UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

“Abordagem comparativa da maturação cuticular em
abelhas sociais e solitárias utilizando-se RNA-seq,
quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica”

Tiago Falcón Lopes

Ribeirão Preto, SP

2016

TIAGO FALCÓN LOPES

Abordagem comparativa da maturação cuticular em abelhas sociais e solitárias utilizando-se RNA-seq, quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Gentile
Bitondi

Ribeirão Preto, SP
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lopes, Tiago Falcón

Abordagem comparativa da maturação cuticular em abelhas sociais e solitárias utilizando-se RNA-seq, quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica. Ribeirão Preto, 2016.

125 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ciências Biológicas I, com ênfase em Genética.

Orientador: Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. heterocronia. 2. maturação cuticular em abelhas. 3. transcriptoma. 4. microscopia eletrônica de transmissão. 5. hidrocarbonetos cuticulares

Nome: Lopes, Tiago Falcón

Título: Abordagem comparativa da maturação cuticular em abelhas sociais e solitárias utilizando-se RNA-seq, quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).:	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof(a).Dr(a).:	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof(a).Dr(a).:	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof(a).Dr(a).:	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof(a).Dr(a).:	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para a execução desta tese (Processo FAPESP: 2012/24284-5).

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, minha orientadora, que acompanhou de perto todos os avanços e dificuldades deste trabalho. Sempre incentivou as novas ideias e projetos. Como já havia dito na Dissertação de Mestrado, representa, para mim, o modelo de orientador a ser seguido.

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, que esteve presente durante a execução do trabalho, colaborando com suas leituras e sugestões.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e foi de fundamental importância para compreendermos as abelhas solitárias. Também esteve presente nos momentos mais difíceis da execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, que me ensinou os métodos de análises de bioinformática para sequenciamentos em larga escala e colaborou diretamente na preparação e análise dos nossos dados moleculares.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, que disponibilizou seu laboratório para a realização das análises de hidrocarbonetos cuticulares e forneceu diversas ideias para se trabalhar estes dados.

Ao Dr. Moysés Elias Neto, que desde o início de meu estágio no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas – LBDA, USP-RP) foi o grande incentivador do meu trabalho e colaborou com a execução desta tese.

À minha esposa e colaboradora Dra. Juliana Stephanie Galaschi Teixeira, que além de me ouvir falar constantemente sobre o trabalho, coletou e dissecou parte de nossas amostras e leu e forneceu sugestões inúmeras vezes.

Ao amigo e colaborador Fabiano Carlos Pinto de Abreu.

À Marcela Aparecida Framartino Bezerra Laure e Dra. Vera Lúcia Castelo Figueiredo que ajudaram a coletar, dissecar e manter os ninhos das abelhas aqui coletadas.

À Dra. Juliana Ramos Martins que forneceu sugestões e colaborou para a realização da microscopia eletrônica.

À Dra. Maria Juliana Ferreira-Caliman e à Isabel Cristina Casanova Turatti que colaboraram com a quantificação absoluta dos hidrocarbonetos.

À Dra. Michelle Prioli Miranda Soares pelas sugestões.

Aos Professores Doutores Ademilson Espencer Egea Soares, Marco Antônio del Lama e Francis de Moraes Franco Nunes, pelas sugestões fornecidas.

Às Professoras Doutoradas Solange Augusto e Anete Pedro Lourenço que forneceram

amostras de *Tetrapedia diversipes*.

À Dra. Gabriele Antico Freiria que disponibilizou as amostras de *Euglossa cordata*.

Ao Dr. Sidnei Mateus que disponibilizou as amostras de *Bombus brasiliensis*.

A Diego Moure por fornecer ninhos para a coleta de abelhas solitárias recém emergidas.

A José Carlos Serrano pela identificação das amostras de *T. diversipes*.

Aos técnicos do LBDA Luís Roberto Aguiar, Rogério Pereira e Jairo de Souza que me ensinaram um pouco do manejo das colônias e me auxiliaram durante a coleta; Roberto Mazzuco, pela manutenção da flora local, fundamental para as abelhas, e ajuda para preparar os locais do meliponário para receber os ninhos armadilha ; e Pedro Roberto Prado pelo auxílio na informática.

Às amigas Rosana Almeida, Vera Lúcia Castelo Figueiredo e Maria Juliana Ferreira-Caliman que são parte da família aqui em Ribeirão Preto. Estão sempre por perto seja nas comemorações ou quando precisamos de ajuda. Infelizmente não dá para construir um pedestal para vocês aqui na tese.

Aos amigos do Bloco A e do Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas.

Ao grupo do café da manhã, tornando o começo de nossos dias mais relaxantes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP.

Aos secretários do Departamento de Genética, Susie, Silvia, Ana Claudia e Gustavo pelos serviços indispensáveis para o bom andamento do curso.

À minha família espalhada pelo Brasil.

Resumo

Lopes, T. F. Abordagem comparativa da maturação cuticular em abelhas sociais e solitárias utilizando-se RNA-seq, quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica. (2016). 125p. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Diferenças no *timing* da melanização e esclerotização do exoesqueleto são evidentes quando se compara a morfologia externa de abelhas de hábitos sociais e as solitárias. A esta diferença convencionamos chamar de heterocronia da maturação cuticular, o termo heterocronia significando variações no tempo relativo, ou ritmo, de um evento ontogenético em relação ao ancestral ou entre taxons. Propusemos que as abelhas sociais, que após a ecdise permanecem na colônia por vários dias, alcançariam a maturidade de alguns sistemas orgânicos, entre eles o tegumento, muito mais tarde que as espécies de abelhas solitárias que ao emergir partem imediatamente para atividades extra-nidais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em testar esta hipótese utilizando o tegumento em maturação das espécies de abelhas sociais, *Apis mellifera* e *Frieseomelitta varia*, e da espécie solitária *Centris analis*, em estudos comparativos de expressão gênica, ultraestrutura e quantificação de hidrocarbonetos cuticulares (CHCs). Para isto utilizamos sequenciamento de mRNA (RNA-seq), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e cromatografia de gás e espectrometria de massas (CG/MS). Os perfis de expressão de genes da via de melanização/esclerotização cuticular (*ebony* e *tan*) diferenciaram as espécies sociais da solitária, assim como a expressão de genes com função na via de metabolismo de quitina (*Cda5*, *Idgf4* e *chitooligosacchariodolytic-domain-like*) e de genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula (*CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR23*, *CPR26*, *Apd-3* e *Apd-like*). Genes com função na regulação da maturação cuticular (*FTZ-F1*, *E74*, *Hr46* e *Hr4*) se mostraram co-expressos nas espécies sociais e os perfis de expressão destes genes, exceto *Hr46*, e de outros reguladores (*Ethr*, *Hr38*, *Rickets* e *Ptx-1*) também diferenciaram as espécies sociais da solitária. Ressaltamos em nossas análises os genes do ciclo circadiano, cuja expressão tem relação com a deposição de quitina cuticular, além de genes de vias de pigmentação não melanínicas. As análises de MET, abrangendo outras três espécies de abelhas (*Bombus brasilienses*: primitivamente eussocial; *Euglossa cordata*: facultativamente social; *Tetrapedia diversipes*: solitária), mostraram diferenças consistentes entre a ultraestrutura e espessura das cutículas das espécies sociais e solitárias, o que reforçou nossos resultados de RNA-seq. A quantificação absoluta dos CHCs diferenciou as abelhas sociais da solitária, consistente com a hipótese de heterocronia da maturação cuticular e com os perfis de expressão de genes envolvidos na biossíntese de CHCs. Assim, além de desvendar transcriptomas de tegumento de três espécies de abelhas, a comparação da expressão gênica aliada à análise de ultraestrutura da cutícula e quantificação de CHCs levaram à caracterização de diferenças no processo de maturação cuticular entre as espécies sociais e solitárias.

Palavras-chave: heterocronia, RNA-seq, maturação cuticular, MET, hidrocarbonetos cuticulares, abelhas eussociais, abelhas solitárias

Abstract

Lopes, T. F. A comparative approach of cuticular maturation in social and solitary bees using RNA-seq, hydrocarbons' quantification, and electron microscopy. (2016). 125p. PhD Thesis – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Differences in the timing of exoskeleton melanization and sclerotization processes are evident when comparing the external morphology of social and solitary bee species. Such differences may constitute a relevant example of cuticular maturation heterochrony, this term referring to a genetic change in timing of an ontogenetic process relative to an ancestor or between taxons. We proposed that social bees, which remain protected inside the colony for many days before initiating outside nest activities, would reach the maturity of some organic systems, such as the integument (epidermis and cuticle), later than solitary bees, which start such activities immediately after ecdysis. We tested this hypothesis in a comparative study of the developing integument of eusocial bees, *Apis mellifera* and *Frieseomelitta varia*, and the solitary bee *Centris analis*. Using RNA-seq, we verified that the expression profiles of genes involved in cuticular melanization and sclerotization (*ebony* and *tan*), chitin deposition and organization (*Cda5*, *Idgf4*, *chitooligosaccharyl-dolyl-transferase-like*), and cuticle formation (*CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR23*, *CPE26*, *Apd-3*, *Apd-like*) were positively, correlated between the two eusocial species, but not between the eusocial and the solitary species. Some of the genes with roles in regulating exoskeleton maturation (*FTZ-F1*, *E74*, *Hr46*, *Hr4*) were co-expressed only in the eusocial species. The expression profiles of these genes (except *Hr46*) and other regulatory genes (*Ethr*, *Hr38*, *Rickets*, *Ptx-1*) were also positively correlated exclusively in the eusocial bees. We also highlighted the expression of genes involved in non-melanin pigment production and the expression of circadian rhythm genes that could be related to chitin layers deposition. Transmission electron microscopy analysis of the integument of the two eusocial and the solitary bee species, in addition to other three bee species (the primitively eusocial *Bombus brasiliensis*; the facultatively social *Euglossa cordata*; the solitary bee *Tetrapedia diversipes*), showed differences in cuticle ultrastructure and thickness, thus supporting the RNA-seq data. In agreement with our hypothesis, CHC quantifications were consistent with the expression levels of genes involved in CHC biosynthesis, thus differentiating the superficial cuticle layer of the eusocial and solitary species. Together, the integument transcriptomes, ultrastructure, and CHC quantification allowed us to characterize differences in the timing of cuticle maturation in social and solitary bees.

