una carga neta positiva a pH fisiológico, además, la mayoría presenta en su estructura α -helices anfipáticas u horquillas β -plegadas, o estructuras mixtas (Bulet *et al.*, 1999). Adicionalmente a los sistemas de protección individual, los insectos sociales han desarrollado mecanismos de resistencia colectivos para compensar el elevado riesgo de infección por microorganismos patógenos debido al contacto frecuente (Ilyasov *et al.*, 2011). Estos mecanismos de protección son denominados “inmunidad social”, “pública” o “colectiva” (Cremer *et al.*, 2007). Algunos de estos ejemplos de defensa social corresponden a la identificación y remoción de individuos infectados de la colmena (Rothenbuhler, 1964; Spivak & Reuter, 2001), la construcción de nidos con materiales antimicrobianos (Christe *et al.*, 2003), higienización social (Rosengaus *et al.*, 1998a), fiebre social en respuesta a enfermedades (Starks *et al.*, 2000), transferencia de resistencia a patógenos (Trianello, *et al.*, 2002), comunicación efectiva sobre información del ataque de

patógenos en la colmena (Rosengaus *et al.*, 1999) y la producción de secreciones con actividad antibiótica desde glándulas exocrinas (Rosengaus *et al.*, 1998b).

En la abeja melífera se han detectado distintos tipos de péptidos antimicrobianos. La hymenoptaecina: corresponde a un péptido de 93 residuos aminoácidos y presenta un efecto principalmente sobre bacterias Gram-negativas y también en un par de Gram-positivas (Casteels *et al.*, 1993). También están presentes en la hemolinfa de la abeja melífera dos tipos de péptidos antimicrobiano ricos en prolina: la apidaecina que posee 18 aminoácidos y es altamente activa contra bacterias Gram-negativas (Casteels *et al.*, 1989); y la abaecina que contiene 34 residuos aminoácidos y presenta una actividad moderada frente a bacterias Gram-positivas y Gram Negativas (Casteels *et al.*, 1990).

Las defensinas conforman una familia de péptidos con actividad antimicrobiana presente en *Apis mellifera*. Estos péptidos antimicrobianos poseen un tamaño que varía entre 3 y 5 kDa y están ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal (Bulet *et al.*, 2004). Solo considerando artrópodos, se han aislado más de 70 tipos de defensina desde especies de diversas taxa como insectos, escorpiones, garrapatas, moluscos y arañas (Dimarcq *et al.* 1998; Bulet *et al.*, 1999). Las defensinas de insectos se caracterizan por tener una longitud de 36 a 51 aminoácidos y ser ricas en cisteínas que forman enlaces disulfuro (Klaudiny *et al.*, 2005), además de ser activas principalmente contra bacterias Gram-positivas (Yamauchi, 2001). El mecanismo de acción de las defensinas de invertebrados, a diferencia de las defensinas humanas, aún no se ha descrito completamente. Estudios en defensina de moluscos demostraron su unión (e inhibición) a la molécula *Lipid II*, el cual es un peptidoglicano anfipático precursor en la síntesis de la pared celular en bacterias (Schmidtt *et al.*, 2010), por lo que la de insectos podría tener un mecanismo similar. Adicionalmente, se demostró que defensinas son capaces de unirse a la membrana plasmática debido a su carga neta positiva y dominios anfipáticos, afectando su permeabilidad y permitiendo la salida de los cationes de potasio desde el interior de la bacteria. En este estado parcialmente despolarizado la respiración es inhibida, lo que produce una fuerte disminución del contenido de ATP dentro de la célula (Cociancich *et al.*, 1993). En la abeja melífera se han descrito dos tipos de este péptido, denominados

defensina 1 y defensina 2, que poseen una masa molecular de 5,5 y 4,8 kDa, respectivamente (Ilyasov *et al.*, 2012). La defensina 1 posee 3 isoformas: la primera corresponde a la isoforma que se encuentra en la hemolinfa de la abeja; las otras dos isoformas se denominan royalisina, varían en uno o dos aminoácidos respecto a la primera y se encuentran principalmente en la jalea real, se identifican como Ro-F (5525,1 Da) y Ro-K (5515,5 Da) (Figura 2) (Fujiwara *et al.*, 1990; Klaudiny *et al.*, 2005). Tanto la defensina 1 como la defensina 2 son expresadas en el tórax de la abeja melífera, sin embargo, en las glándulas torácica, mandibular e hipofaríngea solo se expresa mRNA de la defensina 1, lo que demuestra una expresión tejido-específica (Klaudiny *et al.*, 2005).

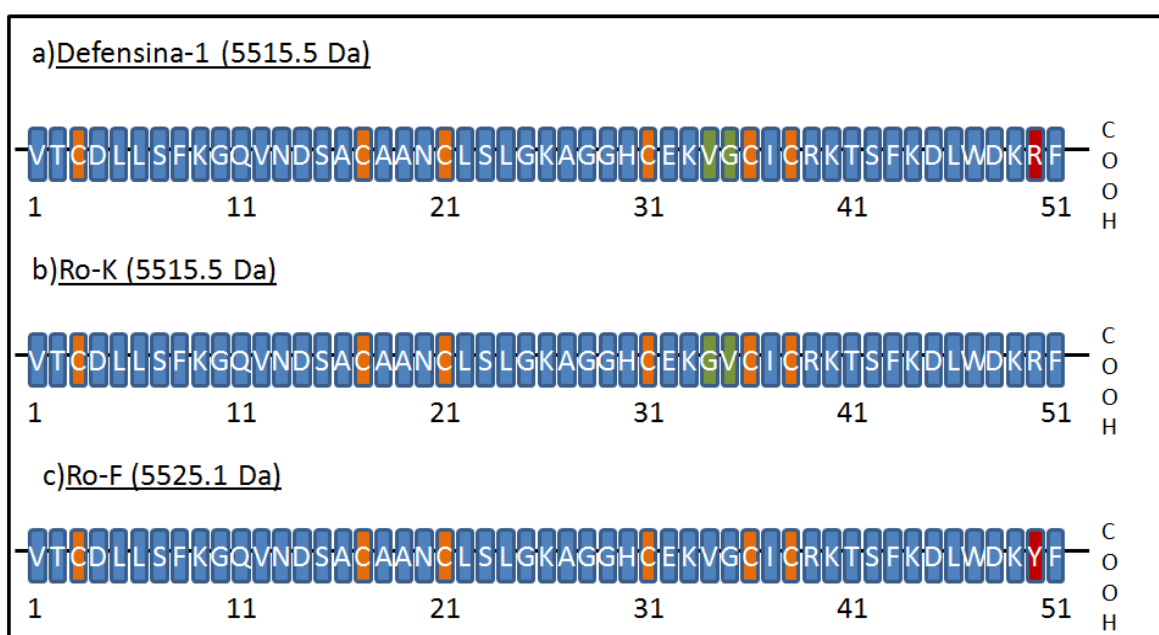


Figura 2. Isoformas Defensina-1 de abeja. Representación esquemática de las 3 isoformas del péptido antimicrobiano defensina-1. La diferencia entre Defensina-1 y Royalisina-K es una inversión de los aminoácidos valina y glicina en las posiciones 34-35 y está señalada en verde. La diferencia entre Defensina-1 y Royalisina-F está representada en rojo, al reemplazar una arginina por tirosina en la posición 50. Estos péptidos son ricos en cisteínas, señaladas en color naranja. Secuencias obtenidas de la base de datos en línea de NCBI.

Abejas y Miel

Las abejas producen miel a partir del néctar recolectado de las flores. Lo recolectan utilizando su larga lengua y en sus estómagos se mezcla con proteínas y enzimas, para ser regurgitado en la colmena y enseguida evaporado mediante corrientes de aire generadas con

sus alas (Marlowe *et al.*, 2014). Esto último permite concentrar desde un 80% de agua inicial en el néctar hasta un 14-18% de agua en la miel, obteniendo un alimento enriquecido nutricionalmente para alimentar a las larvas. El mayor constituyente de la miel son los azúcares, principalmente fructosa y glucosa, representando un 95% del peso seco aproximadamente (Bogdanov *et al.*, 2008). También contiene otros constituyentes bioactivos, como compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos orgánicos, metabolitos de óxido nítrico, compuestos aromáticos, vitaminas, aminoácidos y proteínas, entre otros (Gheldof *et al.*, 2002; Bogdanov *et al.*, 2008; Beretta *et al.*, 2010). En cuanto a enzimas, ha sido reportada la presencia de glucosa oxidasa, amilasa, invertasa, fosfatasa, catalasa y peroxidasa (Bogdanov *et al.*, 2008). La miel de abeja ha presentado potente actividad como antimicrobiano (Tan *et al.*, 2009; Irish *et al.*, 2011), antifúngico (Feás & Estevinho, 2011) y antiviral (Zeina *et al.*, 1996), lo que demuestra su importancia en la defensa contra ataques de patógenos dentro de la colmena, cumpliendo un rol en mantener una buena salud de la misma. El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) presente en la miel, su pH ácido y su alta osmolaridad son de las razones más conocidas por las cuales la miel tiene un efecto antimicrobiano. El peróxido de hidrogeno es producido mediante la oxidación de la glucosa presente en la miel catalizado por la enzima glucosa oxidasa (GOX), produciendo ácido glucónico y H_2O_2 , el cual es un potente agente antimicrobiano, formando parte de la inmunidad social de las abejas (Mahmoud & Owayss, 2006).

Cabe señalar que se ha observado un efecto sinérgico negativo entre la acción de los microsporidios y el insecticida imidacloprid sobre la actividad de la GOX en abejas, lo que afecta tanto a su inmunidad individual como social. Ello implicaría una mayor susceptibilidad de la colonia ante el ataque de otros patógenos (Alaux *et al.*, 2010).

Junto a la acción de la GOX, en el último tiempo se han descrito otros componentes presentes en la miel que ayudan a la inmunidad social. Estos son el metilglioxal (MGO) y el péptido antimicrobiano defensina-1 (Kwakman *et al.*, 2010). MGO es un bactericida natural que se encuentra particularmente en la miel producida a partir del árbol de manuka (*Leptospermum scoparium*), que es originario de Nueva Zelanda y conocido por su actividad antibacteriana no peróxidica (Mavrck *et al.*, 2008). Por su parte la defensina-1,

ya descrita previamente, es producida en las glándulas hipofaríngeas de las abejas, desde donde es secretada, junto a otras proteínas, en la jalea real y la miel durante su producción.

Herramientas analíticas para caracterizar defensina-1 y actividad de GOX

Como se describió anteriormente y como se aprecia en la figura 2, defensina-1 posee un tamaño aproximado de 5 kDa, así como aminoácidos aromáticos fluorescentes y es rico en cisteínas, pudiendo formar hasta 3 puentes disulfuro entre sus 6 residuos de cisteína. Son estas características las que se pretenden explotar para poder determinar la presencia del péptido en la miel, mediante espectros UV-visible y de excitación-emisión (EEM).

Las lecturas de fluorescencia total (espectros de emisión registrados a diferentes longitudes de onda de excitación) permiten construir una EEM. La EEM comprende una matriz de datos J x K, (J=número de longitudes de onda de excitación y K=número de longitudes de onda de emisión). Si la forma de los espectros de excitación y emisión permanece sin variación en todo un intervalo de concentraciones, entonces se puede considerar que los datos son trilineales y se pueden ordenar los datos en una formación de datos de tres vías. (Eq. 1)

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N A_{in} B_{jn} C_{kn} + E_{ijk}$$

Ecuación 1: Ecuación para datos trilineales.

Donde A_{in} representa la concentración relativa (también llamado *score*) de un constituyente n en la muestra i, B_{jn} y C_{kn} son las intensidades de ambos modos instrumentales (llamados *loadings*) y E_{ijk} colecta los errores de ajuste. La sumatoria implica que las señales de los constituyentes son aditivas.

La ecuación 1 representa el modelo trilineal en el cual se basan los logaritmos de descomposición de la data espectral, como el análisis paralelo de factores (PARAFAC). Los perfiles contenidos en las matrices B y C son proporcionales a los perfiles

instrumentales de cada constituyente puro en cada modo (ejemplo: espectros de excitación y emisión puros), mientras que el “score” contenido en A es proporcional a la concentración del constituyente puro. Esto implica que se puede construir un calibrado que contenga los componentes o fluoróforos de interés (EEM muestras 1 y 2 en Figura 3), sobre los que se “apila” la muestra real (EEM muestra 3 en Figura 1) que puede contener constituyentes inesperados no calibrados. Luego, tanto los fluoróforos de interés como los interferentes pueden ser modelados y matemáticamente aislados, tal como si los constituyentes fuesen físicamente separados de la muestra (Figura 3). La información provista por los “loading” de los constituyentes (B_{jn} y C_{kn}) permite el análisis cualitativo de la muestra, mientras que los “scores” de los constituyentes (A_{in}) puede ser utilizados para construir un calibrado de pseudo orden cero entre estos y la concentración de los analitos en las muestras de calibrado. De esta forma, la concentración de la muestra desconocida puede ser predicha por la interpolación de los scores en la curva ajustada.

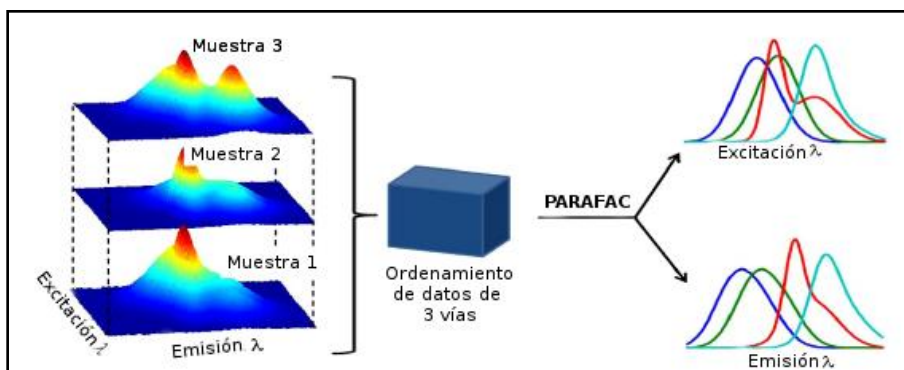


Figura 3. Representación esquemática de PARAFAC.

En el caso de la resolución multivariada de curvas (MCR), una matriz D que contiene información de todos los componentes presentes en la muestra (por ejemplo cromatogramas versus espectros de emisión, perfiles cinéticos versus espectros emisión, espectros de excitación-emisión, etc) se descompone matemáticamente en las contribuciones vinculadas a cada uno de los componentes puros presentes en el sistema. De esta forma este algoritmo permite la descomposición de la matriz de datos inicial (mezcla de varios componentes) en el producto de dos matrices de datos C y S^T , cada uno de ellos

contiene los perfiles de respuesta puros (por ejemplo, cromatograma y espectro de emisión, concentración y espectro de emisión, espectro de excitación y de emisión) de los componentes de la mezcla (muestra). En notación matricial, la expresión para esta resolución es:

$$D = CS^T + E$$

Donde D ($f \times c$) es la matriz de datos original, C ($f \times n$) y S^T ($n \times c$) son las matrices que contienen el perfil de los componentes puros relacionados a la variación de los datos en la dirección de las filas y las columnas, respectivamente, y E ($f \times c$) es la matriz de error o de la variación residual no relacionada con ninguna contribución química. Las variables f y c representan el número de filas y columnas en la matriz de datos original; mientras que n es el número de componentes químicos en la mezcla. C y S^T hacen referencia habitualmente a perfiles de concentración y espectros, sin embargo, los métodos de resolución como MCR han probado su utilidad en muchos otros diversos problemas como los espectros de excitación-emisión. La figura 4 muestra cómo opera la resolución multicomponente para los datos colectados en HPLC-DAD.

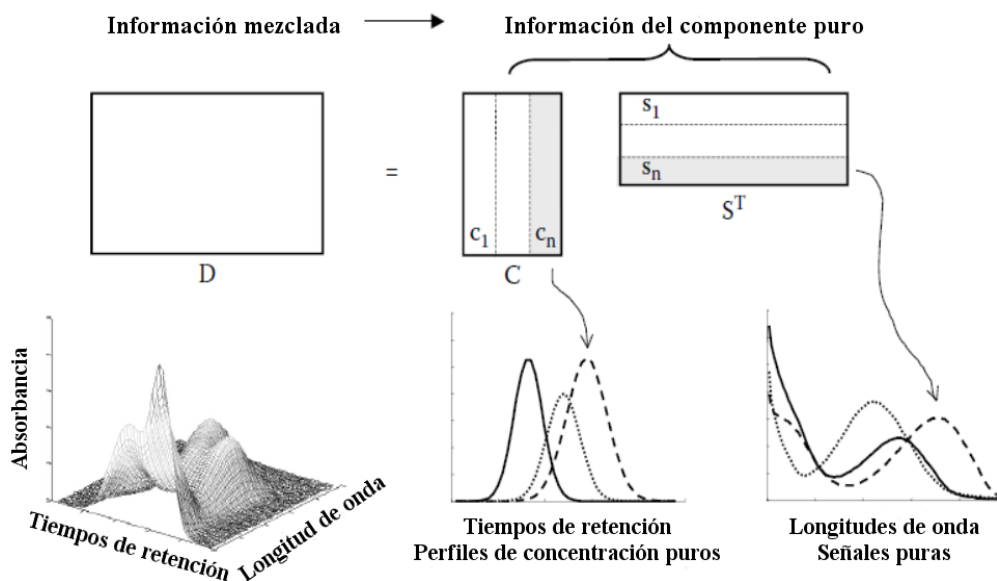


Figura 4: Composición de matrices desde información trilinear. Resolución multicomponente de información recogida en HPLC-DAD contenida en la matriz D en: sus perfiles de concentración puros (matriz C , cromatogramas) y respuestas puras (matriz S^T , espectros).

