



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Influencia nutricional en el sistema de defensa de
*Apis mellifera***

Proyecto que presenta
Elma Cristina Pech Jiménez

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **ELMA CRISTINA PECH JIMÉNEZ** titulado **INFLUENCIA NUTRICIONAL EN LA SISTEMA DE DEFENSA DE *Apis mellifera*** fue realizado en la UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR y en la UNIDAD DE RECURSOS NATURALES, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los **Dres. SOLEDAD MARÍA TERESA HERNÁNDEZ SOTOMAYOR** y **MARÍA AZUCENA CANTO AGUILAR**, dentro de la opción de **BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 28 de Enero del 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

LN. Elma Cristina Pech Jiménez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de aceites de la flora nativa y levaduras simbióticas” (Clave 219922), en el que participe bajo la dirección de la Dra. Maria Azucena Canto Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. En especial, a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y a la Unidad de Recursos Naturales por facilitarme material, equipo y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No.618989 para realizar la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al proyecto CONACYT “Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de aceites de la flora nativa y levaduras simbióticas” (Clave 219922) a cargo de la Dr. María Azucena Canto Aguilar.

A Dr. Luis Medina Medina y M. en C. Humberto Moo Valle del Departamento de Apicultura de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) por sus valiosas aportaciones en los bioensayos con *Apis mellifera*, por proporcionar acceso a los apiarios de la UADY y proporcionar el material biológico para la tesis.

A la Biol. Elisa Chan Vivas, la M. en C. Rosalina Rodríguez Román y el M. en C. César Canché Collí, por su apoyo durante los bioensayos.

Al Laboratorio de Fisiología Ambiental de Plantas, que nos permitió utilizar sus instalaciones para los bioensayos, y al técnico responsable M. en C. Rober Us Santamaría.

Al Laboratorio número 10, de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por permitirme utilizar sus instalaciones, y al técnico a cargo M. en C. Armando Muñoz Sánchez.

Al proyecto CONACYT “Liberación controlada de fármacos antidiabéticos mediante nanoesferas de polímeros biodegradables” (Clave 248378), por permitirme el uso del espectro Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek), y la Dra. Nayeli Rodríguez por su tiempo y disposición.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Instituto de Ecología y al Laboratorio de Ecología de Parásitos, por facilitarme material, equipo y laboratorios, durante la estancia realizada.

Al Colegio de Posgraduados, Unidad Motensillo, en especial al Dr. Gabriel Otero por su disponibilidad para facilitar material biológico, durante la estancia realizada.

A los integrantes de mi comité de evaluación: Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Dra. María Azucena Canto Aguilar, Dr. Efraín Ramírez Benítez, Dr. Alex Córdoba Aguilar, y Dr. José Luis Andrade Torres.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
ANTECEDENTES.....	2
1.1 <i>Apis mellifera</i>	2
1.1.1 GENERALIDADES	3
1.1.2 NUTRICIÓN APÍCOLA.....	4
1.1.3 SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS.....	5
1.1.3.1 LEVADURAS	6
1.1.4 NUTRICIÓN APÍCOLA E INMUNIDAD	6
1.1.5 SISTEMA DE DEFENSA	7
1.1.5.1 SISTEMA DE DEFENSA SOCIAL.....	8
1.1.5.2 SISTEMA INMUNE INDIVIDUAL	9
1.2 LA ENZIMA FENOLOXIDASA (EC 1.14.18.1)	11
1.2.1 LA PO Y LA METALOGÉNESIS	13
1.2.2 <i>A. mellifera</i> Y LA PRESENCIA DE LA PO.....	16
1.3 LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4).....	17
1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GOX	18
1.3.2 <i>A. mellifera</i> Y LA PRESENCIA DE LA GOX.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS	20

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
CAPÍTULO II	22
ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS PO Y GOX.....	22
2.1 INTRODUCCIÓN	22
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO	22
2.2.1 TÉCNICA DE DISECCIÓN	22
2.2.2 HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	23
2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	25
2.2.4 PERFIL PROTEICO.....	27
2.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO	28
2.2.5.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO	28
2.2.5.2 CUANTIFICACIÓN DEL OXIDO NÍTRICO.....	29
2.2.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX.....	30
2.3 RESULTADOS	31
2.3.1 HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	31

2.3.3 PERFIL PROTEICO.....	32
2.3.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO	33
2.3.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO	34
2.3.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX.....	34
2.4 DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO III	38
EFFECTO DE DIFERENTES DIETAS EN LA DEFENSA SOCIAL Y SISTEMA INMUNE DE <i>A. mellifera</i>	38
3.1 INTRODUCCIÓN	38
3.2 METODOLOGÍA	40
3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	40
3.2.2 TRATAMIENTOS.....	40
3.2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	40
3.2.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO	41
3.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO	41
3.2.6 CUANTIFICACIÓN DEL NO	41
3.2.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX.....	42
3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	42
3.3 RESULTADOS	43
3.3.1 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA PO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE <i>A. mellifera</i>	43

3.3.2 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA PROPO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE <i>A. mellifera</i>	46
3.3.3 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA PRODUCCIÓN DEL NO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE <i>A. mellifera</i>	50
3.3.4 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA GOX, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE <i>A. mellifera</i>	54
3.3.5 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN EL PERFIL PROTEICO, DE ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE <i>A. mellifera</i>	58
3.3 DISCUSIÓN.....	59
CAPITULO IV	66
DISCUSIÓN GENERAL.....	66
CAPITULO V	69
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	69
5.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	69
5.2 PERSPECTIVAS	70
ANEXOS	71
BIBLIOGRAFÍA	73

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 La abeja <i>Apis mellifera</i>	2
Figura 1.2 Organización de las colonias de <i>A. mellifera</i>	3
Figura 1.3 Síntesis de melanina.....	12
Figura 1.4 Intervención de PO en la melanogénesis.....	13
Figura 1.5 Proceso de melanización.....	14
Figura 1.6 Reacción enzimática catalizada por la GOX.....	17
Figura 1.7 Estructura molecular de la GOX.....	18
Figura 1.8. Estrategia experimental seguida en este trabajo.....	21
Figura 2.1 Técnica de disección.....	23
Figura 2.2 Tejido de abdomen de <i>A. mellifera</i>	23
Figura 2.3 Estandarización del método de extracción proteica.....	24
Figura 2.4. Homogenización del tejido de <i>A. mellifera</i>	25
Figura 2.5 Curva estándar de BSA, utilizando el método del BCA (Smith <i>et al.</i> , 1985).....	26
Figura 2.6 Curva estándar de la concentración de proteínas, a partir del método de Bradford.....	26
Figura 2.7 Curva estándar de melanina.....	28
Figura 2.8 Curva estándar de la concentración de NaNO ₂	29
Figura 2.9 Curva estándar de H ₂ O ₂	30
Figura 2.10 Análisis obtenido del extracto total de cabeza de <i>A. mellifera</i>	32
Figura 2.11 Análisis obtenido del extracto total de abdomen de <i>A. mellifera</i>	32

Figura 2.12 Actividad enzimática de la PO, en función de la concentración de proteína. .33	33
Figura 2.13 Normalización de la actividad específica de la enzima PO a un mg de proteína.33	33
Figura 2.14 Actividad enzimática de la proPO, en función de la concentración de proteína34	34
Figura 2.15 Normalización de la actividad específica de la enzima proPO a un mg de proteína.34	34
Figura 2.16 Actividad enzimática de la GOX, en función de la concentración de proteína .35	35
Figura 2.17 Normalización de la actividad específica de la enzima GOX a un mg de proteína.35	35
Figura 3.1 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. bombicola</i> , en la actividad de la PO.43	43
Figura 3.2 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. versatilis</i> , en la actividad de la PO.44	44
Figura 3.3 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. apicola</i> , en la actividad de la PO.....45	45
Figura 3.4 Efecto de la dieta adicionada con <i>Z. mellis</i> , en la actividad de la PO.45	45
Figura 3.5 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. cerevisiae</i> , en la actividad de la PO.46	46
Figura 3.6 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. bombicola</i> , en la actividad de la proPO. .47	47
Figura 3.7 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. versatilis</i> , en la actividad de la proPO. ...48	48
Figura 3.8 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. apicola</i> , en la actividad de la proPO.....48	48
Figura 3.9 Efecto de la dieta adicionada con <i>Z. mellis</i> , en la actividad de la proPO.49	49
Figura 3.10 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. cerevisiae</i> , en la actividad de la proPO 50	50
Figura 3.11 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. bombicola</i> , los niveles del NO.51	51

Figura 3.12 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. versatilis</i> , en los niveles del NO.	52
Figura 3.13 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. apicola</i> , en los niveles de NO.....	52
Figura 3.14 Efecto de la dieta adicionada con <i>Z. mellis</i> , en los niveles de NO.	53
Figura 3.15 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. cerevisiae</i> , en los niveles del NO.	54
Figura 3.16 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. bombicola</i> , en la actividad de la GOX ..	55
Figura 3.17 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. versatilis</i> , en la actividad de la GOX.....	55
Figura 3.18 Efecto de la dieta adicionada con <i>C. apicola</i> , en la actividad de la GOX.	56
Figura 3.19 Efecto de la dieta adicionada con <i>Z. mellis</i> , en la actividad de la GOX.....	57
Figura 3.20 Efecto de la dieta adicionada con <i>S. cerevisiae</i> , en la actividad de la GOX...	57
Figura 3.21 Análisis del perfil proteico obtenido del extracto total de cabeza de <i>A. mellifera</i>	58
Figura 3.22 Análisis del perfil proteico obtenido del extracto total de abdomen de <i>A. mellifera</i>	59

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 composición de las diferentes soluciones amortiguadoras.	24
Cuadro 2.2 Rendimiento y cuantificación de proteína	31
Cuadro 3.1 Composición de la dieta base, modificado de Williams <i>et al.</i> , (2013).	40
Cuadro 3.2 Diseño de las dietas modificadas.....	41

ABREVIATURAS

AME	Abejas melíferas europeas
PAM's	Péptidos antimicrobianos
GOX	Glucosa oxidasa
HPGs	Glándulas hipofaríngeas
proPO	Profenoloxidasa
PO	Fenoloxidasa
L-dopa	3,4-dihidroxifenilalanina
DHI	5-6, dihidroxiindol
PSP	Péptidos de dispersión de plasmocitos
NADA	N -acetyldopamine
NBAD	N-B-alanildopamina
NBANE	N -acetilnonepinefrina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
BCA	Ácido bincinconínico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
NO	Óxido Nítrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
KDa	Kilodalton

RESUMEN

El sistema de defensa de *Apis mellifera* está integrado por un componente social y un sistema inmune individual. En el componente de defensa social, la enzima glucosa oxidasa (GOX) destaca como un indicador clave en este sistema de defensa; mientras que la enzima fenoloxidasa (PO) y sus componentes de la cascada de señalización representan a los marcadores del sistema inmune individual.

La nutrición es fundamental para las funciones inmunes de los organismos, ya que permite respuestas naturales para reaccionar hacia los tóxicos, patógenos o cualquier otro elemento extraño. En el caso de las abejas, se sugiere que la adición de levaduras en calidad de probióticos en su dieta puede ser una estrategia importante para mantener a las colonias saludables y con una buena inmunocompetencia. Por lo anterior, abejas recién emergidas tuvieron dietas suplementadas con levaduras simbiotes, con el objetivo de evaluar la influencia nutricional de estas levaduras en el sistema inmune de *A. mellifera*, a través de las actividades enzimáticas de la GOX y la PO.

Para alcanzar este objetivo, en el sistema de defensa *A. mellifera*, fue fundamental estandarizar y optimizar la metodología para medir los marcadores del sistema de defensa. Esto implicó el establecimiento de un protocolo homogéneo, tanto para la extracción proteica y cuantificación como para la medición de las actividades enzimáticas de la GOX y la PO.

Los resultados obtenidos indican que existe un ligero efecto de las dietas sobre los marcadores bioquímicos del sistema de defensa de la abeja. En particular, el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de *A. mellifera* indujo un efecto significativo sobre la actividad enzimática de la PO. En cuanto al indicador del sistema de defensa social, se encontró que las levaduras, *Candida versatilis* y *Candida apícola*, tuvieron un leve efecto sobre la actividad de la enzima GOX, con respecto al uso de la dieta base. A partir de estos resultados, es posible sugerir que existe un vínculo entre la nutrición y los componentes centrales del sistema de defensa de este organismo.

ABSTRACT

The defense system of *Apis mellifera* consists of a social component and of an individual immune system. In the social component, the enzyme glucose oxidase (GOX) is the key indicator of this defense system; on the other hand, the enzyme phenol oxidase (PO), and its components of the signaling cascade, represent the markers of the individual immune system.

Nutrition is fundamental for the immune function of the organisms, since it allows natural responses towards toxic substances, pathogens or any other foreign element. For bees, it has been suggested that the addition of yeasts as probiotics in their diet may be an important strategy to keep colonies healthy and with good immunocompetence. In this study, newly emerged bees had modified diets with symbiotic yeasts, in order to determine the nutritional influence of yeasts in the immune system of *A. mellifera*, through the enzymatic activities of GOX and PO.

To reach such objective, we standardized and optimized the methodology to measure the markers of the defense system of *A. mellifera*. This allowed the establishment of a homogeneous protocol, for protein extraction and quantification, as well as for the measurement of the enzymatic activities of GOX and PO.

The obtained results indicate that there is a slight effect of the diets on the biochemical markers of the bee's defense system. In particular, it was observed that the use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the feeding of *A. mellifera*, induced a significant effect on the enzymatic activity of the PO. Regarding the indicator of the social defense system, we found that the yeasts, *Candida versatilis* and *Candida apícola*, had a slight effect on the activity of the GOX enzyme, with respect to the use of the base diet. Our results suggest that there is a link between nutrition and the central components of the defense system of this organism.

INTRODUCCIÓN

La abeja melífera (*Apis mellifera*) es un insecto social organizado en colonias con tres tipos de jerarquías: la abeja reina que tiene la función de poner huevos; las obreras encargadas de recolectar el néctar y el polen, producir miel, jalea real y cera, limpiar, y otras tareas; y los zánganos, quienes fecundan a la abeja reina (SAGARPA, 2015). La apicultura es una actividad definida como la crianza y cuidado de las abejas, para la obtención de productos como la miel, la jalea real, el propóleo, la cera y el polen, que representa un beneficio económico, alimenticio y medicinal para el ser humano (Galindo y Jose, 2016).

En la actualidad, la apicultura enfrenta peligros tales como la presencia de patógenos, el uso de pesticidas, el mal manejo y nutrición de las colonias (Güemes *et al.*, 2002). El escaso recurso de la floración hace más difícil obtener suficientes fuentes de polen para cubrir los requerimientos nutricionales de las abejas. En consecuencia, la colonia se hace más vulnerable a la presencia de patógenos debido a que la nutrición y el sistema inmune están íntimamente ligados (Brodschneider y Crailsheim, 2010; Traynor, 2008).

El efecto alimentario sobre la capacidad inmune es la premisa de la presente tesis, ya que se pretende estudiar el vínculo que poseen las dietas modificadas con el sistema inmune, a través de marcadores bioquímicos de la inmunidad social e individual. El conocimiento acerca de la capacidad de defensa de la abeja, por medio de las enzimas con participación inmunológica, permitirá conocer si la nutrición es un factor crítico en la respuesta inmune de las abejas.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1.1 *Apis mellifera***

Apis mellifera (Figura 1.1) es un insecto del orden Hymenoptera, familia Apidae, subfamilia Apinae. Las abejas melíferas africanizadas son un híbrido entre las diferentes subespecies de abejas melíferas europeas (AME) como: *Apis mellifera*, *A. m. carnica* o *A. m. ligustica*, y la abeja melífera africana *A. m. scutellata* (Ojar, 2002; Hutchins *et al.*, 2003). El cuerpo de estas abejas está cubierto con vellosidades color amarillo-marrón y con líneas negras. Poseen cuatro alas y seis extremidades, todas unidas al segmento medio del cuerpo (tórax). El abdomen es más largo que el tórax y termina con un aguijón en las hembras, que los zánganos no presentan (Woodward y Quinn, 2011). La cabeza es más pequeña que el tórax y el abdomen (Ojar, 2002). Las abejas obreras miden de 9.5 a 15.8 mm de largo, los zánganos 15.8 mm mientras que la reina mide 19.5 mm. La cabeza, las antenas y extremidades son negras, mientras que las alas son traslúcidas (Hutchins *et al.*, 2003). Las abejas obreras poseen corbículas, que son estructuras recolectoras de polen, formadas por pelos curvados especializados que se encuentran en la tibia de las patas traseras (Caccavari y Cilla, 2010).



Figura 1.1 La abeja *Apis mellifera*. La imagen muestra el modelo de estudio polinizando a una flor (tomado de Kimber, 2014)

1.1.1 GENERALIDADES

Las abejas melíferas son insectos sociales y viven en colonias perfectamente organizadas, donde cada individuo cumple con una función determinada (SAGARPA, 2001). Una colonia de estas consiste en una reina, varios miles de obreras y algunos cientos de zánganos (Figura 1.2), en general más de 80,000 abejas pueden vivir en una sola colonia (Hutchins *et al.*,2003).

La función principal de la reina es la producción de huevos (Woodward y Quinn, 2011); la tarea de los zánganos es aparearse con la reina, los individuos que lo hacen mueren después de esto. Las abejas obreras poseen órganos que no tienen la reina ni los zánganos, estos les permiten realizar tareas relacionadas con la vida de la colonia, además están a cargo de realizar todos los trabajos dentro y fuera de la colmena, los cuales realizan de acuerdo a su edad y desarrollo glandular. Entre estas actividades se encuentran: limpiar los panales, dar calor a los huevos y larvas, alimentar a las larvas, producir cera, construir panales, defender la colonia de la entrada de elementos extraños, recolectar néctar, polen, agua y todo lo necesario para cubrir las necesidades de la colonia (SAGARPA, 2001).

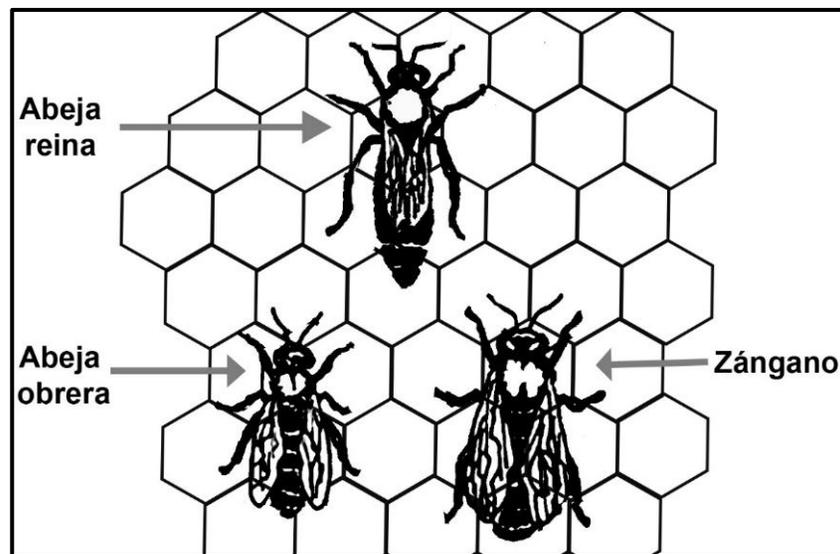


Figura 1.2 Organización de las colonias de *A. mellifera*. La colmena está compuesta por diferentes individuos: abeja reina, abejas obreras y zánganos.

1.1.2 NUTRICIÓN APÍCOLA

Las abejas melíferas requieren una alimentación adecuada para su crecimiento y desarrollo, por ello su dieta debe contener sustancias que ayudan a un adecuado ciclo de vida. La nutrición de las abejas se basa en la ingesta del néctar y el polen (Vaudo *et al.*, 2015).

El néctar es la fuente natural de carbohidratos de las abejas melíferas, es recolectado de las plantas por las abejas obreras, posteriormente es llevado a la colmena y finalmente es almacenado en las celdas como miel. La transformación de néctar a miel comienza durante el curso del vuelo de las abejas (Nicolson y Human, 2008). Ya en la colonia, el contenido de agua se reduce de un 16 a un 20% aproximadamente, a este proceso se incorporan enzimas para coadyuvar a la producción de miel. Los carbohidratos provenientes de la miel logran satisfacer las necesidades energéticas de las abejas melíferas adultas (Kunert y Crailsheim, 1988; Hrasnigg y Crailsheim, 2005).

A partir del polen, las abejas obtienen la mayoría de sus proteínas, incluidos los aminoácidos esenciales libres. Estos organismos necesitan ingerir aminoácidos que se han descrito como esenciales para su dieta, como la leucina, la isoleucina y la valina (De Groot, 1953). En la colonia, las abejas melíferas mezclan el polen con el néctar regurgitado, la miel y las secreciones glandulares para producir “pan de abeja”, que difiere del polen recién recolectado, ya que tiene un pH ácido y contiene menos almidón (Herbert y Shimanuki, 1978; Ellis y Hayes, 2009). El cambio en la calidad del polen almacenado en la colonia (pan de abeja), se debe a los microorganismos simbiotes asociados con *A. mellifera* (Gilliam, 1997).

Para la nutrición de *A. mellifera* también es importante el consumo de lípidos, vitaminas y minerales (Haydak, 1970). Estos compuestos antes mencionados, se obtienen exclusivamente del polen, y este contenido varía entre un 0.8% y un 18.9%, de acuerdo a las especies de polen recolectado de los diferentes recursos florales (Roulston y Cane, 2000). Las vitaminas solubles en agua, a diferencia de las insolubles, son comunes en el polen (Roulston y Cane, 2000), pero el contenido de vitamina C, por ejemplo, varía a lo largo de las estaciones del año de acuerdo con diferentes fuentes florales. Se ha

estudiado que las abejas melíferas (y sus microorganismos simbióticos) son capaces de sintetizar la vitamina C (Anderson y Dietz, 1976).

Por último, el agua es indispensable para la supervivencia de las abejas, ya que ellas recolectan agua por dos razones, relacionadas con diferentes tipos de clima: para enfriar por evaporación el área de cría en días calurosos, y para alimentar a las larvas cuando la alimentación está limitada en días fríos (Nicolson y Human, 2008).

Los suplementos de alimentación pueden ayudar a las colonias con la adición artificial de grasas, vitaminas y minerales, y contenido de agua, para las épocas del año donde el néctar es escaso, con el objetivo de mantener la colonia con buenas poblaciones, fortaleciéndolas y preparándolas para la época de mayor flujo de néctar (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

1.1.3 SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

En temporadas de invierno o de ausencia de floración las abejas no disponen de recursos suficientes para poder alimentarse y vivir en forma normal; por tanto, el apicultor debe suministrar algún tipo de dieta artificial para evitar que las abejas mueran de hambre, enfermen o enjambren (Montero *et al.*, 2012; Prost, 2001), aunque los alimentos no necesariamente tienen que ser artificiales, utilizando la miel de otras colonias o bien la miel almacenada (SAGARPA, 2004).

