

DÉBORA LINHARES LINO DE SOUZA

**EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS NO SISTEMA DIGESTÓRIO E
TÚBULOS DE MALPIGHI DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) E
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE AM_EGLP 1**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S729e
2018

Souza, Débora Linhares Lino de, 1987-

Expressão de aquaporinas no sistema digestório e túbulos de Malpighi de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e caracterização funcional de Am_Eglp 1 / Débora Linhares Lino de Souza. – Viçosa, MG, 2018.

vii, 28f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 23-28.

1. Abelhas - Aparelho digestivo. 2. Expressão gênica.
3. Aquaporinas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

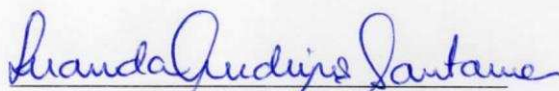
CDD 22. ed. 595.799


DÉBORA LINHARES LINO DE SOUZA

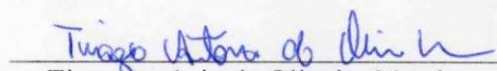
**EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS NO SISTEMA DIGESTÓRIO E TÚBULOS
DE MALPIGHI DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) E
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE AM_EGLP 1**

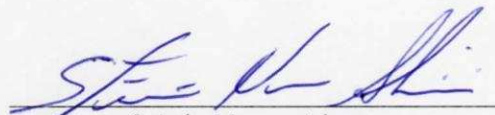
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

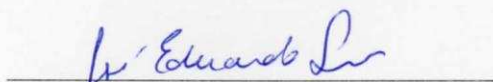
APROVADA: 31 de julho de 2018.


Luanda Medeiros Santana


Leandro Licursi de Oliveira


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Stênio Nunes Alves


José Eduardo Serrão
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos estudantes de Pós-Graduação brasileiros, que se esforçam e se dedicam diariamente na tentativa de fazer pesquisa com baixo orçamento e altos desafios. Não se deixem abalar. A sua pesquisa pode parecer não ter importância para alguns, mas com certeza fará diferença em crescimento pessoal, profissional e para a ciência.

AGRADECIMENTOS

Escrevo esses agradecimentos àqueles que foram fundamentais nesta jornada.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, meu destino desde a graduação, aonde conquistei conhecimento como Professora e Bióloga, Mestre, e agora Doutora. Onde fiz grandes amizades e aprendi o valor da Universidade.

Aos cidadãos brasileiros que financiaram os meus estudos através dos impostos, meu muitíssimo obrigado. Espero um dia poder retribuir para a sociedade como ela contribuiu para a minha formação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, incluindo o período de doutorado que realizei no exterior.

Aos professores que tive ao longo de toda a minha vida acadêmica, que se doaram para o meu crescimento na Graduação e Pós Graduação. Em especial aos professores do Departamento de Biologia Geral.

Ao Doutor José Eduardo Serrão, que me orientou e foi meu maior exemplo de pesquisador, professor e líder. Muito obrigada por ter confiado em mim e me possibilitado aprender mais e mais a cada dia. Agradeço imensamente pelas correções e pelas conversas. Deixo a UFV com a certeza de que seus ensinamentos me ajudarão a superar os desafios da vida acadêmica com muito mais leveza do que eu faria se não tivesse te conhecido.

Ao Doutor Immo Alex Hansen que, mesmo sem me conhecer, me recebeu em seu laboratório e colaborou com as pesquisas realizadas neste doutorado. Às meninas do Molecular Vector Physiology Lab que tanto me ajudaram.

Agradeço aos funcionários do DBG e da UFV que se dedicam diariamente para tornar as atividades mais simples. Em especial, agradeço à Beth por ser minha memória nesta etapa em que tudo é tão estressante que nos faz esquecer os detalhes. Meu muito obrigada pelas conversas e por toda a ajuda que você me proporcionou. Sem você eu estaria perdida!

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Ultraestrutura Celular agradeço pela convivência na bancada, a companhia nos cafés, e a amizade fora do laboratório. Muito obrigada por terem colaborado para o meu crescimento pessoal e profissional. Vocês fizeram desta minha caminhada uma atividade muito prazerosa. Fui muito feliz trabalhando com vocês, e vou levar cada um em meu coração.

Agradeço aos meus pais, que me incentivaram a estudar sempre. Meu pai dizia que podemos perder tudo, exceto o conhecimento. Obrigado por este primeiro ensinamento que sempre me fez ir além. À minha mãe, pelo amor incondicional. Sei que sacrifícios foram feitos para que eu chegasse até aqui e serei eternamente grata por isso. Acredito, agora, que podemos perder tudo, exceto o conhecimento e a gratidão. Às minhas irmãs e familiares, meu muito obrigada pelo carinho.

Muito obrigada aos amigos que tive o privilégio de conhecer em Viçosa. Foi com a ajuda de vocês que consegui superar as adversidades que enfrentei. Também sou agradecida aos amigos de outras datas. Apesar da distância e dos longos períodos sem encontrar, nos mantivemos unidos e apoiando uns aos outros. Espero ter conseguido retribuir todo o amor que vocês me deram.

Ao Artur, muito obrigada por sua calma e tranquilidade, suporte e apoio ao longo de tantos anos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
Extração de RNA total	3
Análise de expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR)	3
Tabela 1: Dados sobre genes preditos para aquaporinas de <i>A. mellifera</i>	4
Hibridização <i>in situ</i>	5
Tabela 2: <i>Primers</i> de RNA utilizados para hibridização <i>in situ</i>	5
Caracterização da proteína Am_Eglp 1 e potencial sensibilidade ao mercúrio (Hg)	7
Construção de vetor e síntese de cRNA para expressão heteróloga em ovócito de <i>Xenopus laevis</i>	8
Análise de expressão da proteína por Western Blot	9
Expressão da aquaporina Am_Eglp 1 em ovócitos de <i>Xenopus laevis</i> e ensaio de absorção de água	9
Análise estatística e representação gráfica	10
RESULTADOS	11
Expressão de aquaporinas	11
Figura 1: Expressão relativa de genes preditos de aquaporinas em órgãos do sistema digestório e túbulos de Malpighi de forrageiras de <i>A. mellifera</i>	12
Hibridização <i>in situ</i>	13
Figura 2: Montagem total de órgãos do sistema digestório e túbulos de Malpighi de forrageiras de <i>A. mellifera</i> submetidos à hibridização <i>in situ</i>	14
Caracterização da proteína predita Am_Eglp 1	15
Ensaio de absorção de água	15
Figura 3: Comparação das sequências de aminoácidos de aquaporinas de diferentes organismos e com diferentes sensibilidades ao mercúrio (HgCl ₂)	16
Figura 4: Perfil de hidrofobicidade de Am_Eglp 1	17
Figura 5: Análise do coeficiente de permeabilidade em ovócitos de <i>X. laevis</i> expressando Am_Eglp 1 e submetidos ao ensaio de absorção de água	17
DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS	23

RESUMO

DE SOUZA, Débora Linhares Lino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Expressão de aquaporinas no sistema digestório e túbulos de Malpighi de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e caracterização funcional de Am_Eglp 1.** Orientador: José Eduardo Serrão.

Aquaporinas são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de água através das membranas celulares. Estas proteínas são encontradas e amplamente investigadas em insetos, porém pouco estudadas em *Apis mellifera*. As regiões do sistema digestório e os túbulos de Malpighi dos insetos expressam aquaporinas, o que aumenta a permeabilidade natural dos tecidos e a velocidade do transporte de água. Neste estudo foi avaliado o nível de expressão de cinco genes preditos para aquaporinas, que apresentaram diferentes níveis de expressão nos órgãos do sistema digestório – papo, intestino médio, íleo e reto – e túbulos de Malpighi de abelhas forrageiras. O gene *Am_Eglp 1* apresentou maior expressão relativa no intestino médio, e a hibridização *in situ* confirmou a presença de RNA mensageiro para este gene em todas as regiões investigadas. Além disso, o ensaio de absorção de água, após a expressão heteróloga de *Am_Eglp 1* em ovócitos de *Xenopus laevis*, comprovou que o gene da aquaporina codifica para uma proteína funcional, capaz de transportar água e que é bloqueada por mercúrio. Este foi o primeiro relato da funcionalidade de uma aquaporina de abelhas, que atua principalmente no intestino médio, aumentando a permeabilidade à água nas membranas da região.

ABSTRACT

DE SOUZA, Débora Linhares Lino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Aquaporin expression in the digestive tract and Malpighian tubules of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and functional characterization of Am_Eglp 1.** Advisor: José Eduardo Serrão.

Aquaporins are membrane proteins responsible for water transport through cell membranes. These proteins are found and widely investigated in insects, but still little studied in *Apis mellifera*. In insects, digestive tract and Malpighian tubules express aquaporin, increasing the natural permeability of tissues and the speed of water transport. In this study five predicted aquaporin genes had their expression level evaluated in forager honey bees, which presented different expression on digestive tract organs – crop, midgut, ileum and rectum – and Malpighian tubules. *Am_Eglp 1* showed higher relative expression level in the midgut, and *in situ* hybridization confirmed the presence of mRNA to this gene in every organ evaluated. In addition, heterologous expression of *Am_Eglp 1* was performed in *Xenopus laevis* oocytes, followed by water uptake assay, demonstrating that this gene encodes for a functional aquaporin, capable of transporting water and blocked by mercury. This was the first time a honey bee aquaporin was tested, and the results suggest that Am_Eglp 1 plays an important role on increasing membrane water permeability, mainly on *A. mellifera* midgut.