Sin embargo, la descomposición matemática de una sola matriz de datos, sin importar el método utilizado, se reconoce estar sujeta a ambigüedades. Esto significa que muchos pares de matrices C y S^T pueden reproducir los datos originales con el mismo ajuste de calidad. En otras palabras, la correcta reproducción de la matriz de datos original se puede lograr mediante el uso de componentes con perfiles diferentes en forma (ambigüedad de rotación) o en magnitud (ambigüedad de intensidad). Para encontrar la resolución correcta se requiere el uso de restricciones que ayudan en tal sentido.

De acuerdo a lo antes señalado, la defensina-1 contenida en la fracción de miel entre 3 y 10 kDa y con presencia de aminoácidos fluorescentes, podría ser caracterizada y cuantificada mediante el uso de espectroscopía de fluorescencia asociada a PARAFAC y/o MCR. Además, la presencia de puentes disulfuro en este péptido podría ser detectada con un método sencillo de pre-reducción y reacción del grupo tiol con 4,4-ditiopiridina para formar un cromóforo característico (Hansen *et al.*, 2007)

Por otra parte, la actividad de GOX en la miel puede ser evaluada mediante el acoplamiento de una reacción entre el peróxido de hidrógeno (generado en la oxidación de la glucosa) y un reductor, catalizada por la enzima peroxidasa. El cromóforo producido en esta reacción puede ser determinado por espectroscopía UV-visible en el tiempo.

HIPOTESIS

“La miel producida por abejas de la especie *Apis mellifera* infectadas con el microsporidio *Nosema ceranae* contiene menor cantidad del péptido antimicrobiano defensina-1 y una actividad de glucosa oxidasa disminuida en relación con la producida por abejas no infectadas.”

OBJETIVOS GENERALES

- Relacionar la presencia del péptido antimicrobiano defensina-1 y la actividad de glucosa oxidasa en miel con la infección por *Nosema ceranae* en abejas.
- Contar con métodos de análisis simples para establecer la presencia del parásito *Nosema ceranae* en abejas a través del examen de la miel producida por estas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener el péptido antimicrobiano Defensina-1 de *Apis mellifera* puro.
- 2) Caracterizar espectroscópicamente y determinar la presencia de puentes disulfuro en el péptido defensina-1.
- 3) Comparar los perfiles de fluorescencia total de la fracción de miel entre 3 y 10 kDa de *Apis mellifera* infectadas con *Nosema ceranae* y sanas.
- 4) Evaluar la actividad de la enzima glucosa oxidasa en miel de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae*.
- 5) Realizar ensayos de actividad antimicrobiana de mieles sanas e infectadas con *N. ceranae*.

MATERIALES

Insumo	Proveedor
Extracto de levadura	Merck
Peptona	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Peróxido de hidrógeno	Merck
PMSF	Sigma-Aldrich
Partidores	GenScript
Orto-dianisina	Sigma-Aldrich
Peroxidasa	Sigma-Aldrich
Cisteína	Sigma-Aldrich
4-Ditiodiipiridina	Sigma-Aldrich
2-propanol	Merck
Ácido acético	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Borohidruro de sodio	Merck
Insulina	Actrapid®, NovoRapid® Flexpen®
EDTA	Merck
Tris	AppliChem
DTT	Sigma-Aldrich
B-ME	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
IPTG	US Biological
UREA	Merck
E.Z.N.A. Plasmid DNA mini kit II	Omega
Ampicilina	US Biological
TCEP	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Reactivos utilizados.

Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron las cepas *Escherichia coli* DH5 α y *Escherichia coli* BL21 (DE3) para el trabajo de biología molecular, obtenidas del Laboratorio de Bioquímica del Dr. Mauricio Báez Larach de la FCQyF de la Universidad de Chile. Para los ensayos de actividad antimicrobiana se trabajó con las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas Aeruginosa* obtenidas del Laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Desarrollo.

Vector: pET21d

Partidores: Para la inserción de codón de termino prematuro para la secuencia de Defensina-1 se utilizaron los siguientes partidores:

H-Def-1 F: 5' TGT GGG ATA AAC GTT TTG GCT AAT AAG AAT TCG AAG '3

H-Def-1 R: 5' GCC AAA ACG TTT ATC CCA CAG GTC TTT GAA '3

MÉTODOS

Transformación bacteriana y expresión de Defensina-1

El vector pUC57 que contiene la secuencia de Def-1 fue incorporado en la cepa DH5 α de *E. coli* mediante electroporación. La secuencia de la Def-1 fue subclonada en el plasmidio pET21d. Esto permite expresar la defensina utilizando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) mediante el operon *lac* presente en el vector. Para expresar la Def-1 con la secuencia poli-His y el sitio de corte TEV en su extremo amino terminal, se subclonó el gen de Def-1 en el plasmidio pET21d utilizando las enzimas restricción NcoI y HindIII. Luego del subclonamiento, se insertó un codón de termino de la traducción en el extremo carboxilo terminal de la secuencia de Def-1 mediante mutagénesis sitio dirigida. Esta secuencia se denominó como H-Def.

Para la obtener el péptido puro se transformó la cepa de *E. coli* BL21 con la secuencia de H-Def subclonada en el plasmidio pET21d y se indujo su expresión por la bacteria mediante IPTG. La proteína recombinante se purificó mediante una columna de Ni-agarosa. Con este propósito, la cepa *E. coli* BL21 portadora del vector pET21d con H-Def se cultivó en dos litros de medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5. La inducción de la expresión de H-Def se realizó con IPTG 0,8 mM por 4 horas a 37°C. Luego de este tiempo, se procedió a centrifugar a 5000g por 20 minutos a 10°C, se desechó el sobrenadante y el sedimento de bacteria se almacenó a -20°C. El sedimento de bacterias fue disuelto en 70 ml de una solución de lisis (8 M Urea, 25 mM Tris pH 8, 0,4M NaCl, 40 mM Imidazol, 10 mM β -ME, y Fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) 1 mM mediante agitación por 1 hora para posteriormente ser lisadas mediante sonicación (30% de potencia, pulso de 50% por 5 minutos en hielo). El sobrenadante de la lisis obtenido mediante centrifugación (12000 rpm por 20 minutos a 10°C) fue aplicado en columna de Ni-Agarosa (GE Healthcare, USA) de 1 ml de resina equilibrada con la solución de lisis. La carga de la muestra se realizó a razón de 1 ml por minuto. Luego la columna fue lavada con solución de lisis para luego eluir el péptido con 10 ml de la solución de elución (Urea 8 M, 0,4 M NaCl, 0,2 M Ácido acético,

10 mM β -ME). Las fracciones eluidas se tomaron cada 1 ml y la concentración de proteína se cuantificó por absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar calculado para el péptido de H-Def. Las fracciones con mayor concentración de proteínas se concentraron utilizando una membrana de exclusión por tamaño molecular de 3 kDa de promedio de poro (Amicon®, Merck, USA). La composición de la solución del péptido recuperado de la columna se modificó para obtener las condiciones adecuadas para la reacción de corte de la proteasa TEV (2 M Urea, 50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT). Para eliminar la secuencia de histidina proteolíticamente, la solución del péptido se incubó *over-night* con 200 μ g de proteasa TEV a temperatura ambiente. El grado de purificación y la acción de la proteasa TEV se determinó mediante electroforesis de SDS-PAGE-Tricina utilizando la muestra de la proteína antes (H-Def) y después del corte (Def) con proteasa TEV. La solución del péptido digerido con la proteasa TEV fue almacenada a -20 °C. Protocolo adaptado de Sojka *et al.* (2016)

Secuenciación de plásmidos

Para confirmar la transformación bacteriana con el producto deseado los plásmidos fueron purificados utilizando E.Z.N.A. Plasmid DNA mini kit II según instrucciones del fabricante y enviados a secuenciación realizado por la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Análisis MALDI-TOF del péptido defensina-1

Este análisis fue realizado en el Centro Para el Desarrollo de la Química (CEPEDEQ) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

La adquisición de espectros de masas se realizó en un sistema MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA), en modo de iones positivos mediante detección de reflexión. Antes de obtener los espectros, se realizó una calibración del equipo con un patrón externo correspondiente a una mezcla de péptidos en masa de 650-2000 Da. Para el control del espectrómetro, se utilizó el programa Flex-Control 3.0 (Bruker Daltonik GmbH,

Alemania). Para obtener los espectros de masas, se mezcló 1 μ L de muestra no diluida o 1 μ L de la muestra diluida 1: 5 en ácido fórmico al 0,1% v / v con 1 μ L de la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), preparada a 10 mg / ml en 50% v / v de ácido acetonitrilo-fórmico al 0,1% v / v en una placa de micromuestreo Scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Este medio se seleccionó ya que se usa preferiblemente para péptidos y / o proteínas de masa molecular menor de 10000 Da. Los espectros finales corresponden a la suma de 10 escaneos de 30 impactos de láser (300 impactos de láser totales). Para el análisis de los espectros se utilizó el programa mMass versión 5.5.0.

Análisis por dicroísmo circular del péptido defensina-1

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en el equipo Jasco J-1500 CD Spectrometer en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Se midió def-1 de concentración 0,2 mg/ml en 50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA, 5 mM β -ME. Para la forma reducida se incubó la misma proteína a 37°C *over-night* en el mismo amortiguador con adición de 1 mM de TCEP.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante el test de Mann-Whitney para variables no paramétricas.

Recolección de muestras de miel y abejas.

En noviembre de 2015 se tomaron muestras de mieles y de abejas de distintas colmenas desde apiarios de la Región de O'Higgins de las zonas de Chimbarongo, Codegua, Peumo y Rengo (Figura 5 y Tabla 2). Las muestras de miel fueron almacenadas en recipientes de polipropileno de tapa rosca y las abejas en una solución de etanol 70% en recipientes similares para su transporte al laboratorio. Las muestras de miel fueron congeladas a -20° hasta su análisis. Para el muestreo se contó con la ayuda de personal técnico y apicultores de la zona con experiencia en el trabajo con abejas.

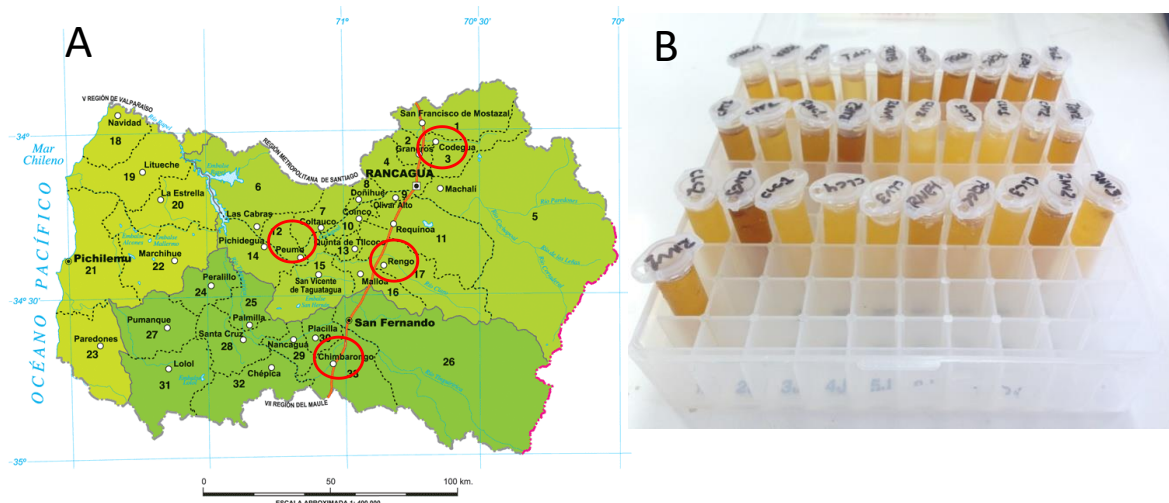


Figura 5. Muestras de miel utilizadas en este trabajo. En la (A) se señala las zonas donde se encuentran los apiarios desde donde se obtuvieron las muestras en la región de O'Higgins. En (B) se muestran las mieles de trabajo, donde destacan los distintos colores observados.

Como se muestra en la Tabla 2, a cada una de las muestras se le asignó un código de 3 letras y un número, donde la primera letra corresponde a la localidad, y la segunda y tercera al apiario desde donde se obtuvieron. El número corresponde al número de colmena asignado.

Tabla 2. Códigos asignados a las muestras de mieles y su localidad de origen.

Muestra	Localidad	Muestra	Localidad	Muestra	Localidad
CLC1	Chimbarongo	CPT2	Codegua	RNC3	Rengo
CLC2	Chimbarongo	PQG2	Peumo	RNC4	Rengo
CLC3	Chimbarongo	PQGA	Peumo	RNE1	Rengo
CLC4	Chimbarongo	PQGB	Peumo	RNE2	Rengo
CLC5	Chimbarongo	PQGC	Peumo	RNE4	Rengo
CLV1	Chimbarongo	PQP3	Peumo	RNV1	Rengo
CLV2	Chimbarongo	PQPA	Peumo	RNV2	Rengo
CLV3	Chimbarongo	PQPB	Peumo	RNV3	Rengo
CPF1	Codegua	PQPC	Peumo	RNV4	Rengo
CPF2	Codegua	RNC1	Rengo		
CPT1	Codegua	RNC2	Rengo		

Determinación de la acumulación H₂O₂ en la miel

Se determinó la actividad de la enzima glucosa oxidasa comparando la acumulación de peróxido de hidrógeno generado por un gramo de miel por hora, para un total de 24 horas. Se realizó una curva de calibración utilizando H₂O₂ 30% v/v desde donde se obtuvieron diluciones con concentraciones desde 2,2 hasta 17,4 mg/L en buffer fosfato pH 6,5. El cromóforo utilizado fue la *o*-dianisina, el cual es oxidado por el H₂O₂ (reacción catalizada por peroxidasa) generado en la miel por la enzima glucosa oxidasa a partir de la glucosa como sustrato (Kwakman *et al.*, 2010). La forma oxidada de la *o*-dianisina tiene un máximo de absorción a 444 nm. Los parámetros de calidad obtenidos de la curva de calibración fueron: R² de 99,8%; sensibilidad de 0,22; REC% de 2,6; (SA)⁻¹ de 0,06 µg/g x hr; LOD de 0,18 µg/g x hr y LOQ de 0,55 µg/g x hr.

Cuantificación de proteínas totales en la miel

Para esto se procedió a cuantificar proteínas mediante el método de Bradford siguiendo los pasos descritos (Bradford, 1976). Se preparó el reactivo de Bradford utilizando 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml de etanol 95% y 100 ml de ácido fosfórico 85%, la solución se aforó a 1 litro usando agua mili-Q y se almacenó a temperatura ambiente. Se realizó una curva de calibrado utilizando un patrón de BSA de 0 a 800 µg/ml y se midió absorbancia a 595 nm. Para cuantificar proteínas de las muestras se utilizaron 50 µl de miel al 20% p/v y se adicionó a 2,5 ml de reactivo de Bradford. También se realizó una curva para el ensayo de micro proteínas de Bradford con concentraciones de 5 a 100 µg/ml de BSA. Para este ensayo de utilizaron 100 µl de las muestras de miel al 20% y se adicionó a 1 ml de reactivo de Bradford.

Fraccionamiento de las muestras de miel

Se prepararon soluciones de 50 ml de miel al 20% p/v en HCl 1 mM y se agregó Fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) 0,05 mM para inhibir serin-proteasas presentes en la miel. Se procedió a filtrar con papel filtro multipropósito para remover restos de cera y

otros sedimentos. Posteriormente, 20 ml de solución de miel fueron cargados en membranas de exclusión por tamaño molecular de 10 kDa (Amicon®, Merck, USA) y sometidas a ultrafiltración (3000g, 30°C, 120 min). Se recuperaron las fracciones de tamaño molecular inferior a 10 kDa y se cargaron en membranas de 3 kDa (Amicon®, Merck, USA) y sometidas nuevamente a ultrafiltración (3600g, 30°C, 150 min). Posteriormente se realizó un lavado con 5 ml de agua nano-grado para eliminar impurezas retenidas en la fracción. La fracción retenida en la membrana (correspondiente a la fracción entre 10 y 3 kDa) fue recuperada y enrasada a 1 ml. Finalmente fueron almacenadas a -20°C. Todas las mieles fueron trabajadas con un duplicado en paralelo durante todo el proceso, excepto la miel RNV2, la cual se perdió un duplicado durante el fraccionamiento. Este proceso se fue desarrollado por nuestro grupo de investigación.