Keywords: heterochrony, RNA-seq, cuticle maturation, TEM, cuticular hydrocarbon, eusocial bees, solitary bees

Lista de Figuras

Figura 1 - Sequência dos eventos das mudas metamórfica e imaginal coordenados pelo título de ecdisteróides em abelhas operárias <i>A. mellifera</i> . (A-E) Modificações do tegumento durante o processo de muda. (A) Estrutura do tegumento antes do início da muda, indicando ainda as camadas da cutícula. (B) Ocorrência da apólise, onde pode ser observado o espaço exuvial. A apólise é induzida pelo aumento do título de ecdisteróides. (C) O espaço exuvial é preenchido pelo fluido de muda secretado pela epiderme. (D) A cutícula velha (do ínstar ou estágio anterior) é parcialmente reabsorvida enquanto a nova cutícula é formada. Nesse momento o nível de ecdisteróides está decaindo. (E) Momento da ecdise, quando a cutícula velha é eliminada e o nível de ecdisteróides circulantes é basal. (F-H) Sequência do desenvolvimento incluindo a muda metamórfica (de larva para pupa) e a muda imaginal (de pupa para adulto). (F) Demarcação dos estágios de desenvolvimento de acordo com a morfologia externa (imagens apresentadas em H). (G) Os eventos de apólise (setas) e ecdise (pontas de setas) estão marcados em relação aos estágios identificados em (F) e às fases do desenvolvimento apresentadas em (H). As letras a-b-c-d-e representam as fases onde estão ocorrendo as etapas da muda ilustradas em A-B-C-D-E. Pbm (adulto-farata com pigmentação cuticular e grau de esclerotização intermediários), Re (abelha adulta recém emergida) e Fg (abelha forrageira) são as fases do desenvolvimento utilizadas neste trabalho (A-F: adaptado de Riddiford, 1985 e Klowden, 2007; G e H: adaptado de Elias-Neto et al., 2009; Soares, 2012).....	5
Figura 2 - Fluxograma de dissecação da região do terceiro tergito abdominal. Modelo do exemplo: operária de <i>A. mellifera</i> Ne. T = tergito.....	18
Figura 3 - Curvas de calibração dos compostos: (a) C23, (b) C25 e (c) C32.....	21
Figura 4 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração os genes diferencialmente expressos. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	23
Figura 5 - Diagramas de Venn representando o número de genes mais expressos em cada comparação entre as fases do desenvolvimento para cada espécie. <i>A. mellifera</i> (A); <i>F. varia</i> (B); <i>C. analis</i> (C).....	25
Figura 6 - Sumário das categorias obtidas nas análises de Gene Ontology (GO) relacionando os principais processos envolvidos na formação e diferenciação da cutícula adulta. <i>A. mellifera</i> (barras azuis escuras), <i>F. varia</i> (barras azuis claras) e <i>C. analis</i> (barras vermelhas). O eixo X apresenta o número de genes (ou contigs) obtidos para cada categoria (eixo Y – GO categories). Os genes mais expressos nas fases mais jovens (Pbm e Ne) do que na mais velha (Fg) estão agrupados na categoria Younger>Fg. Os genes mais expressos nas fases mais velhas (Fg e Ne) do que na mais nova (Pbm) estão agrupados na categoria Older>Pbm. O retângulo verde identifica as categorias de GO envolvidas na diferenciação da epiderme; o retângulo roxo identifica as categorias de GO envolvidas na formação e diferenciação da cutícula; o retângulo preto indica as categorias de GO envolvidas na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares; o retângulo amarelo indica as categorias de GO envolvidas em processos de pigmentação não melanínicos na cutícula de abelhas. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.	26
Figura 7 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas da via de melanização e esclerotização da cutícula). As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores de suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	27

Figura 8 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas da via de melanização e esclerotização. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Genes: Dopamina N-acetiltransferase (Dat), tan, Tirosina hidroxilase (TH), ebony, Dopa-descarboxilase (Ddc), Laccase2 (Lac2) e Yellow (yellow-y). Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	28
Figura 9 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas da via do metabolismo de quitina. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicação de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	29
Figura 10 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas do metabolismo da quitina. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Cht = quitinase; Cda=quitina desacetilase. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	31
Figura 11 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR1. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges). Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	34
Figura 12 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR1. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	35
Figura 13 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR2. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	36
Figura 14 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR2. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	37
Figura 15 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A.), <i>F. varia</i> (B.) e (C) <i>C. analis</i> levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais não pertencentes às famílias RR1 ou RR2. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	38
Figura 16 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais não pertencentes às famílias RR1 ou RR2. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C)	

C. analis. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	39
Figura 17 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>F. varia</i> (B) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas na biossíntese de CHC). As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	41
Figura 18 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas (desaturases e elongases) potencialmente envolvidas na via de biossíntese dos CHC. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	42
Figura 19 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	43
Figura 20 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	45
Figura 21 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes do ciclo circadiano no tegumento. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	47
Figura 22 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes relacionados ao ciclo circadiano como osciladores periféricos no tegumento. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	48
Figura 23 -Distâncias entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i> (A), <i>F. varia</i> (B) e <i>C. analis</i> (C) levando-se em consideração a expressão de genes de vias de pigmentação não melânicas no tegumento. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).....	49
Figura 24 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes relacionados à vias de pigmentação não melanínicas no tegumento. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.	

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.....	50
Figura 25 - Resumo das análises de clusterização realizadas com base na expressão gênica. A coluna da esquerda indica o processo analisado; as três colunas centrais representam as fases do desenvolvimento estudadas (Pbm, Ne e Fg); a coluna da direita indica as espécies estudadas. Os retângulos preenchidos (amarelo para Pbm, vermelho para Ne e azul para Fg) indicam que as três amostras da fase representada agruparam com suporte de clusterização ≥ 95 . As estrelas indicam as fases que se agruparam com suporte de clusterização ≥ 95 . Os círculos indicam as fases que se agruparam com suporte de clusterização < 95 . As linhas pontilhadas separam processos diferentes.....	51
Figura 26 - Perfis de expressão dos genes de interesse significativamente correlacionados entre as espécies. Apesar de Ddc não ser significativamente correlacionado nós o adicionamos para completar o pool essencial de genes da via de melanização/esclerotização. Legenda de cores no final da figura. Melhor visualizada em pdf.....	53
Figura 27 - Perfil de expressão, no cérebro de operárias de <i>A. mellifera</i> , de genes potencialmente envolvidos na regulação da formação e maturação da cutícula. AmEth (Ecdysis triggering hormone), AmEthR (Ecdysis triggering hormone Receptor), AmEh (Eclosion hormone), AmCCAP (Crustacean Cardioactive Peptide), AmCCAPR (Crustacean Cardioactive Peptide Receptor), Amburs β (bursicon, subunidade β), Amburs α (bursicon, subunidade α).....	54
Figura 28 - Representação gráfica das matrizes de posição encontradas para os sítios de ligação na região promotora (até 3000 pb de distância na região 5' UTR) dos genes envolvidos na formação e maturação da cutícula em <i>A. mellifera</i>	55
Figura 29 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas dos genes do tegumento de <i>A. mellifera</i> envolvidos com a formação da cutícula.....	56
Figura 30 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas dos genes do tegumento de <i>F. varia</i> envolvidos com a formação da cutícula.....	57
Figura 31 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas dos genes do tegumento de <i>C. analis</i> envolvidos com a formação da cutícula.....	58
Figura 32 - Interações comuns às redes de co-expressão gênica nos tegumentos de <i>A. mellifera</i> e <i>F. varia</i>	59
Figura 33 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas entre a expressão de neuropeptídeos no cérebro e de genes envolvidos na formação e maturação do tegumento de <i>A. mellifera</i>	60
Figura 34 – MET de tegumentos das abelhas sociais (<i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> , <i>B. brasiliensis</i> e <i>E. cordata</i>) e solitárias (<i>C. analis</i> e <i>T. diversipes</i>). (A, B e C): esquerda:Pbm; meio: Ne; direita: Fg. (D, E e F): esquerda: Ne; direita: Fg. (A) <i>A. mellifera</i> : aumento de 10kx. (B) <i>F. varia</i> : aumento de 40kx. (C) <i>C. analis</i> : aumento de 4kx. (D) <i>B. brasiliensis</i> : aumento 5kx. (E) <i>E. cordata</i> : aumento 4kx. (F) <i>T. diversipes</i> : aumento 4kx. Cu=cutícula; Ep=epiderme. Figuras alinhadas na junção cutícula epiderme para facilitar as comparações. Escalas na posição inferior direita de cada figura.....	63
Figura 35 - Clusters das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de <i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> e <i>C. analis</i> baseados no perfil total de CHCs e distância Euclidiana. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam clusters estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos clusters (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de clusters maiores. AU (valores em vermelho): suporte do cluster; BP (valores em verde): suporte de bootstrap; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.....	68
Figura 36 - Clusters das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de <i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> e <i>C. analis</i> baseados no perfil total de n-alcanos e distância Euclidiana. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam clusters estatisticamente significantes com 95% de confiança (os	