Los alimentos que se pueden dar a las abejas son muy variables en sus contenidos nutritivos, de acuerdo al tipo de preparación, conservación, calidad y región donde se consigan, y la dieta puede ser de sostén, estímulo o suplementaria. Como fuente de energía se utilizan carbohidratos contenidos en alimentos como la sacarosa, la glucosa, la fructosa o miel procedente de colonias sanas, sola o adicionada con un poco de agua. Como fuente de proteína se puede emplear harina de soya, levadura de cerveza, y polen procedente de colonias sanas (SAGARPA, 2004). Existe evidencia levaduras simbiotas para la formulación de dietas modificadas que mejoren la nutrición y supervivencia de las abejas.

1.1.3.1 LEVADURAS

Las levaduras como la *Candida magnoliae* y *C. bombicola* (*Starmerella bombicola*) se encuentran en una asociación simbiótica con las abejas, siendo esta última frecuentemente encontrada en el néctar y el polen (Rosa *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha aislado e identificado a un grupo significativo de especies de levaduras asociadas a colmenas de abejas *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis* estrechamente emparentadas a las encontradas en *A. mellifera* (Gilliam *et al.*, 1990; Gilliam, 1997).

En el caso de las levaduras adicionadas a dietas modificadas para abejas, se han utilizado a las levaduras “domésticas” *Saccharomyces cerevisiae* y *S. boulardii* en la alimentación animal (vertebrados; Gismondo *et al.*, 1999) y en la comunidad apicultora su uso es frecuente. Dentro de los diferentes suplementos utilizados para la nutrición de las abejas, se usan los liofilizados de *S. cerevisiae* como ingrediente para elaborar jarabes, pastas, y dulces que se suministran a las colonias como fuente de proteínas en las épocas críticas en las que el néctar y el polen se encuentran escasos (Sammataro y Avitabile, 1998).

Existe la evidencia que sugiere que la adición de levaduras en calidad de probióticos en la dieta de las abejas puede ser una estrategia importante para mantener a las colonias saludables y con buena capacidad de inmunocompetencia (Pătruică y Mot, 2012). Se utilizan bacterias de los grupos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que han sido aisladas de los buches de abejas melíferas; su efecto fisiológico dispara respuestas humorales que crean una barrera inmunológica en el intestino, además estas, sirven como fuente de vitaminas, proteínas y otros componentes esenciales en la dieta (Olofsson y Vásquez, 2008; Corcionivoschi *et al.*, 2010).

1.1.4 NUTRICIÓN APÍCOLA E INMUNIDAD

La nutrición es fundamental para las funciones inmunes de los organismos, ya que permite respuestas naturales del organismo para reaccionar hacia los tóxicos y parásitos. Hay estudios donde se sugiere que la activación de la respuesta inmune puede disminuir la longevidad de una abeja, debido a que existe mayor utilización de los recursos energéticos del organismo para iniciar la actividad inmunológica. En las abejas melíferas, los niveles nutricionales han demostrado que poseen un efecto en la longevidad de las

abejas adultas, el desarrollo de las glándulas, y la sensibilidad a los patógenos y pesticidas (Wahl y Ulm, 1983; Alaux *et al.*, 2010; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Haydak, 1970).

La disponibilidad, la calidad y la diversidad de la dieta del polen, se traduce en los nutrientes disponibles para la colonia y estos a su vez reflejan el estado de salud de las abejas. La calidad del polen puede afectar a la longevidad de la abeja, la activación del ovario (Hoover *et al.*, 2006; Human *et al.*, 2007; Pirk *et al.*, 2010) el tamaño del cuerpo larvario (Tasei y Aupinel 2008) y las funciones del metabolismo (Alaux *et al.*, 2011; Di Pasquale *et al.*, 2013). Mientras que la diversidad de polen probablemente también juega un papel importante en la inmunidad (Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Una nutrición adecuada permite a los organismos mayor resistencia y recursos suficientes para responder al estrés, mientras que aquellos organismos sin una nutrición adecuada son más propensos a sucumbir a los factores estresantes (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Ponton *et al.*, 2013).

1.1.5 SISTEMA DE DEFENSA

El sistema inmune es el encargado de identificar dentro del organismo sustancias y/o elementos que le resulten extraños para inhibirlos o destruirlos. Estos elementos extraños pueden ser pesticidas, bacterias, hongos, parásitos y virus entre otros (Gillespi *et al.*, 1997). La reacción inmunológica del organismo animal constituye el conjunto de procesos que se desencadenan a partir del contacto del cuerpo, el tejido o la célula blanco con un agente extraño. El objetivo de la respuesta inmune es proteger al organismo ante la agresión de su integridad, pasando por fases que abarcan desde el reconocimiento y la identificación del agente nocivo, hasta la neutralización o la destrucción del elemento agresor (Lavine y Strand, 2002).

El sistema inmune está conformado, por dos mecanismos: a) el sistema inmune adquirido, basado en respuestas de defensa mediadas por células que producen anticuerpos que les permiten reconocer con gran especificidad a un antígeno y generar memoria mediante exposiciones previas a éste, para así responder con mayor eficacia ante una segunda exposición; y b) el sistema inmune innato constituido por 1) componentes celulares representado por células fagocíticas principalmente y 2) componentes humorales que

están mediados por la síntesis de moléculas secretadas o intracelulares denominados péptidos antimicrobianos (PAM's) (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Immler y Bullock, 2005; Siva-Joty *et al.*, 2005).

Los animales vertebrados cuentan con ambos tipos de sistemas inmunológicos mientras que los insectos solo poseen un sistema inmune de tipo innato, el cual se encuentra muy evolucionado ya que es de acción inmediata y posee mecanismos de reconocimiento de patógenos inespecíficos o desconocidos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Immler y Bullock, 2005; Siva-Joty *et al.*, 2005).

Los insectos cuentan con un sistema eficiente y complejo de defensa contra patógenos y parásitos que involucra barreras físicas como el integumento (corteza impermeable) y el intestino; las reacciones coordinadas por poblaciones de hemocitos y la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos y proteínas, principalmente por el tejido graso (Lavigne y Strand, 2002). Las abejas son organismos vulnerables, cuando se encuentran expuestos a distintos patógenos debido a la enorme capacidad de transmisión entre los integrantes de la colmena. Por tal motivo han desarrollado mecanismos de defensa a nivel individual y social (Evans y Spivak, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Por lo que el sistema de defensa de *A. mellifera* se puede explicar desde dos perspectivas: la inmunidad individual y el sistema de defensa social.

1.1.5.1 SISTEMA DE DEFENSA SOCIAL

Desde el punto de vista del patógeno, la competencia de este agente depende de su capacidad de ingresar a la colmena, establecerse y por último dispersarse (Cremer *et al.*, 2007). Por tal motivo, en primer lugar el ingreso de potenciales patógenos está limitado por la presencia de una red de abejas guardianas y la encapsulación de los mismos en cubiertas de propóleos, los cuales son empleados en actividades de limpieza y aseo de la colmena. Una vez que el patógeno ingresa a la colonia, se ponen en marcha mecanismos para evitar su establecimiento y diseminación, como el comportamiento higiénico y el “grooming” (Cremer *et al.*, 2007).

El comportamiento higiénico consiste en la capacidad que tienen las abejas obreras de detectar y remover crías infectadas en las celdas operculadas (Invernizzi, 2001; Evans y

Spivak, 2009). El *grooming* es la capacidad que tienen las abejas de remover al patógeno de sí mismo (*autO-grooming*) o de sus compañeras (*allogrooming*) y es especialmente efectivo contra el ácaro *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010). La remoción de abejas muertas de la colmena, la muerte de las mismas en lugares alejados de la colmena, el cuidado continuo de la reina de modo que la misma no se infecte y de esta forma evitar la transmisión vertical de la enfermedad, constituyen otros comportamientos sociales para evitar el contagio de los patógenos (Cremer *et al.*, 2007).

La enzima glucosa oxidasa (GOX), es un parámetro bioquímico para conocer el nivel del sistema de defensa social de las abejas. La actividad enzimática de esta proteína se encuentra principalmente en las glándulas hipofaríngeas (HPGs) (Ohashi *et al.*, 1999). La GOX cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, estos últimos productos poseen propiedades antisépticas (White *et al.*, 1963). Los productos antisépticos se excretan hacia el alimento larval (Sano *et al.*, 2004) y a la miel (White *et al.*, 1963; Ohashi *et al.*, 1999), estos productos contribuyen a la esterilización del y por lo tanto previenen enfermedades (Alaux *et al.*, 2010).

1.1.5.2 SISTEMA INMUNE INDIVIDUAL

Una vez que el patógeno traspasa las barreras de defensa social, se ponen en marcha los mecanismos de defensa individual (Evans *et al.*, 2006). La respuesta inmune innata de los insectos está integrada por el sistema celular y el humoral (Nappi *et al.*, 2001). La respuesta celular es mediada principalmente por los hemocitos, involucrados en funciones como la fagocitosis, la formación de agregados multicelulares, la nodulación y la encapsulación de bacterias y parásitos (Eleftherianos y Revenis, 2011).

En el sistema inmune humoral existe una gran variedad de componentes, como son las lisozimas, las defensinas, las atacinas y las cecropinas (Flores-Villegas *et al.*, 2015), así también las lectinas, las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, y las cascadas enzimáticas complejas como el sistema proFenoloxidasa (proPO). Una vez activado el sistema proPO, éste genera factores que ayudan a estimular a los hemocitos para la eliminación del agente extraño (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). El sistema proPO juega un papel fisiológico muy importante durante el desarrollo del insecto como en el caso de la esclerotización de la cutícula, la cicatrización de heridas (Daquinag *et al.*, 1995)

y como mecanismo de defensa, sobresaliendo el proceso de la melanogénesis (Nappi y Christensen, 2005).

El óxido nítrico (NO) es una molécula efectora inmune y de señalización que se ha propuesto como una molécula clave en la inmunidad de *A. mellifera* (Negri *et al.*, 2014). El NO es un radical libre multifuncional altamente reactivo generado durante la oxidación de L-arginina a L-citrulina por la enzima NO sintasa (NOS). Se ha descrito una amplia gama de funciones fisiológicas controladas por la señalización de NO que se rigen por la activación de diferentes isoformas NOS y por la rápida difusión de esta molécula a través de las membranas celulares (Davies y Dow, 2009). En invertebrados, solo se detectó una isoforma NOS con una función constitutiva (señalización) o inducible (tóxico). En algunos casos, se ha encontrado que la misma isoforma tiene ambos roles (Rivero, 2006).

El NO actúa como una molécula citotóxica no específica (Rivero 2006). La toxicidad celular se debe a la oxidación de grandes cantidades de NO en peróxido de nitrito y otras moléculas inestables, que tienen como funciones dañar el ADN, las proteínas y los lípidos (Hillyer y Estévez-Lao, 2010). En los insectos, el NO se produce como una molécula efectora inmune en respuesta a la infección microbiana en varias especies de lepidópteros, hemipteros y dípteros (Rivero, 2006).

En el modelo de *A. mellifera*, el NO se produce después de un reconocimiento de un patógeno, y desempeña un papel en la propagación de los hemocitos (Negri *et al.*, 2013). Dado que el NO participa en la respuesta inmune de *A. mellifera* (Negri *et al.*, 2013), también es participe en la respuesta de curación, cuando se trata de confrontar a un patógeno como *V. destructor* (Negri *et al.*, 2013). La investigación de Negri *et al.*, (2014) sugiere que el NO desempeña un papel de señalización en la respuesta de herida y encapsulación en el modelo de *A. mellifera*.

Ciertos intermediarios de la síntesis de melanina interactúan con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y con las especies reactivas de nitrógeno (RNS), todo esto para mejorar la actividad citotóxica (Nappi y Christensen 2005). El ROS y el RNS que se genera durante la melanogénesis, junto con los precursores de pigmentos, se han implicado en la mortalidad de los patógenos que amenazan a los insectos (Nappi y

Christensen 2005), por lo que la medición de la producción de NO, se ha propuesto como un indicador para el sistema inmune (Negri *et al.*, 2013).

Dentro del sistema la proPO, participa un zimógeno con el mismo nombre, el cual tiene un peso de 70-80 KDa (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012). La proPO es activada por una serina proteasa para dar como resultado la enzima fenoloxidasa (PO) (Genta *et al.*, 2010), la cual tiene un peso de 50-60 KDa y forma parte del grupo de las tirosinacinasas que tienen como principal función la oxidación de fenoles (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012).

En los insectos la PO cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales se polimerizan espontáneamente para formar melanina insoluble; los fenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo, esto compuestos a su vez dan lugar a las quinonas (Eleftherianos y Revenis, 2011). La melanina es un pigmento marrón oscuro, presente en la respuesta de defensa de los insectos, una vez formada se deposita en el sitio de la infección o daño; también posee actividad citotóxica contra los microorganismos y contiene la invasión de patógenos por medio de la encapsulación de éstos (Cerenius *et al.*, 2008; Eleftherianos y Revenis, 2011).

1.2 LA ENZIMA FENOLOXIDASA (EC 1.14.18.1)

La proteína PO es una enzima dependiente de cobre, que cataliza la reacción que convierte sustancias fenólicas como la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) a quinonas inestables como la dopaquinona. Los estudios químicos y espectroscópicos que se han realizado en la PO han demostrado que se acopla binuclearmente a un sitio activo de cobre (Mason, 1955, 1965). Esta enzima es importante para las funciones inmunes ya que es responsable de la oxidación de los derivados de tirosina para posteriormente lograr la síntesis de melanina (Figura 1.3).

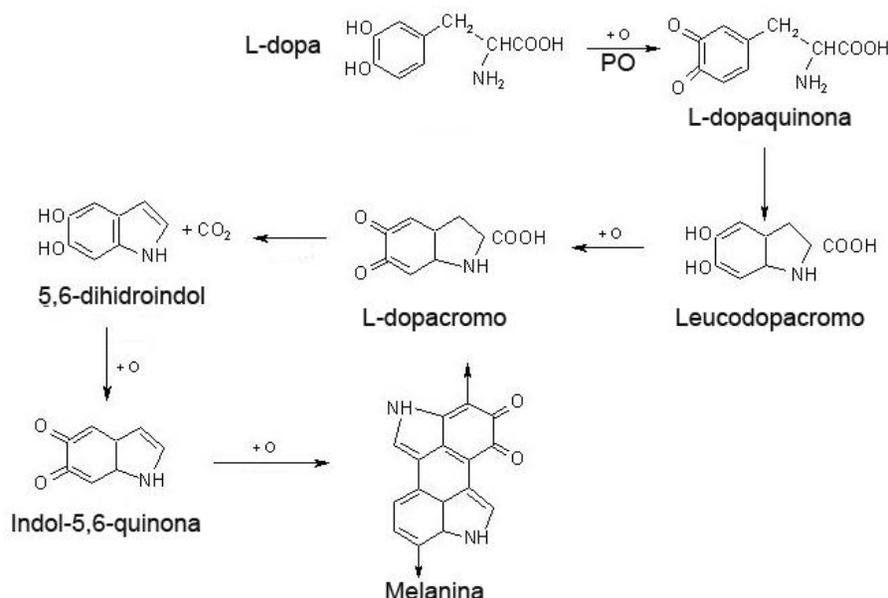


Figura 1.3 Síntesis de melanina. Es una reacción catalizada por la enzima PO a partir de un sustrato de L-DOPA (modificada de Kamkaen *et al.*, 2007).

La PO es un miembro del grupo de las enzimas denominadas tirosinasas, cuya función principal es la oxidación de los fenoles, se han ampliamente descrito en animales, plantas y hongos, estas están involucradas en muchas funciones biológicamente esenciales, como la pigmentación, la esclerotización, la respuesta inmune primaria y la defensa contra el huésped. Debido a lo anterior las enzimas tirosinasas de diferentes especies tienen diferentes propiedades estructurales, distribución y localización celular. Las tirosinasas utilizan el oxígeno molecular para catalizar dos reacciones enzimáticas diferentes: la hidroxilación de *O*-monofenoles a *O*-difenoles (actividad monofenolasa y cresolasa); y la oxidación de *O*-difenoles a *O*-quinonas (actividad difenolasa y catecolasa). Esta enzima pertenece a la familia de proteínas de cobre clase 3, ya que contiene dos átomos de cobre en el sitio activo, cada uno estabilizado por tres de residuos de L-histidina.

La molécula de L-dopacromo es imprescindible para la síntesis de melanina. Esta molécula está sujeta a etapas tanto enzimáticas como no enzimáticas de oxidación y polimerización, que conducen a la formación de los diversos tipos de melanina que se encuentran en muchos organismos vivos (Jaenicke y Decker, 2003).

1.2.1 LA PO Y LA MELANOGÉNESIS

La melanización es efectuada por la enzima PO la cual convierte fenoles a quinonas que posteriormente se polimerizan para formar melanina (Söderhäll y Cerenius, 1998.) La melanina se forma a partir del aminoácido fenilalanina, que primero es hidroxilado y pasa de tirosina a fenilalanina hidroxilada. La tirosina es entonces hidroxilada por la enzima PO activa para producir L-dopa, que una vez oxidado, pasa a ser dopaquinona y se convierte inmediatamente a dopacromo por una reacción espontánea no enzimática (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011).

La reorganización estructural no enzimática del dopacromo, es seguido por la descarboxilación que genera el 5,6, dihidroxiindol (DHI). El DHI es oxidado por la enzima PO para formar 5,6, indolquinonas. Estas indolquinonas finalmente se polimerizan a eumelanina en presencia de compuestos de tiorfeomelaninas (Nappi y Christensen, 2005) (Figura 1.4).

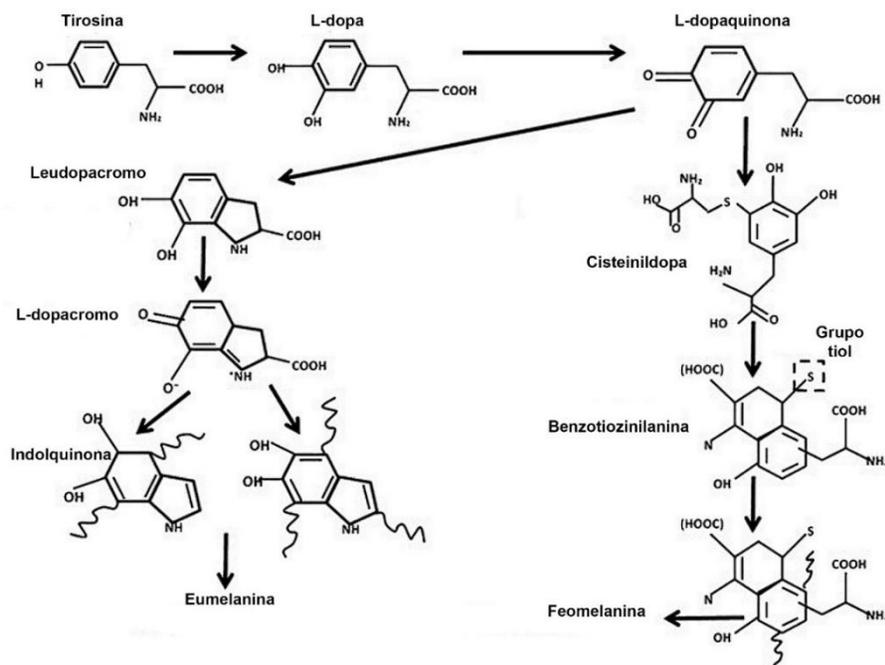


Figura 1.4 Intervención de PO en la melanogénesis. Tipos de melanina y sus precursores. Izquierda: La síntesis de eumelanina a partir de L- dopacromo. Derecha: La síntesis de feomelanina a partir de benzotiazinilánina. (Modificado de González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011).

El DHI puede ser producido por una ruta alterna donde la L-dopa descarboxilasa elimina CO_2 de L-dopa para formar dopamina (Beerntsen *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005). La vía de melanización comúnmente descrita (Figura 1.5), es el proceso de melanización contra huevos de parasitoides en larvas de mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nappi y Vass, 1993).

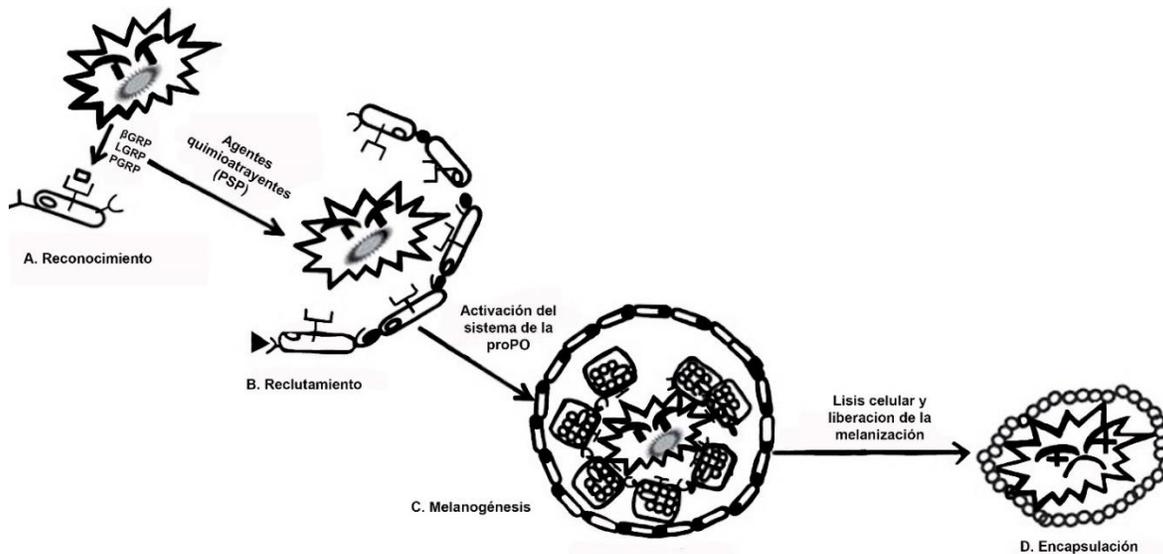


Figura 1.5 Proceso de melanización. A) Reconocimiento del patógeno a través de moléculas específicas. B) Movilización de hemocitos que rodean al cuerpo extraño. C) Deposición de grandes cantidades de hemocitos sobre el cuerpo extraño. D) Encapsulación y muerte del patógeno por inanición (modificado de González- Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011).

Los diferentes tipos de melanina se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que la melanina es un compuesto químico que tiene como una de sus funciones la formación de pigmento (Nappi y Christensen, 2005) Se encuentra en las plantas, los animales y protistas. La melanina más común es la eumelanina que está formada por un polímero dihidroxindol que proviene de la descarboxilación de la molécula dopaquinona (dopacromo); este tipo de melanina tiene la característica de producir un color marrón o negruzco oscuro. Otro tipo común de la melanina es la feomelanina, que se forma por la polimerización de benzotiazina y produce el color rojizo o marrón (Napolitano *et al.*, 2000).