Caracterización espectroscópica de miel fraccionada mediante fluorescencia total y MCR

Las soluciones de miel fraccionada se diluyeron diez veces en agua previa al análisis de fluorescencia. Se utilizó un espectrofluorímetro Varian Cary-Eclipse (Mulgrave, Australia) equipado con una lámpara de flash de xenón para obtener espectros de fluorescencia total (EEM). Se utilizó una celda de cuarzo Starna (Essex, Inglaterra) con un volumen interno de 800 µl y una trayectoria de luz de 5 × 5 mm. Los EEM se registraron en los intervalos λ_{exc} de 220-350 nm cada 5 nm y λ_{em} de 250-450 nm cada 2 nm. Los anchos de las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 y 10 nm, respectivamente. Los espectros se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una computadora para su posterior manipulación. Todas las rutinas y cálculos quimiométricos se implementaron en Matlab v.7.6 (Mathworks, Natwick, MA).

Se usó la rutina propuesta por Zepp y colaboradores (Zepp *et al.*, 2006) para eliminar los picos de dispersión de Rayleigh y Raman de los EEM. El algoritmo MCR-ALS se implementó para analizar estos datos utilizando la interfaz gráfica de la caja de herramientas MCR (Jaumota *et al.*, 2005) descargada de www.mcrals.info. La descomposición por MCR se llevó a cabo en la matriz aumentada en la dirección de las

columnas (concatenada verticalmente). Por lo tanto, los espectros de emisión correspondían al "modo espectral" y los espectros de excitación al "modo de concentración". La varianza espectral y el número de componentes latentes se evaluaron mediante el análisis de componentes principales (PCA). La inicialización posterior consideró la alternativa pura en el modo espectral, no negatividad en ambos modos y el 10% como tolerancia en el ruido. Como resultado el análisis MCR-ALS permitió la determinación del número de fluoróforos en el sistema multicomponente y la extracción de sus espectros de excitación y emisión. Además, es posible determinar las concentraciones relativas de cada fluoróforo en cada muestra.

Cuantificación de enlaces disulfuro en miel fraccionada

Se utilizó 150 μl de muestra o patrón y se le agregaron 25 μl de NaBH_4 7 M. La reducción de los puentes disulfuro se llevó a cabo a 50°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 40 μl de HCl 6M para eliminar el NaBH_4 excedente de la reacción y 10 μl de isopropanol como antiespumante. Se adicionaron 225 μl de amortiguador acético 0,4 M, pH 4 y 250 μl de 4-ditiodipiridina (4-DTDP) 1,8 mM, que reacciona con los tioles formados y se dejó reaccionar por 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 324 nm (Reiner *et al.*, 2002). Se construyó una curva de calibrado usando cisteína como patrón con siete puntos con concentraciones de 5 a 90 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Dado que la insulina tiene una estructura similar a la defensina, incluyendo tres puentes disulfuro; la eficacia del procedimiento para reducir los enlaces disulfuro y la posterior determinación de los tioles formados en un péptido se evaluó previamente mediante el análisis de insulina recombinante humana inyectable comercial (Actrapid® y Novorapid® de Novo Nordisk, Dinamarca) de tres lotes diferentes a 100 UI/ml (3,5 mg/ml), equivalente a 438 mg de cisteína/L. Las recuperaciones medias fueron cercanas al 90% en los tres lotes, lo que confirmó la eficacia del método.

Ensayos de Concentración inhibitoria mínima de la miel

Se procedió a diluir las muestras de miel a 50% p/v. Se realizaron diluciones seriadas a partir de las mieles de prueba al 50% con medio LB para determinar una dilución con la cual comparar las muestras de miel por igual. Las mieles de prueba corresponden a cosechas de la colmena del Laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Desarrollo correspondiente a los años 2015 y 2016. Se seleccionaron cuatro cepas bacterianas para evaluar la actividad antimicrobiana: *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. Aeruginosa*. Las diluciones fueron las siguientes: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pocillos y fue medido el crecimiento bacteriano en base a su densidad óptica (OD₅₇₀) después de 24 horas en un lector de placas. Este ensayo se desarrolló para este estudio.

Confirmación de la presencia de *Nosema ceranae* en abejas

Se determinó la presencia de *Nosema ceranae* mediante recuento de esporas en el microscopio y amplificación de su material genético a través de PCR en tiempo real (Martínez *et al.*, 2012), procedimientos llevados a cabo por los colaboradores del grupo del Laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Desarrollo.

Software

Matlab v7.6.0.324 (R2008a), The MathWorks, Inc.

The Unscrambler v9.7, CAMO software AS.

STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03, Stat Point Technologies, Inc.

Geneious 11.0.4, Biomatters Ltd.

Microsoft Office 365

Base de Datos

Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Obtención del péptido antimicrobiano Defensina-1 de *Apis mellifera* puro.

1.1 Diseño de secuencia de Defensina-1

Se procedió a diseñar una secuencia para la defensina-1 en su forma madura introduciendo una secuencia de poli-Histidina (poli-His) y sitio de corte para la proteasa TEV tanto en amino como en el carboxilo terminal (Figura 6). La estrategia de utilizar poli-His se basa en facilitar la purificación del péptido mediante columna de Ni-agarosa. La presencia de la secuencia TEV fue incluida para remover el residuo de poli-His del péptido puro. La secuencia del DNA de def-1 (H-Def-H) indicada en la Figura 6 fue sintetizada por GeneScript (USA) con optimización codogénica para su traducción en *E. coli* y subclonada en el vector pUC57.



Figura 6. Diseño de la secuencia de ADN propuesta para expresar Defensina-1. La secuencia que codifica para la forma madura de Defensina-1 se destaca en verde y su secuencia nucleotídica en blanco. En negrita y subrayado se destacan los sitios de restricción. Subrayado se indica el codón de término.

1.2 Obtención Defensina-1

Posteriormente, se procedió a transformar el vector pUC57 en *E. coli* DH5 α . El vector pUC57 con la secuencia H-Def-H fue amplificado en la bacteria, purificado e incubado con las enzimas de restricción NcoI y HindIII y se subclonó en el vector pET21d. Esto permite expresar la defensina utilizando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) mediante el operon *lac* presente en el vector. El plásmido fue amplificado, purificado y sometido a PCR mutagénico con los partidores H-Def-1 F y H-Def-1 R para insertar un codón de término en el carboxilo terminal del péptido y así expresar la Def-1 con la secuencia poli-His y el sitio de corte TEV solo en su extremo amino terminal. A este producto se le denominó H-Def (Figura 7). El plásmido H-Def fue transformado en la cepa *E. coli* BL21 y esta última bacteria fue utilizada para la inducción de la expresión y posterior purificación del péptido.

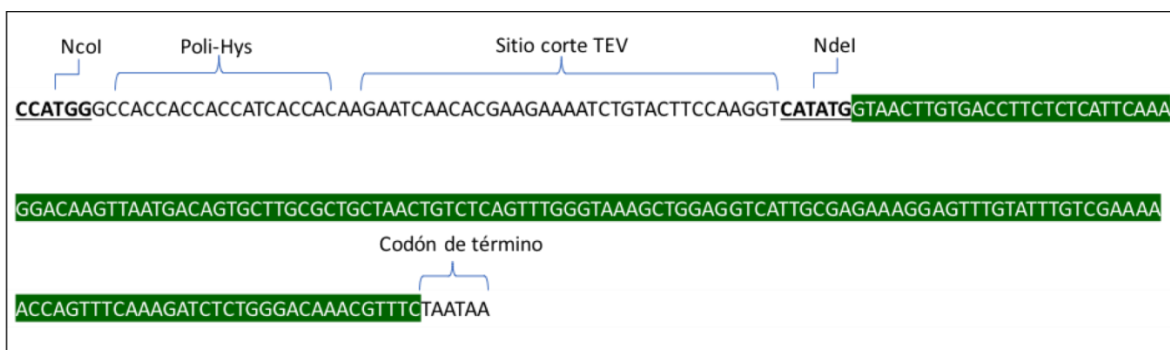


Figura 7. Secuencia de ADN correspondiente al producto de PCR mutagénico. La secuencia que codifica para la forma madura de Defensina-1 se destaca en verde con su secuencia nucleotídica blanco. En negrita y subrayado se destacan sitios de restricción.

1.3 Análisis por MALDI-TOF/MS del péptido Defensina-1

El resultado de este análisis se muestra en la Figura 8. El péptido tiene una fórmula $C_{252}H_{403}N_{75}O_{75}S_7$ correspondiente a una masa promedio de 5907,82 g/mol. El resultado de MALDI-TOF/MS muestra cuatro grupos de señales cada uno conformado por 2 o 3 especies moleculares con diferencias entre 11-15 Da: el 1° grupo corresponde a las masas moleculares 5901, 5916 y 5932 Da; el 2° grupo a las masas 5979, 5994 y 6009 Da; el grupo 3 a las masas 6059 y 6073 Da y el grupo 4 a las masas 6136 y 6149 Da. Resultados similares fueron reportados por Rees *et al.* (1997), quienes atribuyen la diferencia de 7Da en la primera especie (5901 Da) a la eliminación de seis átomos de hidrógeno (-6Da), asumiendo que las seis cisteínas están comprometidas en tres puentes disulfuro intramoleculares; mientras que la diferencia adicional de 16 y 32Da de las otras especies (5916 y 5932 Da) se debería a la oxidación de triptófano, metionina o lisina (+ 16 Da o 32 Da para un oxígeno o dos oxígenos adicionales). Kludiny *et al.* (2005) observaron una huella espectral similar en la isoforma royalisina bajo la misma técnica de MALDI-TOF/MS. En cuanto a las diferencias de 77-80 Da entre grupos, esta se puede atribuir a complejos formados entre el péptido y una, dos o tres moléculas del mercaptoetanol (78,13 g/mol) presente en el medio, por reducción de los correspondientes puentes disulfuro. Si bien la información apunta a que es probable haber obtenido el péptido, esto solo puede ser confirmado por una secuenciación aminoacídica.

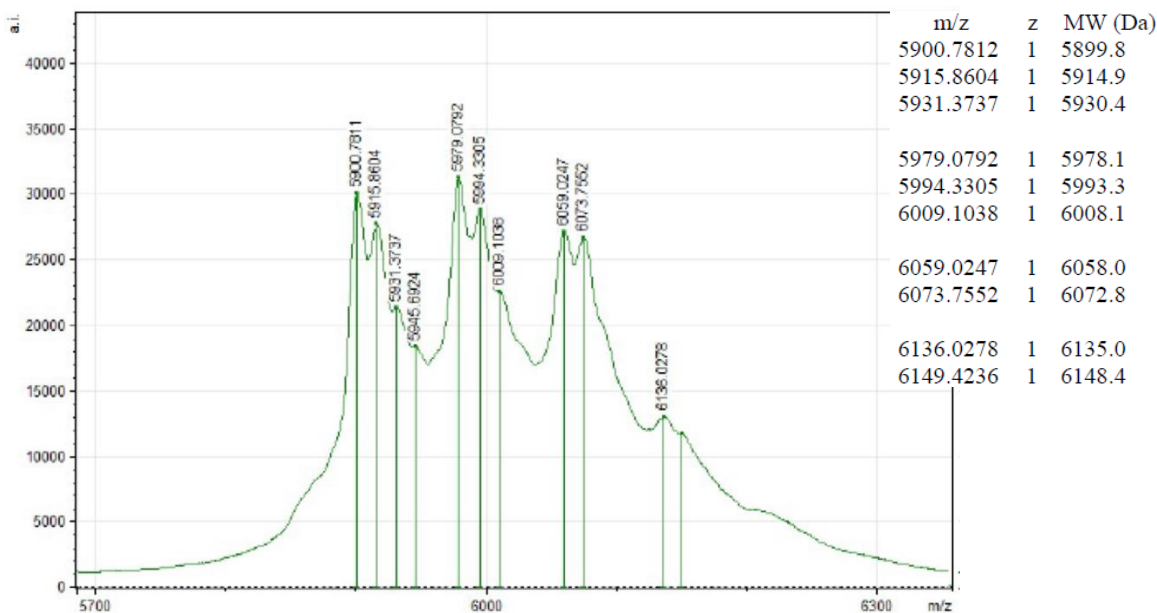


Figura 8. Espectro de masa de Defensina-1 recombinante. Espectro obtenido por MALDI-TOF/MS donde se observan cuatro grupos de señales donde el primero, el de relación masa-carga más baja correspondería a Defensina-1 y los demás a complejos del péptido con mercaptoetanol.

2) Caracterización espectroscópica y determinación de la presencia de enlaces disulfuro en el péptido Defensina-1.

2.1 Caracterización espectroscópica

Desde el artículo de Fujiwara *et al.* en 1990, se ha descrito la presencia de defensina-1 como compuesto antimicrobiano clave en la jalea real y miel. Las tres isoformas de defensina-1 contienen 51 aminoácidos, 6 residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro y un residuo de triptófano en la posición 47. El análisis por espectrometría de masas de defensina ha reportado diferencias entre la masa molecular de la defensina-1 de hemolinfa o Ro-K (PM = 5515,5 Da) y la de jalea real Ro-F (PM = 5525,1 Da). La diferencia en la masa molecular es causada por la sustitución de arginina a tirosina en Ro-F en la posición 50 del extremo C-terminal (Casteels-Josson *et al.*, 1994). La isoforma encontrada en la miel corresponde a la que presenta arginina (Kwakman *et al.*, 2010; Valachova *et al.*, 2016). En la Figura 9 se muestra la identidad aminoacídica de la

Defensina-1, la Defensina recombinante obtenida en el objetivo 1 y la isoforma royalisina de la familia de la Defensina-1, presente en jalea real. Por ello la detección de triptófano mediante fluorescencia permite la caracterización de la Defensina-1 y podría ayudar a evidenciar su presencia en las mieles.

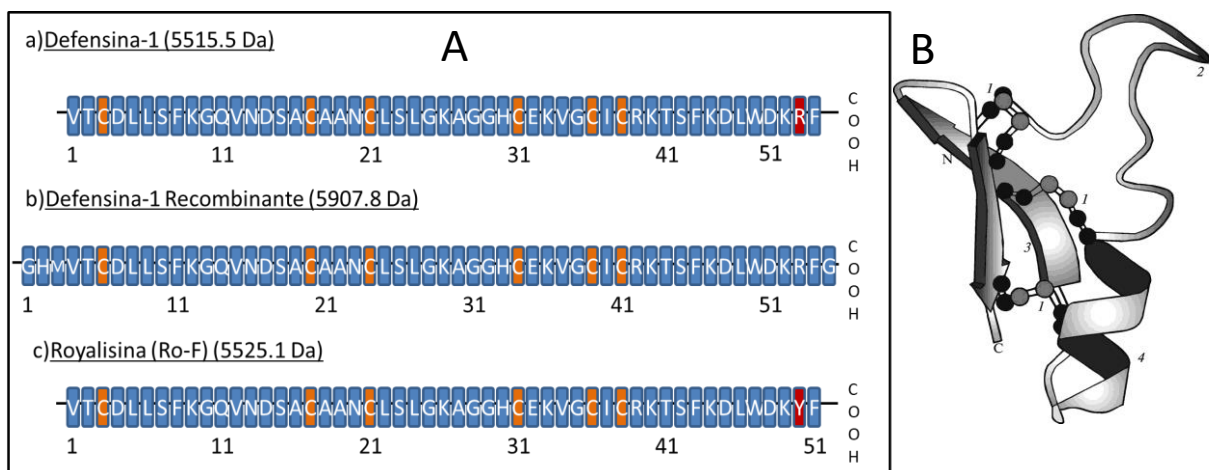


Figura 9. Caracterización estructural de Defensina-1. En la (A) se compara la identidad aminoacídica de la Defensina-1, Defensina recombinante y la isoforma royalisina, donde se desatacan en naranja las cisteínas y en rojo la diferencia entre las isoformas defensina-1 y royalisina, dada por un reemplazo de tirosina por arginina. En la (B) se muestra la distribución espacial del péptido: 1) puentes disulfuro; 2) loop; 3) dos estructuras β -plegadas antiparalelas; 4) α -hélice (Ilyasov *et al.* 2013)

Se procedió a medir los espectros de excitación-emisión del péptido recombinante puro obtenido en el objetivo 1. Estos fueron registrados entre 200 y 350 nm cada 5 nm en excitación y entre 250 y 450 nm cada 2 nm en emisión. En la Figura 10 A, B y C se observan los perfiles de excitación-emisión (EES) del péptido recombinante obtenido en el objetivo 1, tirosina (300 ppb) y triptófano (250 ppb), respectivamente. En el caso de la tirosina pura (Figura 9B) se observan dos señales: la más intensa a una excitación cercana a 225 nm y excitación cercana a 300 nm; y una segunda señal menos intensa a una excitación de 275 nm y emisión a 300 nm la cual es atribuida a la superposición de dos transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ separadas del anillo fenólico (Creed, 1984a). Para la EEM del triptófano, se observan también dos señales: una señal intensa a excitación de 225 nm y emisión cercana a 355 nm; y una señal menos intensa a excitación de 275 nm y emisión de 355 nm la cual es atribuida a la superposición de dos transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ separadas del anillo indol (Creed, 1984b)

Para el péptido se observa una señal similar a la menos intensa observada para triptófano en solución acuosa, pero desplazada hacia longitudes de onda más cortas, lo que podría indicar que el único residuo de triptófano que posee el péptido recombinante se ubica en un entorno más hidrofóbico que el aportado por el agua en el patrón (Vivian & Callis, 2001). Además, en el péptido hay ausencia de tirosina.

