

CAPÍTULO 10

Virus que afectan a las abejas (*Apis mellifera*)

Francisco J. Reynaldi, Alejandra Larsen y Hernán Sguazza

La apicultura resulta importante para el hombre, fundamentalmente por el rol que cumple la abeja melífera como polinizador de cultivos representando el 35 % de la polinización necesaria de los cultivos del mundo que producen alimentos básicos para el hombre. A escala mundial, se estima que de las 115 especies de importancia económica que se cultivan, 87 (correspondiente al 75 % que necesita polinización biótica) incrementan en mayor o menor medida su producción cuando sus flores son visitadas por polinizadores. La polinización no solo asegura la sustentabilidad productiva de los cultivos, sino también la reproducción sexual de un gran número de plantas con flores que en forma indirecta preserva el mantenimiento de la biodiversidad de la mayoría de los ecosistemas terrestres.

En el año 2014, Argentina llegó a ocupar el 2º lugar como exportador mundial pero actualmente se encuentra en el 5º, debido a la disminución en la producción de miel y al número de colmenas. Esta merma en la producción es reflejo de una situación que se viene observando en los últimos años en distintos países productores de miel.

Por su importancia en la sustentabilidad de los cultivos necesarios para alimentar un mundo con sobrepoblación y escasez alimenticia, es prioritario el estudio de los virus que afectan a los distintos polinizadores bióticos, en especial a la abeja. En este capítulo se desarrollarán las dos familias virales a la cual pertenecen los virus de mayor importancia en abejas ya sea por su impacto económico como por importancia biológica para la vida en el planeta.

Las abejas (*Apis mellifera*) son afectadas por una gran cantidad de enfermedades infecciosas incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos. En general, las enfermedades de origen viral no producen signos clínicos en las colonias, por lo que eran poco detectadas. Sin embargo, algunos autores consideran que la inmunosupresión debida a parásitos como el ácaro *Varroa*

destructor induce la replicación viral. Más aún, otros autores relacionaron algunos virus que afectan a las abejas con el devastador Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas (SDC). Desde entonces, el papel de los virus en las enfermedades de las abejas es una preocupación creciente, sobre todo teniendo en cuenta su relación con el SDC que diezmoó cerca del 25 % de las colmenas en EEUU en la temporada 2006-2007 y fue, en parte, responsable de la disminución del 2 % de la producción mundial de miel esa temporada. En la actualidad, el SDC sigue siendo un problema particularmente en América del Norte y Europa y si bien en Argentina no existen denuncias formales ante SENASA, ya se detectaron casos de mortandad de colmenas en diversos lugares del país.

Características de los virus que afectan a las abejas

Estructura y composición

En la actualidad, hay 24 virus identificados que afectan a las abejas melíferas. Una particularidad de los virus ARN es que muchos de ellos están muy relacionados entre sí, incluso en muchos casos se los considera cuasi-especies y hasta una misma especie viral, lo que reduciría la cantidad a 16-18 verdaderamente únicos. En general los virus ARN, de ubicación taxonómica conocida, pertenecen al Orden Picornavirales y las familias representadas son Iflaviridae y Dicistroviridae, excepto por el virus Filamentoso de las abejas y el *Apis iridescent virus*, el resto de los virus que ataca a las abejas son esféricos u ovals (20-30 nm de diámetro), con simetría icosaédrica, desnudos, con coeficiente de densidad en CsCl entre 1,33 a 1,42 g/ml y coeficiente de sedimentación de 100-190 S (Figura 1). Debido a las características similares que presentan estos virus, resulta muy difícil distinguirlos morfológicamente por microscopía electrónica. Los virus que afectan a las abejas son, en general ARN simple cadena y de polaridad positiva y pertenecen al grupo de los "Picorna-like" virus. El genoma viral está compuesto por una simple hebra de ARN cubierta por una cápside proteica. El genoma (ARN) está unido de manera covalente en el extremo 5' a una proteína viral (VPg), mientras que en el extremo 3' presenta una cola de poliA. Al final del extremo 5' existe una Región Larga no Traducible (UTR por su sigla en inglés). La replicación de los virus ocurre en el citoplasma de las células hospedadoras. La partícula viral se adhiere a la superficie de la célula blanco, interactúa con sus receptores de membrana e inyecta el genoma viral en el interior de la célula. De acuerdo con el orden en que se encuentran las proteínas en el genoma, los virus de las abejas se dividen en dos grupos: bicistrónicos (Figura 2) y monocistrónicos (Figura 3). Luego, el genoma se traduce en una única poli-proteína (monocistrónicas) o dos poli-proteínas (bicistrónicas). Ambos tipos de genoma codifican proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y no estructurales (helicasa, proteasa y RdRp RNA polimerasa dependiente de ARN que es la encargada de realizar la copia del genoma viral). La poliproteína estructural se sintetiza a partir de una pre-proteína (VP0) que luego es escindida por una proteasa para dar lugar a las 4 proteínas estructurales. Con la ayuda de la ARN