La melanina, además de participar en la pigmentación de los organismos invertebrados, participa en varias funciones de éstos. Varios estudios han demostrado que la lesión mecánica o la presencia de macro patógenos (por ejemplo, nemátodos o parasitoides), da

como resultado la síntesis de melanina alrededor del tejido dañado u objeto extraño. Este proceso se conoce comúnmente como melanización (Ashida y Brey, 1997; Sugumaran, 2002; Cerenius y Söderhäll, 2004; Kanost *et al.*, 2004; Nappi y Christensen, 2005). En los artrópodos, la melanización comienza cuando un objeto extraño es reconocido por los hemocitos a través de una cascada de señalización, en la cual se hallan implicados los lipopolisacáridos, los peptidoglicanos, los glucanos, y las proteínas de reconocimiento (Strand, 2008).

Los hemocitos rodean el cuerpo extraño y liberan proteínas quimiotácticas (por ejemplo, los péptidos de dispersión de plasmocitos o PSP). Estas proteínas atraen plasmocitos (Lavine y Strand, 2002), que forman una pared multicelular (Wood *et al.*, 2006). Las capas internas de la pared del plasmocito aumentan y se vuelven gruesas y oscuras debido a la producción de melanina. La melanina se almacena finalmente sobre la parte externa de la pared. La cápsula melanina previene el crecimiento y la reproducción del patógeno y, finalmente, por inanición logra la muerte de este (Gillespie *et al.*, 1997). La PO que se encuentra en los insectos, cataliza tres tipos de reacciones en el proceso de la melanogénesis: (1) la hidroxilación de un monofenol, (2) la oxidación del *O*-difenoil y (3) la deshidrogenación de un dihidroxiindol (Korner y Pawelek, 1982).

Hay dos clases de compuestos que han sido documentados como sustratos para la PO que se encuentran en los insectos, de los cuales se encuentran los monofenoles, tales como tirosina o tiramina. (Zhao *et al.*,1995). También se encuentran los sustratos de catecol, incluyendo el 1,2-dihidroxibenceno (catecol), catecol 4-metilo, L-dopa, dopamina, N -acetyldopamine (NADA), N-B-alanildopamina (NBAD), N -acetilnorpinefrina (NBANE), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), norepinefrina, ácido 3,4-dihydroximandelico, y 3,4- ácido dihidroxibenzoico (Chase *et al.*,2000). De estos catecoles, la L-dopa se ha utilizado con mayor frecuencia para analizar la actividad de PO experimentalmente. En base a la solubilidad y las propiedades oxidativas, la dopamina, NADA, o NBAD suelen ser los sustratos naturales para la PO (Sugumaran, 2002).

1.2.2 A. mellifera Y LA PRESENCIA DE LA PO

En el modelo de estudio, *A. mellifera*, se identificó y se caracterizó la actividad PO en las pupas. La melanogénesis de la cutícula se inicia en el medio de la fase de pupa, y se

encuentra bajo unas condiciones endocrinas particulares. El inicio de la melanización cuticular se va transformando progresivamente, en la cutícula clara y suave que sucede en el exoesqueleto; y la cutícula oscura y dura en el organismo adulto emergente, esto coincide con la decadencia posterior en los niveles ecdisteroides (Feldlaufer *et al.*, 1985 ; Zufelato *et al.*, 2000 ; Pinto *et al.*, 2002). Durante la melanización, la hemolinfa y principalmente la epidermis son sitios propicios para buscar transcripciones de proPO.

La investigación de Zufalato *et al.*, en el 2004, refiere que la PO de la hemolinfa de las abejas de la miel, posee una masa molecular aparente de 70 kilodaltons (KDa), según lo estimado por filtración en gel y SDS-PAGE. Estos autores determinaron que el pH y la temperatura óptima eran 6.5 y 20 °C, respectivamente. La actividad enzimática fue completamente estable durante 30 minutos a 50 °C. Encontraron que esta enzima se activó por la tripsina, y se inhibe por inhibidores de proteasas y por la feniltiourea. Al utilizar altas concentraciones de azida de sodio, se inhibió por completo la actividad detectada de la PO.

Para evaluar los efectos de las dietas modificadas en polen, en la capacidad de resistencia a las enfermedades, se ha determinado empíricamente la concentración de los hemocitos y el contenido de grasa corporal, como evaluaciones indirectas de la inmunidad celular y humoral, ya que la actividad de la PO participa en ambos procesos. Los hemocitos participan en la fagocitosis y la encapsulación de los parásitos, este último proceso requiere actividad de PO, y la grasa corporal es el principal sitio de síntesis de péptidos antimicrobianos. Como organismos sociales, las abejas dependen no sólo en la inmunidad individual, sino también del buen funcionamiento de la colmena (Schmid-Hempel y Schmid-Hempel 1998).

El efecto de la alimentación sobre la actividad de la PO, no se ha definido claramente, ya que existen datos encontrados en abejorros, donde la nutrición limitada no afectó la respuesta de encapsulación mediada por la PO (Schmid-Hempel y Schmid-Hempel 1998). Sin embargo, Alaux y colaboradores (2010) sugieren que los daños inducidos por patógenos revelan un papel fundamental de la dieta sobre la actividad de la PO. En su investigación determinaron la actividad de PO en hemolinfa, tórax, abdomen y el abdomen desprovisto de la zona digestiva, de las colonias de *A. mellifera*.

1.3 LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4)

La enzima GOX es una flavoproteína que cataliza la oxidación del β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) mediante oxígeno como aceptor de electrones (Pluschkell *et al.*, 1996; Hatzinikolaou *et al.*, 1996). La reacción se puede dividir en una fase reductiva y otra oxidativa (Figura 1.6). La GOX cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona, posteriormente es hidrolizada por una reacción no enzimática a ácido glucónico. Posteriormente el anillo de flavín adenín dinucleótido (FAD), donde la GOX reduce el FAD a $FADH_2$ (Witt *et al.*, 2000). En la reacción de reducción que sufrió la GOX, de nuevo es oxidada para producir H_2O_2 .

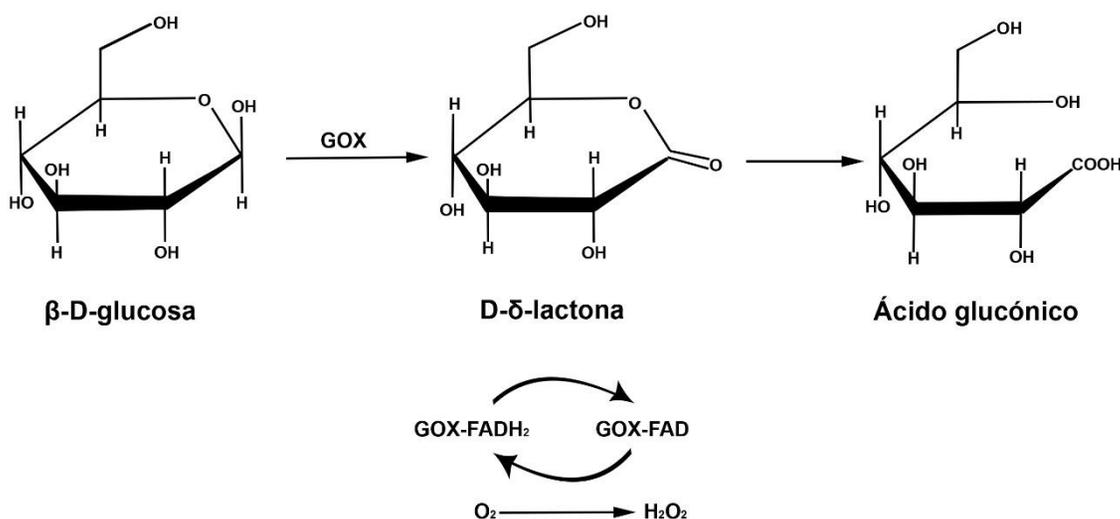


Figura 1.6 Reacción enzimática catalizada por la GOX. A partir de un sustrato de β -D-glucosa, que da lugar a dos productos, el ácido glucónico y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

La GOX fue descubierta por primera vez por Müller (1928) en extractos *Aspergillus niger*. En un trabajo posterior se publicó la secuencia de ADN que codifica a la GOX (Kriechbaum *et al.*, 1989) así como la estructura en 1.9 Å (Wohlfahrt *et al.*, 1999). Estructuralmente, como se muestra en la figura 1.7, la GOX es un homodímero compuesto por dos subunidades idénticas de 80 KDa y dos FAD no unidos covalentemente. Las coenzimas FAD actúan como un transportador de electrones durante la catálisis enzimática (Wilson y Turner 1992).

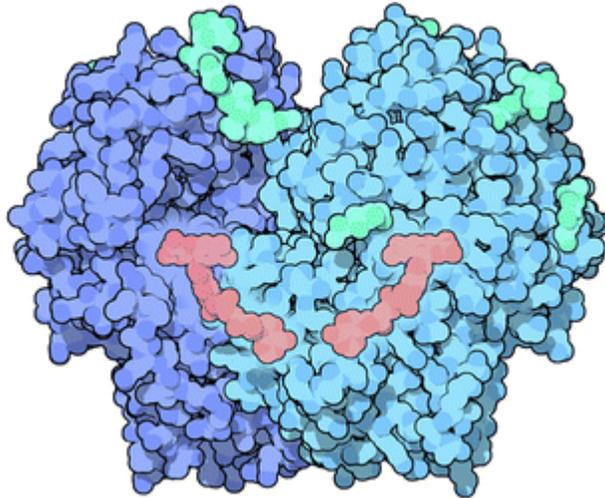


Figura 1.7. Estructura molecular de la GOX. Sus dos subunidades son representadas con el color azul oscuro y claro, mientras que el coenzima FAD se representa de color rosa (Goodsell, 2006).

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GOX

El peso molecular de la GOX es de aproximadamente 130 a 175 KDa (Kalisz *et al.*, 1997). Esta enzima es altamente específica para el β -anómero de la D-glucosa. La actividad de la GOX se observa cuando se utiliza un sustrato la como 2-deoxi-D-glucosa, la d-manosa y la d-galactosa. Los inhibidores de la GOX incluyen el p-cloromercuribenzoato, el ion plata, el ion mercurio, el ion cobre, la hidroxilamina, la hidracina, la fenilhidrazina, la dimedona y el bisulfato de sodio (Kusai *et al.*, 1960).

La GOX es altamente específica para la β -D-glucosa y solo se han observado actividades secundarias con otros azúcares. La β -D-glucosa es oxidada en presencia de oxígeno en la posición carbono 1 Δ glucono-1, 5-lactona, que es, a su vez hidrolizado espontáneamente al ácido D-glucónico (Danneel *et al.*, 1993; Hatzinikolaou *et al.*, 1996; Pluschkell *et al.*, 1996).

La GOX es una enzima producida de forma natural por algunos hongos y los insectos que se enumeran en el cuadro 1.1 Como era de esperar, su función natural está estrechamente relacionada con su actividad catalítica. La función principal de la GOX es actuar como anti-bacteriana y agente anti-hongos a través de la producción de peróxido de hidrógeno. Hay estudios que refieren que es muy eficaz contra el crecimiento bacteriano o fúngico, especialmente si el microorganismo no produce captadores de

peróxido de hidrógeno, como la catalasa (Tiina y Sandholm 1989; Dobbenie *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995).

1.3.2 *A. mellifera* Y LA PRESENCIA DE LA GOX

El mantenimiento del sistema inmunológico es uno de los sistemas fisiológicos más costosos, en cuanto a la utilización de energía por parte del organismo (Lochmiller y Deerenberg 2000, Schmid-Hempel 2005), y la nutrición deficiente puede provocar un daño a la función inmune y aumentar la susceptibilidad de los individuos a los patógenos. La investigación de Alaux *et al.*, (2010), señala que el sistema de defensa de *A. mellifera* es afectado por la cantidad de proteína y la diversidad de la dieta, por lo que estos autores realizaron un experimento en el que, se suministraron dietas de polen mono y poliflorales a las abejas para evaluar su efecto en el sistema inmune.

En ese estudio, se proporcionó evidencia experimental de un vínculo entre la nutrición y la inmunocompetencia en abejas. El consumo de polen aumentó considerablemente la actividad del GOX y, además, el tipo de dieta tuvo un efecto significativo sobre su actividad ($F_{6,446} = 19.9$, $p < 0.001$). Esto sugiere que las dietas poliflorales indujeron una mayor actividad de la GOX, siendo esta enzima un marcador del sistema inmune social, en comparación con las mismas dietas monoflorales a nivel de proteína. Lo anterior, sugiere que las abejas invierten más recursos enzimáticos en la inmunidad social (Alaux *et al.*, 2010)

JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia que la adecuada nutrición en las abejas, deriva en una mejora del sistema de defensa de este modelo, ya que se ha observado que la adición de levaduras en la alimentación aumentan la capacidad inmune; y esto se logra observar a través del aumento en los niveles de la actividad de la enzima PO y la producción del NO, para evaluar el sistema inmune individual, y la enzima GOX para el sistema de defensa social.

Por ello, para contrarrestar la mortalidad de *A. mellifera*, se ha iniciado la administración de dietas que incluyen el empleo de microorganismos en calidad de probióticos, que sugieren la posibilidad que exista un efecto positivo en el sistema de defensa de este

organismo. Por lo que el estudio de estos efectos, a través de las actividades enzimáticas de la PO y la GOX, permitiría generar conocimientos acerca del impacto en el sistema de defensa que pueden tener los diferentes tipos de nutrición suministrada a las abejas.

HIPÓTESIS

Las levaduras simbiotes de abejas, en dietas suministradas para la nutrición de *A. mellifera*, incrementarán la actividad enzimática de la PO y la GOX.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la alimentación suplementada con levaduras simbiotes, en las actividades enzimáticas de la GOX y la PO, como parte del sistema de defensa *A. mellifera*?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia nutricional de las levaduras en el sistema inmune de *A. mellifera*, a través de las actividades enzimáticas de la GOX y la PO.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad enzimática de la PO, en abejas obreras sometidas a dietas enriquecidas con levaduras.
- Determinar la actividad enzimática de la GOX, en abejas obreras sometidas a dietas enriquecidas con levaduras.
- Analizar el perfil proteico de las abejas obreras, sometidas a dietas enriquecidas con levaduras.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para esta investigación se utilizaron abejas obreras del modelo *A. mellifera*, ya que este tipo de casta posee funciones vitales dentro de la colmena, que van desde la recolección

del alimento hasta la higiene, sanidad y defensa de la misma; lo que la hacen un elemento importante para su estudio y análisis.

Se realizaron experimentos con abejas obreras alimentadas con distintas dietas, y para cada uno de estos bioensayos se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental.

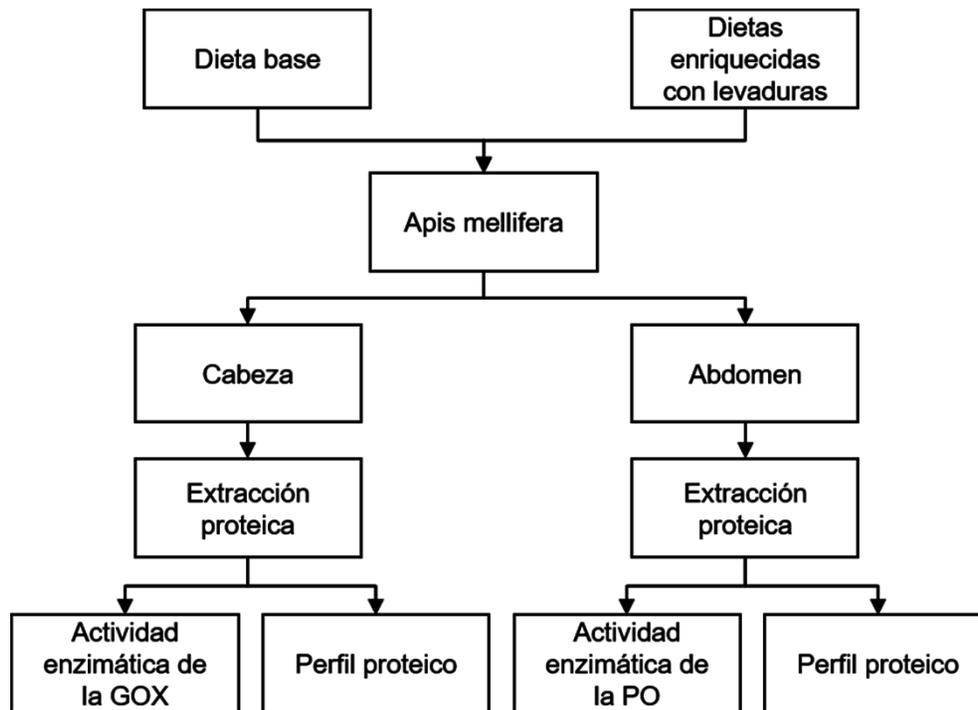


Figura 1.8. Estrategia experimental seguida en este trabajo.

CAPÍTULO II

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS PO y GOX

2.1 INTRODUCCIÓN

El trabajo referido en este capítulo, consistió en la optimización de los protocolos de disección de los individuos de abejas obreras, la homogenización del tejido, y la determinación de las condiciones experimentales, para la medición de actividad enzimática de la PO y la GOX en *A. mellifera*.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se analizaron las muestras de abejas obreras, en particular abejas nodrizas que se hallan en los marcos inferiores de la colmena, originarias del apiario ubicado en Kini, Motul, Yucatán. Las muestras fueron recolectadas durante el mes de marzo de 2017, siguiendo la metodología que a continuación se refiere.

2.2.1 TÉCNICA DE DISECCIÓN

El cuerpo de las abejas se logra describir anatómicamente a partir de tres secciones, en las cuales se encuentra la cabeza, el tórax y el abdomen. La disección es una técnica que consiste en dividir las partes de un insecto, que son de interés para esta investigación, por medio del empleo de pinzas entomológicas, un bisturí y un microscopio estereoscópico. De acuerdo a lo anterior, se estandarizó la técnica de disección de los individuos de *A. mellifera*. Para los propósitos de esta investigación, se disectó cada abeja para separar la cabeza y el abdomen, en los cuales se encuentra la mayor concentración de la enzima GOX (cabeza) y la enzima PO (abdomen), componentes bioquímicos de interés para el estudio del sistema inmune (Alaux *et al.*, 2010). Primero, se procedió a separar la unión de la cabeza con el tórax, mediante el uso de un bisturí (Figura 2.1), después de esto la cabeza es colocada en tubos de 1.5 ml de capacidad, y es resguardada en congelación a una temperatura de -20 °C, para su posterior empleo en las mediciones enzimáticas.

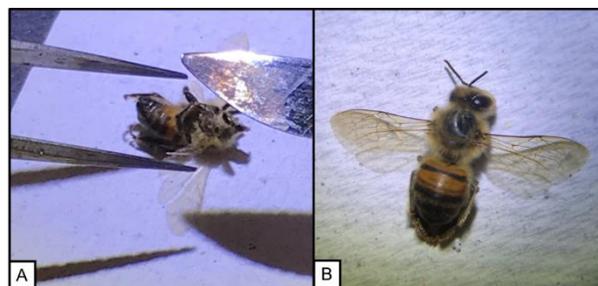


Figura 2.1 Técnica de disección. (A) Se muestra el uso de una pinza y un bisturí, para separar los segmentos de tórax y cabeza. (B) La cabeza y el abdomen son conservados en refrigeración a una temperatura de -20°C , para su consecuente homogenización.

Para la disección del abdomen, este segmento anatómico fue apartado de la unión con el tórax, por el empleo de un bisturí; con la utilización de las pinzas entomológicas, se retiró el aparato digestivo contenido en el abdomen (Figura 2.2A), y consecutivamente se hizo una limpieza con un papel filtro para evitar la menor cantidad de restos vicerales; logrando así que el interior de este componente anatómico se encuentre vacío y limpio de residuos (2.2B). Es necesario que los abdómenes se encuentren en las condiciones antes mencionadas, para lograr que la extracción de proteínas no se contamine y/o degrade. El tejido de abdomen es preservado en microtubos de 1.5 ml de capacidad, a una temperatura de -20°C .

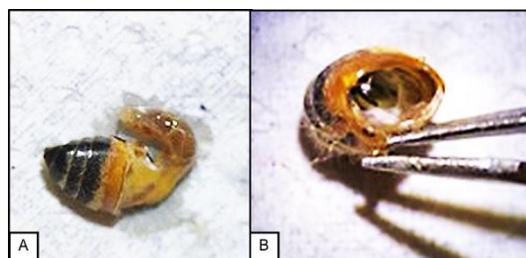


Figura 2.2 Tejido de abdomen de *A. mellifera*. (A) Se puede observar que el contenido digestivo del abdomen de la abeja, es apartado de la estructura por medio del uso de pinzas entomológicas. (B) Tejido de abdomen.

2.2.2 HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se evaluaron dos soluciones de amortiguador de fosfatos para usarlo como parte de la homogenización del tejido; la composición de cada solución se presenta en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Composición de las diferentes soluciones amortiguadoras.

Reactivos	Amortiguador 1	Amortiguador 2
NaH ₂ PO	80 mM	80 mM
NaCl	20 mM	20 mM
Triton X-100	0.05% (v/v)	-
pH	7.4	7.4

Para la homogenización del tejido se utilizó el protocolo reportado por Alaux *et al.*, (2010) con modificaciones. Se utilizaron cuatro cabezas de *A. mellifera*, en cada microtubo, para la determinación de la actividad de la GOX; así como cuatro abdómenes para la determinación de la actividad de la PO (Figura 2.3).

Al tejido, se le añadió 470 µl del amortiguador 1 de fosfato o el amortiguador 2 de fosfato (Cuadro 2.1). Ambos amortiguadores, contienen a su vez una mezcla de inhibidores de proteasas (2 mg/ml de antipaina, leupeptina y pepstatina A, 1 mg/ml de aprotinina y 0.1 mg/ml de inhibidor de la tripsina).

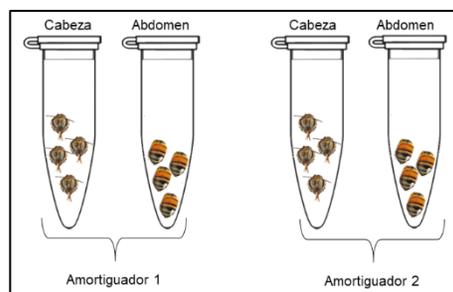


Figura 2.3 Estandarización del método de extracción proteica. Este diagrama, muestra el uso y distribución de los dos amortiguadores de extracción de proteínas, para dar paso a la homogenización de los tejidos.