INTRODUÇÃO

As aquaporinas são proteínas de membrana que facilitam e aumentam a velocidade de troca de água entre células, seus arredores, e estruturas intracelulares, descritas pela primeira vez para células de mamíferos (Denker et al., 1988; Smith & Agre, 1991; Jung et al., 1994; Duchesne et al., 2003). Desde a sua descoberta, as aquaporinas foram encontradas em quase todos os organismos vivos (Revisado por: Tomkowiak & Pienkowska, 2010). Estas proteínas apresentam algumas características conservadas, como a presença de seis domínios hidrofóbicos de regiões transmembrana que são conectados por cinco *loops* hidrofílicos (Preston et al., 1992). Análises da sequência de aminoácidos da proteína forneceram evidências sobre a hidrofobicidade das sequências que compõem as regiões transmembrana, bem como sobre o perfil hidrofílico dos *loops* (Gorin et al., 1984; Preston & Agre, 1991). Os *loops* B e E apresentam os domínios NPA, geralmente formados pelos aminoácidos asparagina (N), prolina (P) e alanina (A), e que são responsáveis pela formação do poro por onde moléculas de água são transportadas (Jung et al., 1994). O transporte de água através do poro pode ser influenciado, e até mesmo interrompido, quando a aquaporina interage com moléculas de mercúrio (Preston et al., 1992). A capacidade de o mercúrio influenciar ou bloquear o transporte é dependente da presença e da distância do resíduo de cisteína próximo à segunda sequência do motivo NPA (Preston et al., 1993; Le Cahérec et al., 1996). Além disso, as aquaporinas apresentam um arranjo em forma de ampulheta quando inserida nas membranas (Jung et al., 1994), sendo organizadas em tetrâmeros (Smith & Agre, 1991).

Em insetos, as aquaporinas foram classificadas em seis grupos com base na sequência gênica e suas características funcionais, incluindo canais específicos de água (DRIP), proteína transportadora de água e ureia (PRIP), canal de cátions (BIB), gliceroporinas (Glp), entomogliceroporinas (Eglp), e aquaporinas não ortodoxas (Finn et al., 2015). Nos insetos as aquaporinas foram identificadas e testadas em várias espécies em diferentes tecidos e regiões. Estas proteínas apresentam funções e localização diversificadas, e estão relacionadas a mecanismos de sobrevivência e adaptação de organismos em condições de estresse como congelamento, desidratação e no controle da osmoregulação (Le Cahérec et al., 1997; Philip et al., 2011; Drake et

al., 2015). O genoma da abelha *Apis mellifera* apresenta seis genes preditos para aquaporinas e uma sequência para aquaporina não ortodoxa – DRIP: *Am_DRIP*; PRIP: *Am_PRIP*; BIB: *Am_BIB*; Eglp: *Am_Eglp 1*, *Am_Eglp 2*, *Am_Eglp 3*; não ortodoxa: *Am_Aqp 12L* (Campbell et al., 2008; Elsik et al., 2014; Finn et al., 2015). Apesar de conhecermos os genes preditos para aquaporinas em abelhas, a expressão e funcionalidade destas proteínas são pouco esclarecidas e, até hoje, apenas um trabalho demonstrou a expressão de diferentes aquaporinas no sistema digestório de *A. mellifera*, com uma proteína evidenciada localmente no papo (Serrão et al., 2014). Ainda assim, permanece incerto se estas proteínas são funcionais nas abelhas.

Nas abelhas, o sistema digestório é composto por intestino anterior, onde está presente o papo e o proventrículo, o intestino médio e intestino posterior – contendo íleo e reto, sendo que no reto se encontram as papilas retais (Snodgrass, 1956). O papo é responsável por armazenar e transportar o néctar da fonte floral à colmeia e também é onde inicia a conversão do néctar em mel por ação de enzimas das glândulas salivares e hipofaríngeas (Maurizio, 1975; Oddo et al., 1999). Apesar de ter sido considerada uma região impermeável, devido às características celulares e à presença de cutícula revestindo seu interior (Cruz Landim, 1985), foi demonstrado que no papo ocorre absorção de água, contribuindo para a desidratação do néctar (Serrão et al., 2014). O intestino médio é o principal órgão onde as enzimas digestivas são sintetizadas, e onde ocorre a digestão e absorção de nutrientes, enquanto que o intestino posterior, associado aos túbulos de Malpighi, é responsável pela excreção e osmoregulação (Chapman, 2013; Gonçalves et al., 2014). Os órgãos do sistema digestório e excretor de insetos, incluindo *A. mellifera*, são capazes de trocar água e outros solutos através da membrana celular, e a velocidade do transporte é aumentada pelas aquaporinas (Le Cahérec et al., 1997; Drake et al., 2015).

Neste estudo foi utilizado o PCR tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão relativa de cinco genes preditos para aquaporinas – *Am_Eglp 1*, *Am_Eglp 3*, *Am_DRIP*, *Am_PRIP* e *Am_BIB* - no papo, intestino médio, íleo, reto e túbulos de Malpighi de forrageiras de *A. mellifera*. Além disso, foi realizada hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA especificamente desenvolvidas para o gene *Am_Eglp 1* com o objetivo de identificar localmente o mRNA sintetizado em cada órgão do trato digestório e túbulos de Malpighi. Para testar a funcionalidade de

Am_Eglp 1, foi realizada expressão heteróloga em ovócitos de *Xenopus laevis*, seguida pelo ensaio de absorção de água.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de RNA total

Abelhas operárias de *A. mellifera* foram coletadas enquanto forrageavam no Campus da New Mexico State University (NMSU), Las Cruces, Estados Unidos, em maio de 2017. Um total de 30 espécimes foram crioplanados e dissecados em tampão salino (NaCl 0,1M; Na₂HPO₄ 0,1M; KH₂PO₄ 0,1M). O sistema digestório e túbulos de Malpighi foram removidos e as regiões foram separadas (papo com proventrículo, intestino médio e intestino posterior separado em íleo e reto). Os órgãos foram distribuídos em três tubos, originando três repetições com amostras de 10 abelhas em cada. Para extração de RNA, o material foi macerado em 250 µL de Trizol[®] Reagent (Invitrogen). Em seguida, o volume de Trizol[®] foi completado para 500 µL, os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, 100 µL de clorofórmio foram adicionados em cada tubo seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante gerado foi transferido para novos tubos contendo 250 µL de isopropanol. As amostras foram agitadas e incubadas por 16 horas a -20°C. Após este período foi realizada outra centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, seguido de secagem e ressuspensão em 20 µL de água livre de nucleases (nuclease free water). Posteriormente as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e armazenadas a -80°C.

Análise de expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Primers específicos para cinco aquaporinas preditas de *A. mellifera* foram desenhados utilizando a ferramenta Primer BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com base nas sequências de *Am_Eglp 1*, *Am_Eglp 3*, *Am_DRIP*, *Am_PRIP* e *Am_BIB* (Finn et al., 2015). Também foi utilizado o gene de referência *RpL32* para proteína ribossomal de *A. mellifera* (Lourenço et al., 2008) (Tabela 1). As reações foram feitas utilizando iTaq[™]

Universal SYBR[®] Green One-Step Kit (Biorad), sendo montadas de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação continha 50 ng de RNA total previamente extraído das amostras de abelhas, *primer F (forward)* e *R (reverse)* a 300 nM e volume total da reação de 10 µL. A análise foi executada com três repetições biológicas e três repetições técnicas. O RT-qPCR foi realizado no termociclador Eppendorf Mastercycler ep realplex[®] (Eppendorf) seguindo as seguintes condições: transcrição reversa a 50°C por 10 minutos, ativação de polimerase e desnaturação de DNA a 95°C por um minuto, 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 60 segundos. Os resultados foram avaliados pelo método Cycle Threshold, utilizando a fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

Tabela 1: Dados sobre genes preditos para aquaporinas de *A. mellifera*, gene de referência e sequência dos *primers* para RT-qPCR.

Gene Predito	Número de Acesso (NCBI)	Primers	Referência
Am_Eglp 1	XM_001121043.4 transcript variant X1	F: CCGCCACCATTACAAACGTC R: ACCGTTGTGCATCCTGGAAT	Finn et al., 2015
Am_Eglp 3	XM_624191.5 transcript variant X1	F: GCTATCCAAGGCCTCCTTCT R: GACTCGGTGCCAATCAGATT	Finn et al., 2015
Am_DRIP	XM_624528.5 transcript variant X2	F: TTGTTTGCCAGTGTTGTGGT R: TCCTCCTTCTGGTTGTCCAC	Finn et al., 2015
Am_PRIP	XM_394391.6 transcript variant X2	F: GCAGAATTTCTTGGCACGTT R: CATAGGTGCAATAGCGGGAT	Finn et al., 2015
Am_BIB	XM_396705.5	F: GTAGCCGGAGCATCCTCATC R: CAGGGAGGGTCAACAGCAAA	Finn et al., 2015
Gene de Referência	Número de Acesso (NCBI)	Primers	Referência
RpL32	XM_006564315.2	F: CCCATAACGTTCTATCTGTGGCA R: CTCGTCATATGTTGCCAACTGG	Lourenço et al., 2008

Hibridização *in situ*

Para a hibridização *in situ* foram desenhados *primers* específicos para *Am_Eglp 1* com base na sequência do mRNA encontrada no NCBI, utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 6.0 (Tamura et al., 2013). O programa MEGA também foi utilizado para comparar a semelhança da sequência usada nos *primers* para *Am_Eglp 1* às sequências dos genes e mRNA das demais aquaporinas preditas em *A. mellifera*. De modo semelhante, a plataforma NCBI foi utilizada para comparar a sequência usada para desenhar o *primer* a qualquer outra sequência no genoma de *A. mellifera*, garantindo a especificidade do *primer*. No total foram desenhados quatro *primers*, um F e um R e dois contendo região promotora T7: F T7 e R T7.