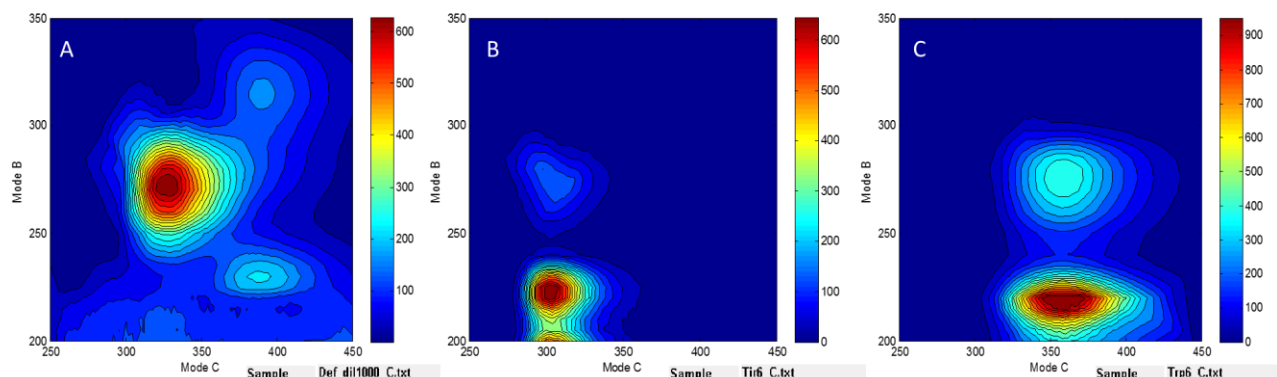


Figura 10. Espectros de excitación-emisión. En la imagen se muestran los perfiles de fluorescencia (mode C: emisión; mode B: excitación) de: A) Defensina recombinante pura, B) Tirosina (300 ppb), C) Triptófano (350 ppb)

Para determinar el correcto plegamiento del péptido recombinante, este se analizó mediante dicroísmo circular, lo que permite determinar cambios a nivel de estructura secundaria de las proteínas. En el caso de la Defensina-1 esta presenta una mezcla de α -hélice y β -plegadas en su forma nativa (Ilyasov *et al.* 2013). En las Figuras 11A y 11B se muestran los espectros de dicroísmo circular del péptido recombinante en ausencia y presencia de un medio reductor, respectivamente. En la Figura 11A se aprecia un mínimo de absorción cercano a 226 nm, pero el resultado no se puede relacionar con espectros de referencia de estructuras secundarias patrón. Sin embargo, la forma espectral obtenida tiene cierta similitud a la forma característica de la estructura β -plegada (Figura 11C), lo que permite postular que en condiciones oxidantes la defensina recombinante posee este tipo de estructura secundaria. No obstante, el espectro típico de una hoja beta plegada presenta un mínimo espectro desplazado hacia longitudes de onda menores respecto al espectro de la defensina recombinante. Este último efecto podría ser causado por propiedades intrínsecas del péptido recombinante o por su interacción con el medio en el que se encuentra. Se han descrito *peaks* negativos en 222 nm en coprisina (43

aminoácidos), un péptido de la familia de las defensinas de insecto aislada de escarabajo pelotero (*Copris tripartitus*), pero con una forma espectral menos pronunciada, la cual los autores atribuyen a estructuras α -helice y β -plegadas presentes en el péptido y separadas dentro del mismo (Lee *et al.*, 2013). Debido a que la estructura de la defensina presenta 3 enlaces disulfuros, las muestras fueron incubadas con el agente reductor (TCEP) a 37°C durante la noche. Como se muestra en la Figura 11B, la presencia del agente reductor cambia de manera significativa el espectro de dicroísmo circular de la defensina mostrando una disminución hacia valores negativos a medida que se acerca a longitudes de onda más cortas. Esta última forma espectral se asemeja a la forma espectral para proteínas desordenadas (Figura 11C). No obstante, aunque el espectro presenta una forma esperada para estados desordenados de proteína, este está desplazado hacia longitudes de onda más largas respecto a espectros de estados desplegados descritos en la literatura. Por lo tanto, es posible la reducción de los enlaces disulfuros no sea suficiente para desplegar completamente la proteína. En cuanto a los espectros de referencia, se han descrito estructuras secundarias que poseen *peaks* negativos en el rango de longitudes de onda analizados, donde se atribuye un *peak* a 222 nm a correspondientes estructuras α -helice y a 218 nm estructuras β -antiparalelas (Greenfield, 2006), como se muestra en la Figura 11C. Cabe señalar que la defensina sufre modificaciones post-traduccionales, que permiten su maduración de propeptido a péptido, además de la formación de puentes disulfuro, por lo que la maquinaria de traducción procarionte y las condiciones reductoras del citoplasma podrían favorecer que el péptido presente formas finales que no se asemejen a la nativa.

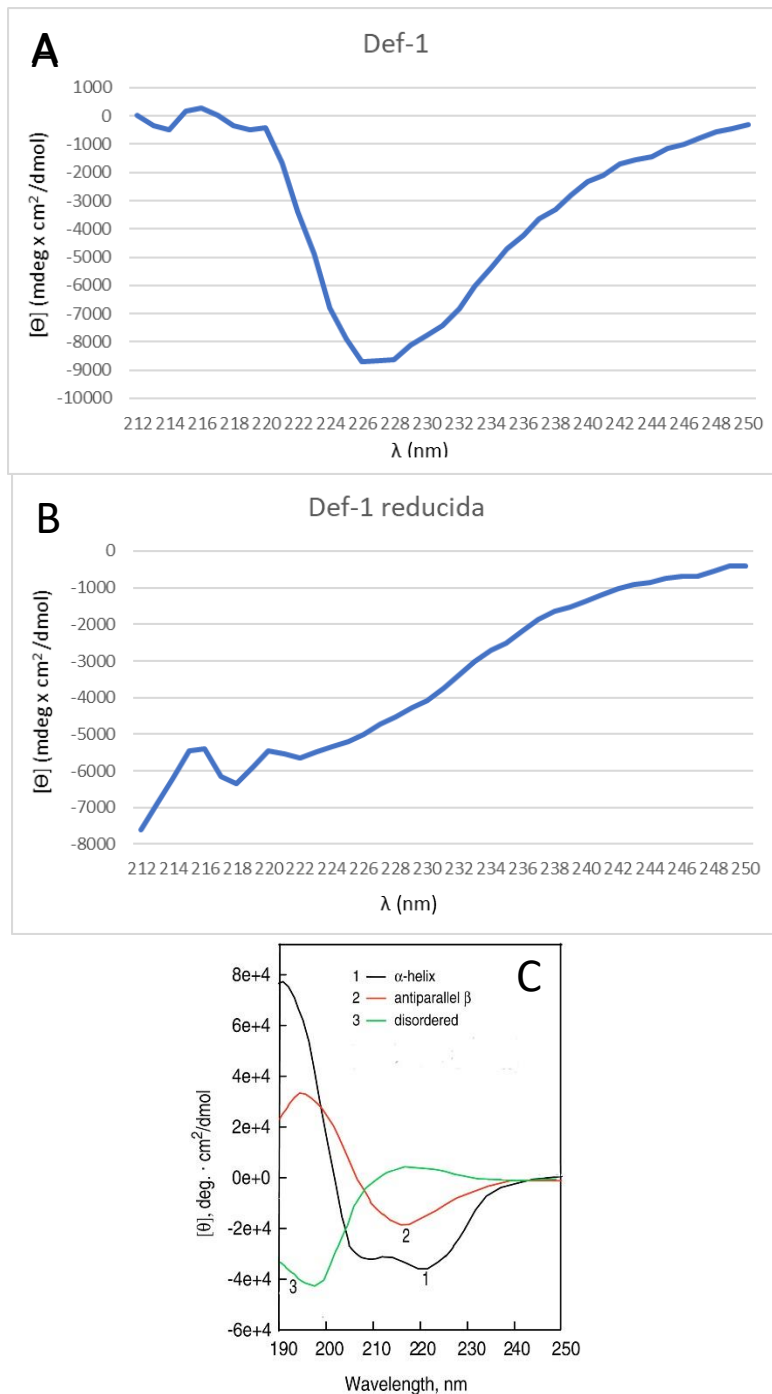


Figura 11. Análisis mediante Dicroísmo Circular de la Defensina-1. A: Dicroísmo circular para defensina sin reducir; B: dicroísmo circular para defensina reducida con TCEP; C: Dicroísmo circular de distintas estructuras secundarias proteicas adaptado de Greenfield (2006).

2.2 Cuantificación de enlaces disulfuro

Las defensinas son miembros de una familia ampliamente distribuida de péptidos antibacterianos de insectos con un patrón distintivo de seis cisteínas / tres enlaces disulfuro dando como resultado una estructura globular compacta. Todas las defensinas de insecto tienen el mismo apareamiento de cisteínas: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys6 (Bulet *et al.*, 1999). Se evaluó entonces la presencia de enlaces disulfuro en el péptido recombinante y posteriormente los atribuibles a la defensina en la miel fraccionada. Para esto se realizó la curva de calibración presentada en la Figura 12.

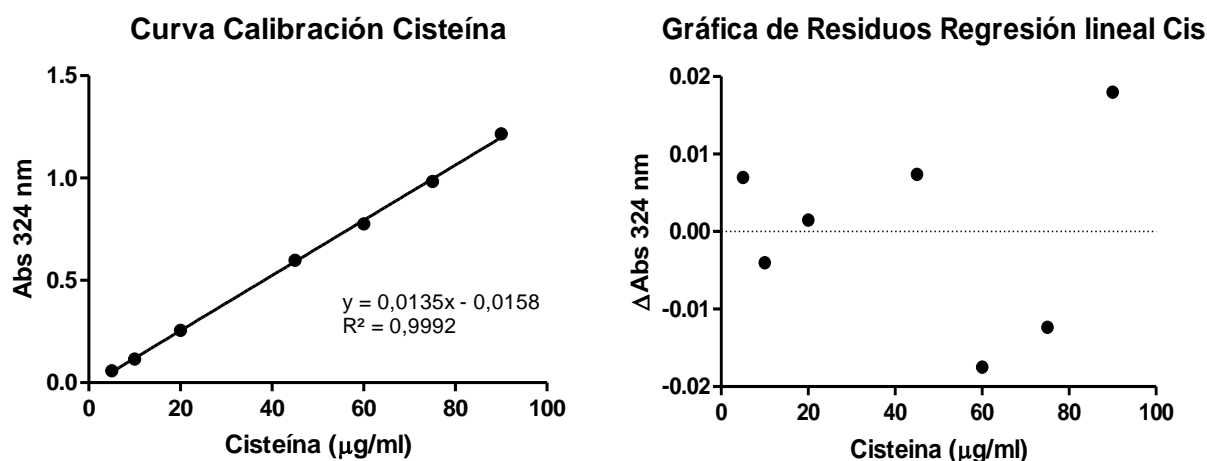


Figura 12. Curva de Calibración para cuantificar la cisteína. En el gráfico de la izquierda se observa la curva y su regresión lineal. A la derecha se encuentra el gráfico de residuos.

En la Tabla 3 se muestran los valores de cisteína calculadas para dos metodologías distintas. Según la metodología de Bradford, se cuantificó la concentración total de proteína de una muestra de defensina recombinante y se calculó la concentración de cisteínas considerando la proporción del aporte de masa de 6 cisteínas presentes en el péptido (729,6 Da de 5907,9 Da totales). Para la metodología de puentes disulfuro se utilizó el procedimiento descrito en la metodología que cuantifica directamente la cantidad de cisteínas. La diferencia de concentración de cisteína de ambas metodologías es de un 16,9%

Tabla 3. Concentración de cisteína de defensina recombinante

	Bradford	Puentes disulfuro
Promedio concentración cisteína (µg/ml)	187,3	225,6

Además, de acuerdo a este análisis se obtuvo un valor de 7 residuos de cisteína por mol de defensina recombinante, cercano a los seis residuos que forman tres puentes disulfuro descritos para el péptido. Esto corrobora la correcta cuantificación de la concentración del péptido y la presencia de esta estructura.

3) Comparación los perfiles de fluorescencia total de la fracción de miel entre 3 y 10 kDa de *Apis mellifera* sanas e infectadas con *Nosema ceranae*.

3.1 Identificación de colmenas infectadas con *Nosema ceranae*.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para las abejas de las colmenas muestreadas. También se consideró la información proporcionada por los apicultores sobre la infección por nosema en la temporada. Solo 4 muestras de las 31 (12,9%) dieron positivo para la amplificación de genes de nosema. Si consideramos la información proporcionada por los apicultores, aumenta a 10 (32,3%) el número de muestras consideradas expuestas a nosemosis. Este último grupo muestral fue considerado para hacer las comparaciones entre colmenas sanas y colmenas expuestas a nosemosis.

Tabla 4. Identificación colmenas infectadas. En la tabla se muestran los resultados obtenidos por amplificación por PCR de genes de nosema. (+): amplificación ADN nosema; (-): sin amplificación; (*): apicultores declararon nosemosis en la temporada.

Muestra	Nosemosis	Muestra	Nosemosis	Muestra	Nosemosis
CLC1	-	CPT2	-	RNC3	-
CLC2	-	PQG2	-(*)	RNC4	-
CLC3	-	PQGA	-(*)	RNE1	-
CLC4	-	PQGB	-(*)	RNE2	-
CLC5	-	PQGC	-(*)	RNE4	-
CLV1	-	PQP3	-(*)	RNV1	-
CLV2	-	PQPA	+(*)	RNV2	-

CLV3	+	PQPB	-(*)	RNV3	-
CPF1	-	PQPC	+(*)	RNV4	-
CPF2	-	RNC1	-		
CPT1	+	RNC2	-		

3.2 Caracterización espectroscópica de la miel fraccionada

En la Figura 13 se muestran los EEM de algunas de las fracciones de mieles ocupadas en este trabajo. La Figura 13A corresponde a la EEM de una miel infectada con nosemosis, donde se puede apreciar una señal muy intensa que corresponde a fluorescencia de triptófano y una señal más débil correspondiente a tirosina, ambos comparables a los respectivos patrones (Figuras 10B y 10C). Adicionalmente, en las mieles se observa una señal de λ_{em} 380-450 nm (máximo de 430 nm) y λ_{exc} 300-350 nm (máximo de 340 nm) la que dio cuenta de la mayor variabilidad de la data espectral de los EEM obtenidos. A esta señal se le designó como “componente 1” y es probable que se deba a la presencia de productos de glicación avanzada de proteínas (AGEs), los que se producen en medios ricos en azúcares y presentan fluorescencia en el intervalo de longitudes de onda señalados (Schmitt *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012). La Figura 13B corresponde al EEM de una miel proveniente de una colmena considerada sana, donde se ve una señal más intensa correspondiente a Tyr, y una señal débil de Trp. Por otra parte, en la Figura 13C se muestra el espectro de la fracción entre 3-10 kDa de la miel con la menor señal fluorescente de triptófano, la que fue previamente enriquecida con el péptido recombinante, donde se puede observar el desplazamiento de la fluorescencia del triptófano hacia mayores longitudes de onda, comparado con el péptido recombinante solo (Figura 10A), así como una mayor similitud con el EEM observado en la miel (Figura 13A). Este cambio en el EEM del péptido se podría deber a alguna modificación en su estructura provocado por los componentes de la miel, incluida una posible glicación. Sin embargo, este es un aspecto que requiere un mayor estudio.

