

DÉBORA LINHARES LINO DE SOUZA

**EXPRESSÃO DO GENE *aqp-4-like* NO TRATO DIGESTÓRIO DE
OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação 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 Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

T

S729e Souza, Débora Linhares Lino de, 1987-
2014 Expressão do gene aqp-4-like no trato digestório de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / Débora Linhares Lino de Souza. - Viçosa, MG, 2014.
vii, 35f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.26-35.

1. Abelha. 2. Aquaporina. 3. Proteínas. 4. Fisiologia. 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

Aos meus pais,
Maria da Conceição e José Pedro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de aprendizado e pela possibilidade de realização da pesquisa. À Beth, que sempre me ajudou com o que fosse necessário. A todos os professores com quem tive contato e que me transmitiram seus conhecimentos, e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço em especial ao meu orientador, José Eduardo Serrão, pela disposição de me ensinar desde 2008, pela inspiração na pesquisa, apoio acadêmico e por todas as lições. Muito obrigada pelos conselhos, críticas e comentários, e principalmente por fazer com excelência seu papel de orientador, me acalmando quando o desespero batia à porta e me incentivando sempre.

Aos meus colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular que se tornaram grandes amigos nessa jornada. Obrigada pela ajuda na procura e interpretação de artigos, na hora de ir para a bancada, e pelos momentos de descontração. Em especial, agradeço ao Dihego pelos ensinamentos teórico e prático, pela disposição e pelo trabalho conjunto, não me deixando desistir mesmo que o desânimo tenha surgido várias vezes.

Ao Luis Carlos e ao Murilo que me deram suporte na pesquisa, esclarecendo dúvidas de um modo que eu não encontraria em nenhuma bibliografia.

Agradeço ao José Luiz Monteiro, que esteve sempre à disposição quando era preciso de um reagente ou de um café para manter o ritmo de trabalho. E à Renata, pelo esforço de me ajudar com seus conhecimentos e pelo incentivo.

Ao professor Weyder Cristiano Santana e aos técnicos do Apiário Central da UFV, que possibilitaram a minha pesquisa com as abelhas. Em especial agradeço ao Lulu, pela prosa e pelas horas que passou “pintando” as abelhas comigo. Sem sua ajuda com certeza eu não teria conseguido.

Devo agradecer também às próprias abelhas, que foram meu objeto de estudo, e que se comportaram tão bem, exceto quando foram embora sem nem me dar tchau e pelas ferroadas.

Ao Laboratório de Imunovirologia Molecular, em especial ao professor Sérgio de Paula, à Michele e Roberto, que me receberam e auxiliaram nos experimentos, disponibilizando muitas horas de trabalho. Muito obrigada.

Aos meus amigos de Viçosa que conseguiram me aguentar por mais dois anos de altos e baixos, de calma e correria, meu muito obrigada por tudo!! E aos meus amigos originalmente de BH, agradeço pelas conversas e peço desculpas pela ausência. Sem vocês tudo seria muito mais difícil!

Ao Artur por ter cuidado de mim todas as vezes que estive convalescente, por ter me apoiado sempre que precisei e principalmente pela paciência.

À minha família que sempre me deu apoio, mesmo que à distância. Agradeço pela paciência e compreensão, a saudade foi sempre imensa.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
MATERIAL BIOLÓGICO.....	12
EXTRAÇÃO DE RNA	13
SÍNTESE DE CDNA	14
TESTE DE VIABILIDADE DOS PRIMERS	14
PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR).....	15
ANÁLISE DOS DADOS	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

SOUZA, Débora Linhares Lino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Expressão do gene aqp-4-like no trato digestório de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)** Orientador: José Eduardo Serrão.

O polietismo etário das operárias de *Apis mellifera* está relacionado a alterações morfofisiológicas de diversos sistemas, incluindo o sistema digestório, e à mudança da dieta das abelhas, sendo que operárias mais jovens consomem principalmente pólen e as mais velhas mel. As aquaporinas são proteínas de membrana identificadas em diferentes órgãos do trato digestório de insetos e são responsáveis pelo transporte transmembrana de água. Este trabalho avaliou se há diferença na expressão de aqp-4-like, um gene para aquaporina de *A. mellifera*, entre abelhas nutridoras e campeiras. Os túbulos de Malpighi, papo, intestino médio, intestino fino e reto de operárias exercendo diferentes funções foram utilizados na realização de qPCR. Os resultados demonstraram que em abelhas nutridoras houve maior expressão de mRNA para aqp-4-like nos túbulos de Malpighi e no intestino fino, enquanto que nas campeiras ocorreu maior expressão no papo e reto. O intestino médio foi o único órgão que não apresentou diferença de expressão entre nutridoras e campeiras, mas foi o órgão com maior expressão de aqp-4-like quando comparado aos túbulos de Malpighi. Estes dados mostram que a AQP-4-like é diferencialmente expressa em vários órgãos do trato digestório de operárias nutridoras e campeiras devido às diferentes dietas e fisiologia. A expressão diferencial do gene está relacionada à osmorregulação nos túbulos de Malpighi, intestino fino e reto. A desidratação do alimento no papo e intestino médio por esta aquaporina evita a diluição de enzimas digestivas, garantindo a realização da digestão.

ABSTRACT

SOUZA, Débora Linhares Lino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2014. **Expression of the gene aqp-4-like in the digestive system of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) workers.** Adviser: José Eduardo Serrão.

The age polyethism of *Apis mellifera* workers is related to morphological and physiological changes in many systems, including the digestive system, and to diet change of the bees, younger workers consuming mainly pollen and older bees consuming honey. The aquaporins are membrane proteins that have been identified in different organs of the digestive tract of insects and are responsible for transmembrane transport of water. This study evaluated whether there are differences in the expression of aqp-4-like, a gene for aquaporin in *A. mellifera* bees between nurses and foragers workers. The Malpighian tubules, crop, midgut, ileum and rectum of workers with different tasks were used to perform qPCR. The results showed that in nurse bees aqp-4-like mRNA was greater expressed in Malpighian tubules and ileum, while in the forager the highest expression occurred in the crop and rectum. The midgut was the only organ that showed no difference in expression between nurses and foragers, but it was the organ with the highest expression of aqp-4-like compared to the Malpighian tubules. These data show that AQP-4-like is differentially expressed in various organs of the digestive tract of nurses and foragers workers due to its different diets and physiology. The differential expression of the gene is related to osmoregulation in the Malpighian tubules, ileum and rectum. Also, the dehydration of the food content in the crop and midgut by this aquaporin avoids the digestive enzymes dilution, ensuring the completion of digestion.

INTRODUÇÃO

As abelhas eusociais, como *Apis mellifera*, apresentam níveis de organização social diferenciado, comportamentos elaborados dentro da colônia e divisão de trabalho associada à idade, denominado polietismo etário (Michener, 1974). Esta última característica garante o funcionamento eficiente da colônia uma vez que abelhas de idades diferentes realizam funções distintas. As abelhas mais jovens realizam tarefas dentro da colônia como limpeza, recebimento e processamento de mel. As operárias jovens que alimentam as larvas são denominadas nutridoras. As operárias campeiras ou forrageiras são mais velhas e são responsáveis por saírem do ninho para coleta de diferentes recursos, como néctar e pólen (Michener, 1974; Seeley, 1995; Johnson, 2010).