retângulos vermelhos incluem Fg na Figura 38A com AU = 94% de confiança e BP = 84). AU (valores em vermelho): suporte do cluster; BP (valores em verde): suporte de bootstrap; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.....	69
Figura 37 - Clusters das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de <i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> e <i>C. analis</i> baseados no perfil de CHCs insaturados e distância Euclidiana. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam clusters estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos clusters (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de clusters maiores. AU (valores em vermelho): suporte do cluster; BP (valores em verde): suporte de bootstrap; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.....	70
Figura 38 - Clusters das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de <i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> e <i>C. analis</i> baseados no perfil de CHCs ramificados e distância Euclidiana. (A) <i>A. mellifera</i> . (B) <i>F. varia</i> . (C) <i>C. analis</i> . Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam clusters estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos clusters (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de clusters maiores. AU (valores em vermelho): suporte do cluster; BP (valores em verde): suporte de bootstrap; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageadora.....	71
Figura 39 - Genes (arrows) showing expression profiles consistent with the hypothesis of cuticle maturation heterochrony related to the solitary or social way of life (the question marks indicate inferences non-supported by experimentation). The three first series show the gene lists and electron micrographs of the developing integument (epidermis and cuticle) of <i>A. mellifera</i> , <i>F. varia</i> and <i>C. analis</i> , respectively. The genes listed in the two series below were extrapolated for the social and solitary/facultatively social species. The onset of adult cuticle formation is regulated by the decrease in the ecdysteroid titer after the apolysis-triggering peak. Bee images were taken at the following developmental stages: pupal (Pw); pupa undergoing apolysis (Pp); pharate-adults (Pbm and Pbd); newly-emerged bee (Ne); forager (Fg).....	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados para a construção da curva analítica das concentrações de CHC.....	20
Tabela 2 - Parâmetros da Curva Analítica. a=Coeficiente angular; b=Coeficiente linear; R=Fator de correlação; R ² =Fator de determinação.....	20
Tabela 3 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i>	61
Tabela 4 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de <i>F. varia</i>	61
Tabela 5 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de <i>C. analis</i>	61
Tabela 6 - Medidas da espessura da cutícula das fases do desenvolvimento de <i>B. brasiliensis</i>	61
Tabela 7 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de <i>E. cordata</i>	62
Tabela 8 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de <i>T. diversipes</i>	62
Tabela 9 - Proporção média das classes de CHCs de <i>A. mellifera</i>	64
Tabela 10 - Proporção média das classes de CHCs de <i>F. varia</i>	64
Tabela 11 - Proporção média das classes de CHCs de <i>C. analis</i>	65
Tabela 12 - Proporção média das classes de CHCs de <i>T. diversipes</i>	65
Tabela 13 – Diferenças na quantidade total de n-alcanos (µg) para cada fase do desenvolvimento de cada espécie de abelha estudada.....	72
Tabela 14 - Diferenças na quantidade total de CHCs insaturados (µg) para cada fase do desenvolvimento de cada espécie.....	73

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Socialidade em abelhas e nossos modelos de estudo: abelhas sociais e solitárias e a hipótese da heterocronia da maturação cuticular.....	1
1.2. A cutícula: estrutura, renovação periódica e maturação.....	3
1.3. Formação e maturação da cutícula definitiva de <i>Apis mellifera</i>	6
1.4. Hidrocarbonetos cuticulares.....	8
2. Objetivos.....	11
3. Metodologia.....	12
3.1. Coleta das amostras.....	12
3.2. Extração do RNA total.....	12
3.3. Sequenciamento de RNA (RNA-seq).....	13
3.4. Análise das bibliotecas de RNA.....	13
a. Remoção dos adaptadores e anotação funcional das sequências.....	13
b. Montagem de novo dos transcriptoma de <i>F. varia</i> e <i>C. analis</i>	14
c. Análise da expressão diferencial.....	15
d. Caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos.....	16
3.5. Busca por sítios de ligação para fatores de transcrição.....	16
3.6. Redes de interação gênica.....	17
3.7. MET.....	17
3.8. Análises dos perfis de CHC.....	18
a. Coleta de amostras, extração e identificação dos CHCs.....	18
b. Análises estatísticas dos perfis de CHCs.....	18
4. Resultados.....	22
4.1. RNA-seq.....	22
a. Expressão gênica no tegumento abdominal.....	22
b. Expressão gênica no cérebro de <i>A. mellifera</i>	54
c. Sítios de interação para fatores de transcrição e redes de co-expressão.....	54
4.2. MET.....	60
4.3. Análises dos perfis de CHCs.....	64
a. Proporções das classes de CHCs detectadas nas espécies de abelhas sociais e solitárias.....	64
b. Diferenças nos perfis de CHCs entre as cutículas em formação e maduras das espécies sociais e solitária.....	65
5. Discussão.....	74
5.1. RNA-seq.....	74
a. Abordagem geral.....	74
b. Via da pigmentação e esclerotização cuticular.....	75
c. Deposição e organização da quitina.....	80
d. Proteínas cuticulares estruturais.....	83
e. Via de biossíntese dos CHCs.....	89
f. Regulação da expressão gênica – hormônios e fatores de transcrição.....	90
g. Osciladores periféricos no tegumento abdominal.....	97
h. Vias de pigmentação não melanínicas.....	99
5.2. MET.....	100
5.3. Análises de CHCs.....	101
5.4. Considerações finais.....	104
6. Conclusões.....	108
Referências Bibliográficas.....	109

1. Introdução

1.1. Socialidade em abelhas e nossos modelos de estudo: abelhas sociais e solitárias e a hipótese da heterocronia da maturação cuticular

A evolução da organização social dos Hymenoptera está vinculada à separação da atividade reprodutiva entre rainhas férteis e as operárias, em geral, funcionalmente estéreis (*quasi* estéreis), responsáveis pelas atividades de manutenção da colônia, como o cuidado com a prole e o forrageamento (Michener, 1974; Wilson, 1975). Estas castas são sistemas modelo de plasticidade no desenvolvimento (Wheeler, 1986) e a evolução da socialidade pode ser considerada como a evolução do altruísmo e da desigualdade reprodutiva, uma vez que as operárias se dedicam à colônia e não ao seu próprio sucesso reprodutivo (revisado em Ratnieks e Helanterä, 2009).

Nas abelhas *Apis mellifera*, estes fenótipos alternativos são induzidos pela alimentação diferencial das larvas que se desenvolverão em rainhas ou operárias (Weaver, 1955). Nestas abelhas encontramos um dos níveis mais extremos de socialidade. Os feromônios produzidos pela rainha e que sinalizam o bloqueio da ovogênese das operárias são os responsáveis por este tipo de controle (Free, 1987), porém o processo chega a ser iniciado, formando inclusive o ovócito em fase estacionária (Tanaka e Hartfelder, 2014; Martins e Bitondi, 2016). Adicionalmente, sob determinadas condições, como por exemplo, em ausência da rainha, certas operárias podem ter seus ovários ativados e assim contribuir por meio de partenogênese para a produção dos machos haploides da colônia (revisado em Tucker, 1958; Ratnieks e Visscher, 1989; Ratnieks, 1993). Já em algumas espécies de abelhas como as da tribo Meliponini, o conflito reprodutivo é mais evidente (Ratnieks e Helanterä, 2009), de forma que alguma contribuição para a produção de machos por parte das operárias pode ser observada mesmo na presença da rainha. As diferenças encontradas entre *A. mellifera* e os membros da tribo Meliponini podem refletir a hipótese de diferentes origens da eussocialidade quando comparamos estes grupos, como se deduz de análises filogenéticas recentes com base em dados moleculares. Isso, no entanto, não é suficiente para excluir a possibilidade de origem única da socialidade em Apidae corbiculados (Danforth *et al.*, 2013).

Em uma colméia de *A. mellifera* há normalmente uma rainha, algumas centenas de zangões e entre 10.000 e 30.000 operárias, quando em estação do ano favorável. Os comportamentos da rainha e zangões são exclusivamente relacionados à reprodução. As operárias, ao contrário, desempenham diversas funções, entre elas, construção e limpeza dos favos, processamento de pólen e néctar, alimentação das larvas e da rainha, aquecimento e resfriamento do ambiente interno da colônia, guarda da entrada da colônia e forrageamento para coleta de água, pólen e néctar. Em geral, estas diferentes atividades são exercidas de modo sequencial e pouco se sobrepõem, o que se

convencionou chamar de polietismo etário, ou seja, a mudança de função por conta da idade (Seeley, 1982). As operárias jovens (nutrizes) alimentam constantemente as larvas por meio da secreção de suas glândulas hipofaríngeas e mandibulares. As mais velhas participam da defesa da colônia e são forrageiras ativas, além das atividades exercidas no processo de produção de mel. Esta sequência de funções é flexível, variando de acordo com as condições da colônia, tais como demografia, reserva e disponibilidade de alimento, e estação do ano (Winston, 2003).

Como outro modelo de abelha eussocial e que, assim como as operárias de *A. mellifera*, apresenta polietismo etário (revisado em Faustino *et al.*, 2002), as abelhas operárias do gênero *Frieseomelitta* distinguem-se pela esterilidade permanente (Terada, 1974). Diferente das operárias de outros gêneros de abelhas sem ferrão que contribuem em maior ou menor grau para a produção de machos (van Benthem *et al.*, 1995; Drumond *et al.*, 1996; Imperatriz-Fonseca e Kleinert, 1996; Koedam *et al.*, 1996), os ovários das operárias de *F. varia* sofrem acentuada morte celular programada e se transformam em uma massa de células onde não mais se distingue ovariolo íntegro (Boleli *et al.*, 1999). Esta característica faz de *F. varia* um modelo extremamente interessante em que a esterilidade da operária impede que contribuam, mesmo que eventualmente, para a atividade reprodutiva. Isso faz de *F. varia* uma espécie em que o efeito do conflito reprodutivo, existente em muitas espécies de Meliponini, seja nulo.