polimerasa dependiente de ARN, la hebra de ARN positiva del genoma viral se copia a una hebra de polaridad negativa intermedia, que servirá como molde para la replicación de nuevas hebras genómicas que serán incluidas en las partículas virales de la progenie. Todos estos virus ARN de simple cadena con polaridad positiva tienen aproximadamente 9 a 10 kb de longitud y las partículas virales tienen un tamaño aproximado de unos 30 nm de diámetro y simetría icosaédrica.

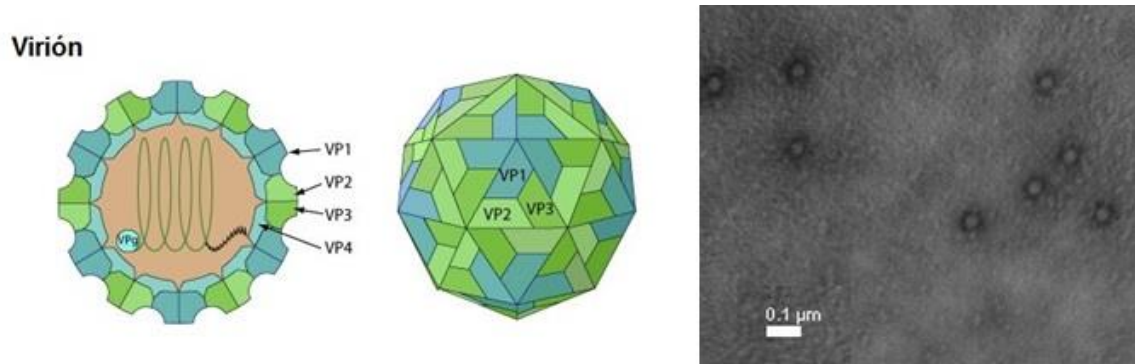


Figura 1. Esquema del virus Iflavirus (Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/278.html). Microscopía electrónica del Virus de las alas deformadas (DWV)

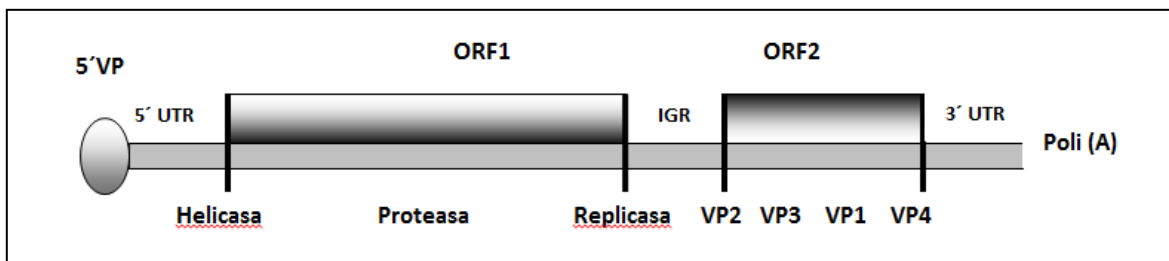


Figura 2. Genoma Monopartito bicistrónico, que presentan genes no estructurales en el extremo 5' y genes estructurales en el 3'. Por ejemplo ABPV, BQCV, KBV y IAPV.