Abelhas de mesma idade que se especializam numa função por um período são enquadradas dentro de castas temporais. Geralmente são descritas quatro castas temporais divididas pelo intervalo de idade das operárias, grupo I: 0-2 dias; grupo II: 2-11 dias; grupo III: 11-20 dias; e grupo IV: > 20 dias (Seeley, 1982). As operárias do grupo I são responsáveis exclusivamente pela limpeza dos favos nos quadros que compõem a colônia. Abelhas do grupo II podem realizar limpeza dos favos, alimentar as larvas, lacrar os favos que contêm as larvas e auxiliar a rainha. As operárias do grupo II e III podem sobrepôr tarefas como auxiliar e alimentar as companheiras de colônia, modelagem dos favos e ventilação do ninho (Oster & Wilson 1978; Seeley, 1982). As operárias nutridoras estão no grupo II das castas temporárias e são distinguidas das abelhas do grupo III por alimentar as larvas (Johnson, 2008). Além disso, as operárias do grupo III recebem e estocam o néctar e guardam o pólen. Por último, as abelhas do grupo IV são as que saem do ninho para o forrageamento (Oster & Wilson 1978; Seeley, 1982).

Pela observação do local de atuação da operária dentro da colônia, é possível identificar qual função está sendo realizada pela abelha. As operárias mais jovens ocupam a região central e seus arredores (grupos I e II das castas temporais), as de idade intermediária (grupos II e III) se encontram nos arredores da região central e na periferia dos quadros, e as abelhas mais velhas (grupo IV) atuam apenas no exterior da colônia. (Seeley, 1982).

O envelhecimento das abelhas gera alterações morfológicas e fisiológicas que influenciam na mudança de tarefa realizada pelas operárias na colônia, como o aumento nos níveis do hormônio juvenil e a atrofia da glândula hipofaríngea nas abelhas nutridoras que estimulam sua mudança para a próxima casta temporal (Johnson, 2010). A divisão de trabalho de acordo com a idade é relativamente flexível, sendo que algumas operárias podem ser realocadas entre as funções dependendo da condição e necessidade da colônia. Por exemplo, nos períodos em que os recursos são abundantes, ocorre uma rápida transição de função das abelhas mais jovens, que trabalham dentro do ninho, para forrageira, ou então quando a população de forrageiras diminui drasticamente as mais jovens devem substituí-las na função (Huang & Robinson, 1992, 1996; Johnson, 2003). As alterações advindas do envelhecimento são difíceis de reverter, podendo impedir que abelhas mais velhas voltem a realizar as tarefas de abelhas mais jovens (Michener, 1974; Seeley, 1995; Nelson et al., 2007). Porém já foi observado que em colônias que tiveram as operárias nutridoras removidas, algumas forrageiras foram capazes de readquirir as funções das nutridoras (Huang & Robinson, 1992, 1996).

O envelhecimento das operárias de *A. mellifera* causa alterações em outros órgãos além das glândulas. No intestino médio de diferentes espécies de abelhas

sem ferrão foi descrito que as células digestivas apresentam citoplasma desorganizado e com maior número de vacúolos autofágicos à medida que a abelha passa de nutridora para campeira (Serrão & Cruz-Landim, 1995). Além disso, as operárias consomem mais pólen quando realizam função de nutridora e mais néctar quando são forrageiras (Serrão & Cruz-Landim, 1995). Esta diferença de nutrientes da dieta também está relacionada com mudanças morfológicas e fisiológicas do trato digestório, onde a diminuição do consumo de proteínas pelas abelhas mais velhas promove alteração na produção enzimática e na morfologia das células do intestino médio (Jimenez & Gilliam, 1989).

Nas abelhas, como nos outros insetos, o trato digestório é dividido morfológicamente em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior ou fino (Snodgrass, 1956; Raes & Verbeke, 1994; Cruz-Landim, 2008). O intestino anterior tem como principal função armazenar e algumas vezes fragmentar alimentos antes que estes cheguem ao intestino médio. O intestino médio está relacionado à digestão e absorção de nutrientes, sendo o sítio primário da síntese de enzimas digestivas. O intestino posterior está envolvido na excreção, além de atuar no equilíbrio osmótico do organismo, principalmente por atuação conjunta com os túbulos de Malpighi (Chapman, 1969).

No intestino anterior das abelhas, encontra-se o papo, uma região dilatada responsável pelo armazenamento do alimento e que apresenta a forma de um saco colapsado quando vazio e pode se distender quando cheio (Snodgrass, 1956; Cruz Landim, 2008). Este compartimento é utilizado para armazenar e transportar o néctar coletado das flores até a colônia, onde será convertido e estocado como mel, após processos de desidratação e digestão (Snodgrass, 1956; Maurizio, 1975; Leta et al., 1996; Oddo et al., 1999; Roces & Blatt, 1999). Tem sido reportado que

no papo das abelhas não ocorre absorção devido aos tipos celulares formadores do epitélio e da cutícula que reveste o órgão internamente (Cruz-Landim, 1985). As substâncias armazenadas nesta região só podem sofrer modificações físicas, uma vez que o intestino anterior é desprovido da capacidade de secretar enzimas (Cruz-Landim, 2008). Qualquer modificação química, que ocorra no conteúdo presente no papo, é devida à produção de enzimas pelas glândulas da cabeça da abelha. O pólen não sofre nenhuma forma de digestão até este ponto do trato digestório, pois não há produção de enzimas proteolíticas pelas glândulas salivar e hipofaríngea (Cruz-Landim, 2008).

Embora não ocorra digestão no papo, o alimento presente no órgão pode sofrer perda de água ou de solutos. Para que este processo ocorra é necessário que a água ou os solutos atravessem as células epiteliais, o que pode ser facilitado pela presença de proteínas de membrana, como as aquaporinas (Smith & Agre, 1991; Tomkowiak & Pienkowska, 2010; Serrão et al., no prelo).

O intestino médio está relacionado com a digestão e absorção de nutrientes, e é onde ocorre produção de enzimas (Snodgrass, 1956; Chapman, 1969). Sua origem é endodérmica, ao contrário do que ocorre no restante do trato digestório, não sendo revestido por cutícula. Portanto é um órgão permeável onde o transporte de água já foi identificado (Serrão & Cruz-Landim, 2000; Serrão et al., 2008). O pólen consumido pelas abelhas transita pelo intestino médio com menor velocidade que o néctar por ser de difícil digestão, portanto necessita de mais tempo de ação das enzimas e pode deixar o intestino médio sem ter sido completamente digerido (Peng et al., 1985, 1986; Serrão & Cruz-Landim, 2000). Em abelhas foi observado que a atividade proteolítica no intestino médio acontece em altos níveis nas operárias nutridoras e decai a partir do início do

forageamento (Moritz & Crailsheim, 1987; Jimenez & Gilliam, 1989). Para que ocorra digestão é essencial que as enzimas digestivas estejam em concentração apropriada, portanto é necessário evitar sua diluição pela remoção de água proveniente da alimentação (Billingsley, 1990; Douglas, 2006), o que pode ser realizado por proteínas de membrana, como as aquaporinas.