Tabela 2: *Primers* de RNA utilizados para hibridização *in situ*

Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')
F	TTTGCGCAGCATGCGCCACT
R	TGAAACTCCAACAACAGAGA
F T7	TAATACGACTCACTATAGGGTTTGCGCAGCATGCGCCACT
R T7	TAATACGACTCACTATAGGGTGAAACTCCAACAACAGAGA

A partir do RNA total isolado anteriormente, foi produzido cDNA utilizando M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs). As reações foram feitas a partir de 500 ng de RNA, 1 µL de primer oligo(dT) a 100 µM, 1 µL de dNTP mix a 10 mM, e água ultrapura para volume final de 10 µL. Os tubos foram incubados a 65°C por cinco minutos e resfriados em gelo. A seguir foram acrescentados 2 µL do tampão 10X M-MuLV buffer fornecido pelo fabricante (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8,3), 1 µL de transcriptase reversa M-MuLV, 0,2 µL de inibidor de RNase e água ultrapura para volume final de 20 µL. O material foi incubado por uma hora a 42°C seguido de inativação da enzima por

incubação por 20 minutos a 65°C. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e armazenado a -20°C.

O cDNA sintetizado foi utilizado para amplificar a sequência de interesse a partir da reação de PCR utilizando 12,5 µL do kit PCR Master Mix 2x (Promega). Cada PCR foi realizado com *primer* na concentração de 1 µM, 200 ng de cDNA e água o suficiente para o volume final de reação de 25 µL. Duas reações diferentes foram realizadas, uma utilizando o par de *primer* F T7 e R, produzindo cDNA denominado *sense* (para gerar sonda controle), e a outra utilizando o par de *primer* F e R T7, produzindo cDNA denominado *antisense* (para gerar sonda para hibridização). As reações foram realizadas no termociclador Eppendorf Mastercycler ep realplex® (Eppendorf) seguindo as seguintes condições: desnaturação por dois minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C com anelamento por 30 segundos a 48°C para cDNA *sense* e por 30 segundos a 58°C para cDNA *antisense*, seguido de extensão por 30 segundos a 72°C. Uma última etapa de extensão por cinco minutos a 72°C finalizou o processo de PCR que foi seguido por quantificação em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). O cDNA resultante foi submetido a gel de agarose 2,0% para confirmar o tamanho esperado de 92 pb do cDNA. O restante da amostra foi armazenado a -20°C.

As sondas *sense* e *antisense* foram sintetizadas utilizando 200 ng de cDNA previamente preparado, 2 µL de RNA polimerase T7 (Roche) e 2 µL de DIG RNA Labeling Mix 10x conc. (Roche) de acordo com instruções do fabricante. As reações de 20 µL foram incubadas por duas horas a 37°C. Abelhas forrageiras foram anestesiadas em gelo e dissecadas em tampão salino, e o sistema digestório (papo – com proventrículo, intestino médio e intestino posterior) e túbulos de Malpighi foram removidos. A hibridização *in situ* foi realizada utilizando 1 µL de sonda (*sense* ou *antisense*) para cada 200 µL de tampão específico para hibridização (50% formamida deionizada, 4x SSC – citrato de sódio salino, 1x solução Denhardt, 250 µg/mL de tRNA de levedura, 250 µg/mL de ssDNA, 50 µg/mL de heparina, 0,1% Tween 20, 5% sulfato Dextran) (Dearden et al., 2009). Cinco abelhas foram utilizadas para sonda *sense*, cinco para sonda *antisense*, e cinco para o controle de acordo com protocolo desenvolvido para *A. mellifera* (Dearden et al., 2009), com modificações. Para bloquear a fosfatase alcalina endógena, foi utilizada solução de imidazol a 20 µM anteriormente ao uso do anticorpo anti-DIG AP antibody (Roche), seguido de extensivas lavagens em tampão PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20- Thermo

Scientific). O anticorpo anti-DIG AP reconhece e se liga à digoxigenina (DIG-UTP) presente na sonda e é conjugado à fosfatase alcalina - alvo para redução por BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium). A reação de redução gera a coloração azul característica desta hibridização *in situ*. O anticorpo anti-DIG AP antibody (Roche) foi diluído em PBST 0,1% e BSA a 1% (albumina de soro bovino) na concentração de 1:1000, e foi aplicado por uma hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após a etapa de ligação do anticorpo, o material foi revelado utilizando BCIP a 50 mg/mL e NBT a 75 mg/mL em tampão (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ e 0,1% Tween 20) por cinco minutos em temperatura ambiente protegido da luz. O papo com proventrículo, intestino médio, intestino posterior - íleo e reto - e os túbulos de Malpighi foram separados, mantidos *overnight* em glicerol 80% e então montados em glicerol 95% para análise. Os órgãos foram observados e fotografados no estereomicroscópio Zeiss Stereomicroscope Discovery V20, com câmera Axiocam MRC Zeiss.

Caracterização da proteína Am_Eglp 1 e potencial sensibilidade ao mercúrio (Hg)

O potencial bloqueio de Am_Eglp 1 por mercúrio foi analisado pela distância dos resíduos de cisteína ao segundo motivo NPA na sequência peptídica, através do alinhamento dos aminoácidos utilizando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013). A sequência de Am_Eglp 1 foi comparada com as sequências de outras três aquaporinas previamente testadas para o bloqueio por mercúrio: aquaporin 1 de mamífero (X70257), sensível ao mercúrio (Le Cahérec et al., 1996); AQPcic de *Cicadella viridis* (Q23808), bloqueada por mercúrio de modo dose-dependente (Le Cahérec et al., 1996); e AQP4 de *Aedes aegypti* (XM_001650118), insensível ao mercúrio (Drake et al., 2015). Para verificar o padrão de hidrofobicidade da proteína Am_Eglp 1, a sequência predita dos aminoácidos desta aquaporina foi avaliada no programa *online* ProtScale (Gasteiger et al., 2005) com base no algoritmo de Kyte & Doolittle (1982), usando janela de 11 resíduos.

Construção de vetor e síntese de cRNA para expressão heteróloga em ovócito de *Xenopus laevis*

O vetor pXOOM, contendo a sequência para o gene *Am_Eglp 1* (XM_001121043.4 transcript variant X1) foi produzido pela Genscript, contendo sequência para o promotor T7, alvo da RNA polimerase, sequência Myc-tag, sítios de clivagem para as enzimas de restrição EcoRI e HindIII e apresentando resistência à canamicina. Para transformação de *Escherichia coli* (NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli*. (High efficiency) – New England Biolabs) e clonagem do vetor, foram usados 50 ng de DNA plasmidial, procedendo de acordo com instruções do fabricante. Após a transformação, as bactérias foram transferidas para meio de cultura sólido contendo canamicina na concentração de 1:1000, e mantidas em estufa a 37°C *overnight* para desenvolvimento das colônias. Dentre as colônias que cresceram individualizadas contendo o vetor pXOOM, duas foram selecionadas de cada placa e então transferidas para tubos individuais contendo 5 mL de meio de cultura líquido com canamicina na concentração de 1:1000. No total foram utilizadas quatro culturas diferentes, resultando em oito tubos. Os tubos foram mantidos em agitador a 37°C *overnight* a 220 rpm, seguido de extração do vetor por QIAprep[®] Spin Miniprep Kit de acordo com instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 40 µL de água ultrapura, e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Para conferir o tamanho da sequência de *Am_Eglp 1* o vetor foi linearizado pela dupla digestão com enzimas de restrição EcoRI e HindIII (New England Biolabs), utilizando 1 µg de DNA plasmidial, 1 µL de cada enzima de restrição, 1 µL de tampão (10x NEBuffer - New England Biolabs) e água ultrapura para completar o volume para 50 µL por uma hora a 37°C. Em seguida, foi feito um gel de agarose 2,0%. Também foi realizada digestão do plasmídeo utilizando apenas HindIII, nas mesmas condições citadas acima. Posteriormente, 1 µg de DNA linearizado com HindIII foi utilizado na síntese de cRNA via transcrição *in vitro* com o kit mMessage-mMachine[®] (Ambion Inc.) contendo RNA polimerase T7, de acordo com instruções do fabricante. O cRNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C.