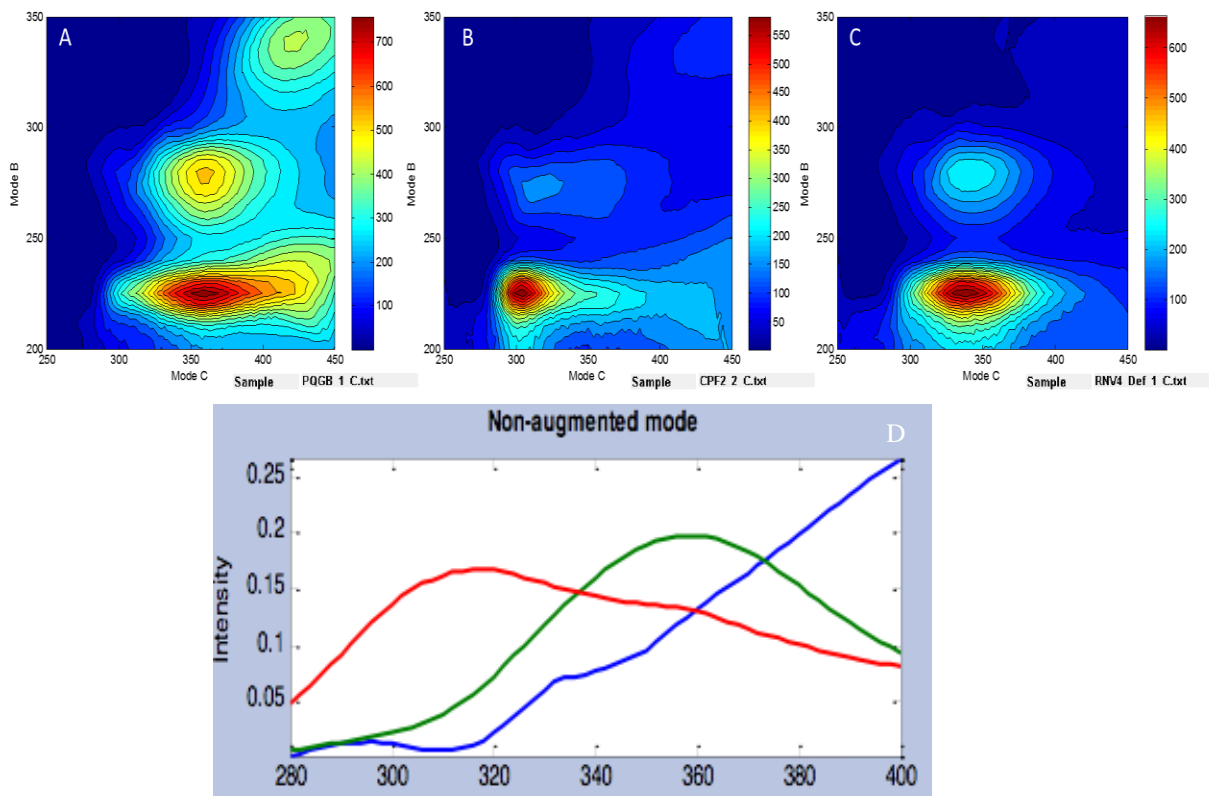


Figura 13. Espectros de excitación-emisión de las mieles de trabajo. En la imagen se muestran los perfiles de fluorescencia de las fracciones 3-10 kDa de: A) EEM de miel infectada con *nosema* (muestra PQGB), B) EEM de miel no infectada con *nosemosis* (muestra CPF2) y C) Miel RNV4 enriquecida con Defensina recombinante (Fracción 3-10 kDa), D) Componentes obtenidos mediante MCR que explican fluorescencia de los EEM. Azul: componente 1; verde: Fluorescencia triptófano; rojo: Fluorescencia tirosina.

Por otra parte, la descomposición de los EEM de las mieles corrobora la presencia de los tres componentes antes mencionados, tal como se muestra en la Figura 13D.

Debido a que los aminoácidos aromáticos que forman parte de una proteína presentan variación en su fluorescencia debido a la estructura de esta y a las condiciones ambientales; el uso de mezclas de aminoácidos libres como referencia con fines cuantitativos es poco confiable. Por ello, a partir de los EEM de las mieles se obtuvieron las concentraciones relativas de los tres fluoróforos en las muestras de miel fraccionadas mediante MCR, donde a la primera muestra de la serie se le asigna un valor arbitrario de 1 en concentración y las restante están referidas a ella. Los valores de los tres componentes se presentan en la Tabla 5; mientras que en la Figura 14 se muestran la relación de triptófano (14A) y tirosina (14B) con las colmenas sanas y expuestas a *Nosema* spp.

Tabla 5. Concentraciones relativas de fluoróforos. Concentración relativa de los tres componentes fluorescentes recuperados por MCR-ALS.

Muestra	Fluo-Trp	Fluo-Tyr	Comp. 1	Muestra	Fluo-Trp	Fluo-Tyr	Comp. 1
CLC1	1,00	1,00	1,00	PQPB	5,69	1,09	3,26
CLC2	2,55	1,03	1,56	PQPC	2,51	0,63	3,85
CLC3	1,17	0,97	0,76	RNC1	6,49	1,14	2,30
CLC4	1,45	1,09	1,96	RNC2	2,50	2,25	2,43
CLC5	1,92	1,21	1,21	RNC3	2,07	0,86	3,69
CLV1	0,83	0,82	1,08	RNC4	2,92	1,53	2,12
CLV2	1,87	0,81	1,33	RNE1	4,06	1,17	3,61
CLV3	1,14	0,68	1,74	RNE2	3,08	0,51	5,97
CPF1	1,19	1,28	0,96	RNE4	1,83	1,07	1,54
CPF2	1,39	2,29	1,40	RNV1	1,46	0,99	2,46
CPT1	1,04	0,94	1,62	RNV2	1,71	0,97	2,39
CPT2	2,13	1,17	1,65	RNV3	1,29	0,85	1,87
PQG2	3,19	0,64	5,08	RNV4	0,49	0,72	0,62
PQGA	10,62	0,75	4,50				
PQGB	5,82	0,80	4,11				
PQGC	1,92	0,93	1,83	Promedio	2,8	1,17	2,4
PQP3	3,82	1,80	2,94	sd	2,2	0,4	1,3
PQPA	6,46	1,19	2,83	RSD (%)	80	39	56

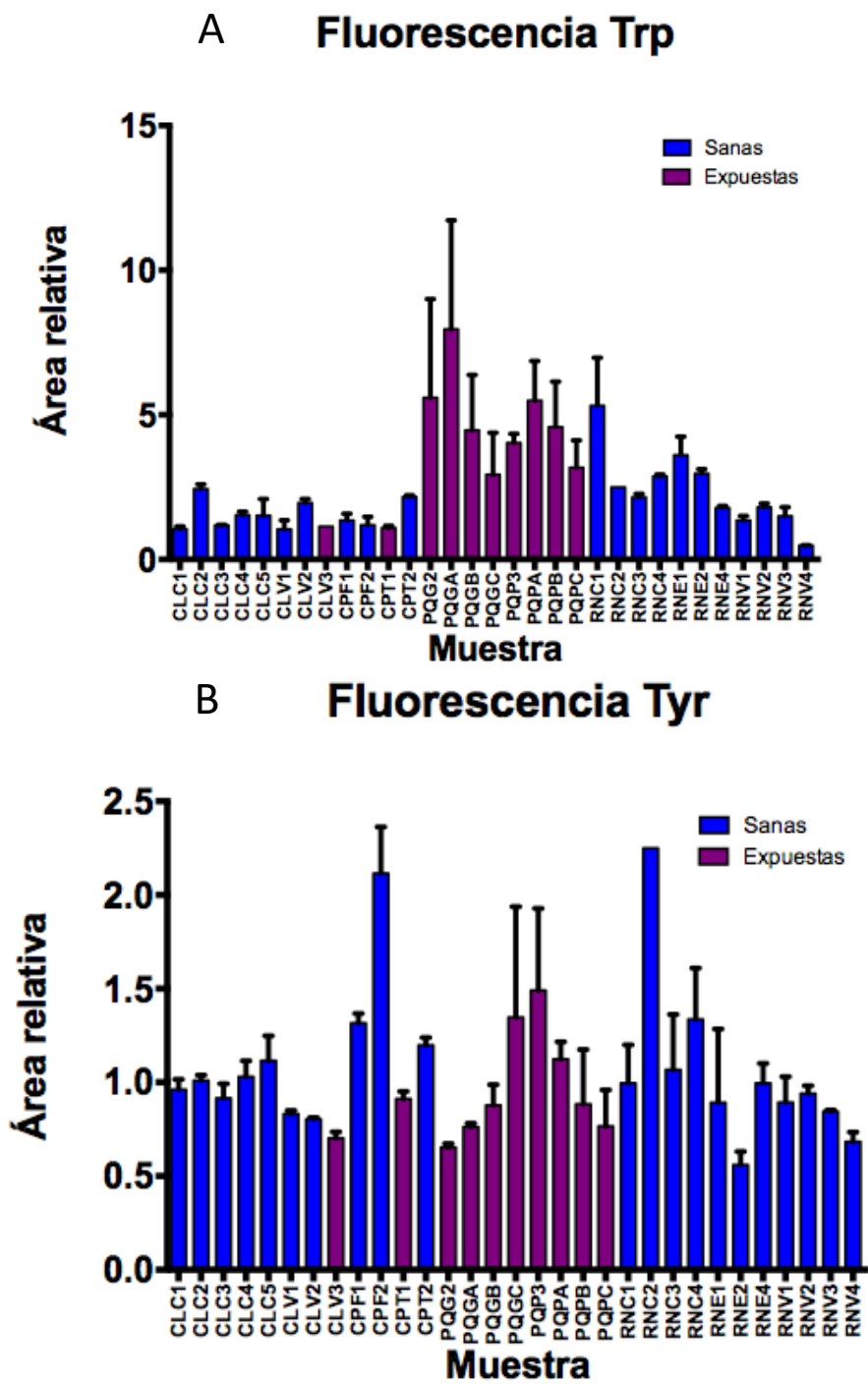


Figura 14. Análisis de las concentraciones relativas de triptófano y tirosina. A: áreas relativas concentración de triptófano; B: áreas relativas concentración de tirosina.

La concentración relativa de triptófano como componente fluorescente y el denominado componente 1 se distribuyó ampliamente en las muestras con una desviación estándar relativa (RSD) de 80 y 56%, respectivamente; mientras que la concentración relativa de tirosina en las muestras fue más estrecha que la del triptófano (RSD = 39%). Por otra parte, como se aprecia en la Figura 15, no se observó correlación significativa entre estos valores ($n = 31$, $r = -0.033$, $p = 0.8578$).

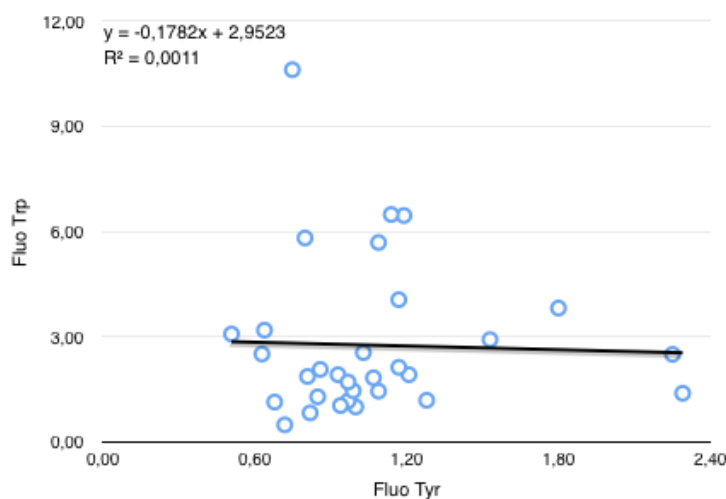


Figura 15. Correlación entre concentraciones relativas de tirosina y triptófano obtenidas a partir de los EEM.

Por otra parte, la concentración relativa de triptófano en las mieles fraccionadas obtenidas desde colmenas sanas ($n = 21$) fue significativamente menor que la de colmenas infectadas ($n = 10$), mientras que para la concentración relativa de tirosina no hubo diferencias entre las colmenas (Figura 16). Estas evidencias indican que ambos aminoácidos no forman parte de la misma estructura proteica, siendo la presencia de triptófano la que pondría en evidencia la presencia de defensiva.

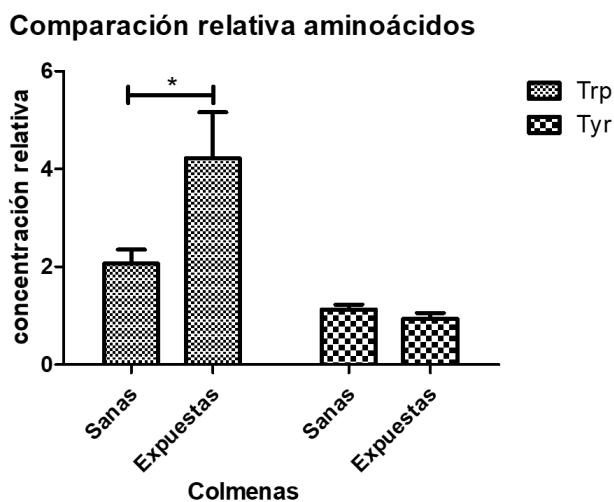


Figura 16. Comparación de concentraciones relativas de aminoácidos aromáticos entre grupos de miel. En la figura se observa una diferencia en los niveles de triptófano entre miel de colmenas expuestas y sanas. *: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

3.3 Cuantificación proteínas totales.

Para determinar si la variación en el contenido de triptófano en la fracción de 3-10 kDa de las mieles infectadas se relaciona con su contenido de proteínas totales presentes en la miel se propuso cuantificar esto último. El contenido proteico de las mieles fue determinado, correlacionado con el primero y utilizado para normalizar el contenido de triptófano. Para esto se procedió a cuantificar proteínas mediante el método de Bradford siguiendo los pasos descritos en la metodología. En la Figura 17 se presenta la curva de calibración obtenida.

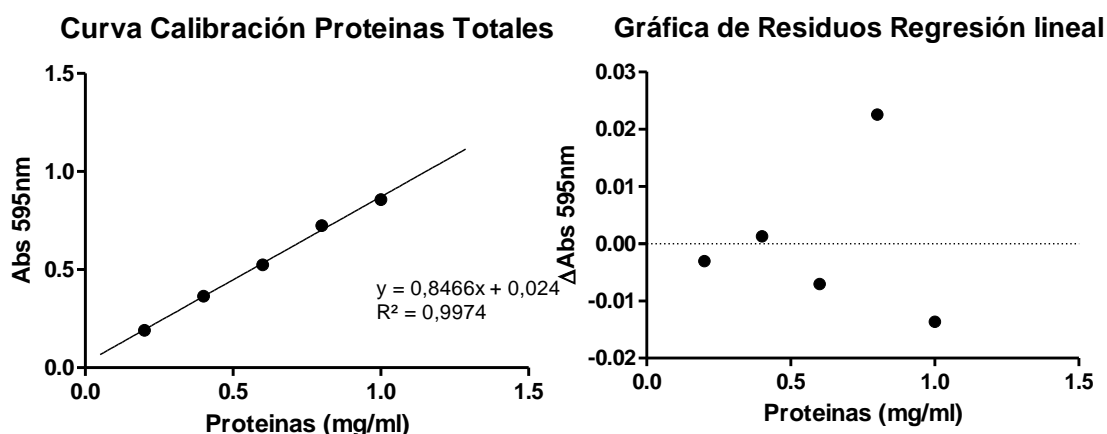


Figura 17. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales. En el gráfico de la izquierda se observa la curva y su regresión lineal. A la derecha se encuentra el gráfico de residuos.

En la Tabla 6 se observan los valores obtenidos de proteínas totales. En primer término, se observó una correlación sólo marginal ($r = -0,3670$, $p = 0,042$) entre los contenidos de proteína y triptófano. En general los contenidos de proteína más bajos se observaron en las muestras de Peumo, que coinciden con la mayoría de las mieles consideradas infectadas con nosema (Figura 18). Para normalizar la concentración relativa de triptófano, esta fue relacionada con la concentración de proteínas totales presentes en la miel. Al igual que lo observado previamente, la concentración normalizada de triptófano de las fracciones de 3-10 kDa en las mieles de colmenas expuestas a nosemosis fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la de colmenas sanas (Figura 19). Dado que triptófano evidenciaría la presencia de defensina-1, el péptido se encontraría en concentración mayor en las colmenas expuestas a nosemosis (Figura 19)

Tabla 6. Concentración de proteínas totales de las muestras de miel.