O intestino posterior pode ser subdividido, sendo o piloro a parte mais anterior e onde ocorre a abertura dos túbulos de Malpighi, a parte mediana é denominada íleo e a porção mais posterior o reto. De modo geral o intestino fino está relacionado ao equilíbrio hídrico e salino das abelhas (Cruz-Landim, 2008).

Na transição intestino médio-posterior é onde os túbulos de Malpighi desembocam, compondo um sistema excretor (Cruz-Landim, 2008; Chapman, 1969). Os túbulos de Malpighi são canais de fundo cego que apresentam uma camada fina de células, e ficam livres na cavidade abdominal dos insetos em contato direto com a hemolinfa (Chapman, 1969). Essas estruturas são responsáveis pela produção da urina primária sendo, portanto, capazes de absorver diversos tipos de substâncias, inclusive água. Juntos, intestino posterior e os túbulos de Malpighi são as principais estruturas responsáveis pela excreção, e formam os órgãos excretores (Nation, 2002).

O íleo é a maior região do intestino posterior e é revestido internamente por uma camada de cutícula. As células deste órgão apresentam vacúolos e microvilosidades associadas a mitocôndrias, características de tecido permeável a diversas substâncias, como íons e água. Portanto o íleo atua na absorção do que não foi absorvido previamente no intestino médio (Chapman, 1969; Gonçalves et al., 2014). A absorção que ocorre no íleo é realizada por regiões especializadas do órgão, sendo os três quartos iniciais responsáveis pela absorção de solutos

orgânicos, e a porção final pela absorção de íons (Cruz-Landim, 1996; Gonçalves et al., 2014). A urina primária, formada pelos túbulos de Malpighi, sofre modificações no íleo pela retenção de substâncias úteis e eliminação do material desnecessário e tóxico (Villaro et al, 1999).

O reto é a última parte do intestino posterior, caracterizado como um saco revestido internamente por uma fina camada de cutícula. O epitélio do reto é composto por células achatadas que não atuam em processos de absorção. A absorção é realizada exclusivamente em regiões do epitélio retal que contêm duas camadas de células, denominadas papilas retais (Snodgrass, 1956).

Em fêmeas de *A. mellifera* são encontradas seis papilas retais de formato fusiforme na porção anterior do reto. O epitélio destas estruturas é formado por uma camada de células principais que está em contato com o lúmen do reto e por uma camada de células secundárias (Ferreira & Cruz-Landim, 1969). As papilas retais apresentam características de tecido absorptivo e de transporte, como a presença de microvilosidades e dobras na membrana basal associadas a mitocôndrias, sendo responsáveis pela absorção de água e íons do material contido no órgão (Garayoa et al., 1999; Serrão et al., 2008; Gonçalves et al., 2014).

De modo geral o trato digestório e túbulos de Malpighi em *A. mellifera* são capazes de transportar água, íons e pequenos solutos através das membranas celulares. Nos insetos, esse transporte geralmente ocorre de forma passiva podendo estar associado a proteínas transportadoras que facilitam e otimizam o processo (Le Caherec et al., 1997; Verkman, 2005; Campbell et al., 2008; Tomkowiak & Pienkowska, 2010).

As membranas celulares são naturalmente permeáveis à água e a alguns pequenos solutos. Curiosamente, a membrana dos eritrócitos e das células do túbulo renal proximal exhibe maior permeabilidade quando comparada a de outros tipos celulares. O grande trânsito de moléculas de água através das membranas foi compreendido após a purificação e identificação de proteínas canais, o CHIP (Channel-forming Integral Protein) dos eritrócitos e rins (Denker et al., 1988) e o MIP (Major Intrinsic Protein of lens) dos olhos (Smith & Agre, 1991). Após diversos ensaios comprovarem o envolvimento destas proteínas no transporte de água, elas foram denominadas comumente como aquaporinas (Agre et al., 1993).

A partir de diversos estudos ficou demonstrado que as aquaporinas são proteínas que atravessam a membrana plasmática. Sua estrutura é composta por seis regiões hidrofóbicas formadas por α -hélice, conectadas por cinco loops, sendo três extracelulares e dois intracelulares. As caudas amino-terminal e carboxi-terminal da cadeia polipeptídica se encontram no interior da célula (Preston & Agre, 1991; Smith & Agre, 1991; Wistow et al., 1991). Entre duas regiões hidrofóbicas são encontradas as regiões denominadas motivos NPA (asparagina – prolina – alanina). De acordo com a estrutura primária da cadeia polipeptídica, os motivos NPA estão distantes um do outro, porém, aproximam e formam o poro por onde ocorre passagem das moléculas quando a proteína está dobrada na conformação funcional (Jung et al., 1994). A região NPA é altamente seletiva, impedindo o fluxo de prótons (Fujiyoshi et al., 2002). Além disso, o transporte através do poro pode ser inibido quando mercúrio se liga a um aminoácido próximo à região NPA pelo lado extracelular. A aquaporina na sua conformação funcional apresenta formato parecido com uma ampulheta, como proposto por Jung e colaboradores (Jung et al., 1994).

As aquaporinas foram inicialmente identificadas como tetrâmeros nas membranas celulares (Smith & Agre, 1991). Estudos posteriores demonstraram que, apesar de as aquaporinas serem encontrada em tetrâmeros, cada monômero é independente e consegue fazer o transporte de água (Verbavatz et al., 1993; Shi et al., 1994). Além disso, foi proposto que o arranjo em tetrâmeros é predominante para as aquaporinas por ser energeticamente mais estável nas membranas celulares (Jung et al., 1994; Verbavatz et al., 1993).

As aquaporinas apresentam homologia e foram reunidas em quatro grupos de acordo com suas características funcionais (Agre et al., 1987; Preston & Agre, 1991; Kambara et al., 2009). O grupo 1 é composto por aquaporinas das subfamílias DRIP (*Drosophila* integral protein) e PRIP (*Pyrocoelia rufa* integral protein) (Lee et al., 2001; Kaufmann et al., 2005). As DRIPs foram primeiramente estudadas em *Drosophila melanogaster*, mas aquaporinas desta subfamília são encontradas em outros insetos (Dow et al. 1995). A AQP_{cic}, do gafanhoto *Cicadella viridis*, é uma DRIP, pois apresenta homologia com as demais aquaporinas do grupo (Le Caherec et al., 1996). Apesar da semelhança estrutural, a expressão dos genes para DRIPs pode ser diferente entre organismos, demonstrando diversidade dentro desta subfamília de aquaporinas (Campbel et al., 2008). As PRIPs foram inicialmente isoladas no coleóptero *Pyrocoelia rufa* (Lee et al., 2001). Recentemente uma PRIP (PvAQP1) foi caracterizada em *Polypedinlum vanderplanki* (Kikawada et al., 2008). As subfamílias PRIP e DRIP são semelhantes, pois são compostas por aquaporinas que transportam água, exclusivamente. A subfamília das PRIPs, no entanto, é a menos caracterizada para insetos (Campbel et al., 2008).