Análise de expressão da proteína por Western Blot

Ovócitos injetados com cRNA, bem como os controles (ovócitos injetados com água e ovócitos sem injeção), tiveram o citoplasma removido e as membranas foram maceradas em Laemmli Sample Buffer (Biorad), β -mercaptoetanol e 1 μ M de mistura de inibidores de protease (Sigma-Aldrich), e também foram submetidas ao choque térmico. Os extratos das membranas dos ovócitos foram aplicados em Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gels (BioRad) e eletrotransferidos para Immune blot-PVDF Membrane for Protein Blotting (BioRad). A membrana foi bloqueada utilizando Blocker Blotto in TBS (Thermo Fisher Scientific) a 4°C *overnight*, seguida de incubação com anticorpo anti-myc-tag (Cell Bolabs) diluído na concentração de 1:1000 em tampão de bloqueio (Thermo Fisher Scientific). Após extensivas lavagens com TBS (50 mM Tris, pH 7.6; 150 mM NaCl), a membrana foi incubada em anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com fosfatase alcalina (Milipore), diluído em tampão de bloqueio (Thermo Fisher Scientific) na concentração de 1:5000 por duas horas em temperatura ambiente. Para revelar a membrana, foi utilizado BCIP[®]/NBT Liquid Substrate (Sigma).

Expressão da aquaporina Am_Eglp 1 em ovócitos de *Xenopus laevis* e ensaio de absorção de água

Para realizar o teste, os ovócitos foram adquiridos da Ecocyte Bioscience US, injetados com 20 ng de cRNA para *Am_Eglp 1* e, para os controles, foram mantidos sem injeção ou injetados com 30 nL de água. A seguir, os ovócitos foram incubados a 16°C por quatro a cinco dias em solução *Barth's solution* 200 mOsm (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,4 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,8 mM, Tris-HCl 5 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, pH 7,3) adquirida também da Ecocyte Bioscience US, e suplementada com penicilina e estreptomicina a 100 mg/mL, cada. Para a realização do ensaio de absorção de água, ovócitos foram transferidos do meio de incubação *Barth's solution* 200 mOsm para meio diluído com água destilada a 50 mOsm (hiposmótico). Após a transferência os ovócitos foram avaliados por quatro minutos em temperatura ambiente com o auxílio de estereomicroscópio. Para testar se Am_Eglp 1 apresenta sensibilidade ao mercúrio, ovócitos foram mantidos por dez

minutos em solução *Barth's solution* a 200 mOsm contendo 1 mM de HgCl_2 antes de serem transferidos para meio hipotônico, como descrito anteriormente. Imagens dos ovócitos foram tiradas a cada 30 segundos utilizando o estereomicroscópio Olympus SZX12 com fonte de luz Lumen 200 e câmera Ample Scientific TCC3.3 ICE supercooled CCD.

O coeficiente de permeabilidade osmótica da água (Pf) foi calculado de acordo com método previamente descrito (Liu et al., 2011), seguindo a fórmula $Pf = \frac{V_0}{S_0} \frac{d(V/V_0)/dt}{V_{\text{H}_2\text{O}} (Osm_{\text{dentro}} - Osm_{\text{fora}})}$. Nessa fórmula, V_0 é o volume inicial do ovócito antes do desafio hiposmótico, $d(V/V_0)$ é a variação de volume do ovócito entre o início e o final do desafio, dt é o tempo utilizado para o teste em segundos, S_0 representa a área da superfície do ovócito, $V_{\text{H}_2\text{O}}$ o volume molar da água, e $(Osm_{\text{dentro}} - Osm_{\text{fora}})$ a diferença entre a molaridade no interior do ovócito – igual à do meio de incubação – e o meio no qual os ovócitos foram submetidos ao teste – meio hiposmótico.

Análise estatística e representação gráfica

Os dados do RT-qPCR e do ensaio de inchaço foram analisados por ANOVA seguido de teste Tukey, utilizando 5% de significância. Os gráficos representando os resultados foram desenvolvidos utilizando o programa GraphPad Prism 5. Para acessar a expressão relativa dos genes para aquaporinas, identificando a média de quanto a mais ou a menos foram expressos, foi utilizado o programa REST 2009 (Pfaffl et al., 2002), com 5% de significância.

RESULTADOS

Expressão de aquaporinas

O RT-qPCR permitiu analisar o nível de expressão dos genes para aquaporinas nos órgãos do sistema digestório e túbulos de Malpighi e cada gene exibiu um perfil diferente de expressão (Figura 1). O gene *Am_Eglp 1* foi o mais expresso no intestino médio (Fig. 1A). A análise indicou que a expressão relativa da entomogliceroporina *Am_Eglp 1* no intestino médio foi 8.000 vezes maior que no papo ($p < 0,05$), 1.500 vezes maior que no íleo ($p < 0,05$), 3.600 vezes maior que no reto ($p < 0,05$) e 560 vezes maior que nos túbulos de Malpighi ($p < 0,05$), calculado pelo programa REST 2009.

O perfil de expressão da outra entomogliceroporina, *Am_Eglp 3*, foi o oposto ao observado para *Am_Eglp 1*. No papo, íleo, reto e túbulos de Malpighi, o gene exibiu alta expressão, enquanto que no intestino médio apresentou o menor valor de expressão relativa (Fig. 1B). No intestino médio a taxa de expressão relativa de *Am_Eglp 3* foi de apenas 5,2% comparada às demais regiões analisadas.

Am_DRIP e *Am_PRIP* foram observados em todos os órgãos avaliados, sendo a maior expressão relativa de *Am_DRIP* nos túbulos de Malpighi (Fig. 1C) e *Am_PRIP* no reto e túbulos de Malpighi (Fig. 1D). Estes dois genes apresentaram menor taxa de expressão no intestino médio onde houve expressão de apenas 1,6% de *Am_DRIP*, e 5,8% de *Am_PRIP* em relação ao quanto foi expresso nos túbulos de Malpighi.

O gene *Am_BIB* foi o que apresentou as menores taxas de expressão, atingindo um máximo de expressão relativa de 2,2 observada no íleo (Fig. 1D). Entre as regiões testadas, o intestino médio foi o que apresentou o menor nível de expressão relativa.

Os dados de expressão relativa indicaram que *Am_Eglp 1* foi o gene com maior expressão relativa, observado no intestino médio (Fig. 1A). Devido à abundância de *Am_Eglp 1*, este gene foi selecionado para ser utilizado nos demais testes deste trabalho.

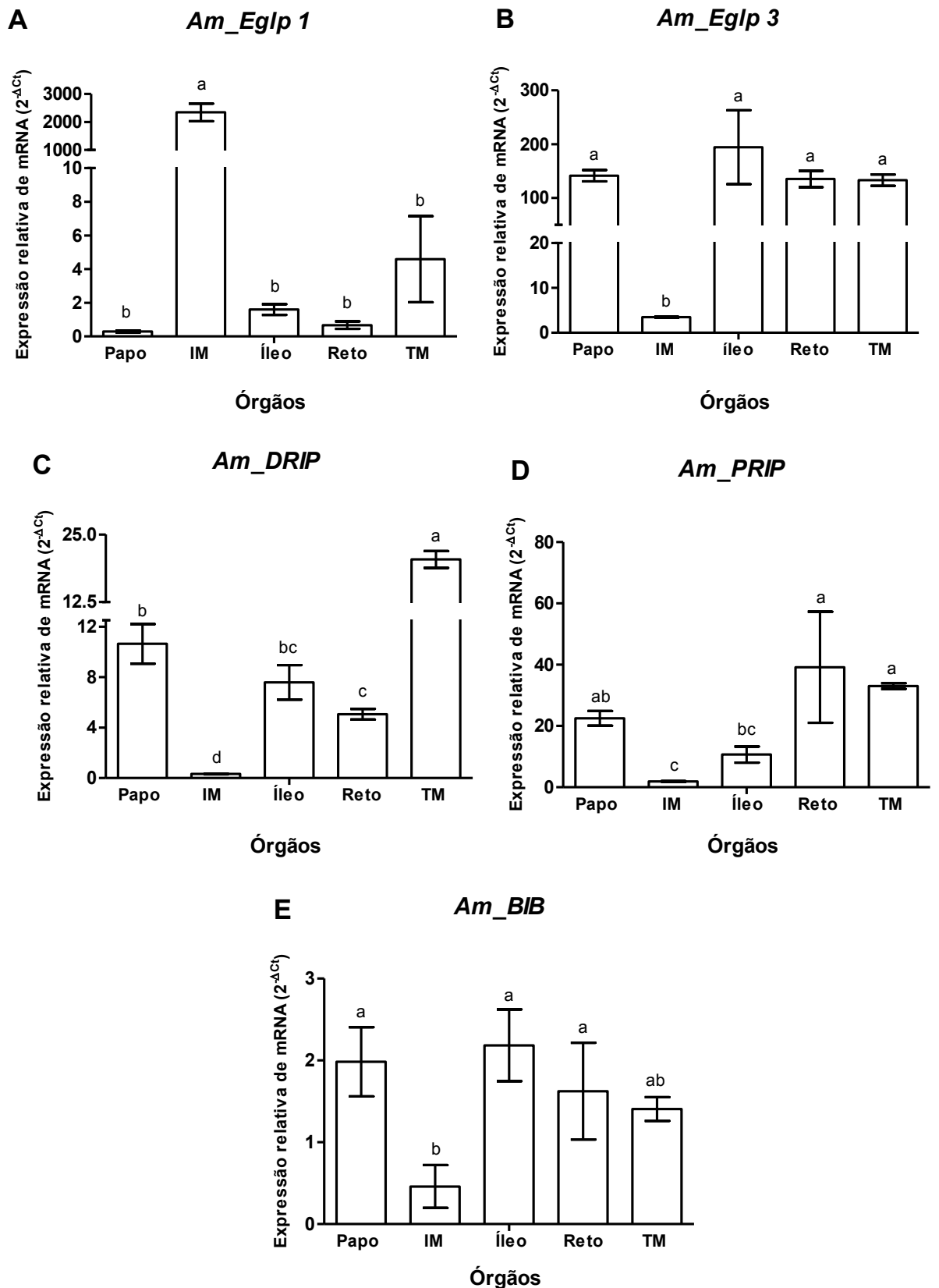


Figura 1: Expressão relativa de genes preditos de aquaporinas em órgãos do sistema digestório e túbulos de Malpighi de forrageiras de *A. mellifera*. **IM:** intestino médio; **TM:** túbulos de Malpighi. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras. Os valores se referem à média e as barras ao desvio padrão.