Diferente das abelhas eussociais, as abelhas solitárias restringem o cuidado com a prole à escolha do local do ninho, à construção do ninho e das células de cria (favos) e ao provisionamento. Abelhas solitárias geralmente morrem ou abandonam o ninho antes da emergência dos adultos da nova geração (revisado em Michener, 2007). Não há sobreposição de gerações nem diferenciação de castas na espécie *Centris (Heterocentris) analis* (Moure, 1960), caracterizando assim o comportamento de uma espécie de abelha solitária. As fêmeas dessa espécie nidificam em cavidades preexistentes em madeiras e demoram de um a cinco dias para terminar todo o processo de construção do ninho, provisionamento, oviposição e fechamento das células do favo, estas organizadas e dispostas de modo linear. As fêmeas são maiores que os machos, existindo pouca sobreposição de tamanho. Os machos eclodem antes que as fêmeas e deixam suas células de cria que, estrategicamente, localizam-se mais próximas da entrada do ninho (Jesus e Garófalo, 2000).

Com hábito de nidificação semelhante, outro modelo de abelha solitária é *Tetrapedia diversipes* (Alves-dos-Santos *et al.*, 2002). As fêmeas dessa abelha podem levar de 27 a 80 dias para emergir como adultas enquanto os machos emergem entre 27 e 180 dias, aproximadamente. Essa abelha constrói ninhos contendo de uma a seis células de cria, com proporção de aproximadamente 2 machos para 1 fêmea, sendo que machos e fêmeas apresentam tamanhos semelhantes (Camilo,

2005).

Dentro deste contexto de hábitos tão diferentes, onde as operárias de abelhas sociais passam um período de suas vidas dentro da colônia, enquanto as abelhas solitárias entram imediatamente em contato com o meio externo logo após sua emergência, sobressai a diferença na cronologia da pigmentação e esclerotização da cutícula, ou exoesqueleto. A esta diferença Elias-Neto *et al.* (2013) atribuíram a denominação de heterocronia da maturação cuticular. O termo heterocronia se refere a mudanças no início ou finalização, ou ritmo, de um evento ontogenético entre ancestrais e descendentes, mas na prática é utilizado para comparações entre táxons que estão relacionados em algum nível, como revisado em Moss (2007). Assim como ocorre em estudos evolutivos envolvendo vertebrados (revisado em Wilson e Werneburg, 2014), a heterocronia pode se apresentar como característica chave para estudos filogenéticos sobre evolução da socialidade e pode refletir um contexto adaptativo. Neste sentido abelhas protegidas em um ambiente colonial levariam mais tempo para alcançar a maturidade de alguns sistemas orgânicos que as espécies de abelhas solitárias, que devem estar preparadas no momento da emergência para o contato com o ambiente externo.

Estudos prévios sobre a morfologia da cutícula em formação e maturação (Elias-Neto *et al.*, 2009; 2013) apontam para a hipótese de que a cutícula das abelhas sociais só amadurece completamente quando atingem certa etapa do estágio adulto e iniciam as atividades extra-nidais. Assim, a cutícula destas abelhas (e talvez dos insetos sociais em geral) permaneceria imatura mesmo após a eclosão do adulto (ecdise), enquanto estes insetos estivessem protegidos no interior da colônia, ou ninho, onde há controle da temperatura e umidade, além de adequadas condições de assepsia (Winston, 2003). Ao contrário, a cutícula das espécies solitárias de abelhas, as quais deixam o ninho logo após a ecdise, tem que estar totalmente madura para enfrentar as condições ambientais e para protegê-las contra a dessecação, infecção por patógenos e ataques de parasitas. Se comprovada, esta hipótese ressaltaria o fenômeno da heterocronia da maturação cuticular (Elias-Neto *et al.*, 2013) como sendo um fator relacionado à socialidade.

1.2. A cutícula: estrutura, renovação periódica e maturação

O tegumento dos insetos é formado pela cutícula e epiderme, fisiologicamente integradas, servindo de meio de interação com o ambiente, local para inserção de músculos assim viabilizando o movimento e locomoção, barreira contra a dessecação e para proteção contra a agressão de predadores, parasitas e patógenos (Hepburn, 1985). A cutícula é a matriz extracelular produzida pela epiderme e também pelo epitélio do sistema de traqueias e das porções proximal e distal do intestino. O crescimento dos insetos seria restringido pela cutícula rígida, mas este problema foi

resolvido pela ocorrência de mudas periódicas (Smith e Rybczynski, 2012). Assim, a cutícula é periodicamente renovada, caracterizando os sucessivos eventos de muda que delimitam as fases de crescimento corporal. No caso das mudas larvais dos holometábolos, e ninfais dos hemimetábolos, um pico de ecdisteróides induz cada episódio de muda. A ação sinérgica do hormônio juvenil (JH) nestes momentos garante a sucessão dos instares larvais ou dos estágios de ninfa (revisado em Smith e Rybczynski, 2012). A **Figura 1** representa a estrutura do tegumento e os estágios de desenvolvimento da abelha *A. mellifera* em relação aos eventos das mudas metamórfica e imaginal, coordenados por variações nos títulos dos hormônios ecdisteróides.

A cutícula que reveste a larva de primeiro instar é produzida ainda durante a embriogênese e é renovada em cada episódio de muda, seja ela larval, metamórfica ou imaginal. Estruturalmente, a cutícula é composta por três camadas: o envelope, mais externo, tem de 10 a 30 nm de espessura e é recoberto por depósitos de lipídios (Locke, 2001). Esta camada era denominada cuticulina (Locke, 1961). Logo abaixo do envelope está a epicutícula (Locke, 2001), composta de proteínas e quinonas e que permite a passagem de lipídios para o envelope (Locke e Krishnan, 1971) através de canais-poros (Locke, 1961). A camada mais interna da cutícula, chamada de procutícula, é mais espessa e composta por uma mistura complexa de moléculas, as principais são a quitina (polímero de *N*-acetilglicosamina) e proteínas diversas (Locke, 2001).

A muda metamórfica que transforma a larva do inseto holometábolo em pupa, e a ninfa do hemimetábolo em adulto, implica em grandes alterações estruturais no organismo (Smith e Rybczynski, 2012). Para que ocorra a muda metamórfica, é necessário que o nível de JH circulante baixe, fazendo com que seja liberado no cérebro o hormônio protoracicotrópico (PTTH). Este hormônio induz a produção de ecdisteróides nas glândulas protorácicas e sua liberação na hemolinfa (Riddiford, 1976). O nível elevado de ecdisteróides na hemolinfa induz a apólise, ou seja, a cutícula se desprende da epiderme (Locke e Huie, 1979) formando o espaço exuvial que é preenchido pelo fluido de muda. Este fluido ajuda a digerir parcialmente esta cutícula, enfraquecendo o que restou dela, tornando-a mais susceptível à ruptura mecânica no momento da ecdise (Kramer *et al.*, 1985). No fluido de muda, a enzima quitinase hidrolisa as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ entre as moléculas de *N*-acetilglicosamina do homopolissacarídeo quitina, assim causando a digestão da porção reaproveitável da cutícula. Enquanto isso, uma nova cutícula é sintetizada pela epiderme. Esta nova cutícula tem baixa concentração de quitina (revisado em Kramer e Muthukrishnan, 2005) e não é degradada pelo fluido de muda devido à proteção exercida pelo envelope (Locke, 2001) e pela ação da proteína Knickkopf, sintetizada pela epiderme (Chaudhari *et al.*, 2011).

Figura 1 - Sequência dos eventos das mudas metamórfica e imaginal coordenados pelo título de ecdisteróides em abelhas operárias *A. mellifera*. (A-E) Modificações do tegumento durante o processo de muda. (A) Estrutura do tegumento antes do início da muda, indicando ainda as camadas da cutícula. (B) Ocorrência da apólise, onde pode ser observado o espaço exuvial. A apólise é induzida pelo aumento do título de ecdisteróides. (C) O espaço exuvial é preenchido pelo fluido de muda secretado pela epiderme. (D) A cutícula velha (do instar ou estágio anterior) é parcialmente reabsorvida enquanto a nova cutícula é formada. Nesse momento o nível de ecdisteróides está decaindo. (E) Momento da ecdise, quando a cutícula velha é eliminada e o nível de ecdisteróides circulantes é basal. (F-H) Sequência do desenvolvimento incluindo a muda metamórfica (de larva para pupa) e a muda imaginal (de pupa para adulto). (F) Demarcação dos estágios de desenvolvimento de acordo com a morfologia externa (imagens apresentadas em H). (G) Os eventos de apólise (setas) e ecdise (pontas de setas) estão marcados em relação aos estágios identificados em (F) e às fases do desenvolvimento apresentadas em (H). As letras a-b-c-d-e representam as fases onde estão ocorrendo as etapas da muda ilustradas em A-B-C-D-E. Pbm (adulto-farata com pigmentação cuticular e grau de esclerotização intermediários), Re (abelha adulta recém emergida) e Fg (abelha forrageira) são as fases do desenvolvimento utilizadas neste trabalho (A-F: adaptado de Riddiford, 1985 e Klowden, 2007; G e H: adaptado de Elias-Neto *et al.*, 2009; Soares, 2012).