O grupo 2 é composto pela subfamília BIB (Big Brain), que contém o gene DmBIB, de *D. melanogaster*, o primeiro do grupo a ser caracterizado (Yanochko & Yool, 2002). Estudos comparativos demonstraram que DmBIB é um canal de cátion não seletivo, assim como aquaporinas de mamíferos que permitem a passagem de íons (Drake et al., 2002; Yanochko & Yool, 2002). As aquaporinas deste grupo são estruturalmente diferentes das aquaporinas de outras subfamílias, apresentando a cauda carboxi-terminal mais alongada. Porém esta diferença é observada em todas as BIBs já estudadas, demonstrando ser uma modificação conservada no grupo (Campbel et al., 2008). Além de permitir a passagem de íons, DmBIB também está relacionado ao desenvolvimento neural de *D. melanogaster*, e provavelmente tenha a mesma função em outros insetos (Doherty et al., 1997).

O grupo 3 é formado principalmente por genes preditos, aqueles cuja sequência genética é similar a de aquaporinas funcionais, mas que ainda não foram caracterizadas efetivamente (Campbel et al., 2008). Porém foi demonstrado que três aquaporinas deste grupo são capazes de transportar glicerol, conhecidas como aquagliceroporinas (Kataoka et al., 2009).

Por fim, o grupo 4 é composto pelas aquaporinas conhecidas como aquaporinas não ortodoxas. Estas aquaporinas ainda não tiveram sua função determinada e também apresentam sequência genética diferente das aquaporinas já estudadas (Ishibashi, 2006).

As aquaporinas foram descritas em todos os reinos, inclusive em vírus (Gorin et al., 1984; Calamita et al., 1995; Chaumont et al., 2001; Echevarria et al., 2001; Montalvetti et al., 2004; Gazzarrini et al., 2006; Rojek et al., 2008). Nos vertebrados as aquaporinas já foram extensivamente investigadas, porém em

invertebrados, como os insetos, os estudos que caracterizam a função e localização destas proteínas começaram a receber mais atenção após a publicação de trabalhos de revisão (Campbell et al., 2008; Spring et al., 2009).

Em insetos são encontrados diversos homólogos para aquaporinas e, além disso, foi proposto que em todos os insetos ocorrem aquaporinas das subfamílias DRIP, PRIP e BIB (Campbell et al., 2008). O estudo de aquaporinas em abelhas ainda é escasso, porém sabe-se que em *A. mellifera* há seis genes preditos para estas proteínas, sendo que recentemente foi demonstrado que cinco destes genes são expressos no trato digestório desta abelha (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006; Serrão et al., no prelo).

Insetos cuja alimentação é rica em água precisam se adaptar para prevenir a diluição de enzimas digestivas e para manter a osmorregulação do organismo. Em *Cicadella viridis* (hemíptera), por exemplo, que se alimenta de seiva de plantas, o intestino médio é modificado em uma câmara filtro rica em aquaporinas. Esta modificação morfológica promove rápida desidratação do material alimentar impedindo a diluição das enzimas digestivas e da hemolinfa (Le Cahérec et al., 1997). Em *Acyrtosiphon pisum* (hemíptera) o intestino médio se encontra próximo ao intestino posterior. Desta forma a água é facilmente transportada para o intestino médio, com a participação de aquaporinas, diluindo o alimento rico em açúcares. Esta dinâmica impede que o animal entre em colapso devido à diferença osmolar entre a hemolinfa e a seiva ingerida (Shakesby et al., 2009).

Em operárias de *A. mellifera* o envelhecimento é acompanhado por mudança da função exercida pela abelha na colônia e pela alteração da alimentação (Seeley, 1982; Serrão & Cruz-Landim, 1995; Johnson, 2010). O tipo

de alimento consumido pelas operárias influencia a fisiologia e a morfologia das células do intestino médio (Jimenez & Gilliam, 1989). A diferença de concentração de água presente nos alimentos requer diferentes níveis de absorção de água pelo sistema digestório, o que pode ser realizado, em parte, pela presença de aquaporinas, como já foi identificado em Isoptera, Coleoptera e Lepidoptera (Kambara et al., 2009; Kataoka et al., 2009; Nagae et al., 2013).

OBJETIVO

Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo analisar a expressão de genes putativos para aquaporina - ang, ang 2, cic, cic 2 e aqp-4-like - em operárias de *Apis mellifera*.

Objetivos específicos

- Verificar se ocorre expressão diferencial dos genes entre os órgãos do trato digestório e dos túbulos de Malpighi comparando operárias exercendo funções distintas na colônia;
- Quantificar a expressão dos genes putativos para aquaporina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Operárias de *A. mellifera* foram obtidas do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, MG. Favos de cria nascentes foram removidos de três colônias de *A. mellifera* e transferidos para gaiolas mantidas durante a noite a 33 °C. As abelhas recém-emergidas foram marcadas com cores diferentes para que pudessem ser diferenciadas quanto à colônia de origem e idade. As abelhas marcadas foram transferidas para uma única colônia de observação previamente preparada com operárias adultas, uma rainha, um quadro de cria e um quadro de alimento (Scheiner et al., 2013). Após um dia da introdução das abelhas marcadas teve início a observação e coleta das abelhas.

As coletas foram realizadas na parte da manhã, tanto para operárias nutridoras quanto para campeiras, e as abelhas capturadas eram transferidas para recipiente resfriado até o momento da dissecação.

Para a coleta das operárias nutridoras, a tampa da colônia de observação era removida e o vidro lateral levantado para acessar as abelhas. As operárias nutridoras foram coletadas enquanto alimentavam as larvas. Isso pôde ser observado pelo tempo que a abelha nutridora permanecia com a cabeça dentro da célula de cria, pela presença da larva naquela célula e também pela presença de alimento depositado, visto quando a nutridora deixava ou era removida da célula.

Para a coleta das operárias campeiras a entrada da colônia foi fechada e as abelhas marcadas que voltavam do campo com pólen na corbícula eram capturadas. Vinte e uma abelhas nutridoras e vinte uma abelhas campeiras foram coletadas de cada colônia de origem. As operárias nutridoras tinham idade entre quatro e nove dias, e as campeiras entre vinte e um e vinte e nove dias de idade.

As abelhas foram dissecadas no mesmo dia da coleta com pinças e microtesouras previamente limpas com solução livre de RNase (Sigma), e tiveram o trato digestório e os túbulos de Malpighi removidos. O trato digestório foi dividido em papo, intestino médio, íleo e reto. As paredes dos tecidos foram rompidas para remoção dos resíduos alimentares de seu interior. Após a divisão e limpeza, sete amostras dos órgãos foram separadas em tubos contendo RNA Later (Ambion), formando três repetições de cada órgão para cada idade e colônia. Os tubos foram armazenados a -20 °C até a realização da próxima etapa.