Hibridização *in situ*

O controle negativo não apresentou nenhuma marcação após o tratamento com solução de imidazol e após ser revelado com o sistema composto BCIP/NBT, que reage com fosfatase alcalina (Fig. 2A – C). Sendo assim, a inibição da fosfatase alcalina endógena foi realizada e, qualquer marcação encontrada nos demais testes, é resultado de hibridização da sonda específica de mRNA para *Am_Eglp 1*.

A sonda *sense* foi utilizada como controle (Fig. 2D – F). Na reação de hibridização utilizando sonda *sense*, onde houver marcação indica hibridização inespecífica, portanto tais resultados devem ser desconsiderados nos resultados observados para a sonda *antisense*. Nas amostras testadas com a sonda *sense* foram observadas apenas fracas marcações inespecíficas (Fig. 2D – F).

Todos os órgãos avaliados apresentaram marcação positiva para a sonda *antisense* (Fig. 2G – I), como esperado após os resultados de RT-qPCR. No papo foi observada marcação positiva no epitélio, mas não no bulbo do proventrículo (Fig. 2G). O intestino médio apresentou marcação positiva homogênea ao longo do tecido, demonstrando a expressão de mRNA para *Am_Eglp 1* em todo o órgão (Fig. 2G). As amostras do íleo e reto tiveram marcação positiva para a sonda. No íleo foram observados pontos de hibridização ao longo do tecido, abrangendo desde a porção anterior até a divisão com o reto. Já no reto, a marcação positiva foi observada no epitélio sendo que, nas papilas retais, não houve hibridização (Fig. 2H). Os túbulos de Malpighi apresentaram marcação positiva principalmente nas porções distais, porém alguns pontos de hibridização também foram observados ao longo de alguns túbulos, mas sem distribuição homogênea aparente (Fig. 2I).

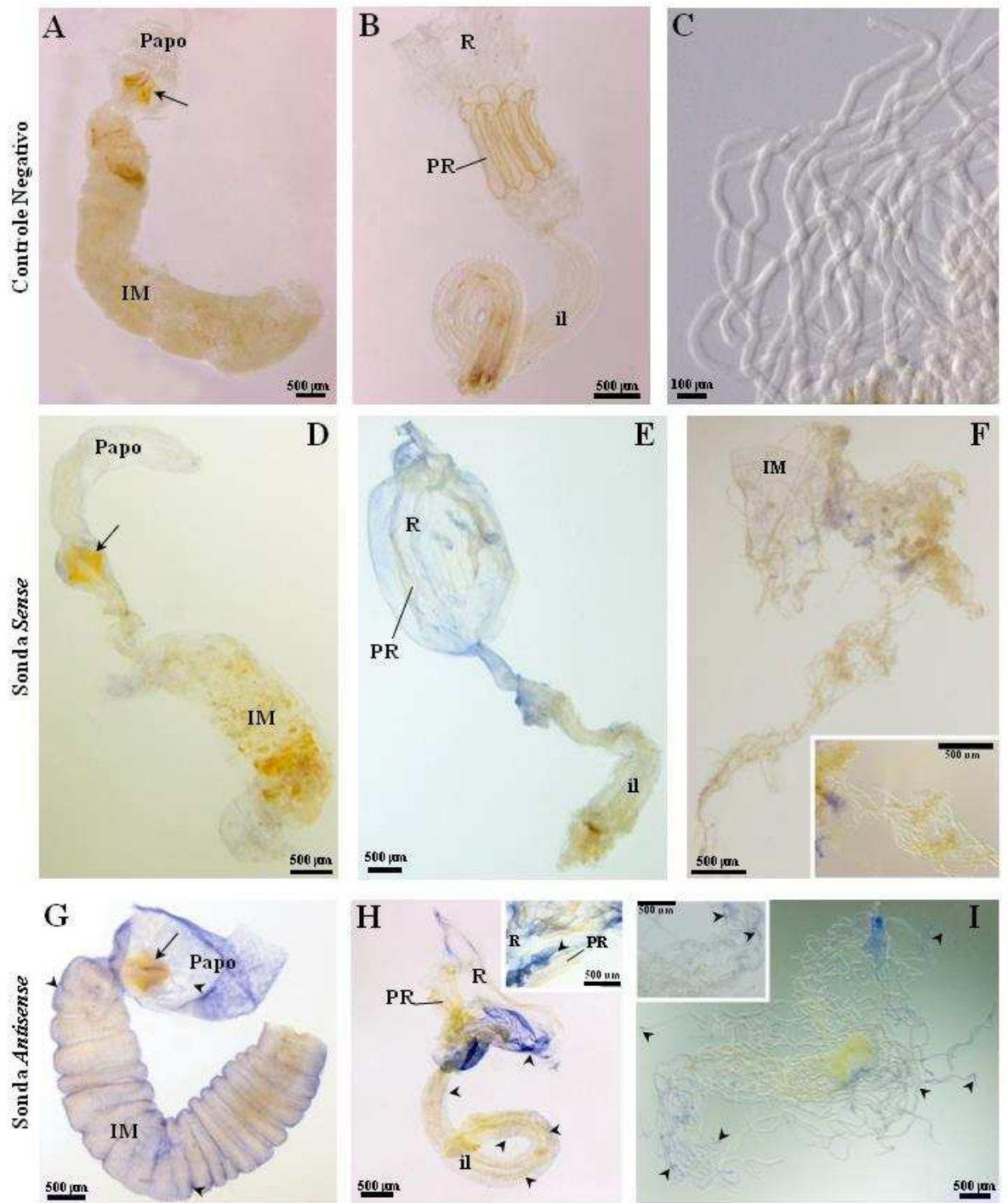


Figura 2: Montagem total de órgãos do sistema digestório e túbulos de Malpighi de forrageiras de *A. mellifera* submetidos à hibridização *in situ*. **A, D e G:** papo com proventrículo e intestino médio. **B, E e H:** íleo e reto, com papilas retais. **C, F e I:** túbulos de Malpighi. Detalhes em **F, H e I:** imagens em maior aumento da região representada – barras: 500 μm . **IM:** intestino médio; **il:** íleo; **R:** reto; **PR:** papilas retais. **Seta:** bulbo do proventrículo. **Cabeça de seta:** marcação positiva indicando hibridização da sonda de mRNA para *Am_Eglp 1*.

Caracterização da proteína predita Am_Eglp 1

A proteína predita Am_Eglp 1 apresenta 280 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 30 KDa, conforme os dados da plataforma NCBI. Na sequência de aminoácidos de Am_Eglp 1 foram observadas duas regiões de motivo NPA, uma iniciando na posição 76, e outra na posição 200 (Fig. 3). O segundo motivo NPA foi precedido por um resíduo de cisteína na posição 197, a dois aminoácidos de distância, indicando potencial bloqueio por mercúrio. Na comparação das sequências de aminoácidos, Am_Eglp 1 e Aquaporin 1 apresentaram o resíduo de cisteína na mesma distância do segundo motivo NPA, enquanto que em AQPcic e AQP4 a cisteína se encontra mais distante, a 12 e a 37 aminoácidos de distância do motivo NPA, respectivamente (Fig. 3). O perfil de hidrofobicidade, gerado pelo algoritmo de Kyte & Doolittle (1982), apontou para seis domínios hidrofóbicos transmembrana (numerados de 1 a 6), regiões amino-terminal e carboxi-terminal hidrofílicas, e cinco regiões hidrofílicas - *loops* (Fig. 4). O *loop* B está representado pela região entre os domínios 2 e 3, e o *loop* E entre os domínios 5 e 6, onde se encontram os motivos NPA, responsáveis pela formação do poro seletivo e transportador de água. O resíduo de cisteína que precede o segundo motivo NPA, que caracteriza o potencial bloqueio por mercúrio, foi indicado (Fig. 4 – cabeça de seta).