Se realizó la maceración del tejido de forma manual con una pinza y posteriormente con un pistilo (Sigma aldrich Z359947) para microtubos (Figura 2.4 A). Por último, se maceró con el rotor para microtubos (Sigma aldrich Z359971) (Figura 2.4 B).

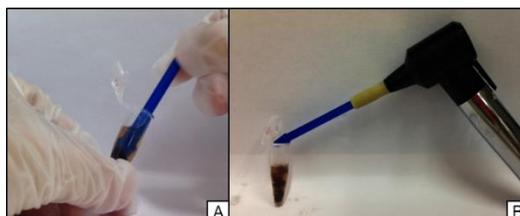


Figura 2.4. Homogenización del tejido de *A. mellifera*, de forma manual con un pistilo (A) y posteriormente con el rotor para pistilo (B).

Por último, se centrifugó la muestra a 15,000 xg por 20 minutos a 4 °C, para recuperar el extracto crudo (sobrenadante) de cada muestra con el uso de una micropipeta. Los extractos crudos fueron conservados a -20 °C hasta su uso en la determinación de la concentración proteica y la medición de las actividades enzimáticas.

2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Las proteínas obtenidas con los diferentes amortiguadores de extracción se cuantificaron a través de dos métodos: el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) y el de Bradford (1976).

El ácido bicinconínico, es una sal sódica capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en un medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico que permite monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). Por lo que se empleó el reactivo comercial de Thermo Scientific PIERCE BCA™ Protein Assay Kit, midiendo la formación del complejo revelador a una longitud de onda de 562 nm y utilizando la proteína albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para preparar la curva patrón de proteínas (Figura 2.5). La curva fue diseñada con concentraciones crecientes de proteína que van desde 5 μg hasta un punto máximo de 25 μg de BSA.

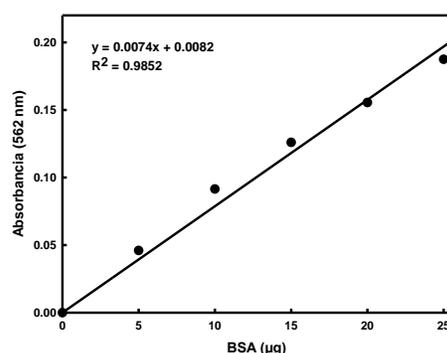


Figura 2.5 Curva estándar de BSA, utilizando el método del BCA (Smith *et al.*, 1985). La absorbancia se midió a 562 nm. En la curva se determinó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de correlación (R^2).

La cuantificación de proteína que se realizó en los extractos por el método de Bradford (1976), el cual está basado en la conversión de la forma leuco del colorante azul de Coomassie brilliant blue G-250, a un color intensamente azul cuando los grupos aniónicos del colorante interactúan con los grupos amino de las proteínas. Para determinar la cantidad de proteína por muestra, se usó una adaptación del método para microplacas, BIO-RAD Quick Start™ Bradford Protein Assay.

Se utilizó como referencia la proteína BSA para la elaboración de la curva patrón (Figura 2.6) y se determinó la ecuación de la recta. Para la curva estándar se utilizaron concentraciones crecientes de BSA, que van desde 0.5 µg hasta 10 µg. Para las lecturas de las muestras se utilizaron microplacas de 96 pozos (Sigma aldrich CLS3995), y un lector de Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis.

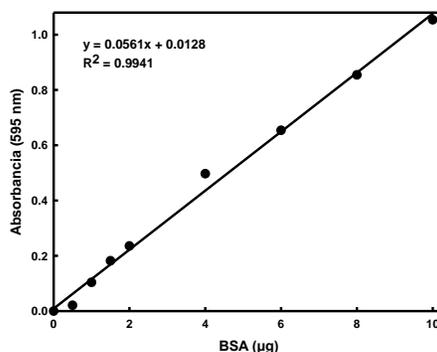


Figura 2.6 Curva estándar de la concentración de proteínas, a partir del método de Bradford. Se emplea a la proteína BSA como estándar. La absorbancia se midió a 595 nm. En la curva se determinó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de determinación (R^2).

A través del análisis de regresión lineal de las concentraciones de los estándares de BSA para la elaboración de la curva de calibración, se establece que hay una linealidad cercana a 1 ($R = 0.9941$), lo que sugiere la precisión en la preparación y dilución de los estándares utilizados.

2.2.4 PERFIL PROTEICO

Para el análisis del perfil proteico de los tejidos utilizados, se realizó una electroforesis de una dimensión, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Las proteínas obtenidas de los extractos totales del tejido de

abdomen y el de cabeza respectivamente, se separaron por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida, de acuerdo con Laemmli (1970), con modificaciones.

Se utilizó el sistema de mini geles de BioRad, con geles de 1 mm de espesor con dos fases. La fase inferior de separación está compuesta por el amortiguador Tris-HCl 0.75 M pH 8.8, SDS al 10%, acrilamida/bisacrilamida 12%, TEMED y persulfato de amonio 10%; y la fase superior de concentración esta compuesta por el amortiguador Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, SDS al 10%, acrilamida/bisacrilamida 4%, TEMED y persulfato de amonio al 10%.

Se determinó el uso de 10 µg de proteína de cada uno de los extractos totales de la muestra de tejido de abdomen y de cabeza, y se mezclaron con la solución de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.01% y β-mercaptoetanol 2%), y se calentaron durante 5 min a 95°C previamente a ser cargadas en el gel. Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en la corrida del gel se utilizó un marcador de peso molecular marca BioRad.

La separación electroforética se realizó utilizando el amortiguador Tris-glicina 0.33 M pH 8.3, con una corriente de 150 V constantes por una hora. Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie R-250 al 0.1%, diluido en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Por último, se procedió a desteñir los geles, con una solución que contenía 40% metanol y 10% ácido acético.

2.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO

El ensayo de actividad enzimática de la PO se determinó en el extracto total de proteína de abdomen, por espectrofotometría a través de la conversión de L-dopa (3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina) a melanina, utilizando el método propuesto por Alaux *et al.*, (2010), con modificaciones.

Se realizó la curva estándar a partir de la melanina (Figura 2.7). Para el diseño de esta curva, se colocaron concentraciones crecientes de melanina, que van desde 20 µg hasta 80 µg. Para las lecturas de las muestras se utilizaron microplacas de 96 pozos (Sigma aldrich CLS3995), y un lector de Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis.

Para el análisis de la actividad de la PO en muestras numerosas, se utilizó una microplaca de 96 pozos (Sigma aldrich CLS3995) se agregaron 90 μl de agua destilada, 20 μl de amortiguador de fosfato de sodio (100 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, pH 7.2) y se adicionaron 50 μl de extracto total. La microplaca fue incubada 5 minutos a 37°C. Al término de la incubación, se agregó 40 μl del sustrato enzimático L-dopa (2 mg/mL) a cada reacción. La lectura se realizó a una longitud de onda de 490 nm, después de 10 minutos de incubación a 37°C en condiciones de oscuridad.

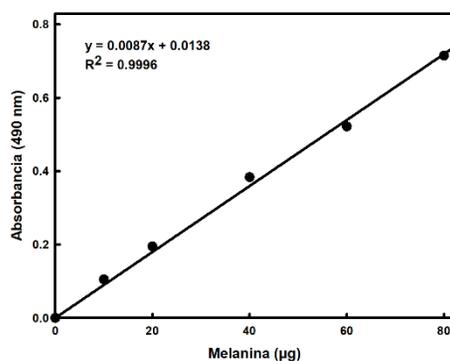


Figura 2.7 Curva estándar de melanina. Se utilizó melanina como estándar. La absorbancia se midió a 490 nm. En la curva se determinó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de determinación (R^2).

2.2.5.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO

Para el análisis de la actividad de la proPO, se utilizó el método propuesto por Favila-Ruiz *et al.*, (2018). En una microplaca de 96 pozos, se colocó en cada pozo 10 μl de extracto, 65 μl de amortiguador de fosfato de sodio (100 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, pH 7.2), y se adicionó 5 μl de α -Quimiotripsina (1 mg/ml), posteriormente se incubó durante 20 minutos a 37°C en condiciones de oscuridad. Por último, se agregaron 130 μl de L-Dopa (4 mg/ml), y se incubó por 10 minutos a 37°C y las lecturas se tomaron a una longitud de onda de 490 nm. Para determinar los μg de melanina producidos, se utilizó la ecuación de la recta generada a partir de la curva estándar de melanina.

2.2.5.2 CUANTIFICACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

La medición del NO, se basa en una reacción de diazotación descrita originalmente por Griess en 1879. El método de Griess es una reacción química en donde se usa la

sulfanilamida, y el dihidrocloruro de N-1-naftiletilendiamina (NED) en condiciones ácidas (ácido fosfórico) para detectar el NO_2 .

Para determinar la cantidad de NO producido, se usó como referencia la concentración de nitritos, para la elaboración de la curva patrón (Figura 2.8). Se usaron concentraciones crecientes de NaNO_2 .

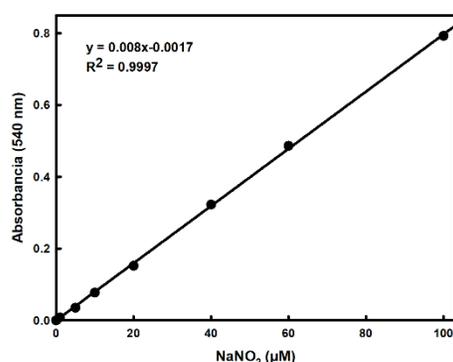


Figura 2.8 Curva estándar de la concentración de NaNO_2 . Se utilizó NaNO_2 como estándar, para cuantificar la concentración de NO por el método de Griess (1879). La absorbancia se midió a 540 nm. En la curva se indicó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de determinación (R^2).

En una microplaca de 96 pozos (Sigma aldrich CLS3995), se realizó la cuantificación de NO en los extractos de abdomen, usando el paquete comercial de Griess Reagent System (Promega G2930), donde en cada pozo se colocó 50 μl de muestra, se agregó 50 μl de la solución de sulfanilamida, y se incubó durante 20 minutos a 37 °C, en condiciones de oscuridad. Después, se añadió 50 μl de la solución NED a todos pozos y se realizó una incubación a 37 °C, protegiendo a la placa de la luz. Por último, se midió el cambio de coloración, a una absorbancia a 540 nm.

2.2.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX

La GOX cataliza la conversión de la β -D-glucosa y el O_2 en la D-gluconolactona y el H_2O_2 (Bentley, 1963). El H_2O_2 , en presencia del sustrato *O*-dianisidina, puede a su vez ser convertida, por la enzima peroxidasa, en *O*-dianisidina oxidada (Alaux *et al.*, 2010), este último producto que puede ser medido espectrofotométricamente (570 nm) para determinar la actividad enzimática de la GOX.

De acuerdo al paquete comercial Glucose Oxidase Activity Assay Kit (Sigma aldrich MAK097), se realizó una curva estándar a partir del estándar de H_2O_2 (Figura 2.9); para obtener la ecuación de la recta, se utilizaron concentraciones crecientes, que van desde 2, 4, 6, 8 y 10 nmoles como puntos estándar de la curva; para cuantificar los moles de H_2O_2 producidos por la enzima GOX.

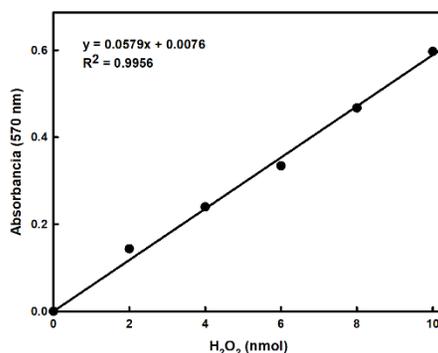


Figura 2.9 Curva estándar de H_2O_2 . La absorbancia se midió a 570 nm. En la curva se determinó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de determinación (R^2).

En una microplaca de 96 pozos (Sigma aldrich CLS3995), se realizó análisis de la actividad de la GOX en los extractos totales de tejido de cabeza, usando el paquete comercial Glucose Oxidase Activity Assay Kit, donde en cada pozo se colocaron 5 μ l de muestra, se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción que indica las especificaciones del producto antes mencionado. Después, se realizó una incubación de 5 minutos a 37 °C, protegiendo a la placa de la luz. Por último, se midió el cambio de coloración, a una absorbancia a 570 nm.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO Y CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

A diferencia de los protocolos reportados por diversos autores, (Alaux *et al.*, 2010; Zufelato, 2004; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Laughton *et al.*, 2011; Di pasquele *et al.*, 2013) en donde hacen uso desde tres a nueve individuos para la obtención de extracto crudo de los tejidos de abdomen y cabeza; para la determinación de las actividades de la PO y la GOX, se encontró que la disección de dos individuos para la homogenización de tejidos, con el uso del mismo volumen de amortiguador (470 μ l) que se había utilizado

para cuatro individuos, es suficiente para obtener la cantidad de extracto proteico adecuado.

En cuanto al uso de amortiguadores de fosfato para la homogenización y la obtención del extracto crudo, se observó que la adición de Tritón X-100, un detergente no iónico, favorece la solubilidad de las proteínas, eso a su vez permite que la mayor parte de las enzimas presentes conserven su actividad catalítica; esto sugiere que para este estudio es necesario la utilización del detergente para una mejor extracción y rendimiento de proteína (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Rendimiento y cuantificación de proteína.

Número de individuos		Concentración de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			
		Método de Bradord		Método de BCA	
		Amortiguador sin Triton X-100	Amortiguador con Triton X-100	Amortiguador sin Triton X-100	Amortiguador con Triton X-100
4	Abdomenes	~ 8	~ 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	Cabezas	~ 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~ 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	Abdomenes	~ 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~ 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	Cabezas	~ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~ 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Según se evidencia en las curvas de calibración de proteínas, de acuerdo al método del BCA (Figura 2.5), o al método de Bradford (Figura 2.6), se obtuvieron modelos de regresión lineal simple que describieron el comportamiento de la señal en función de la concentración de proteína de manera lineal. A partir del análisis de las curvas estándar y los valores de la regresión, se decidió que el mejor método colorimétrico para la cuantificación es el protocolo de Bradford. Debido a que, el análisis de la sensibilidad se empleó como parámetro de comparación la pendiente de cada uno de los modelos de regresión obtenidos, y se hizo evidente que quien presentó una menor sensibilidad es el método de BCA (Cuadro 2.2).

2.3.3 PERFIL PROTEICO

En el perfil proteico del tejido de abdomen (Figura 2.10) y de cabeza (Figura 2.11) se muestra la utilización de amortiguador de fosfato con Tritón X-100 y sin la presencia de Tritón X- 100; se evidencia que la colocación dentro de los pozos del gel, de 10 μg de

proteína fue adecuada para la visualización de patrón de bandas proteicas. Bajo las condiciones de extracción, de acuerdo al uso de los amortiguadores, es evidente que hay una mejor extracción de proteínas en las muestras donde fue utilizado el amortiguador 2, ya que las bandas que logran apreciar en el gel.

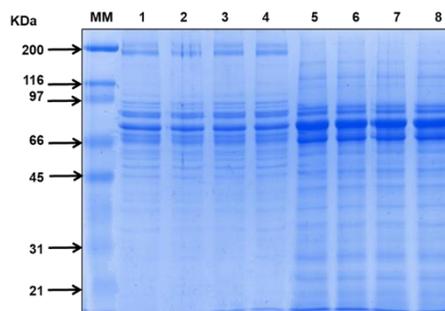


Figura 2.10 Análisis obtenido del extracto total de cabeza de *A. mellifera*. Se utilizó un SDS-PAGE al 12%. En cada carril se utilizaron 10 μg de proteína total. Carriles: 1. Marcador molecular (MM); 2., 3., 4., y 5., extractos proteicos obtenidos con amortiguador sin Triton X-100; y 6., 7., 8., 9., extractos proteicos obtenidos a partir del amortiguador con Triton X-100.

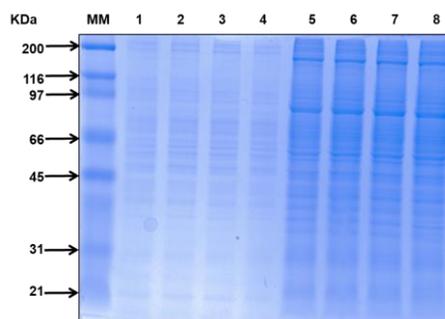


Figura 2.11 Análisis obtenido del extracto total de abdomen de *A. mellifera*. Se utilizó un SDS-PAGE al 12%. En cada carril se utilizaron 10 μg de proteína total. Carriles: 1. Marcador molecular (MM); 2., 3., 4., y 5., extractos proteicos obtenidos con amortiguador sin Triton X-100; y 6., 7., 8., 9., extractos proteicos obtenidos a partir del amortiguador con Triton X-100.

2.3.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO

Como se menciona en el apartado 2.2.5, en el presente trabajo se usó una modificación del método reportado por Alaux *et al.*, (2010). En la figura 2.12, se presenta la relación de la actividad de la PO, en función de la concentración de proteína utilizada. Esto evidencia, que la actividad enzimática se comporta de manera lineal ya que la actividad enzimática de la PO incrementa proporcionalmente con la cantidad de extracto utilizado.

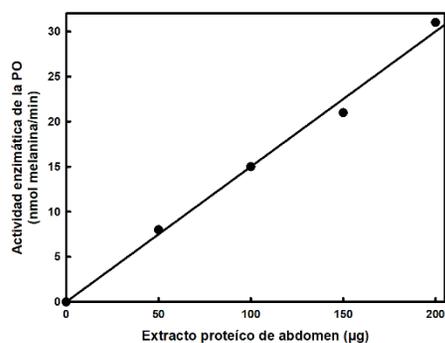


Figura 2.12 Actividad enzimática de la PO, en función de la concentración de proteína.

En cuanto a la actividad específica de la PO (Figura 2.13), se observa que es la misma entre un rango de 50 a 200 µg de proteína, porque lo que el método utilizado es confiable y replicable para el análisis de la enzima PO.

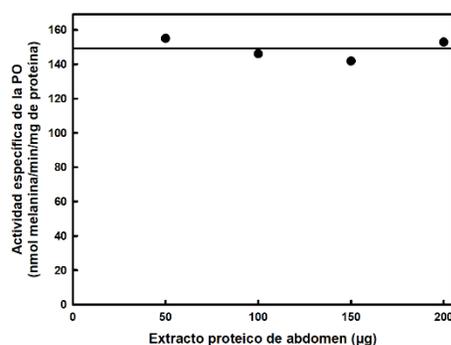


Figura 2.13 Normalización de la actividad específica de la enzima PO a un mg de proteína.

2.3.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO

De acuerdo al apartado 2.2.5.1, en el presente trabajo se utilizó el método reportado por Favila-Ruiz *et al.*,(2018), para la medición de la actividad enzimática de la proPO. En la figura 2.14, se observa que a concentraciones crecientes de proteína, que van desde 50 a 200 µg, aumenta a su vez la actividad enzimática de esta proteína.

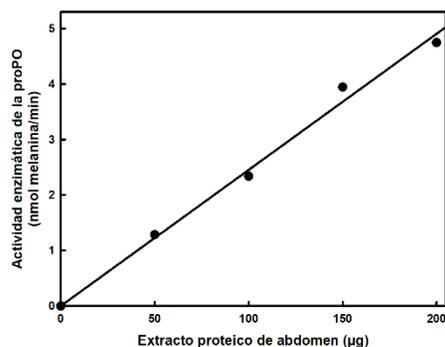


Figura 2.14 Actividad enzimática de la proPO, en función de la concentración de proteína.

En la determinación de la actividad específica de la proPO (Figura 2.15), se observa que es la misma entre un rango de 50 a 200 µg de proteína, porque lo que el método utilizado es confiable y replicable para el análisis del zimógeno proPO.

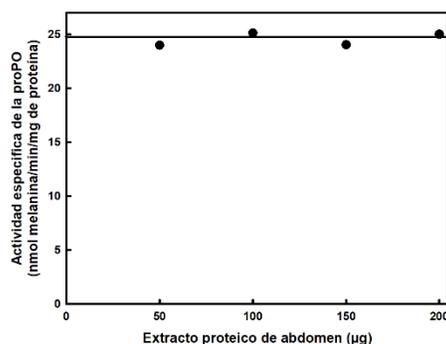


Figura 2.15 Normalización de la actividad específica de la enzima proPO a un mg de proteína.

2.3.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX

De acuerdo a lo mencionado en la sección 2.2.5 de este capítulo, donde se utilizó el paquete comercial Glucose Oxidase Activity Assay Kit. En la figura 2.16, se observa la relación de la actividad de la GOX, en correlación a la concentración de proteína utilizada para este ensayo.

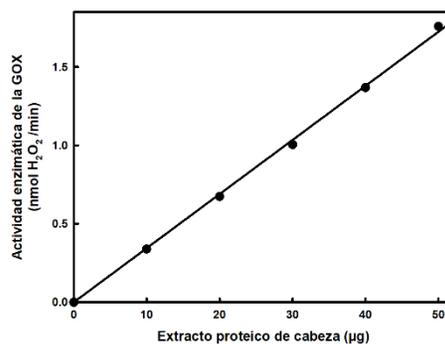


Figura 2.16 Actividad enzimática de la GOX, en función de la concentración de proteína.

En cuanto a la actividad específica de la GOX (Figura 2.17), se observa que es la misma entre un rango de 50 a 200 μg de proteína, porque lo que el método utilizado es confiable y replicable para el análisis de la enzima PO.

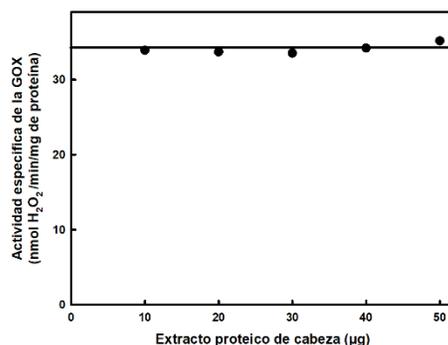


Figura 2.17 Normalización de la actividad específica de la enzima GOX a un mg de proteína.

2.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se han presentado las condiciones para las técnicas y el manejo adecuado de las muestras, con el propósito de obtener los parámetros adecuados para la medición de las actividades enzimáticas de las dos enzimas del sistema de defensa de *A. mellifera*, así como también para la cuantificación del NO como molécula señal de la cascada de serina proteasas, que da lugar a la activación de la proteína PO.

La estandarización de los ensayos para medir la actividad de la PO y la proPO, es de suma importancia, ya que la variación de individuo a individuo es factor muy frecuente en el modelo (Laughton y Siva-Jothy, 2010). De acuerdo a estas variaciones biológicas, estos métodos se han utilizado con éxito posteriormente, para analizar las actividades de la PO y la proPO, en abejas obreras sometidas a diferentes dietas modificadas.