Extração de RNA

Os órgãos das abelhas foram retirados do RNA Later com pinça previamente limpa em solução livre de RNase e tiveram o excesso do fixador retirado com auxílio de papel filtro, transferidos para 250 µL de Tri-Reagent (Sigma). Em seguida o material foi macerado e o volume de Tri-Reagent completado para 500 µL, com exceção do tubo contendo intestino médio, completado para 1 mL, devido ao tamanho do órgão. Os microtubos foram levemente agitados, mantidos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para 100 µL de clorofórmio (intestino médio = 200 µL) seguido de agitação e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e tiveram a fase aquosa transferida para 250 µL de isopropanol (intestino médio = 500 µL), agitados e incubados a -20 °C por 16 horas. Após nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70%, seco ao ar e em seguida ressuspensionado em 20 µL de água ultrapura. A quantidade de

RNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Síntese de cDNA

O RNA obtido (500 ng) dos órgãos de operárias de *A. mellifera* foram transferidos para um tubo contendo 1 µL de dNTP mix a 10 mM, 1 µL de primer oligo(dT) a 100µM, e água ultrapura para volume final de 10 µL. As amostras foram centrifugadas rapidamente, incubadas por 10 minutos a 70 °C e resfriadas em gelo. A seguir foi acrescentado 2 µL de tampão (500 mM TrisHCl pH 8.3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1µL de transcriptase reversa M-MLV (Sigma-Aldrich), 0,5 µL de inibidor de RNase e água ultrapura para volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente seguido de incubação por 50 minutos a 37 °C, e a transcriptase reversa foi inativada a 85 °C por 10 minutos. A seguir o material foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) e armazenado a -80 °C.

Teste de Viabilidade dos Primers

A fim de verificar a viabilidade dos primers de genes putativos para aquaporina de *A. mellifera* foi realizado PCR utilizando primer na ausência de DNA. Os primers para os genes putativos *ang*, *ang 2*, *cic*, *cic 2* e *aqp-4-like* foram testados (Campbel et al., 2008). Além disso, o *rp49*, primer para o gene da proteína ribossomal de *A. mellifera*, usado como controle endógeno, também foi testado (Lourenço et al., 2008) (Tabela 1).

Para isso, foi utilizado água, kit PCR Master Mix (Promega) e par de cada primer (sense e antisense) a 0,1 µM. A reação ocorreu em termociclador (A200 – LongGene) e se iniciou com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 minutos,

seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92 °C por 15 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 30 segundos.

O resultado do PCR foi utilizado para a realização de um gel de agarose a 1% (Sambrook & Russell, 2001). No gel foram aplicadas as amostras, gel red e marcador molecular de 1kb.

PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

O cDNA de todas as amostras – túbulos de Malpighi, papo, intestino médio, intestino fino e reto – das diferentes colônias e idades foram submetidas ao qPCR em duplicatas, utilizando o kit de quantificação por fluorescência GoTaq® Master Mix (Promega) no equipamento Eco Real-Time PCR System (Illumina).

O primer aqp-4-like e controle endógeno – rp49 (proteína ribossomal de *A. mellifera*) foram utilizados em concentração final de 0,1 µM.

Os cálculos para determinar a expressão relativa do gene para aquaporina foram realizados tendo como referência o gene constitutivo rp49. O método Cycle Threshold (Ct) foi aplicado, onde o aumento significativo na quantidade de material amplificado nas amostras é identificado por fluorescência. Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade inicial de mRNA presente nas amostras, e são utilizados para comparar a expressão do gene de interesse ao controle endógeno. Os cálculos foram realizados utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$ que fornece a expressão do gene de interesse nos diferentes órgãos de abelhas nutridoras e campeiras.

Tabela 1 – Primers utilizados nos teste de PCR e PCR quantitativo em tempo real

Gene	Acesso	Primer	Referência
ang	XP_624531	S 5'-CCTAAAGAAGCGATCGGCCA-3' AS 5'-CGTGGACAACCAGAAGGAGG-3'	Campbel et al., 2008
ang 2	XP_394391	S 5'-CTGTCATCACGGGGAACGTC-3' AS 5'-CTGGCACCTTGCCAATAACC-3'	Campbel et al., 2008
cic	XP_001121899	S 5'-TGCCCAATGTATCGGTGGAG-3' AS 5'-AGGTCGCTAAGAATTCCGCC-3'	Campbel et al., 2008
cic 2	XP_624194	S 5'-GCCTTGGTGTCGTTCTTCT-3' AS 5'-TCCAAGCACAACCGATCCC-3'	Campbel et al., 2008
aqp-4-like	XP_001121043	S 5'-GATGCGCCATAACCACAGAT-3' AS 5'-CCAAAAGCTGGGCCGAAAG-3'	Campbel et al., 2008
rp49	AF441189	S 5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3' AS 5'-TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'	Lourenço et al., 2008

Análise dos Dados

Para avaliar se houve diferença significativa na expressão do gene para aquaporina entre os diferentes órgãos de abelhas nutridoras e campeiras, os valores médios estatísticos de $2^{-\Delta CT}$ foram submetidos ao teste t de Student, pelo método Cochran-Cox. O nível de significância considerado foi de 1%. O teste estatístico foi realizado utilizando o programa de computador SAS versão 9.0 para Windows.

Para avaliar e quantificar a expressão do gene aqp-4-like nos órgãos do trato digestório de abelhas desempenhando a mesma função, foram realizadas análises no software REST© com nível de significância de 5% (Pfaffl et al., 2002). Os túbulos de Malpighi foram utilizados como órgão controle. A expressão do gene de interesse foi considerada 100%, que no software é indicada como

sendo igual a 1. Os valores de expressão nos órgãos do trato digestório são dados em proporção ao valor que ocorre nos túbulos de Malpighi.

RESULTADOS

O PCR realizado com os primers para genes putativos para aquaporina e para o controle endógeno demonstrou que ang, ang 2, cic e cic 2 não estavam viáveis. A reação positiva dessas amostras, na ausência de DNA, demonstrou que os primers estavam contaminados. Em contrapartida, aqp-4-like e rp49 não reagiram na ausência de DNA, o que foi observado pela ausência de formação de banda no gel (Figura 1). Portanto apenas os primers para os genes aqp-4-like e rp49 estavam íntegros e poderiam ser utilizados com confiança no qPCR.