Ensaio de absorção de água

Os ovócitos de *X. laevis* injetados com cRNA de *Am_Eglp 1* absorveram água do meio hiposmótico, o que foi observado pelo aumento de tamanho dos ovócitos. Alguns ovócitos absorveram água tão rapidamente, demandando menos tempo do que o estabelecido para o experimento, resultando em rompimento da membrana e extravasamento do citoplasma para o meio. O teste também evidenciou que os controles, ovócitos injetados com água e ovócitos sem injeção, incharam minimamente, apresentando coeficiente de permeabilidade (Pf) menor que os ovócitos injetados com cRNA (Fig. 5A). Quando os ovócitos previamente incubados em solução de HgCl₂ foram submetidos ao teste, não houve influxo ou efluxo de água, sendo o resultado idêntico aos observados para os controles (Fig. 5A). A expressão da proteína Am_Eglp 1 na membrana dos ovócitos de *X. laevis* foi confirmada através de Western blot, que evidenciou marcação positiva contra a sequência myc-tag expressa juntamente com a aquaporina (Fig. 5B).

```

Am_Eglp1      MENDNQKSAWTI-----EKGTMTEIAEVIIGTGILLFIGC
Aquaporin 1  MASEFK-----KKLFWRAVVAEFLAMTLFVFISI
AQPcic       MAADKSVDNTKKIIGIDDIT-----DTKTIWRCLAAELIGTLLLVLIGT
AQP4         MSTNHQNGKDSHLPMPAEQAPSDVGKSNQSFGLGTGHNARDVMSIFLAEFSGTATLMFLGC

Am_Eglp1      MGSIG-----TMGPILPPPLQTSMAFGMTVNLLIMMLGHISGAHLNPAVTIGAVILGIK
Aquaporin 1  GSALGFNYPLERNQTLVQDNVKVSLAFGLSIATLAQSVGHISGAHLNPAVTILGLLSQQI
AQPcic       GSCTGVQI---SEGDVV---VRIALTGFIIATMVQCIGHVSGCHINPAVTCGLLVGTGHI
AQP4         MCCVT-----GFGN-TPTNVSGGIGFGFTVMMAITFGHVSGAHINPSVSI AALVYGLL

Am_Eglp1      TIPTGILYAIQAFIGATIGYGLLMTITPSELLNDGRSNVTIGHCVTVVHPGISITQAIIV
Aquaporin 1  SILRAVMYIIAQCVGAIVASAAILSGITSSLLEN-----SLGRNDLARGVNSGQGLGI
AQPcic       SILKAIFYIIIVQCVGAIAGSAILKVITPAEFRG-----TLCMTSLAPGVTPPMGFLV
AQP4         NVPMLILYLIAQFLGGLCGYGLLMAVTPMKYFTAAM-EIGNGACVTAPHDDLVSMEAFGV

Am_Eglp1      EILCTSFILCAACATWDPRCAHTTDS TAIRFGFSVVGVS LAASPYTGCSMNPARTFGPAF
Aquaporin 1  EIIGTLQLVLCVLATTD RRRRDLGGSAPLAIGLSVALGHLLAIDYTGCGINPARSFGSAV
AQPcic       EACITFVLILLVQSVCD RRRKNLGNAAPVAVGLAITCCHLAAIKYTGSSMNPARSFGPAV
AQP4         EFFVTGILVWTCCGLWDPRNSKMGE GTPVKFALIVAGISIAGGPYTGASMPARTLPPAV

Am_Eglp1      W-NGNWTNQWIYWFGPCAGAF LGTYIYVYLFAEKKENRNECLEFIELKAINDDANYSEKI
Aquaporin 1  L-TRNFSNHWIFWVGPF FIGSALAVLIYDFILAPRSSDFTD---RMKVWTSQVVEEYDLDA
AQPcic       NGDDNWANHWVYWAGPIVGGV VAGITYRALF--RARKPEE-----EASSYDF--
AQP4         W-NGSYKSIWIYFIAPPLAGM VMLIYKYVF--RREL PQDEQTAMVTKTPEEMKAHIVEQ

Am_Eglp1      NKKEENLEENLG
Aquaporin 1  DDINSRVE MKPK
AQPcic       -----
AQP4         NRF-----

```

Figura 3: Comparação das sequências de aminoácidos de aquaporinas de diferentes organismos e com diferentes sensibilidades ao mercúrio (HgCl₂). Am_Eglp 1: entomogliceroporina de *A. mellifera*; Aquaporin 1: aquaporina de mamífero; AQPcic: aquaporina de *C. viridis*; AQP4: aquaporina de *A. aegypti*. Demarcação cinza: aminoácidos conservados entre as sequências das aquaporinas comparado à Am_Eglp 1. Motivos NPA estão destacados com retângulo. **C:** Resíduos de cisteína anterior ao segundo motivo NPA.

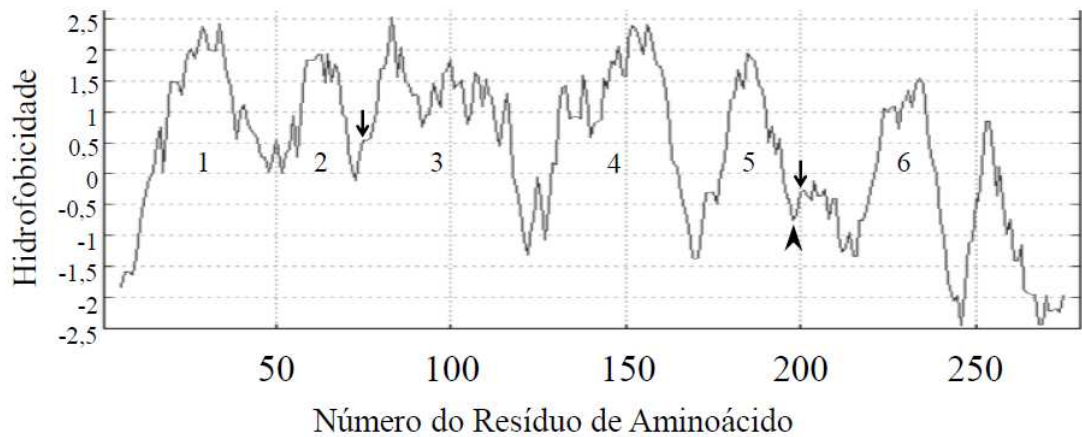


Figura 4: Perfil de hidrofobicidade de Am_Eglp 1. Acima da linha do 0 são representadas as seqüências de aminoácidos com características hidrofóbicas, e abaixo da linha do 0 as com características hidrofílicas. Números de 1 a 6: domínios transmembrana. Linha anterior ao domínio 1: região aminoterminal. Linha posterior ao domínio 6: região carboxi-terminal. Cabeça de seta: posição do resíduo de cisteína anterior ao segundo motivo NPA. Seta: início dos motivos NPA.

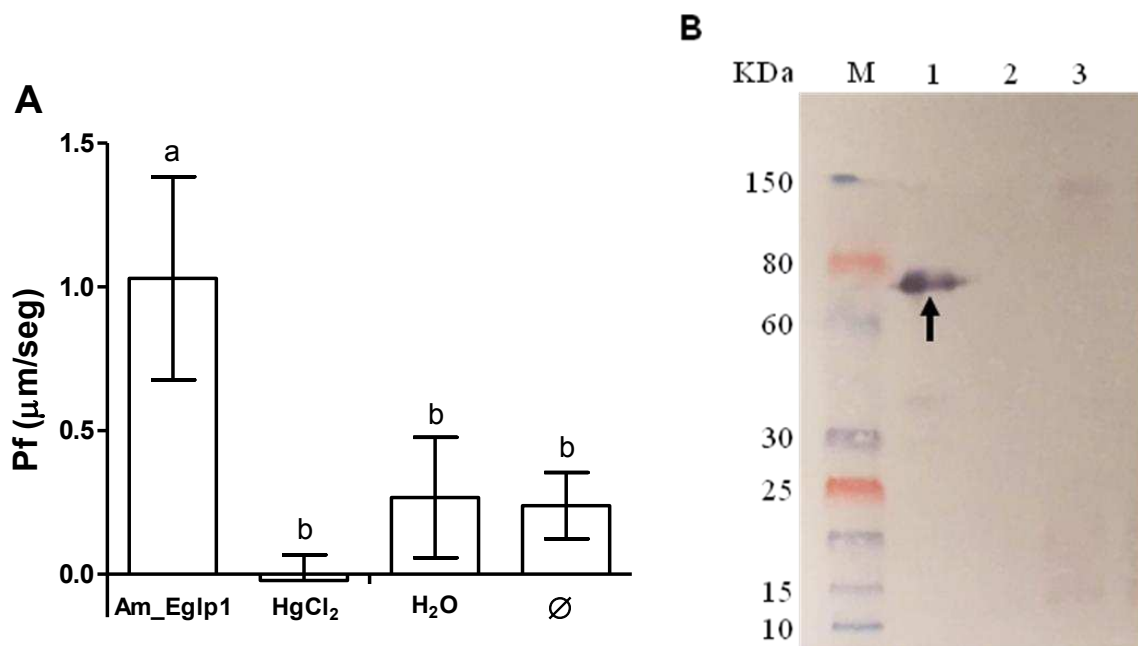


Figura 5: **A:** Análise do coeficiente de permeabilidade em ovócitos de *X. laevis* expressando Am_Eglp 1 e submetidos ao ensaio de absorção de água. Os valores se referem às médias e as barras ao desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$). Am_Eglp 1: ovócitos injetados com cRNA para a aquaporina de *A. mellifera*. HgCl₂: ovócitos injetados com cRNA para a Am_Eglp 1 e expostos ao mercúrio antes do teste de absorção de água. H₂O: ovócito injetado com água. ∅: ovócito sem injeção. **B:** Análise de Western Blot de lisados das membranas dos ovócitos, utilizando anticorpo secundário anti Myc-tag. M: marcador de peso molecular. Canaleta 1: ovócitos injetados com cRNA para Am_Eglp 1. Canaleta 2: ovócitos injetados com água. Canaleta 3: ovócitos sem injeção.