En la investigación de Laughton y Siva-Jothy (2010), se utilizaron 10 abejas obreras para la medición enzimática de la PO y la proPO; mientras que, Alaux *et al.*, (2010), emplearon 8 abejas obreras para la medición de la PO y la GOX; a diferencia de los estudios antes mencionados, en esta investigación se adoptó la estrategia de utilizar dos abejas obreras para las mediciones enzimáticas, ya que se observó que a partir de la disminución de individuos, la correspondiente extracción proteica y las condiciones modificadas desde

este trabajo, le dan a este ensayo la capacidad de percibir la actividad catalítica de las proteínas de interés (Cuadro 2.2)

En esta investigación se encontró que el mejor método para la obtención de las proteínas totales en tejido de abdomen y cabeza de *A. mellifera*, fue la extracción a través del amortiguador de fosfatos adicionado con detergente Triton X-100. La cuantificación espectrofotométrica de las proteínas totales presentes en muestras de tejido de abdomen y de cabeza, fue mejor cuando se empleó el reactivo de Bradford. Con este protocolo se logró un análisis confiable, sencillo, sensible y reproducible.

La medición de la concentración de proteína en el extracto total de cabeza y para tejido de abdomen, se realizó a partir de diluciones 1:10, ya que el extracto puro excedía la cantidad de proteína a cuantificar, de acuerdo a la curva estándar descrita anteriormente (Figura 2.6). En cuanto a la cuantificación de proteínas, se observó que el tejido de abdomen tiene una concentración de aproximadamente 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; y el tejido cabeza una concentración de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Cuadro 2.2).

De acuerdo al análisis del perfil proteico, es esperado que las proteínas se disocien en subunidades (monómeros) bajo las condiciones de SDS-PAGE (Zufelato *et al.*, 2010). Tanto en el perfil proteico del tejido de abdomen (Figura 2.10) y el de cabeza (Figura 2.11), al observar la presencia o ausencia de algunas bandas y la diferencia en la intensidad, se puede sugerir que es debido a la composición del amortiguador que fue utilizado, donde la presencia del detergente está actuando como un surfactante y emulsionante no iónico, ya que logró solubilizar las proteínas, y por tanto se pueden apreciar un mejor perfil proteico en las extracciones donde se utilizó el amortiguador con detergente.

En la figura 2.10, se aprecia la presencia de diferentes bandas con masas moleculares similares, a las reportadas para observar la proteína GOX, 130 a 175 KDa (Kalisz *et al.*, 1997), que se encuentra en las glándulas hipo faríngeas ubicadas en la cabeza de este organismo. De igual forma, debido a que este es un perfil proteico total, basado en el uso de amortiguadores con o sin detergente para la extracción proteica, se observa que los carriles del 1 al 4 (Figura 2.11), donde se utilizó amortiguador con Tritón X-100, hay una

mayor integridad e intensidad de las bandas, lo que sugiere que el diseño y método de extracción logra obtener una suficiente calidad de proteína.

En el 2010, Laughton y Siva-Jothy, exponen que la reproducibilidad y la medición constante de la PO y proPO, es particularmente importante para obtener una comprensión del sistema inmune de *A. mellifera*, pero lo ideal es que estas mediciones sean acompañadas con otros indicadores del sistema de defensa, como el porcentaje de cuerpos grasos o bien, la cuantificación de hemocitos, entre otros.

CAPÍTULO III**EFFECTO DE DIFERENTES DIETAS EN LA DEFENSA SOCIAL Y SISTEMA INMUNE DE *A. mellifera*****3.1 INTRODUCCIÓN**

El sistema de defensa de los insectos, en particular de *A. mellifera* está integrado por un componente social y un componente individual. El sistema de defensa social está formado por respuestas conductuales (el grooming, la conducta higiénica, entre otros), barreras físicas (la colmena, el propóleo) y un elemento fisiológico. El mecanismo fisiológico envuelto en este sistema social está representado por la enzima GOX, la cual tiene entre sus funciones esterilizar el alimento de la colonia y hacer de este, un producto inocuo para los integrantes de la colonia. Esta proteína, cataliza una reacción de óxido reducción, que da lugar a productos como el H₂O₂, que posee la característica de lograr la asepsia del alimento. Es por ello que este tipo de proceso se ha denominado por algunos autores, como un procedimiento más preventivo, que como una respuesta de defensa (Wahl y Ulm, 1983; Alaux *et al.*, 2010; Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Haydak, 1970).

El sistema inmune individual está organizado por una serie de señales, que incluyen en simultáneo una respuesta humoral e innata; donde a partir de la presencia de un elemento extraño en el organismo, se activan una serie de patrones de reconocimiento que, de acuerdo al tipo de elemento, se desencadenan las diferentes vías que van desde el reconocimiento del patógeno hasta el proceso de melanogénesis (James y Xu, 2012).

Una de estas rutas, y de interés para este estudio, es la vía de la serina proteasas, ya que dentro de la serie de pasos que ocurren durante este proceso, se producen moléculas señalizadoras como el NO, que dan paso al zimógeno llamado proPO, que precede a la proteína con carácter catalítico, la PO. La proteína PO es el componente terminal de una cascada inmune innata, esta enzima cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, que luego se polimerizarán no enzimáticamente a melanina (Söderhäll y Cerenius, 1998).

La melanización, es el proceso de polimerización de un primer monómero de melanina, que tiene por objetivo encapsular al elemento extraño que amenace al organismo, y

expulsarlo del mismo. Todo este proceso descrito anteriormente, se puede traducir como una compleja red de señales, que representan y activan al sistema inmune individual de las abejas (James y Xiu, 2012; González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011; Alaux *et al.*, 2010). Los niveles del NO, la actividad del zimógeno proPO, la enzima PO y la enzima GOX, se han referido como los indicadores bioquímicos, para conocer cuál es la condición en que se encuentra el sistema de defensa de *A. mellifera* (James y Xiu, 2012; Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013; Negri *et al.*, 2017).

La nutrición es fundamental para las funciones inmunes de los organismos, ya que permite desarrollar los mecanismos de defensa para reaccionar contra las patógenos tanto bióticas como abióticas (Crailsheim, 1990; Woodward y Quinn, 2011). Las abejas requieren de una alimentación completa, que sea apta para el adecuado funcionamiento de su respuesta inmune. Para tener una alimentación suficiente, se han empleado estrategias que incluyen desde la adición de polen modificado, así como de levaduras, para mejorar su asimilación y nutrición (SAGARPA, 2004).

El empleo de levaduras en el diseño de las dietas utilizadas en este estudio, está basado en reportes donde se ha observado la presencia de levaduras en el néctar floral (Herrera *et al.*, 2009; Canto *et al.*, 2017), en el cuerpo de las abejas (tracto digestivo) y en los reservorios de los alimentos (miel y polen) así como en el alimento larval (Lizama, 2011; Rosa *et al.*, 2003). Es probable que estos microorganismos asociados a las abejas, sostengan una relación simbiótica que beneficie a la nutrición (Gilliam, 1997) del modelo de estudio. Lo anterior coincide con el empleo de estos microorganismos como parte de una alimentación artificial (Williams *et al.*, 2013), por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es regularmente utilizada por los apicultores a modo de suplementos, ya que son considerados inocuos para *A. mellifera*.

Por tanto, los análisis referidos en este capítulo, son el resultado de las determinaciones bioquímicas, para evidenciar cómo la adición de levaduras en la dieta de la abeja, puede afectar a la inmunocompetencia. Entonces, se espera que al alimentarlas con una dieta con levaduras, se observara un incremento en los indicadores de inmunocompetencia de *A. mellifera*.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado para esta investigación fueron abejas obreras recién emergidas de *A. mellifera*, provenientes del laboratorio de apicultura a cargo de Dr. Luis A. Medina del Cuerpo de Académicos de Apicultura Tropical de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Los apiarios que se utilizaron para la colecta de abejas, se encuentran rodeados de un continuo de vegetación secundaria derivada de selva baja caducifolia de donde principalmente las abejas extraen sus recursos alimenticios (Medina-Medina y Martin, 1999; Medina-Medina, 2004; Martínez-Puc *et al.*, 2011).

3.2.2 TRATAMIENTOS

Las abejas obreras recién emergidas, fueron colocadas en pequeñas cajas, donde se les fue administrado cada uno de los nueve tratamientos, en forma de alimento sólido.

En esta investigación se han utilizado nueve dietas o tratamientos, en las cuales se considera como punto de partida una dieta base o control, que ha sido modificada a partir de la composición propuesta por Williams *et al.*, (2013) (Cuadro 3.1); a partir de esta dieta base, se diseñaron las otras cinco dietas con la adición de una levadura (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.1 Composición de la dieta base, modificado de Williams *et al.*, (2013).

Ingredientes	Proporción de la masa total
Harina de soja (desgrasada)	0.143
Harina de caseinato de calcio (proteína de la leche 90%)	0.152
Harina de proteína de suero (proteína de leche 80%)	0.038
Solución de sacarosa (50% p/v)	0.476
Aceite de linaza	0.095

Cuadro 3.2 Diseño de las dietas modificadas.

Tratamientos		
Dieta base		
Dieta base	+	<i>Starmerella bombicola</i>
Dieta base	+	<i>Candida versatilis</i>

Dieta base	+	<i>Candida apícola</i>
Dieta base	+	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>
Dieta base	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Los intervalos de tiempo de muestreo corresponden a las cuatro etapas de desarrollo glandular y función de las abejas: incipiente, secretora de alimento larvario, secretora de cera y secretora para la conversión del néctar (Seeley, 1995). Este experimento tuvo un tiempo de duración de seis días; en donde todos los días se evaluó la supervivencia de estos organismos; y cada tercer día, se cosechó un número de cuatro abejas por cada una de las nueve cajas, para la correspondiente extracción de proteínas y las mediciones de los indicadores bioquímicos a evaluar. Este ensayo se realizó tres veces, durante los meses de junio y agosto del año 2017.

3.2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se obtuvieron un total de 168 muestras, en donde el tejido de cada uno de los abdómenes fue homogenizado con el amortiguador de extracción, de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo II de esta tesis. A partir del extracto total de proteína obtenido, se procedió a la cuantificación de proteína por medio del método de Bradford (1976), utilizando de referencia la curva estándar de BSA (Figura 2.6) descrita anteriormente. Para la medición espectrofotométrica, se usó el espectro Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek).

3.2.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PO

El ensayo de la actividad enzimática de la PO se realizó por espectrofotometría a través de la conversión de L-dopa (3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina) a melanina, conforme a las condiciones establecidas en el Capítulo II.

3.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA proPO

La actividad de la proPO se determinó por espectrofotometría a través de la conversión catalítica de L-dopa a Dopacromo, adicionando previamente α -Quimiotripsina, como activador artificial de la proPO. De acuerdo a lo referido en el capítulo II.

3.2.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GOX

El análisis de la actividad enzimática de la GOX se realizó por espectrofotometría a través de la medición de los moles de H_2O_2 producidos por la enzima. Conforme a las condiciones establecidas en el Capítulo II.

3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R (Douglas Bates *et al.*, 2018), para detectar diferencias en el efecto debido a las distintas dietas utilizadas, en los marcadores bioquímicos, como la actividad de la PO, la proPO y la GOX. A partir de los datos obtenidos de los marcadores bioquímicos antes mencionados, se realizó un análisis exploratorio a cada uno de ellos.

Para examinar el tipo de distribución estadística de los datos y poder realizar las comparaciones entre los tratamientos, se realizaron los histogramas de frecuencia y los diagramas de cuantil-cuantil, para observar la simetría de cada uno de los conjuntos de datos, y así determinar qué tipo de distribución tienen. Sumado a lo anterior, se les realizó una prueba estadística de Shapiro-Wilks, para conocer la naturaleza de las observaciones; esta prueba plantea a la hipótesis de que el conjunto de datos provienen de una distribución normal, solo cuando el valor de significancia es mayor a 0.05.

En función de las pruebas realizadas, se transformaron los datos a través de las técnicas de transformación no lineales. Se probaron tres transformaciones, la transformación logarítmica, la transformación de la raíz cuadrada del dato y la transformación de la raíz cúbica del dato. Esta última, cumplió con las pruebas de normalidad. En el caso de los datos obtenidos de la enzima GOX, se realizó una transformación de Tukey, que se ajustó a las condiciones de normalidad.

Para comparar el efecto que tienen las diferentes dietas sobre la actividad enzimática de la PO, la proPO y la GOX, así como también de la producción de NO, se realizó un análisis de las varianzas (ANOVA) de medidas repetidas. Este tipo de análisis ANOVA permite comparar la actividad enzimática de la PO y de la proPO, en las abejas recién emergidas, y respecto a su efecto a diferentes intervalos de tiempo, entre las diferentes dietas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA PO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE *A. mellifera*.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, en este apartado se presentan los resultados del efecto de la nutrición sobre la actividad enzimática de la PO, en abejas recién emergidas sujetas a dietas adicionadas con levaduras.

En la figura 3.1, se presenta el efecto que tiene la dieta base en contraste con la dieta donde se añade la levadura *Starmerella bombicola*, sobre la actividad específica de la enzima PO, en abejas melíferas. En esta figura se puede observar que las abejas que fueron alimentadas con *S. bombicola*, no hay efecto significativo ($p = 0.4371$). A lo largo del tiempo, se observa como la dieta base tiene un aumento en el día tres, mientras que la dieta suplementada con la levadura *S. bombicola*, no reporta variación en el tiempo.

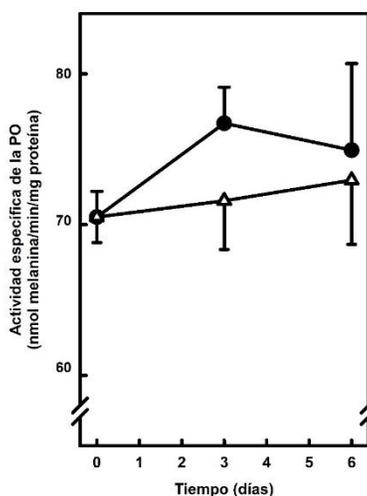


Figura 3.1 Efecto de la dieta adicionada con *S. bombicola*, en la actividad de la PO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●), y con la dieta base suplementada con *S. bombicola* (Δ). La actividad específica de la PO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En las muestras donde se utilizó la levadura *Candida versatilis* en dietas modificadas para la alimentación de *A. mellifera* (Figura 3.2), se registró una actividad enzimática similar durante los tres primeros días con respecto al conjunto de abejas que fue alimentado con

la dieta base, pero en el día seis se observa una menor actividad a lo observado en las abejas alimentadas con la dieta base. Sin embargo no existe diferencia estadísticamente significativa.

A partir del uso de la levadura de *Candida apícola*, en el transcurso de los días de experimentación, se observa que las abejas que fueron alimentadas con esta levadura (Figura 3.3), presentan una menor actividad enzimática con respecto al control, se aprecia que no hay un efecto significativo de esta dieta en la actividad específica de la proteína PO.

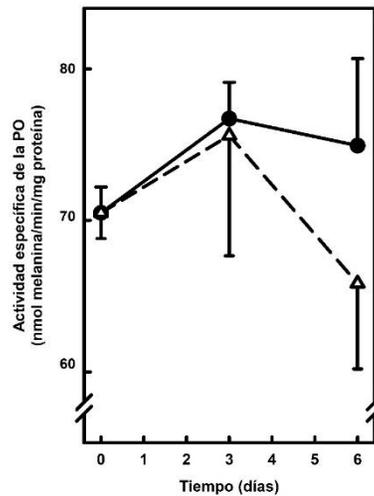


Figura 3.2 Efecto de la dieta adicionada con *C. versatilis*, en la actividad de la PO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●), y con la dieta base suplementada con *C. versatilis* (Δ). La actividad específica de la PO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

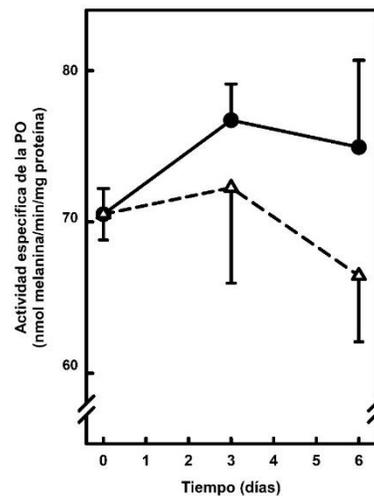


Figura 3.3 Efecto de la dieta adicionada con *C. apicola*, en la actividad de la PO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *C. apicola* (▲). La actividad específica de la PO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

Con respecto a la administración de la dieta modificada con *Zygosaccharomyces mellis* y la dieta base (Figura 3.4), se observa que la actividad enzimática de las abejas alimentadas con la levadura, tiene una tendencia por debajo a lo que registra la actividad de los sujetos control, aunque se observa que en el día seis parece elevarse el marcador al mismo nivel que el control. De acuerdo a la prueba estadística, no existen diferencias significativas entre estos ensayos (ANOVA, $p = 0.1673$).

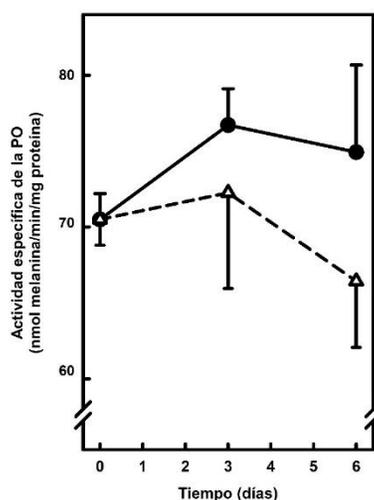


Figura 3.4 Efecto de la dieta adicionada con *Z. mellis*, en la actividad de la PO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *Z. mellis* (▲). La actividad específica de la PO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

El uso de *S. cerevisiae*, como suplemento de la dieta base, es considerado como un control interno, ya que el empleo de esta levadura es ampliamente utilizado en la actividad apícola, al ser considerada como un sustituto de fuente de proteína (SAGARPA, 2004). En esta investigación, se observa que el día tres la dieta suplementada con *S. cerevisiae*, la actividad enzimática es menor en contraste con la dieta base (Figura 3.5), pero con el análisis de ANOVA se encontró una diferencia significativa en el efecto de la actividad de la PO ($p = 0.04$).

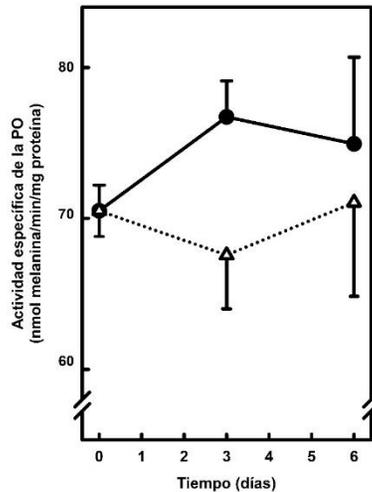


Figura 3.5 Efecto de la dieta adicionada con *S. cerevisiae*, en la actividad de la PO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. cerevisiae* (Δ). La actividad específica de la PO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

3.3.2 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA proPO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE *A. mellifera*.

En esta sección, se determinó la actividad enzimática de la proPO, en abejas recién emergidas sujetas a dietas adicionadas con levaduras. En la figura 3.6, a pesar de que se observa que la dieta adicionada con la levadura *S. bombicola*, a lo largo del tiempo presenta una tendencia al aumento de actividad enzimática después del día 3, esta no es mayor en comparación de la actividad enzimática encontrada en las abejas alimentadas con la dieta base; aunado a lo anterior, la prueba de ANOVA, no arrojó una diferencia significativa entre estos conjuntos ($p= 0.2434$).

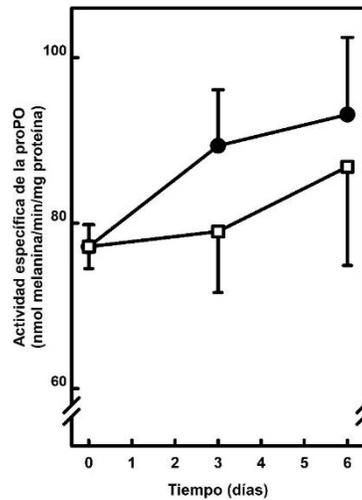


Figura 3.6 Efecto de la dieta adicionada con *S. bombicola*, en la actividad de la proPO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. bombicola* (□). La actividad específica de la proPO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

Con el uso de la levadura de *C. versatilis* en dietas modificadas para su uso en el modelo de *A. mellifera*, se observa que no hay una diferencia significativa de este tratamiento, con lo que respecta a la actividad específica de la proteína proPO (Figura 3.7). En el transcurso de los días de experimentación, se observa que las abejas que fueron alimentadas con la levadura, presentan una menor actividad enzimática con respecto al control, y la producción de esta proteína tiene un descenso importante después del día tres. A través del análisis de ANOVA, se obtuvo una p de 0.8789, por lo que se puede distinguir que no existe un efecto positivo en el sistema inmune de las abejas melíferas, a partir de este tratamiento.

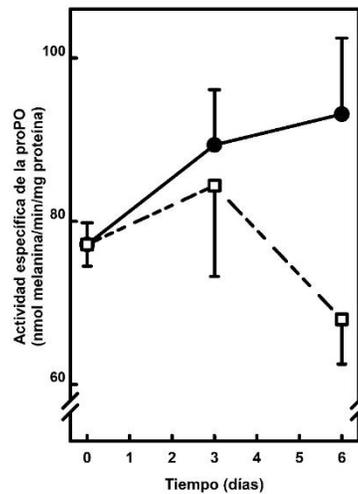


Figura 3.7 Efecto de la dieta adicionada con *C. versatilis*, en la actividad de la proPO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *C. versatilis* (□). La actividad específica de la proPO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

La adición de la levadura *C. apicola* en dietas modificadas para la alimentación de *A. mellifera* (Figura 3.8), mostró una tendencia menor en referencia al conjunto que fue alimentado con la dieta base, pero en el día seis se advierte como la tendencia disminuye en comparación a las abejas alimentadas con la dieta base. A partir de esto, se determinó que este tratamiento no fue estadísticamente diferente a la dieta base ($p = 0.516$).

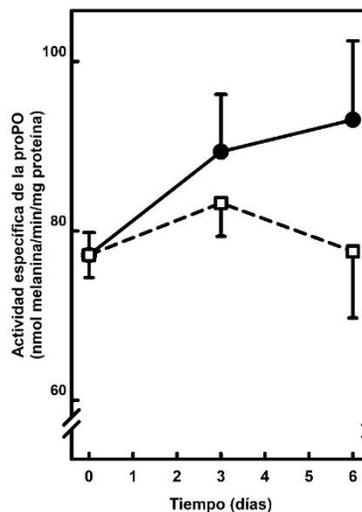


Figura 3.8 Efecto de la dieta adicionada con *C. apicola*, en la actividad de la proPO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *C. apicola* (□). La actividad específica de la proPO fue determinada a diferentes

tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En cuanto al uso de la levadura *Z. mellis*, es posible observar que la tendencia de la actividad enzimática de la proPO aumenta a partir del día 3, pero aun así presenta una menor actividad a lo observado en las abejas alimentadas con la dieta base (Figura 3.9); y al analizar estos efectos mediante la prueba de ANOVA, para determinar si existe un efecto significativo sobre el indicador, se obtuvo una p de 0.4704 que indica que no existe relación entre la dieta y el efecto sobre la actividad de la enzima PO, en las abejas melíferas.