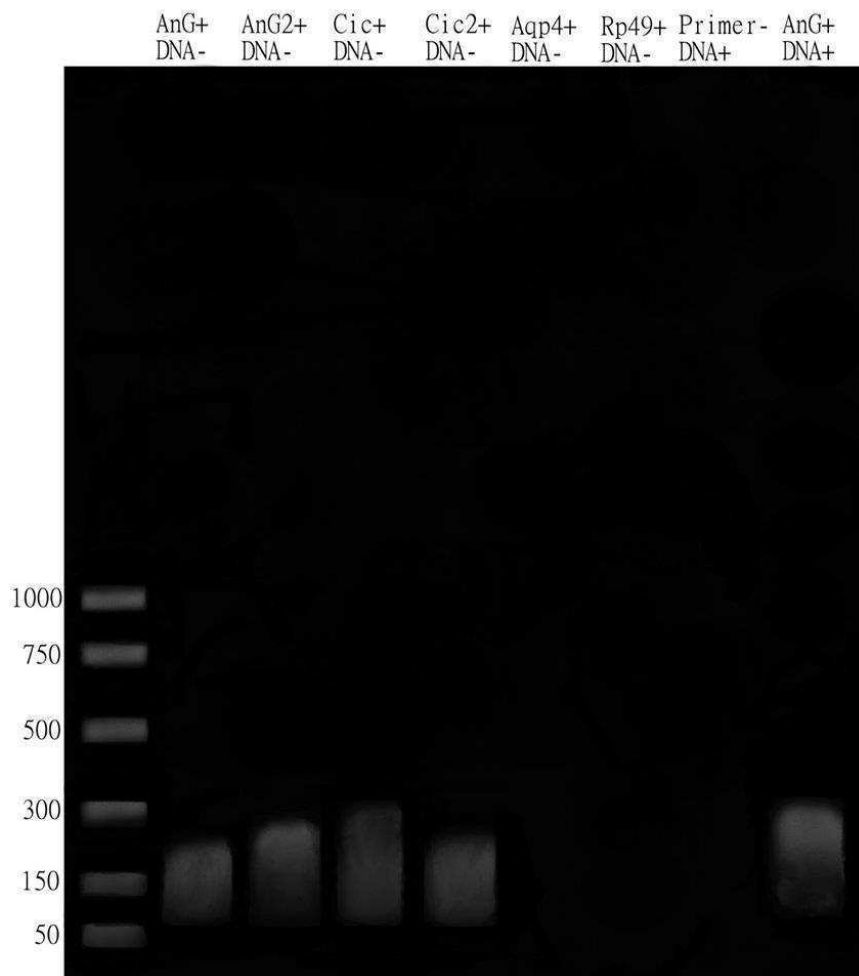


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose testando os primers para os genes putativos para aquaporina e para o controle endógeno rp49 de *Apis mellifera* na ausência de DNA.

As análises de qPCR mostraram que houve expressão diferencial do gene aqp-4-like nos túbulos de Malpighi, papo, íleo e reto quando comparadas operárias nutridoras e campeiras. O intestino médio foi o órgão com maior expressão do gene para aqp-4-like, porém não houve diferença na expressão do gene entre operárias nutridoras e campeiras. O gene para aquaporina se mostrou mais expresso nos túbulos de Malpighi e intestino fino das nutridoras, e no papo e no reto das campeiras (Tabela 2).

Tabela 2: Expressão do gene aqp-4-like nos diferentes órgãos de abelhas nutridoras e campeiras de *Apis mellifera*. Valores das médias de $2^{-\Delta Ct}$ e os respectivos desvios. Probabilidade calculada pelo teste t de Student com 1% de significância. TM: Túbulo de Malpighi; IM: Intestino médio. * Valor significativo.

Órgão	Nutridora	Campeira	Probabilidade
TM	0,01036 ± 0,00550	0,00473 ± 0,00118	p < 0,0001*
Papo	0,00214 ± 0,00065	0,00229 ± 0,00028	p < 0,0001*
IM	2,74419 ± 0,85132	4,07025 ± 0,64071	p = 0,064
Íleo	0,03980 ± 0,00963	0,02948 ± 0,00912	p < 0,0001*
Reto	0,00512 ± 0,00143	0,00737 ± 0,00203	p < 0,0001*

O teste realizado pelo software REST© demonstrou que o intestino médio e íleo são as regiões que expressam mais aqp-4-like em relação aos túbulos de Malpighi, independente da função exercida pela abelha na colônia. No papo e no reto não houve diferença de expressão. O intestino médio é o órgão com maior expressão relativa do gene (Tabela 3).

Tabela 3: Expressão relativa do gene aqp-4-like nos órgãos de abelhas nutridoras e campeiras de *Apis mellifera*. O valor de expressão representa a porcentagem que cada órgão expressou o gene aqp-4-like em relação aos túbulos de Malpighi. Valores obtidos através do software REST, calculado com 5% de significância TM: Túbulo de Malpighi; IM: Intestino médio. * Valor significativo.

Órgão	Expressão em Nutridora		Expressão em Campeira	
Papo	0,4 ± 0,05	p = 0,171	0,6 ± 0,20	p = 0,209
IM	596 ± 84,6	p < 0,05*	1.097 ± 387	p < 0,05*
Íleo	8,6 ± 1,6	p < 0,05*	5,0 ± 0,9	p < 0,05*
Reto	1,0 ± 0,2	p = 0,899	1,6 ± 0,5	p = 0,254

DISCUSSÃO

A presença de aquaporina nos túbulos de Malpighi de operárias de *A. mellifera* foi um resultado esperado, pois os túbulos de Malpighi participam da excreção e osmorregulação. Este órgão absorve substâncias presentes na hemolinfa, formando a urina primária que será liberada no intestino posterior (Cruz-Landim, 2008; Nation, 2002). O influxo de solutos para o lúmen dos túbulos de Malpighi pode ocorrer de forma ativa, o que gera um gradiente de concentração favorável ao fluxo de água para o interior do órgão. A entrada de água é otimizada pela presença de aquaporina na membrana, como demonstrado nas células dos túbulos de Malpighi de grilos (Spring et al., 2007).

Os resultados aqui apresentados mostraram a presença de aquaporina no papo, sendo as operárias campeiras as abelhas com maior expressão de aqp-4-like nesse órgão, em comparação às nutridoras. Essa característica pode estar relacionada ao fato do néctar, principal alimento das abelhas campeiras, ser uma solução de açúcares, gerando um desafio na osmorregulação. Em Hemiptera, que se alimentam de seiva, caracteristicamente um alimento muito diluído, foi identificada uma aquaporina na parte anterior do intestino médio (câmara filtro) onde o alimento é estocado temporariamente. A câmara filtro participa do transporte de água desta região do intestino médio para o intestino posterior, diminuindo a osmolaridade do alimento antes de sua digestão e absorção. Essa rápida desidratação do alimento garante a sobrevivência do animal (Le Cahérec et al., 1997).

Além disso, nas abelhas *Chalicodoma sicula* e *A. mellifera* há aumento na concentração de açúcares do néctar estocado no papo, o que sugere haver desidratação do material presente no órgão por meio do transporte da água para a

hemolinfa (Willmer, 1986; Serrão et al., no prelo), assim como ocorre no intestino anterior de cupins e intestino médio de afídeos (Kambara et al., 2009; Shakesby et al., 2009).