DISCUSSÃO

O perfil de expressão das aquaporinas no sistema digestório e túbulos de Malpighi de *A. mellifera* foi variável, dependendo do órgão, logo se supõe que nas abelhas as aquaporinas são distribuídas dependendo da especificidade de expressão nos tecidos e membranas. Como observado para outros insetos, mais de uma aquaporina pode ser expressa no mesmo organismo e ou mais de uma aquaporina pode ser expressa numa mesma célula (Duchesne et al., 2003; Kataoka et al., 2009; Azuma et al., 2012). Esta redundância de expressão é uma característica comum nos insetos, sendo que as aquaporinas podem transportar apenas água ou até mesmo diferentes moléculas através das membranas, como o glicerol, ureia, entre outras (Kataoka et al., 2009; Azuma et al., 2012; Drake et al., 2015). A expressão de mais de um tipo de aquaporina nas células confere vantagens aos indivíduos inclusive caso ocorra inibição de uma das proteínas, por exemplo, evitando maiores danos já que existem outras aquaporinas para suprir a função (Drake et al., 2010, Herraiz et al., 2011). A redundância na expressão de aquaporinas nas regiões do sistema digestório e túbulos de Malpighi de *A. mellifera* sugere que as diferentes aquaporinas podem atuar simultaneamente ou suprir a função uma da outra nas abelhas.

A expressão de aquaporinas no intestino médio de *A. mellifera*, em especial *Am_Eglp 1*, sugere que estas proteínas atuem no transporte de água em conjunto com as características celulares da região, como invaginações da membrana basal e a presença de diversas mitocôndrias associadas (Serrão et al., 2008). As abelhas forrageiras consomem principalmente néctar (Brodschneider & Crailsheim, 2012), alimento diluído no qual a composição chega até a 90% de água, sendo que o excesso de água necessita ser eliminada do organismo (Nicolson, 1998), evitando a diluição das enzimas digestivas (Douglas et al., 2006). Insetos cuja dieta baseada em alimentos diluídos, como *C. viridis* que se alimenta de seiva, apresentam modificações morfológicas e estruturais que favorecem a eliminação rápida da água, evitando o estresse osmótico (Le Cahérec et al., 1997). Nesses insetos é observada a presença da câmara filtro, região de aproximação entre o intestino médio anterior, intestino médio posterior e túbulos de Malpighi, além da expressão de aquaporinas na membrana basal e em vesículas intracelulares, que aumenta ainda mais a velocidade do transporte de água (Le Cahérec et al., 1997). As abelhas não

apresentam modificações no sistema digestório e túbulos de Malpighi, como em *C. viridis*, porém as aquaporinas e características celulares são suficientes para eliminar o excesso de água da dieta, favorecendo a manutenção da digestão e da osmorregulação.

Além da expressão de *Am_Eglp 1* observada no intestino médio, a hibridização *in situ* confirmou a presença de mRNA para *Am_Eglp 1* nos demais órgãos do sistema digestório e nos túbulos de Malpighi. No papo foi observada hibridização no epitélio, onde *Am_Eglp 1* pode atuar juntamente com outras aquaporinas. *Am_DRIP* foi previamente demonstrada na membrana apical e em vesículas intracelulares do epitélio do papo (Serrão et al., 2014). No bulbo do proventrículo, região altamente esclerotizada em diversas espécies de abelhas, incluindo *A. mellifera* (Serrão, 2001), a hibridização foi negativa, indicando que esta região é impermeável à água, ou que pelo menos *Am_Eglp 1* não atua no processo de transporte de água nesta região. Esses resultados indicam que *Am_Eglp 1* atua no transporte de água pelo epitélio do papo, mas não pelo bulbo do proventrículo. As papilas retais promovem reabsorção de água do conteúdo mantido no reto de *A. mellifera* e demais espécies que as apresentam, e são formadas por células com características histológicas de absorção, como invaginações associadas a mitocôndrias (Santos et al., 2009; Chapman, 2013). A ausência de hibridização do mRNA para *Am_Eglp 1* nas células das papilas retais indica que *Am_Eglp 1* não está envolvida no transporte de água nestas células, porém não exclui a possibilidade de outras aquaporinas realizarem esta função. A hibridização *in situ* evidenciou marcação positiva de mRNA para *Am_Eglp 1* restrita ao epitélio do reto. Estes dados sugerem que *Am_Eglp 1* atua no processo de transporte de água pelas células do epitélio do reto, visto que o epitélio é composto por células achatadas e sem atributos relacionados à absorção (Santos et al., 2009).

Aquaporinas do grupo DRIP e PRIP são comumente encontradas nos túbulos de Malpighi e intestino posterior de insetos (Spring et al., 2007; Kataoka et al., 2009; Drake et al., 2010). Os túbulos de Malpighi, associados ao íleo e reto, compõem o sistema excretor e osmoregulador, sendo os túbulos de Malpighi responsáveis pela filtragem da hemolinfa, originando a urina primária, enquanto o íleo e reto participam da reabsorção do material e finalização da formação das excretas (revisado por: Beyenbach, 2003; Nocelli et al, 2016). Em abelhas, características histológicas do epitélio dos túbulos de Malpighi e do íleo, incluindo

microvilosidades na face luminal, extensas invaginações na região basal e associação de mitocôndrias em ambas as regiões (Gonçalves et al., 2014), apontam para atividade absorptiva. Nossos resultados mostraram a expressão dos genes *Am_DRIP* e *Am_PRIP* nos túbulos de Malpighi e intestino posterior, onde estas proteínas são conhecidas por aumentar a velocidade do transporte de água, auxiliando a formação da urina primária e na manutenção da osmoregulação pela reciclagem de água do intestino posterior para a hemolinfa (Azuma et al., 2012).

No entanto, a expressão de DRIP e PRIP não se restringe ao sistema excretor. Serrão et al. (2014) demonstraram a presença de aquaporina do grupo DRIP no papo de abelhas, e relacionaram o início da conversão do néctar em mel, por desidratação, à aquaporina. Os resultados aqui apresentados confirmaram a expressão de todas as aquaporinas testadas, incluindo *Am_DRIP* e *Am_Eglp 1*. Apesar de o papo ter sido considerado impermeável (Snodgrass, 1956), há evidências de que ocorra transporte de água via aquaporina pelo epitélio. O transporte pode ser facilitado por *Am_DRIP*, *Am_PRIP* ou ainda por *Am_Eglp 1*, cuja funcionalidade foi confirmada neste estudo.

As aquaporinas do grupo BIB foram descobertas e descritas em processos de desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*, sendo que sua expressão diminui ao longo da vida dos insetos (Rao et al., 1990; Doherty et al., 1997). Como este trabalho avaliou apenas adultos de *A. mellifera*, o baixo valor de expressão relativa de *Am_BIB*, comparado aos demais genes preditos, era um resultado esperado, ainda que observada a expressão em todas as regiões avaliadas. Apesar de aquaporinas serem conhecidas pelo transporte de moléculas de água, as proteínas do grupo BIB foram previamente descritas como transportadoras de cátions, incapazes de transportar moléculas de água (Yanochko & Yool, 2002). Porém, foi demonstrado que esta proteína não está relacionada ao transporte, mas atua na adesão célula a célula (Tatsumi et al., 2009). Sendo assim, é razoável concluir que a presença de BIB nas células do sistema digestório e túbulos de Malpighi, juntamente com outras modificações como junções celulares (Serrão et al., 2008), participe da manutenção da integridade e funcionalidade dos tecidos ao promover a adesão celular.

O gene *Am_Eglp 3* apresentou maior expressão relativa no papo, íleo, reto e túbulos de Malpighi, mas ainda houve expressão das outras aquaporinas preditas nestes órgãos. Esses dados sugerem que, apesar da expressão de diferentes tipos de aquaporinas, *Am_Eglp 3* pode ser a proteína que mais participa do transporte de água pelas membranas destas regiões. Assim como *Am_Eglp 1*, a *Am_Eglp 3* é

classificada como entomogliceroporina (Finn et al., 2015) e a expressão de diferentes aquaporinas, inclusive de mesma classificação, é uma característica comum nos insetos, dependendo apenas do tipo de tecido onde ocorre a expressão (Le Cahérec et al., 1997; Duchesne et al., 2003; Azuma et al., 2012).