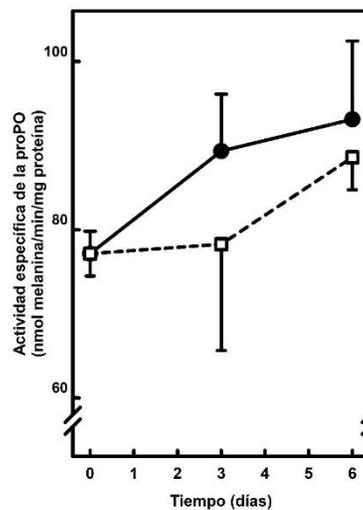


Figura 3.9 Efecto de la dieta adicionada con *Z. mellis*, en la actividad de la proPO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *Z. mellis* (□). La actividad específica de la proPO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En la figura 3.10, se evaluó el efecto que tiene la dieta base en contraste con la dieta donde se adiciona la levadura *S. cerevisiae*, sobre la actividad específica de la proteína proPO, en abejas melíferas. En el diagrama se puede observar que las abejas que fueron alimentadas con la dieta base, tienen una mayor actividad enzimática que las abejas a las que se administró la dieta con la levadura. Después del día tres, se puede apreciar un aumento en la actividad enzimática de las abejas alimentadas con la dieta modificada, con respecto al control. Y en base a la prueba estadística de ANOVA, que compara las medias de la población para determinar si existe una diferencia significativa entre ellas; se

determinó que al observar el efecto de las dietas sobre este marcador del sistema inmune de *A. mellifera*, no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.2677$).

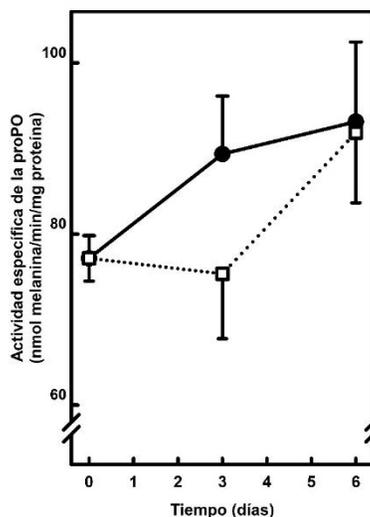


Figura 3.10 Efecto de la dieta adicionada con *S. cerevisiae*, en la actividad de la proPO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. cerevisiae* (□). La actividad específica de la proPO fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

3.3.3 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA PRODUCCIÓN DEL NO, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE *A. mellifera*.

El NO es un gas producido de forma intra y extracelular, ya sea por el intestino o bien por los hemocitos de los insectos, como es el caso de la abeja, el cual traspasa la membrana de los patógenos, dañando tanto a algunas proteínas como a su ADN (Moreno-García, 2010). Esta molécula por tanto, no solo es un molécula señal sino también una parte fundamental en el sistema de defensa de *A. mellifera*. En esta sección, se determinaron los niveles de NO, en abejas recién emergidas sometidas a dietas adicionadas con levaduras.

El empleo de la levadura *S. bombicola* en la dieta modificada para la alimentación de *A. mellifera* (Figura 3.11), mostró una producción del NO en ascenso, en los tres primeros días, con respecto conjunto que fue alimentado con la dieta base; y en el día seis se advierte como la tendencia sigue siendo mayor a lo observado en las abejas alimentadas con la dieta base. Aunado esto, se determinó que este tratamiento no fue significativo con

respecto a la dieta base. Ya que, de acuerdo a la prueba de ANOVA, se encontró un valor de p de 0.947.

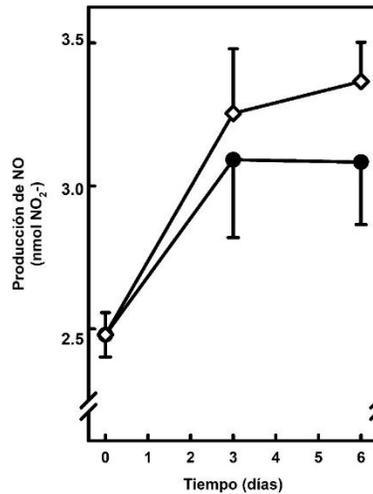


Figura 3.11 Efecto de la dieta adicionada con *S. bombicola*, los niveles del NO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. bombicola* (◇). Los niveles del NO fueron determinados a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

Con el propósito de evaluar el efecto que tiene la dieta donde se añade la levadura *C. versatilis*, sobre los niveles de NO, en abejas melíferas; en la figura 3.12 se puede observar que, durante los primeros tres días las abejas que fueron alimentadas con la dieta base, tienen una mayor actividad enzimática que la dieta con la levadura. Pero después del día tres, se puede apreciar una mayor producción de esta molécula a partir de la dieta modificada con respecto al control. Y en base a la prueba estadística de ANOVA, que compara las medias de la población para determinar una diferencia significativa entre ellas; se encontró que al observar el efecto de las dietas sobre el sistema inmune de *A. mellifera*, no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.859$).

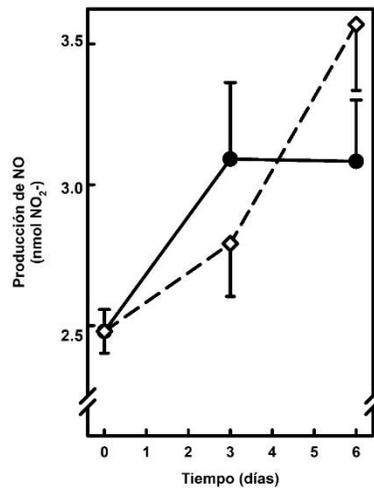


Figura 3.12 Efecto de la dieta adicionada con *C. versatilis*, en los niveles del NO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *C. versatilis* (◇). Los niveles del NO fueron determinados a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

Por lo que se refiere al diseño de la dieta modificada con *C. apícola* y la dieta base (Figura 3.13), se advierte que la producción del NO en las abejas alimentadas con la levadura, tiene un patrón similar a lo que registra la producción de los sujetos control durante los primeros tres días; pero en el día seis, parece disminuir este marcador por debajo del nivel de producción que tienen las abejas alimentadas con la dieta base. Y de acuerdo a la prueba estadística, no se encontró diferencias significativas entre estos ensayos ($p = 0.494$).

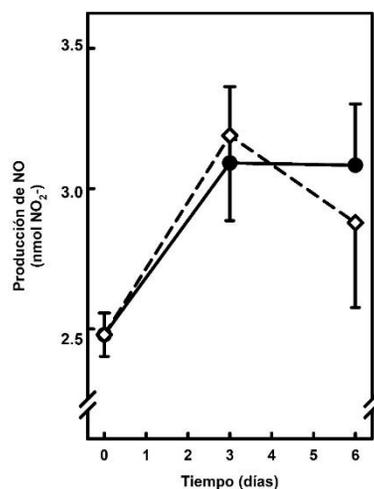


Figura 3.13 Efecto de la dieta adicionada con *C. apícola*, en los niveles de NO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base

suplementada con *C. apícola* (◇). Los niveles del NO fueron determinados a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En cuanto al uso de *Z. mellis* en las dieta modificadas (Figura 3.14), se observa que la producción del NO, en las abejas alimentadas con esta levadura, tiene una similar tendencia a lo que registra la producción de los sujetos control; y esto se confirmó con el resultado obtenido a partir de la prueba de ANOVA, donde no se encontró diferencias significativas entre estos ensayos ($p = 0.998$).

En la figura 3.15, se indica cual es la tendencia de producción del NO, cuando se utiliza una dieta adicionada con la levadura *S. cerevisiae*. En este diagrama, se percibe que a lo largo del tiempo presenta una tendencia al aumento de la producción de esta molécula, sin embargo esta tendencia no es mayor en comparación la producción encontrada en las abejas alimentadas con la dieta base; aunado a lo anterior, la prueba de ANOVA, no arrojó una diferencia significativa entre estos conjuntos ($p = 0.121$).

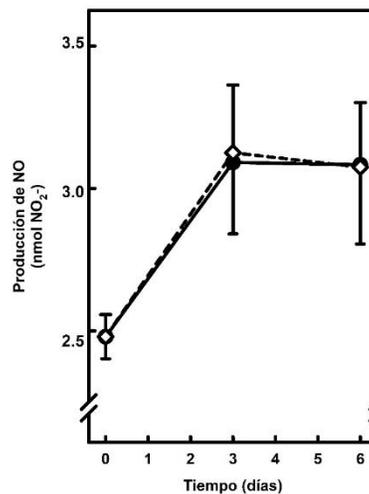


Figura 3.14 Efecto de la dieta adicionada con *Z. mellis*, en los niveles de NO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *Z. mellis* (◇). Los niveles del NO fueron determinados a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

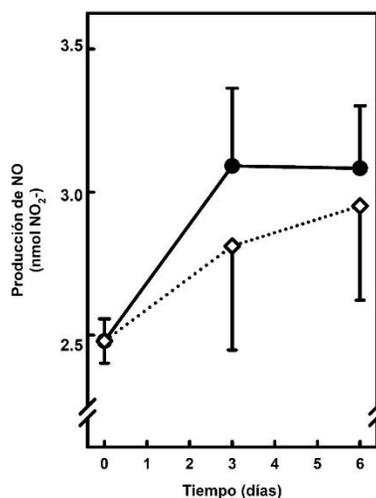


Figura 3.15 Efecto de la dieta adicionada con *S. cerevisiae*, en los niveles del NO. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera*, fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. cerevisiae* (◇). Los niveles del NO fueron determinados a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

3.3.4 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN LA ACTIVIDAD DE LA GOX, EN ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE *A. mellifera*.

La abeja *A. mellifera*, secreta la enzima GOX, a través de los alimentos de cría de sus colonias y las reservas de miel, proporcionando así una inmunidad social a sus compañeras de la colmena (Alaux *et al.*, 2010; Bucekova *et al.*, 2014; Sano *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; White *et al.*, 1963). En este estudio se presentan los resultados acerca del efecto de la nutrición sobre la actividad enzimática de la GOX, en abejas recién emergidas sujetas a dietas adicionadas con levaduras.

En la figura 3.16, se presenta el efecto que tiene la dieta base en comparación con la dieta donde se añade la levadura *S. bombicola*, sobre la actividad específica de la enzima GOX, en abejas melíferas. En esta figura se puede observar que las abejas alimentadas con *S. bombicola*, no hay un efecto significativo ($p = 0.1713$). A lo largo del tiempo, se observa como la dieta base tiene un descenso en el día seis, mientras que la dieta suplementada con la levadura, evidencia un aumento en el día tres.

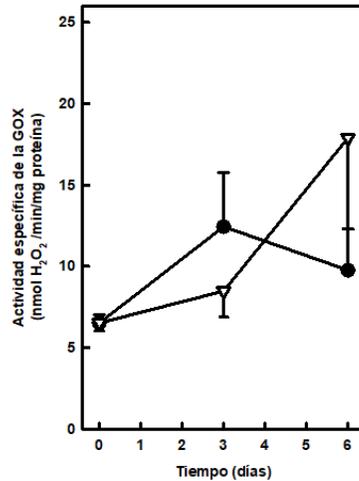


Figura 3.16 Efecto de la dieta adicionada con *S. bombicola*, en la actividad de la GOX. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. bombicola* (▽). La actividad específica de la GOX fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

Con el uso de la levadura de *C. versatilis* en dietas modificadas para su uso en el modelo de *A. mellifera*, se observa que hay una ligera diferencia de este tratamiento ($p = 0.0656$), con lo que respecta a la actividad específica de la proteína GOX observada en la dieta base (Figura 3.17). En el transcurso de los días de experimentación, se percibe que las abejas que fueron alimentadas con la levadura, presentan una mayor actividad enzimática con respecto al control en el día seis.

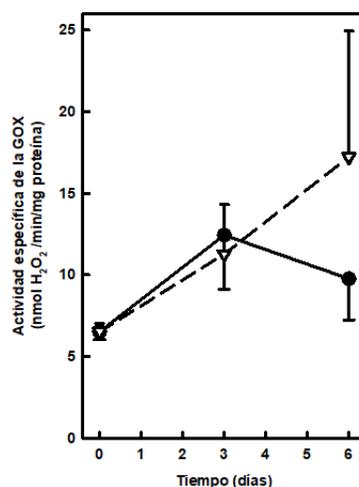


Figura 3.17 Efecto de la dieta adicionada con *C. versatilis*, en la actividad de la GOX. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base

suplementada con *C. versatilis* (▽). La actividad específica de la GOX fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En las muestras donde se utilizó la levadura *C. apícola*, en dietas modificadas para la alimentación de *A. mellifera* (Figura 3.18), se registró una actividad enzimática menor durante los tres primeros días con respecto al conjunto de abejas que fue alimentado con la dieta base, sin embargo en el día seis se observa una mayor actividad a lo observado en las abejas alimentadas con la dieta base. Este experimento refleja un leve efecto sobre la actividad de la enzima GOX ($p = 0.0592$).

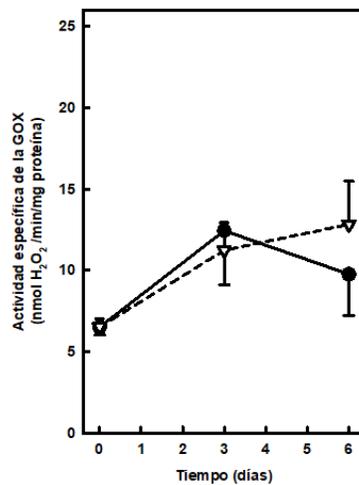


Figura 3.18 Efecto de la dieta adicionada con *C. apícola*, en la actividad de la GOX. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *C. apícola* (▽). La actividad específica de la GOX fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

En cuanto al uso de la levadura *Z. mellis*, es posible observar que la tendencia de la actividad enzimática de la GOX aumenta a partir del día 3, y a su vez presenta una mayor actividad a lo observado en las abejas alimentadas con la dieta base en el día seis (Figura 3.19). Al analizar estos efectos, no es posible sugerir si existe un efecto significativo sobre el indicador ($p = 0.0838$).

En la figura 3.20, se indica cual es la tendencia de la actividad específica de la GOX, cuando se utiliza una dieta adicionada con la levadura *S. cerevisiae*. En esta figura, se percibe que a lo largo del tiempo presenta una tendencia al aumento de la actividad

catalítica, esta tendencia es aún mayor en el día seis, en comparación con los resultados encontrados en las abejas alimentadas con la dieta base; a su vez, no se encontró un efecto significativo entre estos conjuntos ($p= 0.1887$).

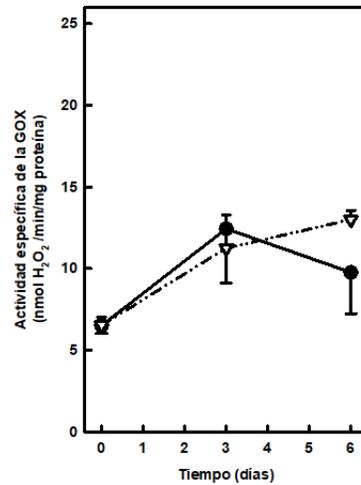


Figura 3.19 Efecto de la dieta adicionada con *Z. mellis*, en la actividad de la GOX. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *z. mellis* (▽). La actividad específica de la GOX fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

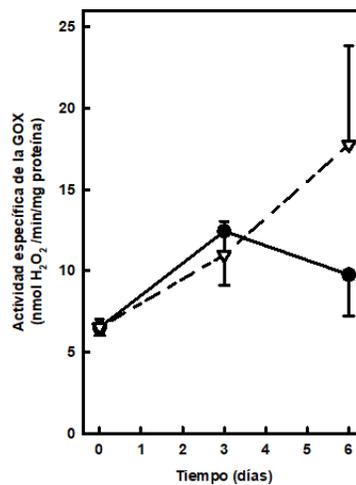


Figura 3.20 Efecto de la dieta adicionada con *S. cerevisiae*, en la actividad de la GOX. Las abejas recién emergidas de *A. mellifera* fueron alimentadas con la dieta base (●) y con la dieta base suplementada con *S. cerevisiae* (▽). La actividad específica de la GOX fue determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones \pm ES.

3.3.5 EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LEVADURAS EN EL PERFIL PROTEICO, DE ABEJAS RECIÉN EMERGIDAS DE *A. mellifera*.

Se realizó un perfil proteico de los extractos totales provenientes de la homogenización del tejido de cabeza (Figura 3.21), de abejas que fueron alimentadas con una dieta base y con dietas modificadas en contenido de levadura. Se puede observar una gran cantidad de proteínas, donde se encontró algunos cambios entre las abejas alimentadas con la dieta base (carril 1), en comparación con los extractos de las abejas alimentadas con levaduras (carriles 2, 3, 4, 5 y 6).

En el perfil proteico (Figura 3.21) se puede observar que los extractos totales obtenidos de las abejas alimentadas con la dieta que contiene *C. versatilis* (carril 3) y con la levadura *C. apícola* (carril 4), presentan un incremento en la intensidad de las bandas proteicas, en contraste con los extractos de la dieta base (carril 1), esta presencia de bandas de mayor intensidad se encuentran entre los pesos moleculares de 116 hasta 66 KDa. En las bandas del carril 6, que corresponde a los extractos de las abejas alimentadas con la dieta que contiene la levadura *S. cerevisiae*, se nota que desaparecen bandas que tienen una menor masa molecular.

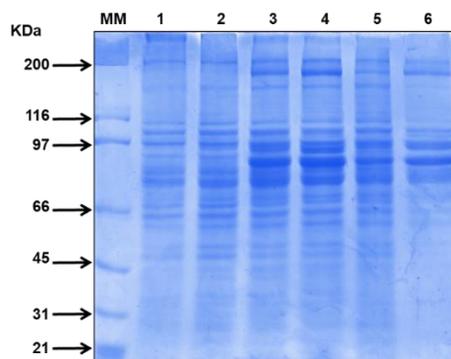


Figura 3.21 Análisis obtenido del extracto total de cabeza de *A. mellifera*. Se utilizó un SDS-PAGE al 12%. En cada carril se utilizaron 10 μ g de proteína total. Carriles: Marcador molecular (MM); 1. Dieta base; 2. Dieta adicionada con *S. bombicola*; 3. Dieta adicionada con *C. versatilis*; y 4. Dieta adicionada con *C. apícola*; 5. Dieta adicionada con *Z. melis*; 6. Dieta adicionada con *S. cerevisiae*.

Al analizar el perfil proteico correspondiente a las muestras obtenidas de tejido abdominal (Figura 3.22), se observa que en el carril 1, es posible notar como las bandas que tienen un menor peso molecular, no se logran del todo observar en este perfil. Por otro lado, en las muestras obtenidas de abejas alimentadas con las levaduras *S. bombicola* (carril 2), *Z.*

mellis (carril 5) y *S. cerevisiae*, (carril 6), existe una intensidad de bandas bastante notoria a lo largo del perfil, de cada una de estas muestras.

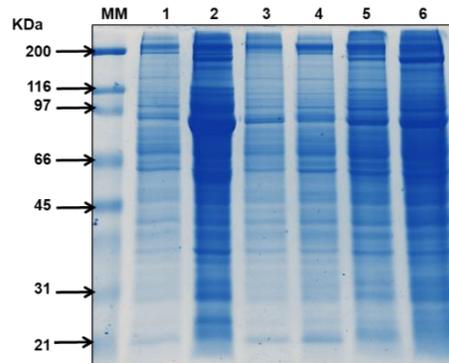


Figura 3.22 Análisis obtenido del extracto total de abdomen de *A. mellifera*. Se utilizó un SDS-PAGE al 12%. En cada carril se utilizaron ~10 µg de proteína total. Carriles: Marcador molecular (MM); 1. Dieta base; 2. Dieta adicionada con *S. bombicola*; 3. Dieta adicionada con *C. versatilis*; y 4. Dieta adicionada con *C. apicola*; 5. Dieta adicionada con *Z. melis*; 6. Dieta adicionada con *S. cerevisiae*.

3.3 DISCUSIÓN

En los últimos años, ha existido un interés creciente por el estudio y conservación de las colonias de *A. mellifera*. Algunas interrogantes, han sido orientadas a la participación que tiene la nutrición en la capacidad de defensa de estos organismos ante las amenazas que le acechan. Este trabajo incorporó diferentes elementos, que son las distintas levaduras utilizadas, en la dieta de las abejas obreras, para observar las respuestas inmunitarias y establecer una relación entre la nutrición y el sistema de defensa de este modelo.

La enzima PO y el zimógeno proPO, juegan un papel importante en la inmunidad de los insectos, ya que participan en varias de sus funciones fisiológicas, por lo que su utilización debe de estar bien regulada, no debe existir una activación descontrolada de la proPO; ya que durante el proceso de melanogénesis, que es donde participa la PO, se producen muchas moléculas tóxicas, lo cual, podría ser letal para los insectos (Lu *et al.*, 2014). En los insectos, el NO se produce como una molécula efectora en la respuesta inmune, provocada por la infección microbiana en varias especies, esta funciona como una molécula de señalización y un componente citotóxico. Por lo tanto, el NO se ha propuesto como una molécula clave para hacer frente a los parásitos en invertebrados (Rivero, 2006). La enzima GOX, tiene funciones importantes de defensa social, para el equilibrio y mantenimiento de la colonia (Alaux *et al.*, 2010).

En este estudio, las abejas obreras fueron alimentadas con las seis dietas modificadas (Cuadro 3.2) pero no se observó un efecto sobre la actividad enzimática de la PO, la proPO y la GOX, así como tampoco de la producción de NO. las actividades enzimáticas encontradas en esta investigación, se pueden comparar con lo reportado por Alaux *et al.*,(2010), Degrandi-Hoffman *et al.*,(2010), Brodschneider y Crailsheim (2010) y Di Pasquale *et al.*,(2013), ya que estos autores refieren que la calidad nutricional y la diversidad de la composición del polen pueden dar como resultado una mejora a la salud de las abejas, y su vez un aumento en la actividad enzimática en el sistema de defensa, lo que se define como un efecto positivo.