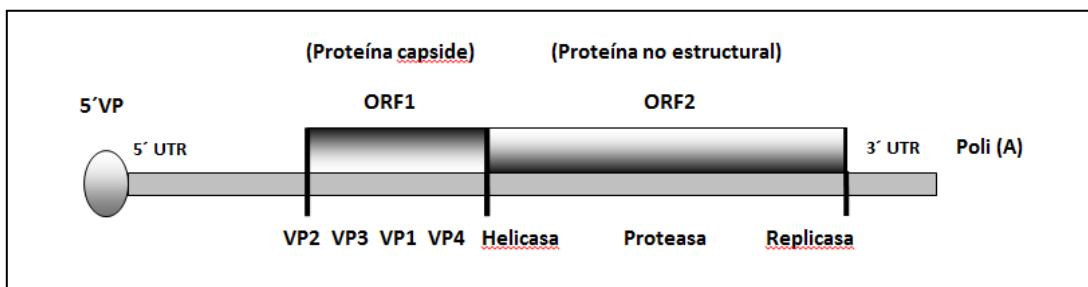


Figura 3. Genoma Monopartito monocistrónico, que presentan genes estructurales en el extremo 5' y genes no estructurales en el 3'. Por ejemplo SBV y DWV.

Epidemiología

La epidemiología de estas infecciones virales resulta muy compleja de estudiar, debido al entramado ambiental en el que se insertan las abejas. Sin embargo, se sabe que un ácaro (*Varroa destructor*) juega un rol fundamental en la diseminación de la mayoría de estas virosis e incluso algunos virus como el de las alas deformadas (DWV) o *Varroa-destructor-Virus* pueden replicar dentro de él, transformando a este ácaro en un vector biológico (Figura 4). Además, la detección de algunas virosis en otros ápidos (no abejas) que comparten el mismo ambiente, genera nuevas preguntas para la comprensión de estas infecciones, llevando a las flores a un lugar central en este escenario ya que son visitadas por todos ellos. Este hecho hace muy complejo su estudio y el diseño de medidas de control.



Figura 4: Abeja melífera con ácaros (*Varroa destructor*) y alas en muñón debido a DWV

Diagnóstico

Si bien el diagnóstico de algunas infecciones virales como DWV, virus de la cría ensacada (SBV), virus de las celdas reales negras (BQCV) puede realizarse en base a los signos clínicos, existen otras enfermedades que comparten signos clínicos como la incapacidad de volar, arrastrar el abdomen o poseer poca coordinación al caminar, temblores corporales, etc. Por tal motivo, el

diagnóstico de laboratorio resulta fundamental. Identificar los virus por microscopía electrónica es muy complejo ya que presentan características morfológicamente similares. Por ello, se han desarrollado otros métodos más sencillos como inmunodifusión, western blot y ELISA. Hasta hace poco tiempo, la inmunodifusión de Outcherlony era la técnica más utilizada debido a su rapidez, relativa especificidad y bajo costo, aunque la gran desventaja que tenía era la baja sensibilidad, lo que imposibilitaba el diagnóstico de infecciones latentes, pudiendo dar reacciones cruzadas entre virus relacionados como el virus israelí de la parálisis aguda de la abejas (IAPV), el virus de la parálisis aguda de la abejas (ABPV) y virus Kashmir de las abejas (KBV). Teniendo en cuenta las posibles co-infecciones virales que ocurren en abejas y sabiendo que las técnicas inmunoserológicas son poco específicas y no permiten detectar infecciones latentes, en la actualidad se prefiere la RT-PCR (retro-transcripción-PCR) como la prueba más adecuada para la detección de virus ARN en muestras de abejas ya que los resultados obtenidos son más sensibles y específicos.

Tratamiento y control

Israel y EE.UU son los únicos países que tienen aprobados tratamientos terapéuticos para control de DWV e IAPV, el cual se basa en el uso de ARNi (ARN de interferencia). Esta técnica se basa en el uso de un ácido nucleico que, administrado con el alimento (jarabe de azúcar), introduce pequeñas secuencias de ARN complementarias al virus a tratar. De esta manera, el virus comienza su replicación pero no puede completarla debido a que la ARN polimerasa viral queda "trabada" en el lugar donde se pegó esta secuencia viral interferente.

Respecto al monitoreo de estas virosis, existen dos factores que tiene un papel fundamental:

- a. El control del ácaro vector (*Varroa destructor*) con la finalidad de que disminuya la circulación viral entre colmenas y entre colmenares.
- b. El manejo productivo y sanitario de la colonia. Si la infección viral ya está presente, se puede evitar y/o minimizar la aparición de los signos de la enfermedad, optimizando otros factores que garanticen el equilibrio de la colonia de abejas, como la alimentación adecuada según el momento productivo, manejo de los espacios dentro de la colonia y control de otras enfermedades.