A maturação da cutícula que revestirá definitivamente o inseto adulto ocorre por meio dos processos de esclerotização e melanização (Locke, 2001). Durante a esclerotização, momento em que a cutícula é estabilizada pela deposição de compostos fenólicos, o aminoácido tirosina é inicialmente hidroxilado formando 3,4-diidroxifenilalanina (dopa) (Andersen, 2010). Esta reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH) codificada pelo gene *pale*, assim denominado em *Drosophila melanogaster*, mas aqui denominado *TH*. Sequencialmente, a enzima dopa-

descarboxilase (DDC) catalisa a transformação de dopa (True *et al.*, 1999), convertendo-a em dopamina, que serve de molécula precursora de melanina na via de pigmentação, ou pode ser *N*-acetilada pela enzima dopamina *N*-acetiltransferase formando *N*-acetildopamina (NADA) e *N*- β -alanildopamina (NBAD). NADA e NBAD são catecóis da via de esclerotização e são então transportados das células epidérmicas para a matriz cuticular sendo oxidados nas orto-quinonas (*o*-quinonas) correspondentes, que podem reagir com grupos nucleofílicos de proteínas. As *o*-quinonas podem ser convertidas em para-quinona metides (*p*-quinona metides) que também reagem com grupos nucleofílicos de proteínas. Especificamente, a molécula NADA *p*-quinona metide pode ser enzimaticamente modificada para reagir com dois grupos nucleofílicos, assim originando *crosslinks*. Estes processos levam ao enrijecimento da cutícula (Andersen, 2010). O passo da oxidação em *o*-quinonas é realizado pela ação da enzima laccase 2 (Arakane *et al.*, 2009; Andersen, 2010).

A maturação da cutícula definitiva, ou adulta, depende do decaimento do título de ecdisteróides. Isto desencadeia uma cascata de regulação hormonal que leva à liberação de bursicon pelo sistema nervoso central (revisado em Song, 2012). Bursicon é um neuro-hormônio que tem a capacidade de induzir a maturação cuticular (Luo *et al.*, 2005; Bai e Pali, 2010) e a expansão das asas dos insetos (Bai e Pali, 2010). A liberação de bursicon na hemolinfa é controlada pelo neuro-hormônio CCAP (*crustacean cardioactive peptide*). O bursicon age via receptor acoplado a proteína G, com consequente aumento de cAMP e ativação da enzima TH via fosforilação. Ocorre então o aumento dos níveis de dopa que é convertida em dopamina (Davis *et al.*, 2007), a molécula precursora da síntese de melanina e de agentes esclerotizantes. Assim, a cutícula torna-se escura e enrijecida.

1.3. Formação e maturação da cutícula definitiva de *Apis mellifera*

Em *A. mellifera*, o decaimento do título de ecdisteróides (Pinto *et al.*, 2002) que ocorre em seguida à apólise da cutícula pupal, induz o início da síntese da cutícula definitiva (da abelha adulta) e, subsequentemente, a pigmentação cuticular e a intensificação da esclerotização (Zufelato *et al.*, 2004). O aparecimento de leve pigmentação na cutícula torácica antecede a fase Pbm e a deposição de pigmentos progride até a ecdise da abelha adulta. Esse processo ocorre em ausência de JH e foi significativamente prejudicado pelo tratamento de pupas com um análogo sintético deste hormônio (*pyriproxyfen*, Sumitomo®) (Bitondi *et al.*, 1998). A deposição e estruturação da cutícula dependem de intensa síntese de proteínas exclusivas, denominadas proteínas cuticulares, que tem sido foco de estudos em *A. mellifera*. Foram caracterizadas sete proteínas do tegumento que podem ser importantes para o processo de formação da cutícula adulta de *A. mellifera* e verificou-se que

seus níveis são modulados pelo pulso de ecdisteróides, em condições de níveis basais de JH (Santos *et al.*, 2001). Extratos do tegumento de larvas, pupas e adultos-faratos de *A. mellifera* processados por eletroforese bidimensional e analisados por espectrometria de massas resultaram na identificação de quatorze proteínas cuticulares (Micas *et al.*, 2016). Estas foram as primeiras proteínas cuticulares estruturais validadas entre aquelas preditas no genoma de *A. mellifera* (Honeybee genome sequencing consortium, 2006), em um total de 47 proteínas (Willis, 2010). Outros estudos tem colaborado para o entendimento da biologia molecular da formação e maturação da cutícula. Assim, a expressão do gene codificador da enzima laccase 2 no tegumento de *A. mellifera* mostrou-se dependente do título de ecdisteróides e o silenciamento parcial deste gene, via RNA de interferência (RNAi), prejudicou a maturação da cutícula, permitindo verificar sua função neste processo (Elias-Neto *et al.*, 2010). O pulso de ecdisteróides indutor da síntese da cutícula adulta (definitiva) de *A. mellifera* também causou aumento da expressão de alguns genes codificadores de proteínas cuticulares (*AmelCPR14*, *AmelTwdl1* e *AmelTwdl2*) e de uma peroxidase cuticular (*Ampxd*), indicando que os respectivos produtos proteicos compõem esta cutícula (Soares *et al.*, 2007, 2011). Experimentos de *microarrays* realizados com amostras de tegumentos desta abelha revelaram a expressão diferencial de centenas de genes nas comparações entre operárias em fase de pupas e adultas-faratas (Soares *et al.*, 2013). Entre os 24 genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais diferencialmente expressos nos *arrays*, 23 mostraram-se positivamente regulados pelo pulso de ecdisteróides e apresentaram aumento significativo de expressão durante a formação da cutícula adulta, indicando participação neste processo. Os genes codificadores das enzimas DDC e TH também foram sequenciados e caracterizados em *A. mellifera* e, consistente com a ativação da via de melanização/esclerotização, ambos genes mostraram significativo aumento de expressão durante a maturação da cutícula (Canhos, 2010). Além disto, os dois genes codificadores do neuro-hormônio bursicon foram caracterizados em *A. mellifera*. O silenciamento de cada um destes genes por meio de RNAi resultou em redução da densidade de transcritos de TH, DDC e da peroxidase cuticular no tegumento, além de prejudicar a maturação da cutícula, indicando que bursicon regula estes genes com função na melanização e esclerotização da cutícula (Costa *et al.*, submetido para publicação). A camada menos conhecida da cutícula, o envelope, também foi estudada em *A. mellifera*. Neste caso, priorizou-se a investigação dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares (CHCs) e de genes codificadores de desaturases e elongases com função na biossíntese destes compostos. Este estudo foi realizado durante um ciclo de muda completo, utilizando-se fases do desenvolvimento subsequentes à ecdise pupal até à ecdise do adulto, além de abelhas plenamente maduras, forrageiras. O objetivo consistiu em identificar os CHCs de tegumentos em formação e maduro, correlacionando os respectivos perfis quantitativos com os da expressão de 6 genes de

desaturases e 10 genes de elongases (Falcón *et al.*, 2014). Os dados obtidos ressaltaram a complexidade molecular desta camada mais superficial da cutícula, o envelope.

Em conjunto, estes estudos mostram o estado atual do conhecimento sobre a variação da expressão gênica e caracterização de componentes moleculares da cutícula, ou exoesqueleto, de *A. mellifera* em processo de maturação.

1.4. Hidrocarbonetos cuticulares

Os CHCs encontrados em insetos foram separados em três classes principais (Blomquist, 2010): n-alcenos ou compostos de cadeia simples; metil-alcenos, que são alcenos que apresentam um grupo metil como ramificação ligado a um carbono terciário (carbono que apresenta 3 ligações com outros 3 átomos de carbono da cadeia e uma ligação com o hidrogênio); e os hidrocarbonetos insaturados, alcenos e alcadienos, que apresentam uma ou duas ligações duplas entre átomos de carbono (Solomons e Fryle, 2005). Esses compostos presentes na superfície externa da cutícula (envelope) são a base do reconhecimento químico entre insetos sociais (van Zweden e d'Ettorre, 2010). Além disto, têm como funções a impermeabilização cuticular contra a perda de água e constituem barreira contra patógenos (Gibbs, 2002). Alcenos simples de cadeia maior que 30 carbonos tornam a cutícula mais impermeável, enquanto alcenos em geral a tornam mais permeável, formando fases sobre a cutícula (Ramsay, 1935; Gibbs, 2002).

Durante os processos de comunicação entre seus pares, as abelhas reconhecem alcenos e alcenos, sendo estes últimos geralmente de mais fácil percepção. Os compostos mal percebidos aparentemente exercem pouca, ou nenhuma função na comunicação química, sendo geralmente representados pelos alcenos. Estes se diferenciam pelo tamanho da cadeia, enquanto os alcenos podem ser caracterizados pela angulação da dupla ligação, pelo comprimento da cadeia curta entre um término e a dupla ligação e o comprimento da cadeia longa entre o outro término e a dupla ligação, e pela posição da insaturação (Châline *et al.*, 2005). Os alcenos com cadeias menores que 29 carbonos são compostos candidatos a estarem relacionados ao reconhecimento entre os membros da colônia, entretanto moléculas estruturalmente similares não são sempre bem discriminadas. É possível que em determinadas condições, por exemplo, enquanto exercem a atividade de guardar a entrada da colmeia, as abelhas estejam mais motivadas a diferenciar esses compostos (Châline *et al.*, 2005).