Hay evidencia que sostiene que, los valores de la PO solamente pueden aumentar cuando se requiera para la melanización de la cutícula del insecto (Chmurzynska y Wojtczak, 1963, Hopkins y Kramer, 1992). Por otro lado, Alaux *et al.*, (2010) refieren que la actividad GOX, que no proporciona una protección inmunológica a la abeja en sí misma pero permite la prevención de enfermedades infecciosas en la colonia, puede ser afectada por la introducción de dietas modificadas a su alimentación, lo que sugiere que las abejas invierten más recursos en la inmunidad social que en la individual.

En cuanto de la dieta base suplementada con la levadura *S. bombicola*, se observó el efecto de este tratamiento sobre la actividad de la PO (Figura 3.1), de la proPO (Figura 3.6) y de la GOX (Figura 3.16), se pudo valorar que no hay una diferencia significativa. Esto puede indicar que se da lugar una respuesta de este organismo al sistema de alimentación al que se encuentra sometido, pero en el caso del tratamiento con *S. bombicola* administrado a las abejas, la respuesta es menor en comparación al efecto que tiene la dieta base sobre la actividad de la PO y la proPO a lo largo de los días. La actividad de la enzima GOX muestra en el último día, un repunte de producción de moles de H₂O₂. Esto puede aludir al tiempo como una determinante dentro de la relación nutrición y sistema inmune.

Laughton *et al.* (2011), refieren que la variación en la actividad inmune se asocia con diferentes fases del desarrollo de la abeja melífera. Ya que los hallazgos de la actividad de PO (Figura 3.1) y la GOX (Figura 3.16), sugieren que en ciertas etapas de la vida, su uso no puede relacionarse directamente con la respuesta inmune, sino que puede estar

relacionado con procesos fisiológicos alternativos relacionados con el crecimiento y el desarrollo.

Se ha demostrado que al usar microorganismos simbiotes, como fuente de alimento para los insectos del orden de los himenópteros, ha desencadenado una respuesta de melanización, en el píloro de la abeja, lo que sugiere la activación del sistema inmune (Engel *et al.*, 2015). Aunque no se observan efectos sobre los marcadores del sistema de defensa, se sugiere que el efecto de las levaduras puede estar en otro sistema fisiológico de la abeja.

El estudio de Laughton *et al.*, (2011), encontró que las abejas en estado larvario tienen niveles bajos de actividad de PO, mientras que las abejas adultas produjeron respuestas inmunitarias más fuertes que los zangános y una mayor plasticidad en la inversión inmune. Las diferentes castas y etapas fisiológicas de *A mellifera*, alteran el manejo de su sistema inmunitario basándose en los factores combinados de riesgo de enfermedad y de historia de vida. Por lo que Laughton *et al.*, (2011), proponen que el costo energético de esta respuesta prohíbe su mantenimiento constante.

Al analizar la producción del NO, en las abejas alimentadas con una dieta que contiene la levadura *S. bombicola* (Figura 3.11), se distingue que la producción de esta molécula aumenta al transcurrir el tiempo de experimentación, si se compara con la producción que tienen las abejas alimentadas con una dieta base, inclusive en el día seis parece tener un mayor nivel de producción que el control. A pesar de esta tendencia, los resultados presentados no son estadísticamente diferentes.

Las abejas que fueron alimentadas con la dieta que contenía la levadura *C. versatilis*, no revelan tener una diferencia en la actividad enzimática de la proteína PO (Figura 3.2) y la proPO (Figura 3.7), con respecto a los individuos alimentados con la dieta base. El efecto de estos tratamientos muestra una disminución en la actividad de ambos marcadores de respuesta inmune, por lo tanto se sugiere que no hay un efecto positivo en el sistema inmune de estos organismos. Por otra parte, los niveles de NO, que se evaluaron después que los organismos fueron alimentados con esta dieta (Figura 3.12), aumentan con el paso del tiempo, ya que la producción tiene un perfil de aumentar a lo largo de todo el

tiempo de alimentación; sin embargo, como en el caso anterior no se encontró diferencia significativa.

La actividad de la GOX (Figura 3.17), por su parte muestra una ligera diferencia con respecto a la dieta base, en particular sobre el día seis, donde es pronunciada la diferencia en producción de moles de H_2O_2 .

Las comunidades microbianas específicas (microbiota), que colonizan los huéspedes animales son de naturaleza omnipresente y, pueden desempeñar funciones importantes, como las funciones digestivas, la defensa inmune y la formación de órganos (Fraune y Bosch 2010). Para el tratamiento donde se utilizó la levadura *C. apícola*, de acuerdo al tiempo en el que fue observado el efecto en la actividad de la PO (Figura 3.3) y la proPO (Figura 3.8), se evidencia que no hay una diferencia importante durante el ensayo, ya que la actividad de ade la dieta base. Cuando este sistema se examina, observando los niveles de NO (Figura 3.13), permite establecer que no hay diferencia entre el efecto que tiene la dieta con la levadura *C. apícola* y la dieta base, en las abejas recién emergidas de las ya alimentadas.

Por otro lado, cuando se examinó la enzima GOX (Figura 3.18), como el marcador del sistema de defensa social, se observó que el uso de la levadura *C. apícola*, presenta una ligera diferencia con respecto a la dieta base, presentando un aumento a lo largo de los días de experimentación.

El uso de la levadura *Z. mellis* en la alimentación de *A. mellifera*, no refleja un efecto positivo en los marcadores del sistema de defensa, como la proteína PO (Figura 3.4), el zimógeno proPO (Figura 3.9), la producción de NO (Figura 3.14) y la enzima GOX (Figura 3.19). El uso de esta levadura, se basa en la secuenciación del metagenoma intestinal de la abeja melífera, lo que reveló la existencia de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*, tales como *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* como parte del microbioma (Cornman *et al.*, 2012). Lo que sugiere que la capacidad protectora de un trasplante de microbioma, puede tener un efecto protector sobre el sistema de defensa de este insecto (Raymann, y Moran, 2018), que en el caso de este estudio no ocurrió.

La levadura *S. cerevisiae*, es empleada por el sector apícola a lo largo del mundo, ya que mejora la palatabilidad, y en consecuencia, evita que las abejas rechacen la alimentación artificial (SAGARPA, 2004). La respuesta de este modelo a la adición de la dieta base con *S. cerevisiae* (Figura 3.5), refleja que hay un efecto positivo, con un ligero aumento sobre la actividad de PO. De acuerdo a la prueba estadística, este tratamiento resulta estadísticamente significativo, por lo que se sugiere que existe un efecto sobre el sistema de defensa de la abeja. En relación al efecto que tiene esta dieta suplementada con la levadura, sobre la actividad de la proPO (Figura 3.10), la producción del NO (Figura 3.15) y la actividad de la GOX (Figura 3.20), no se percibe un efecto evidente para sugerir que exista una diferencia significativa en estos marcadores bioquímicos.

Se ha señalado que la microbiota del intestino de la abeja melífera es distinta de otros insectos, ya que depende en gran medida de los factores ambientales en los que se encuentra inmersa (Yun *et al.*, 2012). Las comunidades intestinales fúngicas de la mayoría de las abejas obreras son altamente dominadas por el género *Saccharomyces* (Yun *et al.*, 2018). Lo que sugiere que el uso de *S. cerevisiae* como alimento, tiene un efecto homeostático, que podría ser de gran importancia para funciones biológicas de estos organismos, tales como la defensa contra patógenos naturales (Koch y Schmid-Hempel 2011; Lazzaro y Rolff, 2011). También, existen estudios, donde se ha informado que las levaduras asociadas a insectos, tales como *Saccharomyces* y *Candida*, desempeñan un papel en la digestión de sustratos por enzimas secretadas (tales como β -glucosidasas, xilasas y celulasas) y en la desintoxicación de metabolitos tóxicos en el insecto (Vega y Dowd, 2005).

En la investigación de Alaux *et al.*, (2010), donde se utilizó a las abejas melíferas sin un reto inmunológico, se observó que el efecto de las dietas modificadas en el contenido de proteínas, sobre el marcador bioquímico del sistema inmune individual (PO) de *A. mellifera*, es leve pero significativo. Es por ello que, estos autores sugieren que es importante observar estos efectos en presencia de un patógeno, para conocer si la activación de la vía de la serina proteasas, daría lugar a al proceso mediado por las enzimas abordadas en este estudio.

La abeja *A. mellifera*, es un modelo particularmente útil, con una comunidad microbiana intestinal adaptada al hospedador. La microbiota intestinal puede ser particularmente

relevante para proteger a las abejas de los patógenos que se sabe colonizan e invaden el intestino, y para mejorar la disponibilidad de nutrimentos (Yun *et al.*, 2018). La activación del sistema inmune innato, es una ruta a través de la cual la microbiota intestinal podría afectar la susceptibilidad del huésped a los patógenos o parásitos (Schwarz *et al.*, 2015). Los experimentos con *Frischella perrara* indican que, al menos esta bacteria, induce la melanización en la región del píloro del intestino de las abejas (Engel *et al.*, 2015). La melanización es una respuesta inmune innata de los insectos que se asocia típicamente con el daño tisular y la invasión de un patógeno (Yun *et al.*, 2018).

Los resultados de GOX, en cuanto al uso de dietas modificadas con el contenido de levadura, todas coinciden en el aumento a lo largo de los días, esto es posible explicar con lo reportado por Bucekova *et al.*, (2014) y Traver *et al.*, (2018), donde refieren que la actividad de GOX parece aumentar progresivamente en las glándulas hipofaríngeas con la edad de las abejas obreras, alcanzando los niveles más altos en abejas que son responsables del procesamiento del néctar en la miel. Con lo que se sugiere, que la ontogenia esta relacionada con el sistema de defensa de la abeja (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

El consumo de una dieta modificada artificialmente es un aspecto importante para la salud general de las abejas (Haydak 1970, Brodschneider y Crailsheim 2010), especialmente cuando las abejas están infectadas con patógenos. Las investigaciones de Di Pasquale *et al.*, (2013) y de Alaux *et al.*, (2010) encontraron que una dieta polifloral aumentaba la actividad GOX, lo que indica un vínculo entre la diversidad de proteínas en la dieta de una abeja, su inmunidad social y la actividad antiséptica en los alimentos de las colonias.

Por otro lado, Di Pasquale *et al.*, (2013), sometieron a las abejas obreras de *A. mellifera* a dietas modificadas en la calidad de proteína, utilizando el polen aislado de los géneros *Cistus*, *Erica*, *Castanea*, *Rubus* y la mezcla de todos los anteriores. A su vez utilizaron como patógeno al microsporidio *Nosema ceranae*, para establecer la relación entre las dietas modificadas y el efecto sobre el sistema inmune de abejas sanas e infectadas; ellos encontraron que si existe un aumento mayor en la actividad de la PO en abejas infectadas con respecto a las abejas sanas, pero la probabilidad de supervivencia fue menor en las abejas retadas con el microsporidio.

En el estudio de Janashia y Alaux (2016), se demostró que las bacterias endógenas pueden tener una función de refuerzo inmunitario en las abejas melíferas. Sin embargo, este papel parece ser específico para cada especie o cepa, esto también se observó en un proceso similar para las bacterias exógenas, descrito por Yoshiyama *et al.*, (2013). Todavía no se conocen los mecanismos subyacentes, pero es probable que el sistema inmune del insecto sea capaz de detectar estructuras moleculares particulares de microorganismos (ADN, componentes de la pared celular y metabolitos) y reaccione específicamente (Medzhitov, 2007). Esto coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que el uso de levaduras desencadenó tendencias particularmente distintas entre los niveles de la PO, la proPO y el NO. Lo que sugieren un reconocimiento y un efecto limitado de este tipo de alimentación sobre el sistema de defensa de *A. mellifera*.

La estimulación inmune no es extensa sino limitada en el uso de microorganismos relacionados al polen floral, como parte de una alimentación artificial (Janashia y Alaux, 2016). Tal respuesta selectiva, también ha sido encontrada durante la exposición a patógenos naturales o bacterias exógenas no patógenas (Evans y López 2004; Yoshiyama *et al.*, 2013), podría explicarse por el costo energético de desencadenar una respuesta inmune. De hecho, en los insectos, una respuesta inmune relativamente simple, como la encapsulación, puede aumentar la tasa metabólica hasta en un 28% (Freitag *et al.*, 2003; Ardia *et al.*, 2012).

Las abejas poseen un sistema de defensa que puede ser analizado desde varios aspectos; esto implica que estos insectos denominados sociales, poseen más de una línea de respuesta para la supervivencia y protección de sus comunidades. Las respuestas inmunitarias de *A. mellifera*, comprenden respuestas celulares que incluyen la coagulación, la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación, y el sistema de activación de la ProPO (Gillespie *et al.*, 1997). Estas respuestas inmunes están siempre presentes, aunque no se mantienen a niveles máximos (Siva-Jothy *et al.*, 2005, Cerenius *et al.*, 2008). Por lo que, la diferencia encontrada en los marcadores bioquímicos del sistema inmune, en las abejas alimentadas con dietas modificadas, puede representar un esfuerzo compensatorio por parte del sistema inmunológico una vez que se desencadena un reconocimiento y señalización por parte de las levaduras utilizadas en las dietas.

CAPITULO IV**DISCUSIÓN GENERAL**

El desarrollo y la supervivencia de las colonias de *A. mellifera*, están relacionados con la disponibilidad de los nutrimentos que les proporciona el medio ambiente (Brodschneider *et al.*, 2010), lo que sugiere que la alteración de los recursos que proveen de una alimentación adecuada, podría provocar una nutrición incompleta y, por lo tanto, afectar la salud de las poblaciones de abejas melíferas (Naug, 2009). Una de las consecuencias de la insuficiente nutrición, es el aumento en la mortalidad de este modelo (Keller *et al.*, 2005), ya que es probable que la salud deficiente de estos individuos, podría afectar al sistema de defensa, cuando se encuentran ante la amenaza de patógenos o pesticidas (Le Conte *et al.*, 2011).

Los resultados reportados en el capítulo II, acerca de las mediciones hechas en este estudio, indicaron que la absorbancia puede ser un parámetro confiable para estimar las actividades enzimáticas de la proPO y la PO, así como los niveles de NO y la cuantificación de proteína, ya que los resultados calculados con base en las curvas de calibración fueron similares en cada uno de los ensayos. La investigación realizada por Laughton y Siva-Jothy (2010), define las condiciones confiables para la medición de PO y proPO, así como el número de individuos para medir estos marcadores bioquímicos. Sin embargo en los resultados presentados en este trabajo, se puede apreciar que se logró tener mejores condiciones para las actividades antes mencionadas, con la optimización del tiempo; los recursos químicos, debido a la uniformidad de los volúmenes empleados; y los recursos biológicos, como el número de individuos a utilizar por ensayo; todo esto, en contraste a lo reportado por Laughton y Siva-Jothy (2010), Alaux *et al.*, (2010), Di Pasquale *et al.*, (2013), entre otros.

El efecto de diferentes dietas en la defensa social y sistema inmune de *A. mellifera*, fue evaluado en el capítulo III. Al observar las actividades enzimáticas de la PO es posible sugerir que el organismo reconoce a las levaduras, dentro de su alimentación y su posterior metabolismo. Aunque en un análisis general para conocer el efecto de los tratamientos en la respuesta inmune de las abejas, no se hallaron diferencias significativas. En un panorama general, se encontró que existe una mayor actividad del zimógeno proPO, si esta es comparada con la actividad de la enzima PO. Esto es posible

de explicar, tomando en cuenta que el nivel de la PO solo puede aumentar cuando sea necesario para el proceso de melanización de la cutícula del insecto (Chmurzynska y Wojtczak, 1963; Hopkins y Kramer, 1992), lo que indica que es un proceso altamente regulado.

En este estudio la producción de NO es menor si se compara con la actividad enzimática de la PO, debido a que el sistema inmune no está reconociendo ningún patrón de patógenos, por tanto las actividades percibidas, son menores a lo detectado por el sistema de la PO. Consecuentemente, se sugiere que la primera fase de la respuesta inmune no se activó debido a que hay una baja producción de NO. Estos resultados logran coincidir con los datos reportados por Negri *et al.*, (2014), donde revelan que el NO participa en la respuesta de curación y encapsulación de la herida, por su función de molécula señalizadora.

De acuerdo con Lourenço *et al.*, (2009), es probable que los recursos disponibles para la biosíntesis de proteínas de almacenamiento se redireccionan para sostener la demanda del sistema inmune, es decir, la producción de proteínas o péptidos inmunes. Por lo tanto, la especificidad de respuesta observada con bacterias endógenas, a nivel de cepa e inmunidad, puede funcionar de manera adaptativa para ahorrar energía y evitar o limitar los efectos perjudiciales sobre el huésped (Janashia y Alaux, 2016). Lo anterior, explica porque muchos de los tratamientos donde se adicionaron microorganismos simbiotes, tienen un menor nivel de PO, proPO y NO, con respecto a las abejas que fueron alimentadas con la dieta base, que no contenía levadura. Al comprometer el sistema de defensa de *A. mellifera* con un patógeno, es posible observar efectos significativos en la vía de señalización de la PO, con respecto al uso de alimentación modificada (Di Pasquale *et al.*, 2013; Alaux *et al.*, 2010).

Es probable que la activación de sistema de defensa mediado por la cascada de señalización de PO, esté estrechamente vinculado a la actividad de las abejas, que a su vez se asocia con la edad de desarrollo. Las abejas obreras adultas exhiben un polietismo de edad, una división temporal y dinámica del trabajo, con obreras más jóvenes (nodrizas) que permanecen dentro de la colmena; que se alimentan y tienden a desarrollar larvas, y limpian o acicalan (Robinson, 1992). A las dos o tres semanas de edad, las abejas

nodrizas, cambian de funciones dentro de la colmena, y salen para recolectar polen y néctar (Hooper, 1997).

La transición de abeja nodriza a forrajera se debe a cambios fisiológicos y de comportamiento (Robinson, 1992). Existe un aumento en la actividad de la PO en las recolectoras en comparación con las abejas nodrizas (Wilson-Rich *et al.*, 2008). En este estudio las abejas llegaron a la edad de seis días, con lo que son consideradas nodrizas, por lo que no están invirtiendo en el sistema inmune individual, sino en un sistema de defensa social, que se desarrolla dentro de la colmena.

Por otro lado, la enzima GOX, muestra una tendencia positiva, al aumentar la actividad específica con respecto a los días en los que fue observado el efecto de las dietas suplementadas con levaduras simbiotas.

Esta tendencia tiene una relación estrecha con la ontogenia del insecto, que a su vez está conectado con el efecto que tiene la dieta sobre la inmunocompetencia del insecto (Hu *et al.*, 2018). Se ha estudiado que en el modelo de *Helicoverpa armigera* existe un aumento de la actividad de la GOX, en las glándulas salivales de las larvas que son alimentadas con una dieta artificial con respecto a una dieta natural. A lo largo del desarrollo larvario, las actividades de la GOX detectadas en las orugas criadas con la dieta artificial, fueron notablemente más altas que las alimentadas con la planta. Por lo que el aumento de la GOX se correlacionó estrechamente con el tiempo empleado, para la alimentación del insecto con la dieta artificial (Hu *et al.*, 2018).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

- Se obtuvieron todas las condiciones bioquímicas necesarias para la medición de los marcadores de inmunocompetencia.
- La actividad específica de la enzima PO, en las abejas melíferas alimentadas con dietas suplementadas con levaduras simbiotes, no difirió de las abejas alimentadas con la dieta base.
- El uso de levaduras simbiotes dentro de la alimentación las abejas, no mostró un efecto significativo en la actividad enzimática de la GOX.
- Aunque el efecto de la alimentación con levaduras en los marcadores bioquímicos, medidos en este estudio no resultaron significativos, existe una tendencia favorable que pudiera significar un efecto bajo otro contexto de experimentación

5.2 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación representan una oportunidad, para comprender el papel de la alimentación en el comportamiento del sistema de defensa. El uso de levaduras simbiotas y aceites esenciales es un enfoque prometedor para mejorar la salud de las abejas. Por lo que, se proponen las siguientes perspectivas:

- Incrementar el número de individuos para un futuro diseño experimental.
- Evaluar los niveles de la inmunodetección de la proteína proPO, la proteína PO y la GOX.
- Evaluar los niveles de expresión de los genes de PO y GOX.
- Evaluar el efecto de las dietas modificadas sobre el sistema de defensa de *A. mellifera*, con la presencia de un patógeno.
- En futuros experimentos, tener en cuenta el costo de activar el sistema inmune, a través de la medición de los cuerpos grasos.

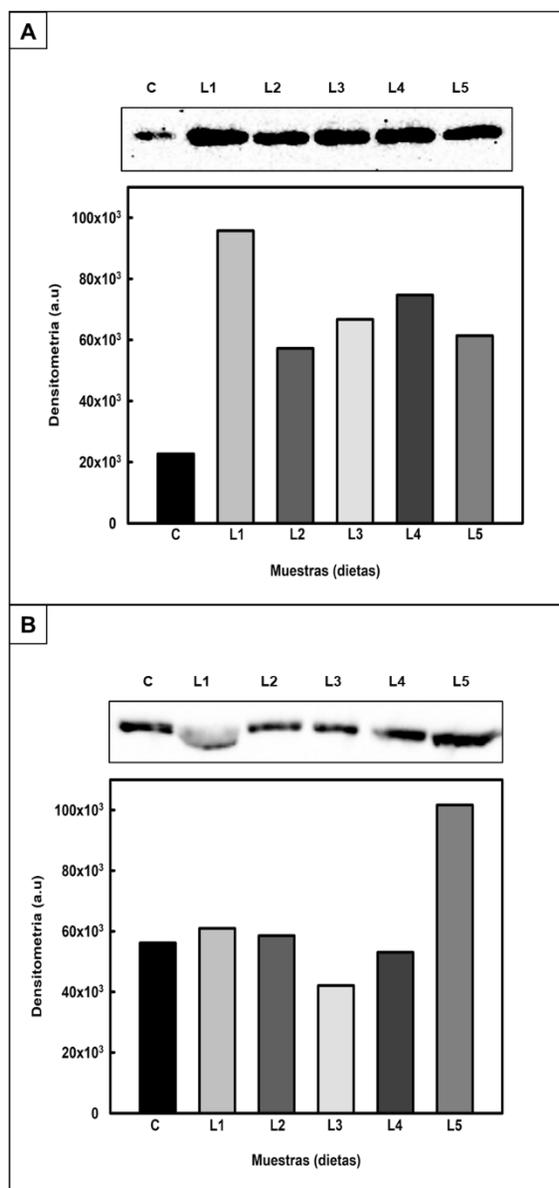
ANEXOS**ANEXO I. Inmunodetección de la proteína HSP70**

Se utilizó el sistema de mini geles de BioRad, con geles de 1 mm de espesor con dos fases. Como se menciona en el capítulo II, de esta tesis. Pero con la modificación en el contenido de proteína. Se determinó el uso de 40 µg de proteína de cada uno de los extractos totales de la muestra de tejido de abdomen y de cabeza

El análisis de transferencia Western por quimioluminiscencia. Para la inmunodetección se utilizó el anticuerpo primario que reacciona de forma cruzada con *Drosophila melanogaster* de HSP70 (Sigma-Aldrich, sab4700714; 1: 5000). El anticuerpo secundario consiste en un policlonal anti-ratón de la peroxidasa (Sigma-Aldrich, 1: 5000). Los anticuerpos unidos se visualizaron utilizando el reactivo de detección de quimioluminiscencia ELC™ WesternBlot (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Las bandas se revelaron utilizando un sistema de imágenes por el equipo BIO-RAD ChemiDoc™. Por ultimo, se obtuvo la cuantificación de cada westernblot utilizando el software con el software ImageJ 1.6.