Muestra	Proteínas (mg/kg)	Muestra	Proteínas (mg/kg)	Muestra	Proteínas (mg/kg)
CLC1	1170	CPT2	560	RNC3	1030
CLC2	1240	PQG2	630	RNC4	1410
CLC3	1110	PQGA	640	RNE1	1080
CLC4	250	PQGB	840	RNE2	800
CLC5	920	PQGC	610	RNE4	1310
CLV1	1070	PQP3	560	RNV1	1120
CLV2	1270	PQPA	590	RNV2	930
CLV3	1300	PQPB	490	RNV3	980
CPF1	550	PQPC	740	RNV4	1090
CPF2	590	RNC1	660	Promedio	880 ± 300
CPT1	1160	RNC2	670	RSD (%)	34

Proteínas Totales

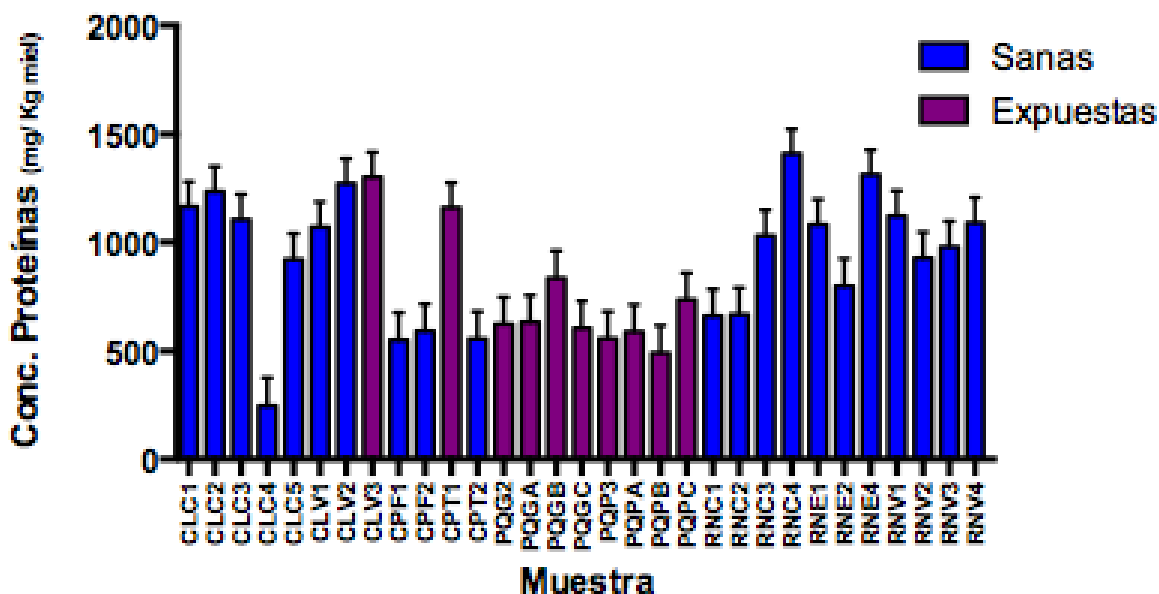


Figura 18. Gráfico de proteínas totales muestras de miel. Resultados graficados de concentración de proteínas totales en las muestras de miel, en morado se presentan las muestras consideradas expuestas a nosemosis.

Normalización trp por proteínas totales

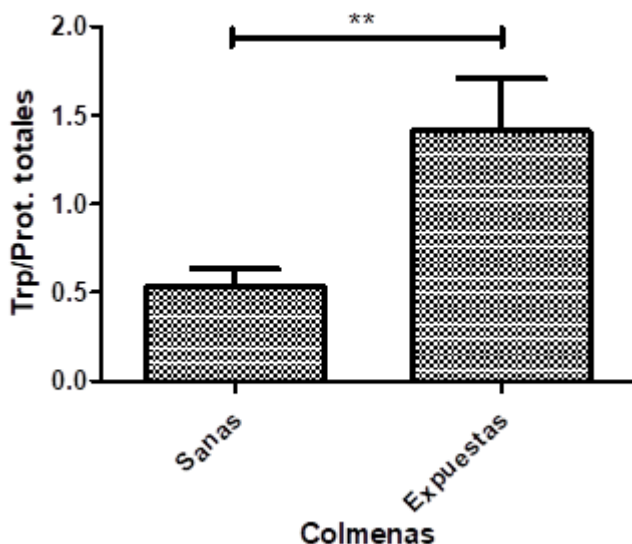


Figura 19. Comparación de concentraciones relativas normalizadas de triptófano entre grupos de miel. **: diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Los niveles proteicos totales de las mieles provenientes de colmenas infectadas son inferiores a los presentes en mieles de colmenas sanas, mostrando una tendencia opuesta a lo observado para el triptófano en las fracciones de 3-10 kDa de las mismas muestras. Esto podría indicar que la nosemosis afecta a la producción global de proteínas por parte de las abejas, lo que hace disminuir su contenido en la miel, pero induce un aumento de los niveles de las proteínas destinadas a la inmunidad social como la Defensina-1.

3.4 Determinación enlaces disulfuro

Se estableció la presencia de enlaces disulfuro presentes en la fracción 3-10 kDa mediante la metodología descrita utilizando como muestra 150 μ l de la fracción. Para descartar la presencia de posibles grupos tiol libres en la miel fraccionada, se realizó también la reacción con 4,4-DTDP sin la etapa de pre-reducción. La absorbancia a 324 nm de estas muestras fue insignificante, indicando que los tioles determinados procedían exclusivamente de puentes disulfuro. Los valores obtenidos se expresaron como mg de cisteína por kg de miel y se presentan en la Tabla 7. Los valores se distribuyeron ampliamente entre 1,0 y 51,1 mg/kg, con una desviación estándar relativa del 116%. En la figura 20 hay una comparación más visual de los valores obtenidos y su incidencia con exposición a nosemosis. Se realizó una comparación estadística entre los valores obtenidos

por muestras de colmenas consideradas sanas y expuestas a nosemosis, donde se consiguieron valores más elevados de concentración de cisteína en las fracciones de 3-10 kDa en mieles consideradas expuestas a nosemosis, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 21).

Tabla 7. Concentraciones de cisteína de muestras de miel.

Muestra	Cisteína (mg/kg)	Muestra	Cisteína (mg/kg)	Muestra	Cisteína (mg/kg)
CLC1	3,1 ± 0,14	CPT2	5,0 ± 0,78	RNC3	6,9 ± 0,48
CLC2	2,3 ± 0,28	PQG2	50,8 ± 2,21	RNC4	6,3 ± 0,88
CLC3	2,5	PQGA	51,1 ± 9,30	RNE1	12,9 ± 1,82
CLC4	3,3 ± 0,19	PQGB	29,7 ± 0,38	RNE2	21,3 ± 0,24
CLC5	0,3 ± 0,63	PQGC	14,0 ± 1,51	RNE4	4,8 ± 1,43
CLV1	1,4 ± 0,09	PQP3	10,2 ± 0,48	RNV1	7,3 ± 0,27
CLV2	3,4 ± 0,21	PQPA	19,4 ± 3,80	RNV2	6,7 ± 0,62
CLV3	3,4 ± 0,27	PQPB	26,2 ± 0,83	RNV3	8,0 ± 0,17
CPF1	3,1 ± 0,07	PQPC	23,8 ± 7,62	RNV4	0,9 ± 0,19
CPF2	2,7 ± 0,50	RNC1	14,2 ± 2,74	Promedio	11 ± 13
CPT1	2,8 ± 0,38	RNC2	5,4	RSD (%)	116

Concentración cisteína

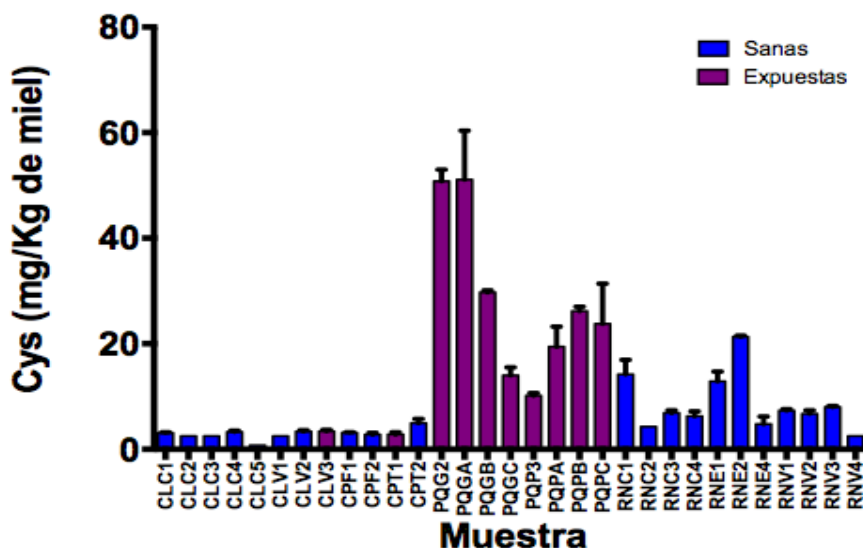


Figura 20. Análisis de concentración de cisteína en muestras de miel mediante reducción de 4-DTDP.

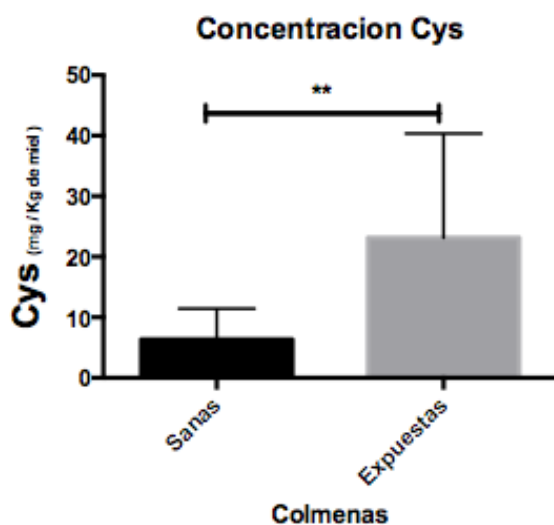


Figura 21. Comparación estadística concentración de cisteína. Comparación de concentraciones de cisteína entre muestras de mieles consideradas expuestas a nosemosis versus sanas. **: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

El contenido de cisteína se correlacionó entonces con la concentración relativa de los tres fluoróforos recuperados mediante MCR-ALS. (Figura 22). Como se muestra en la Figura 22A, se observó una correlación positiva significativa entre cisteína y el componente 1 ($n = 31$, $r = 0,8000$, $p < 0,001$) y entre cisteína y la fluorescencia de Trp en la Figura 22B ($n = 31$, $r = 0,7455$, $p < 0,001$); lo que podría indicar que ambos aminoácidos provienen de la misma fuente proteica, correspondiente a Defensina-1. Por lo tanto, estos hechos apoyan el uso de la espectroscopia de fluorescencia, a través de la evaluación de la fluorescencia de triptófano, como una herramienta de detección para establecer la presencia de defensina en muestras de miel. Por otra parte, no hubo una relación estadísticamente significativa entre la cisteína y la concentración relativa de Tyr ($n = 31$, $r = -0.3276$, $p = 0.072$) como se ve en la Figura 22C. Estos hechos demuestran que la tirosina detectada en la miel fraccionada no es parte de la defensina y que la isoforma Ro-F está ausente en las muestras. Por lo tanto, otros péptidos con una masa de 3-10 kDa que contienen tirosina pueden estar presentes en la miel.

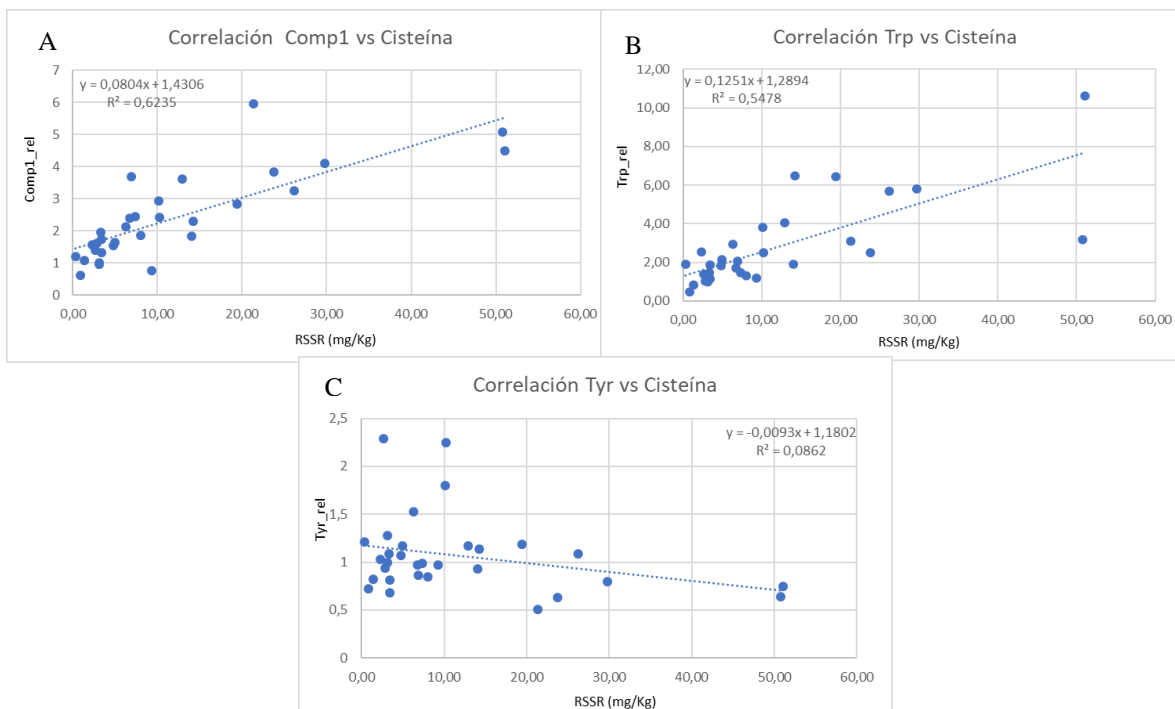


Figura 22. Correlación entre cisteína y fluoróforos. Correlación entre la concentración de cisteína en la miel fraccionada y la concentración relativa de los tres fluoróforos recuperados a través de MCR-ALS. A) Componente 1 vs enlaces disulfuro. B) Fluorescencia relativa Trp vs puentes disulfuro. C) Fluorescencia relativa Tyr vs puentes disulfuro.

En términos generales, las fracciones de miel de abejas consideradas expuestas a nosemosis presentan una mayor concentración de triptófano y de puentes disulfuro. Además, estos valores presentaron una correlación significativa indicando que ambos aminoácidos provienen de la misma fuente proteica. Por otra parte, la falta de correlación entre la cisteína y la concentración relativa de tirosina muestra que la tirosina detectada en la miel fraccionada no es parte de la misma fuente proteica y que otros péptidos con una masa de 3-10 kDa, que contienen este aminoácido, pueden estar presentes. Adicionalmente, la señal de fluorescencia designada como componente 1 podría ser atribuida a productos finales de glicación avanzada (“AGEs” en inglés) los cuales se componen de proteínas y azúcares y ha demostrado excitación cercana a 375 nm y emisión a 430 nm (Schmitt *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012), por lo que es un candidato para el origen de la señal encontrada. La correlación de la fluorescencia de este componente 1 tanto con la fluorescencia de triptófano, como con el contenido de cisteína en la miel fraccionada indicaría un origen común atribuible al péptido en un estado de glicación avanzada. Sin duda que este es un aspecto que requiere un mayor estudio.

Considerando el tamaño molecular de 3 a 10 kDa seleccionado al fraccionar la miel, la presencia en esta fracción de triptófano y cisteína como puentes disulfuro y la correlación entre sus concentraciones; es posible postular con bastante certeza que es la defensina-1 la que se pone en evidencia con estas señales. Estos hechos así mismo apoyan el uso de la espectroscopia de fluorescencia, a través de la evaluación de la fluorescencia de triptófano, como una herramienta de detección para establecer la presencia de defensina-1 en muestras de miel. Es decir, se pudo contar con métodos de análisis simples para establecer la presencia del péptido en mieles basados en espectroscopía molecular. Sin embargo, para confirmar de forma definitiva la presencia de defensina-1 en las muestras de miel, se requiere el uso de técnicas de espectrometría de masas y secuenciación de péptidos.

4) Evaluación la actividad de la enzima glucosa oxidasa en miel de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae*.

4.1 Actividad de Glucosa Oxidasa

La estrategia para determinar la actividad de la enzima Glucosa Oxidasa consiste en cuantificar el peróxido de hidrógeno generado en la muestra luego de 24 horas de incubación. La enzima GOX se encuentra inicialmente en la miel, al someterla a dilución en agua comienza la oxidación de la glucosa que se encuentra en abundancia en la miel por parte de la enzima a ácido glucónico. Posteriormente, el peróxido de hidrogeno generado se somete a reducción con la o-dianisina, la cual en su forma oxidada es capaz de absorber a una longitud de onda de 440 nm. El resumen de las reacciones se presenta en la Figura 23.