Os perfis de CHC diferem entre as abelhas operárias que exercem diferentes atividades (Kather *et al.*, 2011), podendo, então, refletir o polietismo etário. Os alcenos e alcenos são os compostos mais abundantes na cutícula de *A. mellifera*. Esses CHCs são sintetizados a partir de ácidos graxos (Blomquist *et al.*, 1980) em células associadas ao tegumento, os enócitos (Piek,

1964). As estruturas dos ácidos graxos são, em geral, determinadas pela atividade de dois tipos de enzimas: as desaturases e as elongases (Hashimoto *et al.*, 2008), ambas acil-CoA (Howard e Blomquist, 2005). Ao fim do processo de biossíntese de um ácido graxo é necessário que haja a reação de descarboxilação para que deixe de ser um ácido orgânico e passe a ser um hidrocarboneto (Kolattukudy, 1968). Pouco se sabe sobre as descarboxilases atuantes neste processo. As desaturases e elongases têm sido mais estudadas em relação às respectivas funções na via de biossíntese de hidrocarbonetos (Gleason *et al.*, 2009). As desaturases de ácidos graxos são as principais enzimas formadoras de insaturação e são encontradas em todos os eucariontes e bactérias. Suas sequências são caracterizadas por três motivos com oito resíduos de histidina cada (Shanklin *et al.*, 1994) que se localizam na porção citoplasmática da enzima associada ao retículo endoplasmático (Sperling *et al.*, 2003). As desaturases de ácidos graxos catalisam a introdução de uma dupla ligação em uma cadeia acil em região de estereoquímica específica (Sperling *et al.*, 2003). As elongases se dividem em duas classes: elongases S/MUFA (*Saturated/Monounsaturated Fatty Acids*) e PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acids*). As elongases S/MUFA alongam ácidos graxos saturados e monoinsaturados enquanto as elongases PUFA alongam ácidos graxos poliinsaturados (Hashimoto *et al.*, 2008).

No tegumento de operárias forrageadoras de *A. mellifera*, ocorre variação significativa na quantidade de CHCs bem como na expressão de genes codificadores de elongases e desaturases, quando comparadas às fases anteriores do desenvolvimento (Falcón *et al.*, 2014). Este enfoque foi aqui ampliado de modo a abranger outra espécie de abelha social, além de *A. mellifera*, e espécies solitárias. Diferentes abordagens metodológicas foram utilizadas para comparação da expressão gênica no tegumento em processo de maturação destas abelhas, e também para comparação da ultraestrutura e perfis de CHCs da cutícula. Buscou-se as diferenças que fossem consistentes com a hipótese de heterocronia da maturação cuticular associada ao estilo de vida social e solitário.

Para o desenvolvimento desta tese utilizamos de sequenciamentos de RNA em larga escala (RNA-Seq) visando traçar o perfil comparativo da expressão gênica do tegumento entre duas espécies de abelhas sociais e uma espécie solitária durante o período de maturação da cutícula. Esta metodologia permitiu avaliar a expressão gênica diferencial e aspectos de sua regulação no tegumento destas espécies e assim investigar se estariam contribuindo para a heterocronia do processo de maturação cuticular. O conhecimento do transcriptoma é fundamental para se avaliar os elementos funcionais do genoma e constituintes moleculares de células e tecidos (Wang *et al.*, 2009). Muito mais do genoma é transcrito do que se pensava anteriormente (Morin *et al.*, 2008). O sequenciamento de RNA em larga escala permite identificar e quantificar os tipos de transcritos (mRNAs, RNA não codificantes e pequenos RNAs), inclusive isoformas (Wang *et al.*, 2009), em

diferentes condições fisiológicas, ou durante o desenvolvimento, além de prover grande quantidade de informação de excelente qualidade sobre transcriptomas (Wang *et al.*, 2012). Como essa tecnologia utiliza adaptadores próprios para sequenciar, não é necessário o uso de sondas desenhadas com base em um genoma preexistente, tornando possível avaliar o transcriptoma de organismos não-modelos (Wang *et al.*, 2009). Segundo Horne et al. (2012), informações geradas por RNA-Seq de organismos não modelos podem ser reunidas em transcriptomas, nesse caso utilizando-se como referência genomas de espécies modelo com até 100 milhões de anos de divergência, aproximadamente, com resultados de alta qualidade. Tem-se em *A. mellifera* um organismo modelo bem consolidado desde a publicação da primeira versão do seu genoma em 2006 (Honeybee genome sequencing consortium, 2006). Ao mesmo tempo utilizamos para o sequenciamento organismos não-modelo: a abelha eussocial *Frieseomelitta varia* e a abelha solitária *Centris (Heterocentris) analis*, sendo que esta pertence à tribo Centridini, grupo irmão de abelhas corbiculadas como *A. mellifera*. A utilização de RNA-seq nos permitiu comparar a expressão gênica global do tegumento e, principalmente, enfocar os genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula, de enzimas das vias de biossíntese de melanina e de CHCs, de agentes esclerotizantes, de proteínas da via de pigmentação não-melanínica e de fatores de transcrição. Pretendeu-se estabelecer um panorama amplo da expressão gênica durante a maturação cuticular e, ao mesmo tempo, verificar as diferenças temporais que caracterizam este processo e se relacionam à heterocronia cuticular e, possivelmente, à socialidade. Adicionalmente, procedemos ao sequenciamento do transcriptoma do cérebro de *A. mellifera* visando verificar a expressão dos genes reguladores centrais dos processos de maturação cuticular e construir redes gênicas reguladoras. Estes dados ganharam robustez ao serem comparados às informações sobre a estrutura do tegumento, provenientes de análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e aos perfis dos CHCs constituintes do envelope cuticular. Para as análises por MET utilizamos também uma espécie de abelha social, *Bombus brasiliensis*, uma espécie facultativamente social, *Euglossa cordata*, e uma outra espécie de hábito solitário, *Tetrapedia diversipes*.

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consistiu em testar a hipótese de que a heterocronia da maturação cuticular é um caráter associado ao estilo de vida (social/solitário) em espécies de Apinae. Para este estudo comparativo elegemos espécies de abelhas sociais e solitárias. RNA-seq foi utilizado para comparar a variação da expressão gênica global do tegumento em maturação de abelhas sociais e solitárias, enquanto MET permitiu comparar a ultraestrutura da cutícula em desenvolvimento nas espécies de abelhas e os perfis de CHCs foram determinados no envelope em formação.

Em relação a esse objetivo principal, metas complementares também foram definidas: (1) montagem *de novo* do transcriptoma do tegumento de *F. varia* e de *C. analis*; (2) análise do transcriptoma do cérebro de *A. mellifera* para verificar os perfis de expressão de genes reguladores dos eventos de muda associados à formação e maturação cuticular; (3) análise das regiões promotoras dos genes de interesse para verificação de sítios de ligação para fatores de transcrição conhecidos e construção de redes de interação gênica.

3. Metodologia

3.1. Coleta das amostras

As abelhas nativas foram coletadas de acordo com as leis brasileiras: Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob a licença de número: 41883-1; número de autenticação: 71367685; e licença número: 41883-2; número de autenticação: 39944978. Coletamos as amostras de operárias de *A. mellifera* Africanizada e *F. varia* de colônias mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os ninhos-armadilha para a coleta das espécies de abelhas solitárias *C. analis* e *T. diversipes* foram confeccionados como descrito por Jesus e Garófalo (2000), e posicionados na área do apiário. Fêmeas de três fases do desenvolvimento foram utilizadas neste trabalho: adultas-faratas com pigmentação cuticular corporal intermediária (Pbm), adultas recém-emergidas (Ne) com 0h após a emergência para as espécies sociais ou no intervalo entre 0 e 24h para as solitárias, e abelhas forrageadoras (Fg). Nós consideramos as fêmeas das espécies solitárias que estavam nidificando como sendo equivalentes às forrageadoras das espécies sociais, uma vez que precisavam retornar com material coletado (pólen) para a montagem do ninho.

3.2. Extração do RNA total

Para cada fase do desenvolvimento de *A. mellifera* e *F. varia* foram preparados três *pools*, de tegumento, cada um contendo cinco tegumentos abdominais, para cada fase do desenvolvimento de *A. mellifera* e *F. varia*. Para *C. analis* cada um dos três *pools* foi preparado com três tegumentos. Foram também preparadas três *pools* de cérebros de *A. mellifera*, um para cada fase do desenvolvimento, cada um contendo cinco cérebros. Essas 30 amostras foram individualmente homogeneizadas e estocadas a -80°C em microtubos contendo 1ml de TRIzol® (Invitrogen).

A extração do RNA foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). As amostras em TRIzol® foram descongeladas e mantidas por 5 min em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. A cada amostra foram adicionados 200 µL de clorofórmio (MERCK) e, em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 sec e mantidos em temperatura ambiente por 2 min, seguindo-se centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 15 min. Ao final da centrifugação, as amostras apresentaram duas fases: uma fase branca aquosa superior (onde se encontram os RNAs) e outra vermelha inferior (contendo diversos componentes celulares e o restante do TRIzol®). A fase branca foi transferida para outro microtubo onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (MERCK), iniciando a etapa de precipitação do RNA. As

amostras foram então mantidas em temperatura ambiente por 10 min e depois centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C. O RNA precipitado formou um *pellet* gelatinoso nas laterais do fundo do tubo. O sobrenadante obtido na precipitação foi descartado e o RNA foi lavado com 1ml de etanol 75%. Os tubos foram então rapidamente agitados no agitador de tubos até o desprendimento do *pellet* e o material foi centrifugado a 7.500 x g por 5 min a 4°C. Ao fim deste procedimento redissolvemos o RNA. Para isso o sobrenadante foi descartado com cuidado e os tubos, abertos, colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55°C por 10 min para evaporação do álcool remanescente, entretanto não procedemos à secagem por completo, pois o RNA totalmente seco é de difícil solubilização. O RNA foi então ressuscitado em 15-30 µL de água ultra-pura (purificada por osmose reversa, em seguida pelo sistema *Milli-Q Plus*) tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1% (v/v), Sigma) e autoclavada. Para completa dissolução do RNA precipitado, as amostras foram deixadas em termobloco a 55 °C por 5 min. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores de leituras em comprimento de onda de 260 e 280 nm) e a concentração (dada em ng/µL) de cada amostra foram obtidas por absorbância óptica a 260/280 nm em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies). Posteriormente, as amostras foram estocadas a -80°C até o momento de envio para a *Facility* da Universidade Estadual de Campinas – Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD).