ANEXO II

Análisis de transferencia de Western de HSP70 contiene cantidades equivalentes de proteína (40 μg) del tejido del abdomen representativo de seis muestras de tejido de cabeza (A), y abdomen (B). **C** = Dieta Básica (DB), las graficas de barras consisten en la cuantificación utilizando el software ImageJ. **L1**= DB + *Starmarella bombicola*; **L2** = DB + *Candida versatilis*; **L3** = DB + *Candida apícola*; **L4** = DB + *Zygosaccharomyces mellis*; **L5** = DB + *Saccharomyces cerevisiae*.



BIBLIOGRAFÍA

- AbuSara N.F. (2006) Honey as antimicrobial agent. Waikato Honey Research Unit, The University of Waikato, New Zealand.
- Alaux, C., C. Dantec, H. Parrinello, Y. Le Conte (2011) Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* 12, 496.
- Alaux, C., J. Brunet, L. Dussaubat, C. Mondet, F.Tchamitchan, S. Cousin, M. Brillard, J. Baldy, A. (2010) Nosema infection in the Drosophila lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol*, 243:65-80.
- Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6, 562–565.
- Anderson, L. M., y A. Dietz (1976). Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing. *Apidologie*, 7, 67-84.
- Ashida, M., y P.T. Brey (1997) Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P.T., Hultmarck, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman and Hall, London, 135–172.
- Berntsen, B. T., A. A. James y B. M. Christensen (2000) Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64,115-137.
- Bright H.J. y M. Appleby (1969) The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. *J Biol Chem* 244:3625–3634.
- Brodtschneider, R., y K. Crailsheim (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278-294.
- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Kludiny, J., y Majtan, J. (2014) Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101, 661-670.
- Caccavari, M. y G. Cilla (2010) Remoción química como nueva alternativa a la remoción mecánica para el estudio del polen transportado en las escopas de abejas silvestres. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 12, 25–262.
- Candy, D. J. (1979) Glucose oxidase and other enzymes of hydrogen peroxide metabolism from cuticle of *Schistocerca americana gregaria*. *Insect Biochemistry*, 9, 661-665.

-
- Cerenius L., B. Luel-Lee, y K. Söderhäll (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29, 263-271.
- Cerenius, L., y K. Söderhäll (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198, 116-126.
- Chase M.R., K. Raina, J. Bruno y M. Sugumaran (2000) Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 953–967.
- Christensen, V., C. J. Walters, y D. Pauly (2005) *Ecopath with Ecosim: a user's guide*. Fisheries Centre, University of British Columbia, Vancouver, 154.
- Corcionivoschi, N., D. Drinceanu, L. Stef, I. Luca, y C. Julean (2010) Probiotics-identification and ways of action. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6, 1.
- Coulthard C.E., R. Michaelis, W.F. Short y G. Sykes (1945) Notatin: an anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling and *Penicillium resticulosum*. *Biochemistry Journal* 39, 24–36.
- Cremer S., S. Armitage y S. Schmid - Hempel (2007) Social Immunity. *Current Biology*. 17: R693 – R702.
- Danneel, H. J., E. Rössner, A. Zeeck, y F. Giffhorn (1993) Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products. *The FEBS Journal*, 214, 795-802.
- Daquinag A.C., S. Nakamura, T. Takao y Y. Shimonishi (1995) Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92,2964-2968.
- Davies, S. A., y Dow, J. A. (2009) Modulation of epithelial innate immunity by autocrine production of nitric oxide. *General and comparative endocrinology*, 162, 113-121.
- De Grandi-Hoffman, G., Y. Chen, E. Huang, y M.H. Huang (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) *Journal Insect Physiology*, 56, 1184–1191.
- De Groot, A. P. (1953) *Protein and Amino Acid Requirements of the Honeybee (Apis Mellifica L.)* W. Junk.
- Di Pasquale, G., M. Salignon, Y. Le Conte, L.P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, S. Suchail, J.L. Brunet, y C. Alaux (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, e72016
-

-
- Dobbenie, D., M. Uyttendaele y J. Debevere (1995) Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. *Journal of Food Protection*, 58, 273-279.
- Douglas Bates, J. Chambers, P. Dalgaard, R. Gentleman, K. Hornik, R. Ihaka, T. Kalibera, M. Lawrence, F. Leisch, U. Ligges, T. Lumley, M. Maechler, M. Morgan, P. Murrell, M. Plummer, B. Ripley, D. Sarkar, D. Temple Lang, L. Tierney, S. Urbanek (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Dussaubat C., J. L. Brunet, M. Higes, J. K. Colbourne, J. López (2012) Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* en Honey *Apis mellifera*. *PLOS ONE*, 7, e37017
- Edlich W., G. Lorenz, H. Lyr, E. Nega y E.H. Pommer (1989) New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Eur J Plant Pathol* 95:53–62
- Eichenseer, H., M. C Mathews, J. L. Bi, J. B. Murphy, y G. W. Felton (1999) Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*? *Archives of insect biochemistry and physiology*, 42, 99.
- Eleftherianos, I., y C. Revenis (2011) Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of innate immunity*, 3, 28-33.
- Ellis, A. M., y G. W. Hayes (2009) An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*) *Journal of apicultural research*, 48, 215-216.
- Eremin A.N., M.V. Makarenko, L.A. Zhukovskaia y R.V. Mikhailova (2006) Isolation and characterization of extracellular glucose oxidase from *Penicillium adametzii* LF F-2044.1. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 42, 345–352.
- Evans J. K. y M. Spivak (2009) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103, S62 – S72.
- Evans, J. K., Y. P. Aronstein, C. Chen, J.-L. Hetru, H. Imler, M. Jiang, G. J. Kanost, Thompson, Z. Zou and D. Hultmark (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15, 645–656.
- Favila-Ruiz, G., J. G., Jiménez-Cortés, A., Córdoba-Aguilar-Salazar-Schettino, P. M., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Pérez-Torres, A., De Fuentes-Vicente, J. Vences-Blanco, M. Bucio-Torres, A. L. Flores-Villegas y M. Cabrera-Bravo (2018) Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) *Parasites & vectors*, 11, 434.
-

-
- Feldlaufer, M.F., E.W. Herbert Jr., J.A. Svoboda, M.J. Thompson, y W.R. Lusby (1985) Makisterone A: the major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*. 15, 597–600.
- Flores-Villegas AL, P.M. Salazar Schettino, A. Córdoba- Aguilar, A.E. Gutiérrez- Cabrera, G. E. Rojas-Wastavino, M.I. BuciO-Torres y M. Cabrera-Bravo (2015) Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bulletin of Entomological Research*. 105, 523-532.
- Galindo, G., y P. José (2016) Efecto del suplemento energético y proteico en la población de abejas (*Apis mellifera*) en épocas de escasez de floración e incidencia en la producción de miel (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja)
- Genta FA, R. S. Souza, E.S. Garcia y P. Azambuja (2010) Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. *Journal of Insect Physiology*. 56, 1253-1259.
- Gillespie J.P., M.R. Kanost y T. Trenczek (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42, 611–643.
- Gilliam, M. (1997) Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155, 1-10.
- Gilliam, M., D.W. Roubik, y B.J. Lorenz (1990) Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21, 89-97.
- Gismondo, M.R., L. Drago y A. Lombardi (1999) Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 287-292.
- González-Santoyo I. y A. Córdoba-Aguilar (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 1-16.
- Goodsell D.S. (2006) Glucose oxidase. Molecule of the month: PCSB Protein Data Bank.
- Güemes, R. F., C. Echazarreta, y R. Villanueva (2002) Condiciones de la Apicultura en Yucatán y del Mercado de sus Productos. Disponible en: www.miel.uqroo.mx/princip/ensayoyuc.htm
- Hatzinikolaou, D. G., O. C. Hansen, B. J. Macris, A. Tingey, D. Kekos, P. Goodenough, y P. Stougaard (1996) A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied microbiology and biotechnology*, 46, 371-381.
- Haydak, M.H. (1970) Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.*, 15, 143–156.
-

-
- Herbert Jr, E. W., y H. Shimanuki, (1978) Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9, 33-40.
- Herrera, C. M., C. de Vega, A. Canto y M. I. Pozo (2009) Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Hillyer, J. F., y Estévez-Lao, T. Y. (2010) Nitric oxide is an essential component of the hemocyte-mediated mosquito immune response against bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 141-149.
- Hooper, T., (1997) *Guide to Bees and Honey*. Marston House, Yeovil.
- Hoover, S.E.R., H.A. Higo y M.L. Winston (2006) Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *J. Comp. Physiol. B.* 176, 55–63
- Hrassnigg, N., y K. Crailsheim, (2005) Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*) *Apidologie*, 36, 255-277.
- Hu, Y. H., Leung, D. W., Kang, L., y Wang, C. Z. (2008) Diet factors responsible for the change of the glucose oxidase activity in labial salivary glands of *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 68, 113-121.
- Human, H., S.W. Nicolson, K. Strauss, C.W.W. Pirk y V. Dietemann (2007) Influence of pollen quality on ovarian development in honeybees *Apis mellifera scutellata*. *Journal Insect Physiology* 53, 649–655
- Hutchins, M., A. Evans, R. Garrison y N. Schlager (Eds.) (2003) *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. Canada: Thomson Gale.
- Imler J-L. y P. Bulet (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*, structures, activities and gene regulation. *Mech. Epithelial Defense*. 86,1-21.
- Invernizzi C. (2001) Resistencia a la enfermedad de cría yesificada por colonias *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae) *Iheringia. Série Zoologia*. 91,109-114.
- Jaenicke, E., y H. Decker (2003) Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochemical Journal*, 371, 515–523.
- James, R. R., y Xu, J. (2012) Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of invertebrate pathology*, 109, 175-182.
- Jiravanichpaisal P., B.L. Lee y K. Soderhall (2006) Cell mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*; 211,213-236.
-

-
- Kalisz, J., R. Szplet, J. Pasierbinski y A. Poniecki, (1997) Field-programmable-gate-array-based time-to-digital converter with 200-ps resolution. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 46, 51-55.
- Kamkaen, N., N., Mulsri y C. Treesak, (2007) Screening of some tropical vegetables for anti-tyrosinase activity. *Thail Pharm Health Sci J*, 2, 15-19.
- Kang S.O., K.S.Shin, Han Y.H., Youn H.D., Hah YC (1993) Purification and characterisation of an extracellular peroxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta* 116,158–164.
- Kanost, H., X. Jiang y Q. Yu (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198, 97–105.
- Keller I, P. Fluri, y A. Imdorf (2005) Pollen nutrition and colony development in honey bees, Part II. *Bee World* 86, 27-3
- Kim, W. K., W. Mauthe, G. Hausner, y G. R. Klassen (1990) Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany*, 68, 1898-1902.
- Kimber, S. (2014) Beekeeper's Notes January 2016 – An Illustrated Bee Year. The guildford-dragon. Disponible en: <http://www.guildford-dragon.com/2016/01/01/beekeepers-notes-january-16-a-photographic-look-through-the-year/>
- Korner, A., y J. Pawelek (1982) Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217, 1163-1165.
- Kriechbaum, M., H. J. Heilmann, F. J. Wientjes, M. Hahn, K. D. Jany, H. G Gassen y G. Alaeddinoglu (1989) Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *FEBS letters*, 255, 63-66.
- Kunert, K., y K. Crailsheim (1988) Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein content in emerging worker honeybees and their mortality. *Journal of Apicultural Research*, 27, 13-21.
- Kusai, K., I. SekuzuHagihara, B. Okunuki, K. Yamauchi y M. Nakai, (1960) Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochimica et biophysica acta*, 40, 555-557.
- Laughton, A. M., y M. T. Siva-Jothy, (2010) A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2, 140-149
-

-
- Laughton, A., Boots M., M., y M. T. Siva-Jothy (2011) The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of insect physiology*, 57, 1023-1032.
- Lavine, M.D. y M.R. Strand (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295–1309.
- Le Conte Y, Brunet J-L, McDonnell C, Dussaubat C, Alaux C (2011) Interactions between risk factors in honey bees. In: D. Sammataro J. Yoder. *Recent Investigations into the Problems with our Honey Bee Pollinators*. Taylor & Francis Inc.8, 215-222.
- Leiter E., F. Marx, T. Pusztahelyi, H. Haas y I. Pocsi (2004) *Penicillium chrysogenum* glucose oxidase—a study on its antifungal effects. *J Appl Microbiol* 97,1201–1209.
- Lindberg, Ch.M., A.P.Melathopoulos, y M.L. Winston (2000) Laboratory Evaluation of Miticides to Control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Parasite. *Journal of Economic Entomology* 93,189-198.
- Liu S., S. Oeljeklaus, B. Gerhardt y B. Tudzynski (1998) Purification and characterization of glucose oxidase of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*. 53,123–132.
- Lizama, B. (2011) Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, pp. 77
- Lochmiller, R. L. y C. Deerenberg (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88, 87-98.
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y. X. y Ling, E. (2014) Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology*, 5, 252.
- Magnuson J.K. y L.L. Lasure (2004) Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz J, Lange L (eds) *Advances in fungal bio/technology for industry, agriculture and medicine*. Springer, Berlin, 9, 307–340.
- Mason, H. S., W. L. Fowlks, y E. Peterson (1955) Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex¹. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 2914-2915.
- Mason, H.S. (1965) Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* 16, 105–184.
- Medina, R. G., Paxton, R. J., De Luna, E., Fleites-Ayil, F. A., Medina, L. A. M., y Quezada-Euán, J. J. G. (2018) Developmental stability, age at onset of foraging and

-
- longevity of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) under heat stress (Hymenoptera: Apidae) *Journal of Thermal Biology*. 2, 140-149.
- Merkx-Jacques M, Bede JC (2004) Caterpillar salivary enzymes: “eliciting” a response. *Phytoprotection* 85,33–37.
- Merkx-Jacques M, Bede JC (2005) Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *J Insect Sci* 5,1–9
- Montero, A., A. Martos, y J. Chura (2012) Dietas artificiales en la crianza de la abeja melífera, *Api mellifera* L. In *Anales Científicos*,8, 1-5.
- Müller, H. J. (1928) The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability, and its dependence upon temperature. *Genetics*, 13, 279-357.
- Murray FR, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Dennis ES (1997) Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterisation of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Curr Genet* 32,367–375.
- Musser R.O., S. M. Hum-Musser, H. Eichenseer, M. Peiffer, G. Ervin, J. B. Murphy y G.W. Felton (2002) Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* 416,599–600
- Napolitano, R., R. Janel-Bintz, J. Wagner, y R. P. P. Fuchs (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *The EMBO Journal*, 19, 6259-6265.
- Nappi, A. J., y B. M. Christensen (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35, 443-459.
- Nappi, A. J., y E. Vass, (2001) Cytotoxic reactions associated with insect immunity. In *Phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system*.pp. 329-348. Springer US.
- Nappi, A. J., y E. Vass. (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 6, 117-126.
- Naug D. (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol Conserv* 142: 2369-2372.
- Nicolson, S. W., y H. Human (2008) Bees get a head start on honey production. *Biology Letters*, 4, 299-301.
-

-
- Ohashi K, S. Natori y T. Kubo (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.) *Eur J Biochem* 265,127–133.
- Ojar, C. (2002) Africanized Honey bee. Introduced Species Summary Project. Columbia University. Disponible en: http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoffburg/invasion_bio/inv_spp_summ/Apis_mellifera_scutellata.htm
- Olofsson, T.C. y A. Vásquez (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology* 57, 356-363.
- Pătruică, S. y D. Mot, (2012) The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal microflora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*) *Bulletin of Entomological Research* 102,619-623.
- Pinto, L.Z., K., Hartfelder, M.M. Bitondi y Z.L. Simoes (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* 48, 783–790.
- Pirk, C. W., C. Boodhoo, H. Human y S. W. Nicolson. (2010) The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*) *Apidologie*, 41, 62-72.
- Pluschkell, S., K. Hellmuth, y U. Rinas (1996) Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 215-220.
- Ponton, F., K. Wilson, A. J. Holmes, S. C. Cotter, D. Raubenheimer y S. J. Simpson, (2013) Integrating nutrition and immunology: A new frontier. *J. Insect Physiol.*, 59, 130–137.
- Prost J. P. (2001) *Apicultura, Conocimiento de la abeja, Manejo de la colmena*. Editorial Mundi-Prensa. 3era edición.
- Pulci V, D'Ovidio R, Petruccioli M, Federici F (2004) The glucose oxidase of *Penicillium variable* P16: gene cloning, sequencing and expression. *Lett Appl Microbiol* 38, 233–238.
- Ramasamy, K., R. L. Kelley, y C. A. Reddy (1985) Lack of lignin degradation by glucose oxidase-negative mutants of *Phanerochaetechrysosporium*. *Biochemical and biophysical research communications*, 131, 436-441.

-
- Rando D., G.W. Kohring y F. Giffhorn (1997) Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Appl Microbiol Biot* 48,34-40.
- Rivero, A. (2006) Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in parasitology*, 22, 219-225.
- Robinson, G.E. (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 20, 329–338
- Rosa, C. A., M. A. Lachance, J. O. Silva, A. C. P. Teixeira, M. M. Marini, Y. Antonini, y R. P. Martins, (2003) Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4, 271-275.
- Rosa, C.A., E.M. Viana, R.P. Martins, Y. Antonini, y M.A. Lachance (1999) *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia* 91, 428-433.
- Rosenkranz P., P. Aumeier y B. Ziegelmann (2009) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103, S96 – S119.
- Roulston, T. A. H., y J. H. Cane (2000) The effect of diet breadth and nesting ecology on body size variation in bees (Apiformes) *Journal of the Kansas Entomological Society*, 5, 129-142.
- SAGARPA. (2001) Manual Básico de Apicultura. México: SAGARPA.
- SAGARPA. (2004) Manual de Buenas Prácticas de Producción de Miel. Programa de inocuidad de alimentos. México: SAGARPA.
- SAGARPA. (2015) Notiabeja. Programa para el control de la abeja africana. México: SAGARPA.
- Sammataro, D. y A. Avitabile. (1998) *The beekeeper's handbook*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Sano O., T. Kunikata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Ikeda y M. Kurimoto. (2004) Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by twodimensional gel electrophoresis. *J Agric Food Chem.*; 52,15–20.
- Santos K.S., L. Delazari dos Santos, M. Anita Mendes, B. Monson de Souza, O. Malaspina y M.S. Palma (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.) *Insect Biochem Molec* 35,85–91.
- Schmid-Hempel P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50,529-551.
-

-
- Schmid-Hempel, R., y P. Schmid-Hempel (1998) Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Functional Ecology*, 12, 22-30.
- Shin K.S., H.D. Youn, Y.H. Han, S.O. Kang y Y.C. Hah (1993) Purification and characterisation of d-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 215, 747–752.
- Simpson C. (2006) Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium canescens* Tt42: Rhodes University.
- Siva-joty M.T., Y. Moret y J. Rolff (2005) Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Adv Insect Physiol*; 32,1-48.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius, (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*, 10,23-28.
- Strand, M. R. (2008) The insect cellular immune response. *Insect science*, 15(1), 1-14.
- Sugumaran, M. (2002) Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229–334.
- Sukhacheva M.V., M.E. Davydova y A.I. Netrusov (2004) Production of *Penicillium funiculosum* 433 glucose oxidase and its properties. *Appl Biochem Micro* 40:25–29.
- Tiina, Mattila, y M. Sandholm. (1989) Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *International Journal of Food Microbiology* 8, 165-174.
- Traver, B. E., Feazel-Orr, H. K., Catalfamo, K. M., Brewster, C. C., y Fell, R. D. (2018) Seasonal Effects and the Impact of In-Hive Pesticide Treatments on Parasite, Pathogens, and Health of Honey Bees. *Journal of economic entomology*, 111, 517-527.
- Traynor, K. (2008) Bee breeding around the world. *American bee journal*.
- Vargas-Albores F. y A. Ortega-Rubio (1994) El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y Posgrado*. 4. 21-28.
- Vaudo, A. D., J. F., Tooker, C. M., Grozinger, y H. M. Patch (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 133-141.
- Wahl, O., y K. Ulm (1983) Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia*, 59, 106–128.

-
- White J.W., M.H. Subers y A.I. Schepartz (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogenperoxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochim Biophys Acta* 73,57–70.
- Williams, G. R., C., Alaux, C., Costa, T., Csaki, V., Doublet, D., Eisenhardt y T. E. Murray, (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-36.
- Wilson, R., y A. P. F. Turner (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 165-185.
- Wilson-Rich, N., M. Spivak, N. H. Fefferman, P. T. y Starks (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology*, 54, 405-423.
- Witt, H., W. Luck, H. C. Hennies, M. Claßen, A., Kage, U. Laß, y M. Becker, (2000) Mutations in the gene encoding the serinae protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*, 25, 213-216.
- Witteveen C.F.B., M. Veenhuis y J. Visser (1992) Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microb.* 58,1190–1194
- Wohlfahrt G., S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H.M. Kalisz y H.J. Hecht (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr D* 55, 969–977.
- Wong, C. M., K. H. Wong, y X. D. Chen (2008) Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 78, 927-938.
- Wood, W., C., Fria, y A. Jacinto. (2006) Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology*, 173, 405-416.
- Woodward, S., y J. Quinn, (2011) *Encyclopedia of invasive species. De Africanized honeybees to Zebra mussels*. Greenwood: Library of Congress.
- Wu, G., S. A. Meier y D. A. Knabe (1996) Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *The Journal of nutrition*, 126, 2578.
- Zhao, Y., D. Schiferl y T. J. Shankland (1995) A high PT single-crystal X-ray diffraction study of thermoelasticity of MgSiO₃ orthoenstatite. *Physics and Chemistry of Minerals*, 22, 393-398.
-

-
- Zong N., C. Wang (2004) Induction of nicotine in tobacco by herbivory and its relation to glucose oxidase activity in the labial gland of three noctuid caterpillars. *Chinese Sci Bull* 49, 1596–1601.
- Zufelato, M.S., A.P. Lourenco, Z.L.P. Simões, J.A. Jorge y M.M.G. Bitondi (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1257–1268.
- Zufelato, M.S., M.M.G. Bitondi, Z.L.P. Simões y K. Hartfelder (2000) The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid- dependent cuticule melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*) *Arth. Struct. Dev.* 29,111–119.