Aquaporinas podem ter sua atividade de transporte de água bloqueada por moléculas de mercúrio dependendo da distância do resíduo de cisteína em relação ao segundo motivo NPA, como ocorre em Aquaporin 1, onde a cisteína se encontra a dois aminoácidos de distância (Preston et al., 1993; Le Cahérec et al., 1996). AQPcic de *C. viridis* apresenta baixa sensibilidade ao mercúrio, e AQP4 de *A. aegypti* não exibe nenhuma sensibilidade (Le Cahérec et al., 1996; Drake et al., 2010), pois os resíduos de cisteína nestas aquaporinas estão mais afastados do segundo motivo NPA, em comparação à Aquaporin 1. A comparação entre as sequências dos aminoácidos das aquaporinas indica que Am_Eglp 1 tem potencial para bloqueio por mercúrio, pois em Am_Eglp 1 a cisteína está a apenas 2 aminoácidos de distância do segundo motivo NPA. Além disso, o teste de hidrofobicidade revelou que Am_Eglp 1 apresenta similaridades ao perfil de outras aquaporinas comprovadamente funcionais (Jung et al., 1994; Le Cahérec et al., 1996, Pienkowska et al., 2014). Portanto, a sequência dos aminoácidos, junto ao perfil de hidrofobicidade, indicam que Am_Eglp 1 é uma aquaporina funcional, como demonstrado neste trabalho.

A expressão heteróloga de Am_Eglp 1 em ovócitos de *X. laevis* seguida do ensaio de absorção de água confirmou a funcionalidade da aquaporina prevista, pela sequência de aminoácidos e pelo teste de hidrofobicidade da proteína. Nossos testes demonstraram que *Am_Eglp 1* codifica para uma proteína funcional, responsável pelo transporte de água, além de ser sensível ao mercúrio, como diversas aquaporinas de insetos (Le Cahérec et al., 1997; Kataoka et al., 2009; Azuma et al., 2012; Drake et al., 2015). No entanto, se esta proteína transporta pequenos solutos, como glicerol e ureia, permanece sem esclarecimento e futuros testes são necessários para uma caracterização completa de Am_Eglp 1.

Em conclusão, este trabalho demonstrou a ocorrência de diversas aquaporinas no sistema digestório e túbulos de Malpighi de *A. mellifera*, sendo mRNA para *Am_Eglp 1* localizado em todos os órgãos, com exceção do bulbo do proventrículo e das papilas retais. A aquaporina Am_Eglp 1, classificada como entomogliceroporina, e até então uma proteína predita, foi funcionalmente testada e comprovada sua função de transportadora de água, sendo sensível ao mercúrio. Esta foi a primeira

aquaporina de abelhas testada funcionalmente. Apesar dos avanços nas pesquisas, ainda não se conhece a importância fisiológica dessas proteínas para as abelhas. Estes dados servem de incentivo para futuros estudos, como testes via *knockdown* ou silenciamento que podem esclarecer sobre a relevância de Am_Eglp 1 e demais aquaporinas para as abelhas.

REFERÊNCIAS

Azuma M, Nagae T, Maruyama M, Kataoka N, Miyaki S (2012) Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. **J Insect Physiol** 58:523-533

Beyenbach KW (2003) Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. **J Exp Biol** 206:3845-3856

Brodtschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. **Apidologie** 41:278-294

Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS (2008) Invertebrate aquaporins: a review. **J Comp Physiol B** 178:935-955

Chapman RF (2013) The insects: structure and function. Cambridge University Press, Fifth edition, Cambridge, UK

Cruz-Landim C (1985) Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. **Anais Acad Ciencias Est São Paulo** 44:28-49

Dearden PK, Duncan EJ, Wilson MJ (2009) Whole-mount *in situ* hybridization of honeybee (*Apis mellifera*) tissues. **Cold Spring Harb Protoc** 4(6)

Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. **J Biol Chem** 263:15634-15642

Doherty D, Jan LY, Jan YN (1997) The *Drosophila* neurogenic gene *big brain*, which encodes a membrane-associated protein, acts cell autonomously and can act synergistically with notch and delta. **Development** 124:3881-3893

Douglas AE (2006) Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. **J Exp Bot** 57:747-754

Drake LL, Boudko DY, Marinotti O, Carpenter VK, Dawe AL, Hansen IA (2010) The aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE** 5(12) e15578

Drake LL, Rodriguez SD, Hansen IA (2015) Functional characterization of AQPs and AQGIPs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Sci Rep-UK** 5:7795

Duchesne L, Hubert JF, Verbavatz JM, Thomas D, Pietrantonio PV (2003) Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin, present in tracheolar cells, transports water, not glycerol, and forms orthogonal arrays in *Xenopus* oocyte membranes. **Eur J Biochem/FEBS** 270:422–429

Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, de Graaf DC, et al (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. **BMC Genomics** 15(86):1-29

Finn RN, Chauvigné F, Stavang JA, Belles X, Cerdà J (2015) Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement. **Nat Commun** 6:7814

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607

Gonçalves WG, Fialho MCQ, Azevedo DO, Zancunio JC, Serrão JE (2014) Ultrastructure of the excretory organs of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini): Bee without rectal pads. **Microsc Microanal** 20:285-295

Gorin MB, Yancey B, Cline J, Revel JP, Horwitz J (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. **Cell** 39:49-59

Herraiz A, Chauvigné F, Cerdà J, Bellés X, Piulachs MD (2011) Identification and functional characterization of an ovarian aquaporin from the cockroach *Blattella germanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae). **J Exp Biol** 214:3630-3638

Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP—the hourglass model. **J Biol Chem** 269:14648–14654

Kataoka N, Miyake S, Azuma M (2009) Aquaporin and aquaglyceroporin in silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. **Insect Mol Biol** 18(3):303-314

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol** 157:105-132

Le Cahérec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnac G, Guillam MT, Thomas D, et al (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin. Functional comparison with aquaporin 1. **Eur J Biochem** 241:707-715

Le Cahérec F, Guillam MT, Beuron F, Cavalier A, Thomas D, Gouranton J, Hubert JF (1997) Aquaporin-related proteins in the filter chamber of homopteran insects. **Cell Tiss Res** 290:143-151

Liu K, Tsujimoto H, Cha SJ, Agre P, Rasgon JL (2011) Aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* during blood feeding and humidity adaptation. **Proc Natl Acad Sci USA** 108:6062–6066

Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie** 39:372-385

Maurizio A (1975) A comprehensive survey. In: Crane E. (ed) Honey. Heinemann, London pp. 75-105

Nicolson SW (1998) The importance of osmosis in nectar secretion and its consumption by insects. **Amer Zool** 38:418-425

Nocelli RCF, Cintra-Socolowski P, Roat TC, Silva-Zacarin ECM, Malaspina O (2016) Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Open Access Insect Physiology** 6:13-23

Oddo LP, Piazza MG, Pulcini P (1999) Invertase activity in honey. **Apidologie** 30:57-65

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Res** 29(9):2002-2007

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acid Res** 30(9):1-10

Philip BN, Kiss AJ, Lee RE Jr (2011) The protective role of aquaporins in the freeze-tolerant insect *Eurosta solidaginis*: functional characterization and tissue abundance of EsAQP1. **J Exp Biol** 214:848-857

Pienkowska JR, Kosicka E, Wojtkowska M, Kmita H, Lesicki A (2014) Molecular identification of first putative aquaporins in snails. **J Membrane Biol** 247:239-252

Preston GM, Agre P (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. **Proc Nat Sci** 88:11110-11114

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. **Science** 256:385-387

Preston GM, Guggino WB, Agre P (1993) The mercury sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. **J Biol Chem** 268:17-20

Rao Y, Lan LY, Jan YN (1990) Similarity of the product of the *Drosophila* neurogenic gene *big brain* to transmembrane channel proteins. **Nature** 345:163-167

Santos CG, Neves CA, Zanuncio JC, Serrão JE (2009) Postembryonic development of rectal pads in bees (Hymenoptera, Apidae). **Anat Record** 292:1602-1611

Serrão JE (2001) A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). **Micron** 32:379-385

Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) Scanning electronic microscopy of the proventriculus in stingless bees (Apidae: Meliponinae) with a comparison of necrophagous and feeding pollen workers. **Naturalia** 20: 207-212

Serrão JE, Fialho MCQ, Azevedo DO, Zanuncio JC (2014) Aquaporins in the honey bee crop- A new function for an old organ. **Protoplasma** 251:1441–1447

Serrão JE, Ronnau M, Neves AC, Campos LAO, Zanuncio JC (2008) Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera; Apidae). **Ann Ent Soc Am** 101:915-921

Smith BL, Agre P (1991) Erythrocyte Mr-28.000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. **J Biol Chem** 266:6407–6415

Snodgrass R (1956) Anatomy of the honey bee. Cornell University Press, Ithaca

Spring JH, Robichaux SR, Kaufmann N, Brodsky JL (2007) Localization of a *Drosophila*-like aquaporin in the Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*. **Comp Biochem Physiol A** 148:92-100

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol** 30:2725-2729

Tatsumi K, Tsuji S, Miwa H, Morisaku T, Nuriya M, Orihara M, Kaneko K, et al (2009) *Drosophila* big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. **FEBS Lett** 583:2077-2082

Tomkowiak E, Pienkowska JR (2010) The current knowledge of invertebrate aquaporin water channels with particular emphasis on insect AQPS. **Adv Cell Biol** 2:90-103

Yanochko GM, Yool AJ (2002) Regulated cationic channel function in *Xenopus* oocytes expressing *Drosophila* Big Brain. **J Neurosci** 22(7):2530-2540