3.3. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

O sequenciamento de RNA foi realizado em plataforma Illumina (HiSeq 2500). As 30 bibliotecas foram construídas em conjuntos marcados com *tags* que diferenciaram cada amostra. As amostras foram preparadas conforme o protocolo TruSeq™ RNA (Illumina®) (http://epigenome.usc.edu/docs/resources/core_protocols/TruSeq_RNA_SamplePrep_Guide_15008136_A.pdf) que usa adaptadores que se ligam aos fragmentos de RNA das amostras no início do processo de construção das bibliotecas. Assim, foi possível combinar as amostras geradas para um único sequenciamento (seis amostras por *lane*) e, numa análise posterior, individualizar cada uma das bibliotecas.

3.4. Análise das bibliotecas de RNA

a. Remoção dos adaptadores e anotação funcional das sequências

O programa Cutadapt versão 1.4.1 (<http://code.google.com/p/cutadapt/>) que se utiliza da

linguagem Python 2.7 e tem mostrado bons resultados na plataforma Illumina®, sendo eficiente também para pequenos RNAs e para a busca de múltiplos adaptadores ao mesmo tempo numa única corrida (Martin, 2011), foi utilizado para remover a sequência dos adaptadores 5' utilizados no preparo das bibliotecas e para filtrar *reads* com qualidade *Phred* maior que 20 (que reflete um acerto de 99% no reconhecimento das bases, ou *base calling*). O sistema de qualidade *Phred* indica a probabilidade de uma base ter sido sequenciada erradamente. Para calcular o erro, o sistema se baseia na fórmula $q = -10 \times \log(p)$, onde p é a probabilidade estimada de erro. Por exemplo, se uma base tem chance de 1:1000 de estar errada o valor da qualidade será igual a 30 (Ewing e Green, 1998). Adicionalmente usamos o software Scythe versão 0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) para trinar os adaptadores à região 3' das *reads*. Utilizamos o programa PRINSEQ-lite versão 0.20.3 (Schmieder and Edwards, 2011) (<http://prinseq.sourceforge.net>) para verificar a qualidade e contagem das *reads*. Também realizamos a verificação da qualidade das *reads* com o software FastQC versão 0.11.2 (Andrews, 2010).

Após a remoção dos adaptadores, as *reads* do transcriptoma de *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* foram mapeadas por alinhamento no genoma de *A. mellifera* versão 4.5, utilizando o programa TopHat versão 2.0.9 (<http://tophat.cbcb.umd.edu>) que interpreta os arquivos e, além de alinhar as *reads* no genoma utilizando a ferramenta Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>), também descobre sítios de *splicing* dos transcritos (Trapnell *et al.*, 2009). Os alinhamentos dos transcriptomas de *F. varia* e *C. analis* com o genoma de *A. mellifera* não foram satisfatórios e por isso utilizamos apenas os dados da montagem *de novo* para estas espécies.

b. Montagem de novo dos transcriptoma de F. varia e C. analis

A montagem *de novo* dos transcriptomas foi realizada com o software Trinity (trinityrnaseq_r20140717) (Grabherr *et al.*, 2011), como recomendado por Hass *et al.* (2013). O Trinity compreende os seguintes pacotes: Inchworm, que reconstrói os *contigs* de transcritos lineares com base nos *k-mers* (fragmentos de 25 bases provenientes da fragmentação das *reads*), mas ainda não representativos do transcriptoma como um todo; Chrysalis, que reúne os *contigs* obtidos no Inchworm em grupos construindo grafos de Brujin para cada *cluster* de *contigs*; e Butterfly, que trabalha com os grafos de Brujin, trimando as regiões sem suporte e reorganizando os grafos e fornece a sequência linear de cada isoforma ou parálogo presente no transcriptoma (Grabherr *et al.*, 2011). A busca dos ortólogos dos *contigs* obtidos na montagem *de novo* foi realizada com o auxílio do software InParanoid 8 (Sonnhammer e Östlund, 2014), o qual também faz busca comparativa incluindo bancos de dados de proteínas. Foram considerados válidos os

contigs de maior similaridade com *A. mellifera* que com *D. melanogaster*. Optamos por prosseguir nossas análises com os dados obtidos das montagens *de novo* dos transcriptomas de *F. varia* e *C. analis*, os quais mostraram qualidade superior que os obtidos dos alinhamentos dos respectivos transcriptomas com o genoma de *A. mellifera*.

c. Análise da expressão diferencial

Para *A. mellifera*, a análise da expressão diferencial, após a montagem com o TopHat, foi realizada com auxílio do software Cufflinks v. 2.1.1 (<http://cufflinks.cbc.umd.edu>) (Trapnell *et al.*, 2010) que comporta arquivos oriundos do TopHat e reporta seus dados na forma de montagem mais parcimoniosa do transcriptoma, levando em consideração, inclusive, o fato de que alguns genes apresentam múltiplos sítios de *splicing* (Trapnell *et al.*, 2012). O programa Cufflinks, através da extensão Cuffmerge, integra as *reads* mapeadas pelo TopHat gerando a montagem final do transcriptoma. Em seguida, através de um programa anexo, a ferramenta Cuffdiff, foram verificados os níveis de expressão gênica e foi testada a significância estatística entre as fases do desenvolvimento. Com os dados de expressão gênica gerados, utilizando-se da ferramenta do pacote R (v. 3.1.2) CummeRbund versão 2.8.2 (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>), as análises referentes aos níveis de expressão foram plotadas (Trapnell *et al.*, 2012). Usando outro pacote, o pvclust versão 1.3.2 (Suzuki e Shimodaira, 2006), realizamos a análise dos *clusters* com base na distância de correlação associada a um método de ligação completo com 10.000 replicações de *bootstrap* (BP). O método de correlação é o mais indicado quando se trata de dados de expressão gênica (Gibbons e Roth, 2002). Usamos os valores de p corrigidos (AU) e os de BP como medidas de significância dos *clusters*. *Clusters* com AU>95% foram considerados significativos (Suzuki e Shimodaira, 2006).

Neste trabalho foram considerados como genes diferencialmente expressos para *A. mellifera* aqueles que em alguma comparação dois a dois apresentaram q-valor < 0.05 , $\log_2 \text{fold change} \leq -1$ ou ≥ 1 e *fpkm* em uma das fases comparadas ≥ 5 . Para os dados resultantes das montagens *de novo*, a contagem das *reads* e a variação da expressão dos *contigs* provenientes do Trinity foram avaliadas pelos pacotes do R DESeq2 (v. 1.6.3) (Love *et al.*, 2014) e edgeR (v. 3.8.6) (Robison e Smyth, 2008). Foram considerados como genes diferencialmente expressos os *contigs* que apresentaram resultado estatisticamente significativo para os dois pacotes utilizados. Também realizamos para *F. varia* e *C. analis* os mesmos testes realizados para *A. mellifera* com o pvclust. Os *heat maps* foram plotados com base na função *heatmap.2* do pacote gplots v. 3.0.1 (Warnes *et al.*, 2015). Para compararmos os ortólogos de interesse das três espécies analisadas, utilizamos a correlação de Pearson através do software R. Consideramos como significativos os valores de correlação $\geq 0,6$ e p

$\leq 0,1$. Os genes envolvidos em processos específicos de interesse (maturação cuticular e formação das camadas da cutícula) tiveram seus perfis de expressão caracterizados independentemente de serem diferencialmente expressos ou não.

d. Caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos

Para *A. mellifera*, nós utilizamos os IDs dos genes significativamente mais expressos em cada comparação (fases mais jovens, younger - Pbm e Ne > fase mais velha – older - Fg; fases mais velhas, older – Ne e Fg > fase mais jovem, younger - Pbm) para a busca dos ortólogos (identificações do Fly Base) de *Drosophila melanogaster* no software online g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gorth.cgi>) através da função g:Orth (Reimand *et al.*, 2007; Reimand *et al.*, 2011). Os genes diferencialmente expressos também foram representados por diagramas de venn com o auxílio da ferramenta online jvenn (Bardou *et al.*, 2014) (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/example.html>). Filtramos os ortólogos de *D. melanogaster* evitando a repetição do gene ID de *A. mellifera* e utilizamos os dados filtrados para gerar as listas de entrada para o DAVID 6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) para interpretação da função dos genes (Huang *et al.*, 2009a ; 2009b). Os dados obtidos no DAVID possibilitaram a caracterização funcional dos genes com base em busca de *Gene Ontology* (GO). O teste de P-valor Exato de Fisher modificado (EASE Score), com *threshold* de 0,1, foi o utilizado no DAVID, uma vez que esta modificação faz o teste ser muito conservador. As funções foram anotadas de acordo com o processo biológico (BioP), componentes celulares (CC) e funções moleculares (MF). Essa mesma busca foi realizada para *F. varia* e *C. analis* com base nos ortólogos de *A. mellifera*. Para as análises do cérebro, utilizamos como linha de corte os genes mais expressos na comparação entre as fases, ou seja, aqueles que apresentaram $fpm \geq 5$ e $\log_2$ fold change ≤ -2 ou ≥ 2 .