Nas abelhas, o papo é conhecido pelo armazenamento temporário do alimento (Snodgrass, 1956). Porém, a presença de aquaporina neste órgão sugere que ocorre remoção de água do alimento antes da sua passagem para o intestino médio. Além da aqp4-like identificada neste estudo, Serrão e colaboradores (Serrão et al., no prelo) demonstraram a presença de uma aquaporina semelhante a DRIP no epitélio do papo de abelhas, envolvida no transporte de água do papo para a hemolinfa.

O intestino médio de *A. mellifera* foi o órgão onde ocorreu maior expressão de aqp-4-like. O órgão é naturalmente permeável à água devido à sua origem endodérmica, que resulta na ausência de cutícula revestindo o epitélio, e às características celulares como microvilosidades na membrana apical e dobras na membrana basal, ambas associadas a mitocôndrias e com presença de vesículas (Cruz-Landim, 2008; Serrão et al., 2008). A atividade de transporte transcelular neste órgão é aprimorada pela presença de aquaporina, facilitando a digestão através da remoção de água do conteúdo alimentar. Assim, o ambiente ficaria ideal para a ação das enzimas digestivas produzidas no intestino médio (Billingsley, 1990; Douglas, 2006). Em Isoptera (Kambara et al., 2009), Lepidoptera (Kataoka et al., 2009) e Coleoptera (Nagae et al., 2013) aquaporinas estão presentes no intestino médio. Em casos extremos de insetos cuja alimentação é abundante em água, como seiva ou sangue, adaptações como a câmara filtro, em conjunto com a presença de aquaporinas, garantem a realização da digestão no órgão e mantêm a osmorregulação da hemolinfa (Billingsley, 1990;

Le Caherec et al., 1997; Douglas, 2006). Portanto, a maior expressão do gene *aqp-4-like* no intestino médio de abelhas campeiras pode ser atribuído à sua dieta baseada em néctar, alimento mais abundante em água quando comparado ao pólen ingerido pelas abelhas nutridoras. O néctar necessita de maior desidratação antes de ser digerido, evitando a diluição de enzimas digestivas, que resultaria em queda na eficiência do processo digestivo.

Apesar da expressão de *aqp-4-like* no intestino médio ser maior que nos túbulos de Malpighi, não é possível afirmar que o epitélio do intestino médio realiza mais transporte de água. Os túbulos de Malpighi são conhecidos pela filtragem da hemolinfa (Nation, 2002; Beyenbach et al., 2010) e, além disso, avaliamos apenas um gene para aquaporina. Entre os insetos ocorrem vários genes diferentes, sendo seis homólogos já descritos apenas para *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006; Campbell et al., 2008). A *aqp-4-like* é uma das cinco aquaporinas presentes ao longo do trato digestório de *A. mellifera* (Serrão et al. no prelo), e pode ser que seja mais expressa no intestino médio devido a uma especificidade do órgão (Kataoka et al, 2009). Em geral, os insetos produzem simultaneamente diferentes aquaporinas em um mesmo órgão (Drake et al., 2010; Frabick et al., 2014) e a inibição de uma delas não resulta em danos ao inseto, indicando uma possível redundância funcional (Drake et al., 2010; Herraiz et al., 2011).

O íleo, embora faça parte do sistema digestório, também desempenha função excretora, reabsorvendo soluto e íons da urina primária produzida pelos túbulos de Malpighi (Nation, 2002). A expressão de *aqp-4-like* no íleo é maior que nos túbulos de Malpighi, independente da atividade desempenhada pela abelha. Os resultados aqui obtidos confirmaram o papel desta porção do intestino

fino na osmorregulação e na excreção, pois atua absorvendo água da urina primária, como já descrito para outros himenópteros (Cruz-Landim, 1996; Villaro et al., 1999), porém com ajuda de aquaporina.

A presença de aquaporina no reto de operárias de *A. mellifera* está relacionada à absorção de água do conteúdo presente no órgão, como descrito para abelhas e formigas (Ferreira & Cruz-Landim, 1969; Garayoa et al., 1999). No reto de lepidópteros, foram observados dois tipos de aquaporina coexpressas em domínios celulares diferentes, gerando alto fluxo transcelular de água, facilitando a formação das fezes (Azuma et al., 2012). Os resultados aqui obtidos sugerem que *aqp-4-like* é uma das aquaporinas responsáveis pelo transporte de água na formação das fezes de *A. mellifera*. As operárias campeiras expressam mais *aqp-4-like* e também enfrentam maior estresse hídrico quando comparadas às nutridoras, necessitando de maior taxa de transporte de água pelo reto.

Análises filogenéticas de aquaporinas de invertebrados, caracterizadas e preditas por bioinformática, classificam essas proteínas em 4 grupos, sendo o grupo 1 das aquaporinas envolvidas no movimento transcelular de água (DRIP e PRIP), o grupo 2 (BIB) formado por aquaporina que não transporta água, o 3 inclui as aquaporinas preditas e o 4 as aquaporinas não ortodoxas e sem função determinada (Lee et al., 2001; Kaufmann et al., 2005; Ishibashi, 2006; Campbell et al., 2008). Nessas análises filogenéticas, a *aqp-4-like* está classificada no grupo 3, e sua função ainda não foi testada e comprovada. Entretanto, os dados aqui obtidos sugerem que esta aquaporina tem importante função fisiológica em todos os órgãos do trato digestório das abelhas, principalmente no intestino médio.

CONCLUSÃO

Este estudo mostra que a aqp-4-like é uma aquaporina presente no trato digestório de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera*. Sua expressão é maior no intestino médio dessas operárias e a expressão de aqp-4-like é diferencial entre campeiras e nutridoras nos túbulos de Malpighi, papo, íleo e reto. Este é primeiro relato da expressão dessa aquaporina em abelhas. De modo geral, esta pesquisa fornece a possibilidade de estudar mais profundamente a expressão do gene aqp-4-like. Além disso, possibilita a investigação das outras aquaporinas putativas de *A. mellifera*, e suas implicações na fisiologia destes importantes polinizadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agre P, Saboori AM, Asimos A, Smith BL (1987). Purification and partial characterization of the Mr 30, 000 integral membrane-protein associated with the erythrocyte Rh(d) antigen. *J Biol Chem* 262:17497–17503

Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ (1993) Aquaporin: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol.* 265, F461

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, Skaer H, Dow JA (2010) The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu Rev Entomol* 55:351–374

Billingsley PF (1990) The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol* 35:219-248

Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agre P (1995) Molecular-cloning and characterization of AQPz, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270:29063–29066

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

Chapman RF (1969) *The insects: structure and function*. American Elsevier Publ. Co., Inc., New York

Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 125:1206–1215

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

Cruz-Landim C (1996) Ultrastructural evidence of the occurrence of digestion and absorption of organic solutes in bees ileum (*Melipona quadrifasciata anthidioides* – Hymenoptera, Apidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28(4):513-520

Cruz-Landim C (2008) *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora Unesp, São Paulo