Respuesta inmune

Los insectos entre ellos las abejas, a diferencia de los vertebrados superiores, carecen de inmunidad adaptativa y en compensación desarrollaron un sistema inmune innato muy adaptado que

les permite responder a los patógenos específicos con los que co-evolucionaron. El estudio del sistema inmune de las abejas, se basa en el sistema inmune de vertebrados superiores así como de aquellos insectos utilizados como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* y el mosquito *Anopheles gambiae*).

El estudio de la composición, estructura y función del genoma de *Apis mellifera*, permitieron conocer y predecir los componentes del sistema inmune, receptores de reconocimiento, efectores y vías implicadas en la defensa frente a infecciones.

Una peculiaridad del genoma de las abejas es que muestra mayor similitud con el genoma de vertebrados que con los de *Drosophila* y *Anopheles*. Ejemplo son los genes implicados con el ritmo circadiano, las vías de ARN de interferencia y la metilación del ADN, entre otros. Tiene menos genes relacionados con el sistema inmune, con proteínas de la cutícula y receptores de la degustación que los dípteros, en contraste con una mayor cantidad de genes que codifican receptores del olor y otros propios para la utilización de polen y néctar. Estas características tienen relación directa con su comportamiento y organización social. En comparación con *Anopheles* o *Drosophila*, *A. mellifera* presenta un tercio de sus genes relacionados con el reconocimiento y señalización de los efectores inmunes. Esta disminución de genes estaría compensada por la inmunidad social, la cual se caracteriza por diversos mecanismos de defensa propios de las abejas que determina el comportamiento cooperativo de la colonia. Algunos de los mecanismos más comunes son la fiebre social, el acicalamiento, el comportamiento higiénico, la recolección de propóleo y el canibalismo de la cría, entre otros. Estas particularidades postulan a la inmunidad social como una estrategia de defensa que en gran medida disminuye la presión sobre el sistema inmune del individuo, dando como resultado un menor número de genes destinados para la defensa contra la infección.

Por las características de estos insectos (vida media corta, tamaño pequeño) y la falta de disponibilidad de líneas celulares para su cultivo *in vitro*, el estudio del sistema inmune de las abejas se basa en la búsqueda de genes homólogos a componentes del sistema inmune innato de otros organismos vertebrados e invertebrados. En base a esto, si un gen está presente en vertebrados e invertebrados, es muy probable que exista en las abejas. De este modo, se está completando el rompecabezas de su sistema inmune, aunque todavía faltan muchas piezas por descubrir.

El sistema inmune de las abejas tiene la misma secuencia de eventos que el sistema inmune innato de los vertebrados, activación de las vías de señalización y síntesis o activación de efectores solubles o celulares respectivamente. Para el proceso de reconocimiento, las abejas cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de señal y endocíticos, capaces de reconocer Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs).

En los insectos, los PRRs de señal son los receptores Toll (que en vertebrados superiores son receptores similares a Toll, TLR por sus siglas en inglés *Toll like receptors*) que cumplen una función crítica tanto en el desarrollo ontogénico como en el sistema inmune. Se identificaron 5 genes relacionados con Toll en abejas, Toll-1, -6, -2/7, -8, -10. Algunos receptores Toll no contactan directamente con su PAMP específico, sino que reconocen una proteína (denominada Späetzle)

adaptadora entre el PAMP y el receptores Toll, similar a lo que ocurre entre el LPS, CD14 y el TLR4 en vertebrados superiores. También presentan receptores para el reconocimiento del péptidoglicano (PGRP por sus siglas en inglés) de las bacterias gram positivas. Los receptores Toll representa el primer paso para el inicio de la respuesta inmune, activando distintas vías la señalización que, pasando por procesos de reclutamiento de proteínas adaptadoras y activación de proteínquinas, inducen la activación de factores de transcripción homólogos de FNkB, con la consiguiente desregulación de genes que codifican efectores del sistema inmune.

Se demostró que la vitelogenina¹⁵ reconoce Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs), como péptidoglicano y lipopolisacáridos bacterianos y zymosan de hongos. También se comprobó que esta proteína actuaría como transportadora de fragmentos bacterianos, que por transmisión vertical son adquiridos por la descendencia, lo que produciría una especie de “sensibilización” o *priming* del sistema inmune innato.