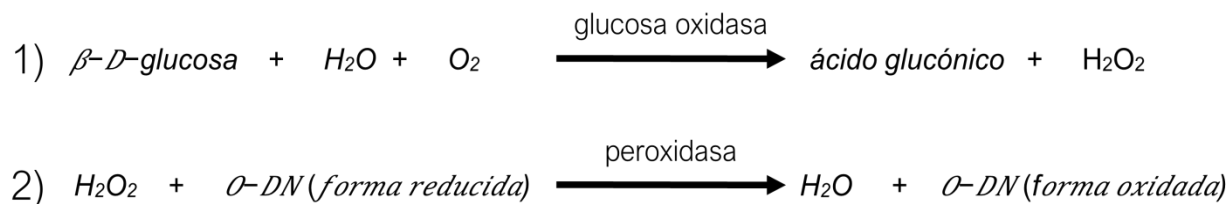


Figura 23. Ecuaciones químicas para cuantificar la actividad de GOX. La experiencia consiste en 2 reacciones consecutivas, donde la O-DN (orto-dianisina) es el cromóforo formado y cuantificado.

Los resultados de determinación de la generación de H₂O₂ para la actividad de la glucosa oxidasa presente en la miel se presentan en la Tabla 8

Tabla 8 Resultados de la generación peróxido de hidrógeno de las muestras de miel. (*: Apicultores declararon nosemosis en la temporada).

Muestra	Nosema	Actividad GOX (µg de H ₂ O ₂ /g x h)	Muestra	Nosema	Actividad GOX (µg de H ₂ O ₂ /g x h)
CLC1	-	<0,18	PQP3	-(*)	3,21
CLC2	-	<0,55	PQPA	+(*)	2,95
CLC3	-	<0,18	PQPB	-(*)	2,7
CLC4	-	<0,18	PQPC	+(*)	1,06
CLC5	-	<0,18	RNC1	-	<0,18
CLV1	-	<0,18	RNC2	-	<0,55
CLV2	-	<0,18	RNC3	-	<0,18
CLV3	+	<0,55	RNC4	-	0,96
CPF1	-	<0,18	RNE1	-	<0,18
CPF2	-	<0,18	RNE2	-	<0,55
CPT1	+	<0,18	RNE4	-	<0,18
CPT2	-	<0,55	RNV1	-	<0,55
PQG2	-(*)	<0,18	RNV2	-	<0,55
PQGA	-(*)	2,34	RNV3	-	0,64
PQGB	-(*)	3,81	RNV4	-	<0,55
PQGC	-(*)	1,14			

En la tabla se puede apreciar que la mayoría de las muestras no superaron el límite de detección (LOD: 0,18 μg de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ x hora) y otras no superaron en límite de cuantificación (LOQ: 0,55 μg de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ x hora). Sin embargo, entre las muestras que presentaron niveles de H_2O_2 mayores al LOQ, la mayoría corresponde a aquellas consideradas expuestas a nosemosis, lo que puede ser relacionado con mayor actividad de la GOX y consecuentemente con una potencial actividad antimicrobiana mayor en estas muestras. En la Figura 24 se grafican los valores encontrados.

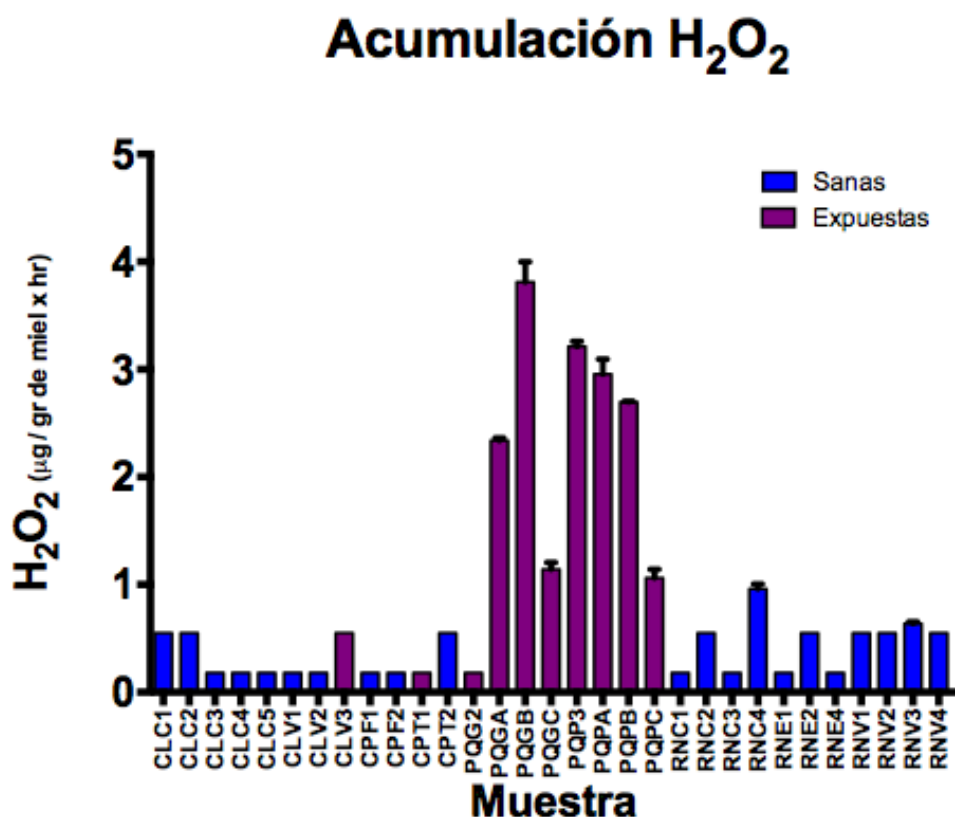


Figura 24. Análisis de las concentraciones de peróxido acumulado en 24 horas. Cuantificación mediante oxidación de *O*-DN.

Para evidenciar diferencias de forma estadística se procedió a comparar los valores obtenidos de peróxido de hidrógeno de las muestras de mieles consideradas sanas y expuestas a nosemosis, donde existió una diferencia estadísticamente significativa respecto a los mayores niveles de peróxido de hidrógenos encontrado en colmenas expuestas a nosemosis (Figura 25).

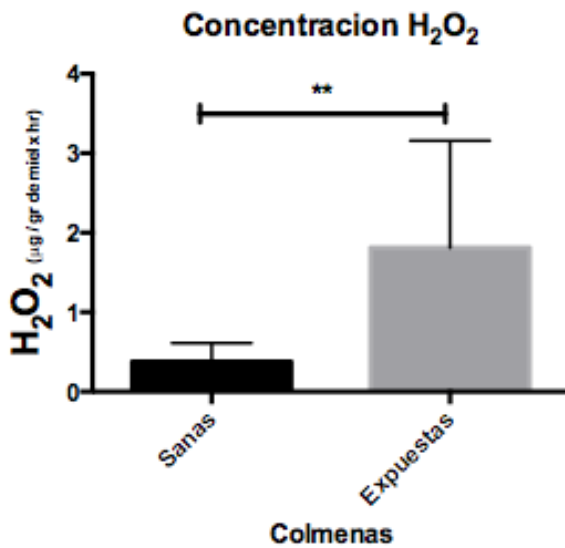


Figura 25. Comparación estadística de la concentración de peróxido de hidrógeno.

Comparación gráfica de peróxido acumulado en 24 horas entre colmenas sanas (n=21) y expuestas a nosemosis (n=10). **: diferencia estadísticamente significativa (p<0,01).

5) Determinación de la actividad antimicrobiana de mieles sanas e infectadas con *N. ceranae*.

5.1 Ensayos de concentración inhibitoria mínima

Se procedió a diluir las muestras de miel a 50% p/v. Se realizaron diluciones seriadas a partir de las mieles de prueba al 50% con medio LB para determinar una dilución con la cual comparar las muestras de miel por igual. Las mieles de prueba corresponden a cosechas de la colmena del Laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Desarrollo correspondiente a los años 2015 y 2016. Se seleccionaron cuatro cepas bacterianas para evaluar la actividad antimicrobiana: *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*. Las diluciones fueron las siguientes: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pocillos y fue medido el crecimiento bacteriano en base a su densidad óptica (DO₅₇₀) después de 24 horas en un lector de placas. La inhibición del crecimiento se comparó con un control que creció solo en medio LB. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para las muestras de prueba expresado en porcentaje de inhibición.

Tabla 9. Determinación de la actividad antimicrobiana con mieles de prueba. Ensayos realizados para determinar diluciones para trabajar con las muestras de miel de la región de O'Higgins para cuatro especies bacterianas. Todos los valores se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento. La escala va de 0% (crecimiento normal) a 100% (ausencia de crecimiento bacteriano).

	Dilución	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
Miel 2015	1:04	99,7	99,3	98,0	99,8
Miel 2016	1:04	99,7	99,7	96,6	101,2
Miel 2015	1:08	36,8	-15,0	98,1	99,3
Miel 2016	1:08	39,2	-8,1	99,9	95,2
Miel 2015	1:16	17,8	-64,1	97,9	89,6
Miel 2016	1:16	22,9	-60,2	98,8	99,5
Miel 2015	1:32	21,9	-68,7	25,8	83,2
Miel 2016	1:32	23,0	-60,0	45,1	91,8
Miel 2015	1:64	19,9	-37,1	20,4	14,8
Miel 2016	1:64	21,6	-75,1	27,0	96,1

Se decidió utilizar la dilución 1:32 para las especies Gram positivo (*S. aureus* y *S. epidermidis*), ya que corresponde a una concentración que permite una apreciación más exigente al momento de determinar la actividad antimicrobiana mediante porcentaje de inhibición de crecimiento. Por otra parte, para las especies Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) se decidió trabajar con una dilución 1:8, con el mismo objetivo de fijar un corte más exigente para determinar que mieles poseen una mayor actividad antimicrobiana.

5.2 Actividad antimicrobiana contra Gram-positivas

Se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de las muestras de miel versus las bacterias *S. aureus* y *S. epidermidis* utilizando una dilución de 1:32. En los resultados se observa que, a esta dilución, la bacteria más sensible fue *S. aureus*, la cual fue completamente inhibida por 8 muestras de miel, de las cuales la mitad corresponden a mieles consideradas expuestas a nosema. Por otro lado, *S. epidermidis* presentó poca

sensibilidad a esta dilución siendo inhibida en un 47,5% su crecimiento para la miel más efectiva contra esta cepa. No existe una correlación entre los porcentajes de inhibición para ambas especies, permitiendo inferir que son afectadas por mecanismos antimicrobianos distintos. Los resultados de actividad antimicrobiana frente a estas se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10. Determinación de la actividad antimicrobiana de muestras de miel con bacterias Gram positivas. La dilución utilizada fue 1:32 para evaluar el porcentaje de inhibición de las muestras de miel estudiadas en valores porcentuales. Todos los valores se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento. La escala va de 0% (crecimiento normal) a 100% (ausencia de crecimiento bacteriano). En naranja se resalta inhibición total efectivas de crecimiento (>95%) (*: apicultores declararon nosemosis en la temporada).

Muestra	Nosema	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Muestra	Nosema	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
CLC1	-	100,3	-8,3	PQP3	-(*)	24,7	23,0
CLC2	-	-29,9	-33,6	PQPA	+(*)	100,2	27,1
CLC3	-	29,8	-9,1	PQPB	-(*)	100,2	25,2
CLC4	-	-16,0	18,6	PQPC	+(*)	74,2	47,5
CLC5	-	12,0	39,3	RNC1	-	-1,8	26,2
CLV1	-	74,0	31,9	RNC2	-	85,0	39,3
CLV2	-	99,7	-7,9	RNC3	-	85,2	-11,4
CLV3	+	59,5	-12,1	RNC4	-	99,8	35,7
CPF1	-	18,5	27,3	RNE1	-	4,2	25,6
CPF2	-	4,2	38,3	RNE2	-	-13,6	17,1
CPT1	+	6,3	40,0	RNE4	-	-31,1	-7,9
CPT2	-	3,3	33,7	RNV1	-	-36,6	-2,9
PQG2	-(*)	-1,6	32,9	RNV2	-	-26,2	-38,4
PQGA	-(*)	99,5	6,7	RNV3	-	99,1	28,5
PQGB	-(*)	96,2	16,3	RNV4	-	-30,3	10,2
PQGC	-(*)	59,9	-23,3				

5.3 Actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas

Se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de las muestras de miel versus las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizando una dilución de miel 1:8. La cepa *P. aeruginosa* fue la más sensible, teniendo sólo 3 muestras que inhibieron su crecimiento completamente, dos de las cuales pertenecen al grupo de expuesta a nosemosis. Los valores negativos corresponden a una densidad óptica mayor respecto al control. En el caso de *P. aeruginosa*, en la mayoría de las muestras de miel formaba un biofilm en el fondo del pocillo, lo que impedía el paso efectivo de la luz. El caso de *E. coli*, no presentó inhibición completa del crecimiento pero sus valores fueron parejos, la mayoría en el intervalo de 40-50% de inhibición. Los valores se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11. Determinación de la actividad antimicrobiana de muestras de miel con bacterias Gram negativas. La dilución utilizada fue 1:8 para evaluar el porcentaje de inhibición de las muestras de miel estudiadas en valores porcentuales. Todos los valores se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento. La escala va de 0% (crecimiento normal) a 100% (ausencia de crecimiento bacteriano). En naranja se resalta inhibición total efectivas de crecimiento (>95%) (*: apicultores declararon nosemosis en la temporada).

Muestra	Nosema	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	Nosema	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
CLC1	-	23,8	42,1	PQP3	-(*)	-60,0	41,8
CLC2	-	-35,8	52,2	PQPA	-(*)	96,5	48,3
CLC3	-	-41,9	41,2	PQP B	+(*)	43,0	49,1
CLC4	-	-27,2	45,0	PQPC	-(*)	45,9	47,2
CLC5	-	-58,4	48,3	RNC1	-	-57,4	50,2
CLV1	-	-53,9	40,6	RNC2	-	64,6	50,9
CLV2	-	-20,3	37,8	RNC3	-	-36,0	39,4
CLV3	+	-41,7	37,2	RNC4	-	99,8	51,5
CPF1	-	-47,4	47,4	RNE1	-	-54,8	48,5
CPF2	-	-51,0	50,5	RNE2	-	-74,8	49,9
CPT1	+	-45,9	50,1	RNE4	-	-45,0	45,2
CPT2	-	-53,3	49,1	RNV1	-	50,5	40,1
PQG2	-(*)	-53,7	46,9	RNV2	-	56,1	31,3
PQGA	-(*)	99,4	42,1	RNV3	-	48,2	53,5

PQGB	+(*)	-40,4	43,5	RNV4	-	-11,5	44,6
PQGC	-(*)	-31,8	51,4				

Los resultados de actividad antimicrobiana indican que existen diferencias en la capacidad de inhibir el crecimiento entre distintas especies bacterianas. La mayor actividad de las mieles fue contra *S. aureus*, donde 8 mieles alcanzaron un 100% de inhibición de crecimiento en la dilución estudiada. El 50% de las mieles de la localidad de Peumo presentaron el 100% de inhibición de *S. aureus*. En cuanto a *S. epidermidis*, ninguna miel inhibió el crecimiento en su totalidad en la dilución estudiada. Para las especies Gram negativas, contra *E. coli* no existieron mayores diferencias en la capacidad de inhibir su crecimiento entre las muestras, pero contra *P. aeruginosa* existieron 3 muestras capaces de inhibir su crecimiento, donde 2 de ellas pertenecen al sector de Peumo. Para comparar la actividad antimicrobiana entre sí, se decidió sumar el porcentaje de inhibición de cada muestra de miel contra las 4 bacterias, y se le asignó arbitrariamente un valor de 1 a la primera muestra de la serie, de esta manera se hizo una comparación en base a la actividad antimicrobiana relativa utilizando este valor (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad Antimicrobiana Relativa de muestras de miel. (*: apicultores declararon nosemosis en la temporada).

Muestra	Nosemosis	AAM relativa	Muestra	Nosemosis	AAM relativa
CLC1	-	1,00	PQPA	+(*)	1,38
CLC2	-	-0,30	PQPB	-(*)	1,36
CLC3	-	0,13	PQPC	+(*)	0,73
CLC4	-	0,13	RNC1	-	0,11
CLC5	-	0,26	RNC2	-	1,52
CLV1	-	0,59	RNC3	-	0,49
CLV2	-	0,69	RNC4	-	1,82
CLV3	+	0,27	RNE1	-	0,15
CPF1	-	0,29	RNE2	-	-0,14
CPF2	-	0,27	RNE4	-	-0,25
CPT2	-	0,21	RNV1	-	0,32
PQG2	-(*)	0,16	RNV2	-	0,14

PQGA	-(*)	1,57	RNV3	-	1,45
PQGB	-(*)	0,36	RNV4	-	0,08
PQGC	-(*)	0,19			
PQP3	-(*)	1,72			

En cuanto a la actividad de glucosa oxidasa, las mieles de colmenas consideradas expuestas a nosemosis mostraron una mayor generación de peróxido de hidrógeno, lo que daría cuenta de una mayor actividad biocida. Esto fue concordante con lo observado para la actividad antimicrobiana de las mieles, con una tendencia a una mayor inhibición del crecimiento bacteriano por parte de mieles de colmenas expuestas. La inhibición fue más evidente contra *S. aureus*, bacteria Gram positiva que además podría ser objetivo de Defensina-1.