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

Dow JAT, Kelly DC, Davies SA, Maddrell SHP, Brown D (1995) A novel member of the major intrinsic protein family in *Drosophila*— are aquaporins involved in insect Malpighian (renal) tubule fluid secretion? *J Physiol* 489P:P110–P111

Drake KD, Schuette D, Chepelinsky AB, Jacob TJ, Crabbe MJC (2002) pH-dependent channel activity of heterologously-expressed main intrinsic protein (MIP) from rat lens. *FEBS Lett* 512:199–204

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

Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez- Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA, Whittombury G (2001) Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. Pflugers Arch 442:27–34

Fabrick JA, Pei J, Hull JJ, Yool AJ (2014) Molecular and functional characterization of multiple aquaporin water channel proteins from the western tarnished plant bug, *Lygus hesperus*. Insect Biochem Molec Biol 45:125-140

Ferreira A, Cruz-Landim C (1969) A comparative study of the rectal pads of Apoidea (Hymenoptera). An Acad Brasil Cienc 41:591-600

Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot B, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A (2002) Structure and function of water channels. Curr Opin Struct Biol 12:509–515

Garayoa M, Villaro AC, Lezaum MJ, Sesma P (1999) Light and electron microscopic study of the hindgut of the ant (*Formica nigricans*, Hymenoptera):II. Structure of the rectum. J Morphol 242:205-228

Gazzarrini S, Kang M, Epimashko S, Van Etten, JL, Dainty J, Thiel G, Moroni A (2006) Chlorella virus MT325 encodes water and potassium channels that interact synergistically. Proc Natl Acad Sci USA 103:5355–5360

Gonçalves WG, Fialho MCQ, Azevedo DO, Zancunico 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 SB, 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

Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931–949

Huang ZY, Robinson GE (1992) Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11726–11729

Huang ZY, Robinson GE (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav Ecol Sociobiol* 39:147–158

Ishibashi K (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta* 1758: 989–993

Jimenez DR, Gilliam M (1989) Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin activity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 20:287–303

Johnson BR (2003) Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proc R Soc Lond* 270:147–152

Johnson BR (2008) Within-nest temporal polyethism in the honeybee. *Behav Ecol Sociobiol* 62:777–784

Johnson BR (2010) Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav Ecol Sociobiol* 64:305–316

Jung J.S, 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

Kambara K, Takematsu Y, Azuma M, Kobayashi J (2009) cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera; Rhinotermitidae). *Appl Entomol Zool* 44:315-321

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

Kaufmann, N, Mathai JC, Hill WG, Dow JAT, Zeidel ML, Brodsky JL (2005) Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am J Physiol* 289:C397-C407

Kikawada T, Saito A, Kanamori Y, Fujita M, Snigorska K, Watanabe M, Okuda T (2008) Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Biochim Biophys Acta* 1778:514–520

Le Caherec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnac G, Guillam MT, Thomas D, Gouranton J, Hubert JF (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin—functional comparison with aquaporin 1. *Eur J Biochem* 241:707–715

Le Caherec 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

Lee KS, Kim SR, Lee SM, Lee KR, Sohn HD, Jin BR (2001) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the aquaporin homologue from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. *Korean J Entomol* 31:269-279

Leta MA, Gilbert C, Morse RA (1996) Levels of hemolymph sugars and body glycogen of honeybees (*Apis mellifera* L.) from colonies preparing to swarm. *J Insect Physiol* 42:239-245

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

Michener CD (1974) *The social behavior of the bees*. Harvard University Press, Cambridge

Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R (2004) A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 279:38673–38682

Moritz B, Crailsheim K (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insect Physiol* 33:923-931

Nagae T, Miyake S, Kosak S, Azuma M (2013) Identification and characterization of a functional aquaporin water channel (*Anomala cuprea* DRIP) in a coleopteran insect. *J Exp Biol* 216:2564-2572

Nation JL (2002) *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, Boca Raton

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5:673–677

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

Oster GF, Wilson EO (1978) *Caste and ecology in the social insects*. Princeton University Press, Princeton

Peng YS, Nasr ME, Marston JM (1985) The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees. *Physiol Entomol* 10:75-82

Peng YS, Nasr ME, Marston JM (1986) Release of alfalfa, *Medicago sativa*, pollen cytoplasm in the gut of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am* 79:804-807

Pfaffl MW, Hogan 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:e36

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

Raes H, Verbeke M (1994) Light and electron microscopical study of two types of endocrines cell in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). *Tiss Cell*, 2:223-230

Roces F, Blatt J (1999) Haemolymph sugars and the control of the proventriculus in the honeybee *Apis mellifera*. *J Ins Physiol* 45:221-229

Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol* 70:301–327

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Scheiner R, Abramson CI, Brodschneider R, Crailsheim K, Farina WM, Fuchs S, Grünewald B, Hahshold S, Karrer M, Koeniger G, Koeniger N, Menzel R, Mujagic S, Radspieler G, Schmickl T, Schneider C, Siegel AJ, Szopek M, Thenius R (2013) Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *J Apicult Res* 52(4):1-58

Seeley TD (1982) Adaptive Significance of the Age Polyethism Schedule in Honeybee Colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 11:287-293

Seeley TD (1995) *The wisdom of the hive*. Harvard University Press, Cambridge

Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) Comparative size and histology of the proventriculus and midgut among the female castes and males of *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Biociências* 3:85-94

Serrão JE, Cruz-Landim C (2000) Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *J Api Res* 39:9-17

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

Serrão JE, Fialho MCQ, Azevedo DO, Zanuncio JC (no prelo) Aquaporins in the honey bee crop - A new function for an old organ. *Protoplasma*

Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J, Roberts DM, Douglas AE (2009) A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem Molec* 39:1-10

Shi LB, Skach WR, Verkman AS (1994) Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type-mutant heterodimers. *J Biol Chem* 269:10417–10422

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 honeybee*. 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

Spring JH, Robichaux SR, Hamlin JA (2009) The role of aquaporins in excretion in insects. *J Exp Biol* 212:358-362

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

Verbavatz JM, Brown D, Sabolic J, Valenti G, Ausiello DA, Van Hoek AN, Ma T, Verkman AS (1993) Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J Cell Biol* 123:605–618

Verkman AS (2005) Novel roles of aquaporins revealed by phenotype analysis of knockout mice. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 155:31–55

Villaro AC, Garayoa M, Lezaun MJ, Sesma P (1999) Light and electron microscopic study of the hindgut of the ant (*Formica nigricans*, Hymenoptera):I. Structure of the ileum. *J Morphol* 242:189-204

Willmer PG (1986) Foraging patterns and water balance: problems of optimization for a xerophilic bee *Chalicodoma sicula*. *J Animal Ecol* 55:941-962

Wistow GJ, Pisano MM, Chepelinsky AB (1991) Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins. *Trends Biochem Sci* 16:170–171

Yanochko GM, Yool AJ (2002) Regulated cationic channel function in *Xenopus* oocytes expressing *Drosophila* big brain. *J Neurosci* 22:2530–2540