Las vías de señalización Toll e Imd¹⁶, presentes en las abejas, están relacionadas con la desregulación de los genes para péptidos antimicrobianos, que aunque su principal función es desestabilizar la pared de las bacterias también se encuentran en infecciones virales. Estos efectores humorales juegan un papel fundamental en el sistema de defensas de los insectos. En abejas se determinó la presencia de apidaecina, abaecina, himenoptaecina y defensinas, así como lisozimas. Otro efector humoral de abejas, relacionado con estas vías, es la transferrina. En vertebrados superiores, esta proteína, forma parte del grupo de las proteínas de fase aguda cuya función inmune es secuestrar hierro y limitar la infección bacteriana. La vía de señalización Imd se relaciona con la vía JNK (por su sigla en inglés, *c-Jun N-terminal kinase*) que también está involucrada con la síntesis de péptidos antimicrobianos.

En ciertos polinizadores se comprobó que los péptidos antimicrobianos actúan en sinergia (mayores efectos aditivos antimicrobianos) y potenciación (un péptido antimicrobiano puede permitir mejorar la actividad del otro). La combinación de estos permite aumentar el espectro de las respuestas, su especificidad, eficacia y robustez, permitiendo de esta forma reducir los recursos asignados al sistema inmune mediante el aumento de la actividad antimicrobiana de estos efectores a bajas concentraciones.

También se determinó la presencia de los componentes principales de la vía de señalización JAK/STAT (tirosin-quinásas de la familia de Janus /proteínas activadoras de la transcripción, por sus siglas en inglés) responsable del control de la expresión de proteínas portadoras de tio-éster y se supone, como sucede en *Drosophila*, codificarían para efectores humorales dependientes del estrés severo. Las proteínas portadoras de enlace tio-éster tienen este enlace característico de su homólogo en vertebrados superiores, la fracción C3 del complemento que les permite la unión de

¹⁵ Vitelogenina: es una proteína con función protectora contra ciertas infecciones

¹⁶ Toll e IMD: vías de señalización relacionadas con la regulación de la traducción de péptidos antimicrobianos

forma covalente a la superficie de los microorganismos para activar la respuesta inmune. En otros insectos, estas proteínas son sintetizadas por hemocitos y/o cuerpo graso.

La vía ARNi presente en abejas, es un mecanismo de defensa contra infecciones virales mediante el silenciamiento de su ciclo replicativo. Presentan un sensor de ARNdc producto del gen *dicer-like*, relacionado con la familia de PRRs o sensores citosólicos RIG-1 en mamíferos. Otro mecanismo epigenético¹⁷ con función antiviral presente en las abejas es la metilación del ADN.

También se demostró la presencia de serin-proteasas y serpinas, proteínas presentes en la hemolinfa, con función inmune relacionada con la cascada de coagulación y sistema del complemento y el mantenimiento de la hemostasis respectivamente.

La profenoloxidasa también está presente en abejas y es una proteína humoral que puede inducir la melanización de patógenos y también está involucrada con la curación de heridas.

Referencias

¹⁷ Epigenética: el estudio de cambios heredables en la función génica que se producen debido a influencias ambientales, pero sin un cambio en la secuencia del ADN.

- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 2015; 10:71-82.
- De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge G, Chejanovsky N, Chen Y-P, Gauthier L, Genersch E, De Graaf D, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, Van Der Steen JJM. 2013 Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research.* *J Apicultural Res.* 2013; 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- Merkling SH, van Rij RP. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J Insect Physiol.* 2013; 59: 159-70. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.07.004
- Rivière M, Ball BV, Aubert MFA. 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. En: Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, Bernardinelli I. *Virology and the honey bee.* Brussels, Belgium, EEC Publications, pp: 15-84.
- van Engelsdorp D, Underwood R, Caron D., Hayes J (Jr). An estimated of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. *Am Bee J.* 2007; 147:599-603.
- Wang PH, Weng SP, He JG. Nucleic acid-induced antiviral immunity in invertebrates: An evolutionary perspective. *Dev Comp Immunol.* 2015; 48:291-6.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR análisis of deformed wing virus in honetbees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol.* 2005; 86: 3419-24.