6) Análisis de componentes principales (PCA)

En primer lugar, los resultados obtenidos demostraron lo contrario a la hipótesis inicialmente planteada, ya que tanto los niveles de defensina como la actividad de glucosa oxidasa fueron significativamente mayores en mieles de colmenas infectadas con nosema que en mieles de colmenas sanas (Tabla 13).

En la Tabla 13 se muestra el resumen de los datos obtenidos para estas muestras de miel en este trabajo, complementada con el contenido de prolina determinado en nuestro laboratorio. De acuerdo a este parámetro, todas las mieles analizadas son consideradas como reales y no sucedáneas ya que superan el mínimo contenido de prolina (180 mg/kg). Se incorporó en la Tabla 13 información sobre la fuente dominante de néctar que tienen las abejas entregada por los apicultores sobre la base de la disponibilidad de flora y la ubicación del colmenar. Respecto a esto último, las muestras de miel que presentaron mayor fluorescencia de triptófano (asociada a defensina) y mayor acumulación de peróxido de hidrógeno y que coinciden con provenir de colmenas consideradas como expuestas a nosemosis, presentan además la misma fuente de néctar (principalmente de peumo) y son del mismo origen geográfico, características que podrían estar jugando un rol en las

diferencias observadas. Esto último se respalda con el análisis de componentes principales (PCA) que se muestra en la Figura 26A, donde se puede ver que las muestras de provenientes de Peumo tienen una tendencia a agruparse, evidenciando características similares. Recientemente se ha demostrado que el aceite de peumo tiene un efecto como antifúngico contra *N. ceranae* (Bravo *et al.*, 2017) y las abejas podrían estar beneficiándose de sus propiedades, lo que abre las posibilidades a nuevos focos de estudio respecto a las abejas y su relación con plantas nativas. Además, puede darse la posibilidad que la defensina-1 y GOX se expresen constitutivamente en mayor cantidad en estas colonias, lo que les daría una ventaja genética sobre otras ante posibles infecciones.

Finalmente, el gráfico de las variables en el PCA (Figura 26B) muestra que existe una correlación directa entre presencia de nosema, generación de peróxido, presencia de cisteína, fluorescencia de triptófano, componente 1 y la actividad antimicrobiana de la miel. Ello indica una relación entre la enfermedad y estos factores relacionados con inmunidad. Por otra parte, estos factores están inversamente relacionados con el contenido proteico total de la miel y la concentración de riboflavina (RF en Figura 26 B), asociable en el primer caso a que la nosemosis afecta a la producción global de proteínas por parte de las abejas.

Tabla 13. Presentación resultados sobre mieles estudiadas. En la tabla se recopila la información de la muestras de la región de O'Higgins. (*: apicultores declararon noseosis en la temporada).

Muestra	Sector	Fuente néctar principal	Nosema	Prot. totales (mg/Kg)	Prolina (mg/Kg)	GOX (ug de H2O2 /gr x hr)	RSSR (mg cys/Kg)	Trp relativo	Comp 1 relativo	Tyr relativo	AAM Relativa
CLC1	Chimbarongo	Multifloral	-	1,165	351	<0,18	3,09	1,00	1,00	1,00	1,00
CLC2	Chimbarongo	Multifloral	-	1,235	401	<0,55	2,30	2,55	1,56	1,03	-0,30
CLC3	Chimbarongo	Multifloral	-	1,105	311	<0,18	9,30	1,17	0,76	0,97	0,13
CLC4	Chimbarongo	Multifloral	-	0,247	224	<0,18	3,31	1,45	1,96	1,09	0,13
CLC5	Chimbarongo	Multifloral	-	0,921	322	<0,18	0,31	1,92	1,21	1,21	0,26
CLV1	Chimbarongo	Multifloral	-	1,070	238	<0,18	1,36	0,83	1,08	0,82	0,59
CLV2	Chimbarongo	Multifloral	-	1,273	272	<0,18	3,38	1,87	1,33	0,81	0,69
CLV3	Chimbarongo	Multifloral	+	1,303	236	<0,55	3,40	1,14	1,74	0,68	0,27
CPF1	Codegua	Multifloral	-	0,553	522	<0,18	3,11	1,19	0,96	1,28	0,29
CPF2	Codegua	Multifloral	-	0,594	425	<0,18	2,67	1,39	1,4	2,29	0,27
CPT1	Codegua	Multifloral	+	1,160	614	<0,18	2,83	1,04	1,62	0,94	0,32
CPT2	Codegua	Multifloral	-	0,558	471	<0,55	4,95	2,13	1,65	1,17	0,21
PQG2	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,626	504	<0,18	50,79	3,19	5,08	0,64	0,16
PQGA	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,635	615	2,34	51,09	10,62	4,5	0,75	1,57
PQGB	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,839	522	3,81	29,73	5,82	4,11	0,8	0,36
PQGC	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,607	475	1,14	14,02	1,92	1,83	0,93	0,19
PQP3	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,559	346	3,21	10,15	3,82	2,94	1,8	1,72
PQPA	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	+(*)	0,590	640	<0,18	19,42	6,46	2,83	1,19	1,38
PQPB	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	-(*)	0,492	486	2,7	26,20	5,69	3,26	1,09	1,36
PQPC	Peumo	<i>Cryptocarya alba</i> (peumo)	+(*)	0,739	613	1,06	23,75	2,51	3,85	0,63	0,73
RNC1	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	0,664	535	<0,18	14,21	6,49	2,3	1,14	0,11
RNC2	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	0,670	430	<0,55	10,22	2,50	2,43	2,25	1,52
RNC3	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	1,031	694	<0,18	6,90	2,07	3,69	0,86	0,49
RNC4	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	1,411	657	0,96	6,28	2,92	2,12	1,53	1,82
RNE1	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	1,082	511	<0,18	12,89	4,06	3,61	1,17	0,15
RNE2	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	0,802	395	<0,55	21,32	3,08	5,97	0,51	-0,14
RNE4	Rengo	<i>Quillaja saponaria</i> (quillay)	-	1,314	467	<0,18	4,78	1,83	1,54	1,07	-0,25
RNV1	Rengo	<i>Trevoa trinervis</i> (tebo)	-	1,122	379	<0,55	7,34	1,46	2,46	0,99	0,32
RNV2	Rengo	<i>Trevoa trinervis</i> (tebo)	-	0,927	507	<0,55	6,75	1,71	2,39	0,97	0,14
RNV3	Rengo	<i>Trevoa trinervis</i> (tebo)	-	0,979	369	0,64	8,02	1,29	1,87	0,85	1,45
RNV4	Rengo	<i>Trevoa trinervis</i> (tebo)	-	1,090	348	<0,55	0,88	0,49	0,62	0,72	0,08

Conclusiones

1. La fluorescencia total asociada a MCR es una herramienta analítica confiable para estimar la presencia de defensina en miel.
2. Las concentraciones de triptófano y tirosina encontradas en las fracciones de 3-10 kDa no demostraron correlación, por lo que probablemente tienen orígenes proteicos distintos.
3. Existe una correlación entre la concentración relativa de triptófano y cisteína, lo que podría indicar un mismo origen proteico.
4. La actividad de la GOX, concentración de defensina y actividad antimicrobiana en mieles de colmenas expuestas a nosemosis fue mayor que en colmenas sanas.
5. Estos últimos resultados se contraponen a lo planteado en la hipótesis, por lo que se considera una hipótesis negativa.
6. La cantidad de proteínas totales en mieles de colmenas expuestas a nosemosis fue menor que en colmenas sanas.
7. Dada la coincidencia en el origen geográfico y floral de las muestras que presentaron nosemosis, no es concluyente que la mayor cantidad de los indicadores de inmunidad social encontrados en la miel (GOX y defensina) está asociado exclusivamente a la infección, pudiendo influir su origen.
8. Se detectó la presencia de un componente fluorescente importante en las mieles fraccionadas, asociable inicialmente a productos finales de glicación avanzada de proteínas, entre los que podría estar la propia defensina glicada. Este es un aspecto que requiere un mayor estudio.

Bibliografía

Ackerman, J. D. (2000). Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. In *Pollen and Pollination* (pp. 167-185). *Springer Vienna*.

Agnew, P., & Koella, J. C. (1997). Virulence, parasite mode of transmission, and host fluctuating asymmetry. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264(1378), 9-15.

Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen M. A. (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a metaanalysis. *Ecology Letters* 9: 968–980.

Ahmad, S., Khan, R. H., & Ali, A. (2012). Physicochemical studies on glycation-induced structural changes in human IgG. *IUBMB life*, 64(2), 151-156.

Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, *et al* (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.

Aliferis, K. A., Copley, T., & Jabaji, S. (2012). Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of insect physiology*, 58(10), 1349-1359.

Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology*, 11(9), 2284-2290.

Ashman, T. L., Knight, T. M., Steets, J. A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D. R., ... & Wilson, W. G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85(9), 2408-2421.

Beretta, G., Gelmini, F., Lodi, V., Piazzalunga, A., & Facino, R. M. (2010). Profile of nitric oxide (NO) metabolites (nitrate, nitrite and N-nitroso groups) in honeys of different botanical origins: Nitrate accumulation as index of origin, quality and of therapeutic opportunities. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(3), 343-349.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.

Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013). *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary research*, 44(1), 1-15.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bravo, J., Carbonell, V., Sepúlveda, B., Delporte, C., Valdovinos, C. E., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2017). Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 141-147.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4), 329-344.

Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 169-184.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal*, 8(8), 2387.

Casteels P., Riviere C. A. van Damme L., Elicone C. & Fleming M. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem*, 187, 381-386.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054.

Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Bartolomé, C., ... & Higes, M. (2014). Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC research notes*, 7(1), 649.

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D., & Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of insect physiology*, 58(8), 1090-1095.

Chauzat M.P., Laurent M., Jacques A., Saugeon C., Hendrikx P., Ribiere-Chabert M. (2014) Preliminary results from EPILOBEE, a European epidemiological study on honeybee colony losses. 10th COLOSS Conference; 2014 Sept 6-8; Murcia, Spain. p. 7

Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 97(2), 186-188.

Christe, P., Oppliger, A., Bancalà, F., Castella, G. & Chapuisat, M. (2003) Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters* 6: 19–22

Creed, D. (1984a). The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids–II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochemistry and photobiology*, 39(4), 563-575.

Creed, D. (1984). The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids–i. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4), 537-562.

Cremer, S., Armitage, S. A., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.

Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers, Peptide Science* , 47: 465–477

Feás, X., & Estevinho, M. L. (2011). A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* sp.) organic honey. *Journal of medicinal food*, 14(10), 1284-1288.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337.

Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary research*, 41(6), 54.

Gheldof, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 5870-5877.

Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42(1), 611-643.

Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876-2890.

Hansen, R. E., Østergaard, H., Nørgaard, P., & Winther, J. R. (2007). Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4, 4'-dithiodipyridine. *Analytical biochemistry*, 363(1), 77-82.

Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 92(2), 93-95.

Howard, A. F., & Barrows, E. M. (2014). Self-pollination rate and floral-display size in *Asclepias syriaca* (Common Milkweed) with regard to floral-visitor taxa. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 144.

Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., & Wang, C. H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38(1), 30-37.

Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., & Nikolenko, A. (2012). Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 115-124.

Ilyasov, R. A., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., & Nikolaenko, A. G. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 49(1), 1-9.

Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., ... & Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150-153.

Jaumota, J., Gargallo, R., De Juan, A., Tauler, R. (2005) A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 76, 101-110

Johnson, R. M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual review of entomology*, 60(1), 415-434.

Kearns, C. A., Inouye, D. W., & Waser, N. M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*, 83-112.

Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(1), 11-22.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.

Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.

Larson, B. M., & Barrett, S. C. (2000). A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological journal of the Linnean Society*, 69(4), 503-520.

Lee, E., Kim, J. K., Shin, S., Jeong, K. W., Shin, A., Lee, J., ... & Kim, Y. (2013). Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure–activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(2), 271-283.

Maget-Dana, R., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Ptak, M., & Maurizot, J. C. (1995). The secondary structure of the insect defensin A depends on its environment. A circular dichroism study. *Biochimie*, 77(4), 240-244.

Mahmoud, A. A., & Oways, A. A. (2006). A modified method to determine hydrogen peroxide activity as a quality criterion of bee honey. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 44(4), 1629-1639.

Marlowe, F. W., Berbesque, J. C., Wood, B., Crittenden, A., Porter, C., & Mabulla, A. (2014). Honey, Hadza, hunter-gatherers, and human evolution. *Journal of human evolution*, 71, 119-128.

Martínez, J., Leal, G., & Conget, P. (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology research*, 111(2), 601-607.

Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular nutrition & food research*, 52(4), 483-489.

Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. (2010). Servicio Agrícola Ganadero (SAG): Informe de caso de *Nosema ceranae* en la región del Bío-Bío.

Mitchell, R. J., Flanagan, R. J., Brown, B. J., Waser, N. M., & Karron, J. D. (2009). New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany*, 103(9), 1403-1413.

Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8), 312-315.

Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees. *PLoS Biol*, 5(6), e168.

Rees, J. A., Moniatte, M., & Bulet, P. (1997). Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(5), 413-422.

Riener C., Kada G., Gruber H. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 266-276.

Richards, A. J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield?. *Annals of Botany*, 88(2), 165-172.

Ricketts TH, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. (2008) Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters* 11: 499–515.

Rothenbuhler, W.C. (1964) Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *American Zoologist*, 4: 111–123.

Rosengaus, R.B., Maxmen, A.B., Coates, L.E. & Traniello, J.F.A. (1998a). Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termitidae). *Behavioral Ecology Sociobiology*, 44, 125–134.

Rosengaus, R. B., Guldin, M. R., & Traniello, J. F. (1998b). Inhibitory effect of termite fecal pellets on fungal spore germination. *Journal of Chemical Ecology*, 24(10), 1697-1706.

Rosengaus, R. B., Jordan, C., Lefebvre, M. L., & Traniello, J. F. A. (1999). Pathogen alarm behavior in a termite: a new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften*, 86(11), 544-548.

Schmitt, A., Schmitt, J., Münch, G., & Gasic-Milencovic, J. (2005). Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Analytical biochemistry*, 338(2), 201-215.

Schmitt, P., Wilmes, M., Pugnère, M., Aumelas, A., Bachère, E., Sahl, H. G., ... & Destoumieux-Garzón, D. (2010). Insight into invertebrate defensin mechanism of action oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), 29208-29216.

Shyoff, J. A., & Schmid-Hempel, P. (1991). Parasites and the advantage of genetic variability within social insect colonies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 243(1306), 55-58.

Sojka, M., Valachova, I., Bucekova, M., & Majtan, J. (2016). Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *Journal of medical microbiology*, 65(4), 337-344.

Sprague, V., Becnel, J. J., & Hazard, E. I. (1992). Taxonomy of phylum Microspora. *Critical reviews in microbiology*, 18(5-6), 285-395.

Spivak, M. & Reuter, G.S. (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32: 555–565.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., & Boman, H. G. (2009). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *The Journal of immunology*, 182(11), 6635-6637.

Starks, P.T., Blackie, C.A., Thomas, D. & Seeley, P.T. (2000) Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87: 229–231.

Tan, H. T., Rahman, R. A., Gan, S. H., Halim, A. S., Hassan, S. A., Sulaiman, S. A., & Kirnpal-Kaur, B. S. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey

against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 34.

The White House, Office of the Press Secretary, Fact Sheet: The Economic Challenge Posed by Declining Pollinator Populations [Internet]. Washington; 2014 Jun . Disponible en: <http://www.whitehouse.gov/the-press-office/2014/06/20/fact-sheet-economic-challenge-posed-declining-pollinator-populations>

Traniello, J.F.A., Rosengaus, R.B. and Savoie, K. (2002) The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc National Academy of Sciences USA* **99**: 6838–6842.

van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., *et al.* (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481

Villa, J. D., & Rinderer, T. E. (2008). Inheritance of resistance to *Acarapis woodi* (Acari: *Tarsonemidae*) in crosses between selected resistant Russian and selected susceptible US honey bees (Hymenoptera: *Apidae*). *Journal of economic entomology*, **101**(6), 1756-1759.

Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical journal*, *80*(5), 2093-2109.

Yamauchi, H. (2001). Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: purification, amino acid sequences and antibacterial activity. *Insect biochemistry and molecular biology*, *32*(1), 75-84.

Zeina, B., Othman, O., & Al-Assad, S. (1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **2**(3), 345-348.

Zepp, R.G., Sheldon, W.M., Moran, M.A. (2004). Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation–emission matrices. *Mar. Chem.*, *89*, 15-36