3.5. Busca por sítios de ligação para fatores de transcrição

A busca por sítios de ligação para fatores de transcrição foi realizada utilizando-se os genes envolvidos nas vias de esclerotização e melanização cuticular, metabolismo de quitina, via de biossíntese de hidrocarbonetos e reguladores da via de esclerotização. Utilizamos uma região de até 3000 bases na região 5' UTR de cada gene de interesse. Genes com a região 5' UTR não determinada ou menor que 500 bases foram excluídos da análise. A referência utilizada foi a versão 4.5 do genoma de *A. mellifera*. As regiões 5' UTR foram então analisadas no TRANSFAC® (data version 2015.3) contra o banco de dados de insetos. Para o fator de transcrição FTZ-F1, nós utilizamos as sequências disponíveis dos sítios de ligação para este fator em *D. melanogaster*

(DROME\$FTZF1_01, DROME\$FTZF1_02 e DROME\$FTZF1_03) e *Bombyx mori* (BOMMO\$CPR92_01 e BOMMO\$CPR92_02) para gerar a matriz posicional do sítio de ligação.

3.6. Redes de interação gênica

As redes de interação gênica foram plotadas com base na correlação da expressão gênica do tegumento, para cada espécie, e com base no perfil de expressão do cérebro de *A. mellifera*. Foi utilizado o software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003), v. 3.3.0 – Mac OSX, e o plugin ExpressionCorrelation App, versão 1.1.0. As correlações aceitas foram de 0,95 para $p \leq 0,05$. No caso das redes do cérebro, utilizamos um valor de correlação de 0,99, uma vez que foram construídas três bibliotecas, uma para cada fase do desenvolvimento.

3.7. MET

Abelhas *A. mellifera* (4 exemplares em fase Pbm, 3 Ne e 4 Fg), *F. varia* (3 exemplares em fase Pbm, 3 Ne e 3 Fg) e *C. analis* (4 Pbm, 4 Ne e 3 Fg) foram dissecadas para extração da região anterior direita do terceiro tergito abdominal (**Figura 2**). Fixamos o material dissecado em uma mistura de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, por 2h sob agitação. Após a fixação as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 e mantidas sob temperatura de 4° C neste tampão até o preparo para a microscopia. Para a microscopia, os fragmentos de tegumento foram fixados por 30 min em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2. Sequencialmente, esses fragmentos foram desidratados em acetona e óxido de propileno, pré-embebidos em resina LX112 (Leica) (1:1v/v) e por fim embebidos em resina pura. O contraste foi realizado com acetato de uranila que gera maior contraste ao reagir com lipídios e proteínas. Os cortes foram realizados no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da FMRP-USP e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol-Jem-100cx-II Electron Microscope. As medidas das espessuras da cutícula foram realizadas com o auxílio do software ImageJ (v. 10.2 - Mac OS) (Abramoff *et al.*, 2004).

As comparações entre as medidas de espessura das cutículas foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) associada ao teste *post hoc* Tukey's Honestly Significance Difference (Tukey's HSD) (R software, v. 3.1.2 para Mac OS).

Também realizamos medições da cutícula de fêmeas de *T. diversipes* (3 exemplares em fase Ne e 3 em Fg) e de uma espécie de Euglossini, *Euglossa cordata* (3 exemplares Ne e 3 Fg), além de operárias de uma espécie de Bombini, *Bombus brasiliensis* (2 exemplares Ne e 2 Fg). No caso de *B. Brasiliensis*, a identificação das abelhas em fase Ne foi estimada com base no padrão de coloração, não tendo necessariamente entre 0 e 24h pós-emergência, como determinado para as demais

espécies.

Figura 2 - Fluxograma de dissecção da região do terceiro tergito abdominal. Modelo do exemplo: operária de *A. mellifera* Ne. T = tergito.

3.8. Análises dos perfis de CHC

a. Coleta de amostras, extração e identificação dos CHCs

Para as espécies eussociais, coletamos quinze abelhas para cada fase do desenvolvimento, enquanto para a espécie de abelha solitária *C. analis*, coletamos quatro exemplares em fase Pbm, sete exemplares Ne e sete Fg. Duas abelhas Ne e quatro Fg de *T. diversipes* também foram coletadas para análise dos CHCs. Cada abelha foi banhada em 1,5 mL de n-hexano 95% (Mallinckrodt Chemicals) para a extração dos CHCs. Após a secagem dos extratos em fluxo de N₂, cada amostra foi ressuspensa em 160 µL de n-hexano 95%. Os picos de CHCs foram identificados como descrito em Falcón *et al.* (2014). Para *F. varia* foi necessário remover as pernas posteriores para se evitar a contaminação dos extratos com resina. Devido ao reduzido tamanho das abelhas desta espécie, foram utilizados 500 µL do n-hexano para extrair os CHCs (Nunes *et al.*, 2008) e após secagem, estas amostras foram ressuspensas em 100 µL de n-hexano antes da corrida. A identificação dos CHCs foi feita em aparelho de Cromatografia a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (Shimadzu GCMS model QP2010), equipado com uma coluna 30m DB-5MS e contendo hélio como gás carreador (1 mL/min), utilizando o método de ionização eletrônica (EI).

b. Análises estatísticas dos perfis de CHCs

A quantificação relativa dos CHCs foi baseada na área dos picos obtidas a partir dos cromatogramas (Singer e Espelie, 1992). Para *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* nós ajustamos a porcentagem dos compostos para 100% e cada área de pico foi normalizada de acordo com a

fórmula $Z = \ln[Ap/g(Ap)]$, onde Ap é a área do pico, $g(Ap)$ é a média geométrica do pico para cada amostra de abelha e Z é a área transformada do pico (Aitchison, 1982). Também comparamos separadamente cada classe de CHC (n-alcenos, insaturados e ramificados), repetindo a normalização para cada caso.

Para verificar as diferenças entre os perfis de CHCs das diferentes fases do desenvolvimento de cada espécie, nós utilizamos a abordagem de clusterização descrita no tópico 4.4. (**seção c**), porém ao invés de utilizarmos um método de correlação, medimos as distâncias Euclidianas entre as fases do desenvolvimento. Também verificamos quais os compostos que melhor explicam a variância encontrada através da Análise de Componentes Principais (PCA) (R software). Verificamos a variação da proporção de cada pico de CHC entre as fases do desenvolvimento por meio do teste One-Way ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's Honestly Significance Difference (Tukey's HSD) (R software).

Adicionalmente realizamos a quantificação absoluta de picos de CHCs. Nós utilizamos a curva analítica (como aceito pelo *Analytical Methods Committee*) para estabelecer a correlação entre os sinais (quantidade de padrão interno utilizado) e quantidades do CHC a ser quantificado. A Curva de Calibração Linear pode ser descrita pela Equação $y = ax + b$, onde y é o sinal mensurado (variável conhecida - quantidade de padrão interno), x é a concentração do CHC a ser determinada (variável desconhecida); a é o coeficiente angular (área do pico do padrão interno); e b é o coeficiente linear (área do *background* interceptado). A curva analítica foi preparada a partir de padrões internos dos n-alcenos C_{23} , C_{25} e C_{32} (Alltech Corporation), usados como referência para os demais. Partindo de uma solução estoque de $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, a curva foi preparada com seis pontos nas concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 1**), injetadas nas condições cromatográficas apresentadas no subitem “3.8 a.” da metodologia. A cada uma dessas concentrações foram adicionados 6,25 μL do padrão interno α -colestano (Sigma-Aldrich). A determinação do composto a ser utilizado como padrão interno deve obedecer às seguintes premissas: nunca ser encontrado na amostra, ser disponível em alto grau de pureza, ser similar ao composto analisado e não apresentar o mesmo tempo de retenção na coluna cromatográfica que os demais picos da amostra. No método do padrão interno, a calibração é feita em termos de uma razão de resposta e é extremamente útil especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis como temperatura da coluna, fluxo de gás de arraste, tamanho de amostra e volume de injeção (Lanças, 1993). O coeficiente de correlação linear (R) e o fator de correlação ao quadrado (R^2) foram calculados. Os valores de coeficientes de correlação para os hidrocarbonetos apresentaram alto valor de correlação, com todos os valores de R igual ou superiores a 0,999 (**Tabela 2**).

Tabela 1 - Dados para a construção da curva analítica das concentrações de CHC.

Ponto da curva	Concentração final (µg/mL)	Padrão Interno (µg/mL)	Volume diluído em n-hexano (µL)
1	1,250	6,25	100
2	2,500	6,25	100
3	5,000	6,25	100
4	10,000	6,25	100
5	15,000	6,25	100
6	20,000	6,25	100

Tabela 2 - Parâmetros da Curva Analítica. a=Coeficiente angular; b=Coeficiente linear; R=Fator de correlação; R²=Fator de determinação.

Hidrocarboneto	a	b	R	R ²
C ₂₃	1,9370	0,004320	0,9995	0,9990
C ₂₅	1,8905	0,007084	0,9994	0,9988
C ₃₂	1,9545	0,008873	0,9996	0,9992

Após a confecção das curvas (**Figura 3**), três abelhas de cada fase de desenvolvimento foram utilizadas individualmente para a análise qualitativa dos CHCs presentes na cutícula de *A. mellifera* e *C. analis*. Devido ao tamanho corporal reduzido, para este método nós utilizamos três abelhas para cada uma das três amostras de *F. varia*. As amostras foram secas e ressuspendidas em uma solução contendo 6,25 µg de α -colestano em 100 µL de hexano e, em seguida, foram injetadas sob as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente. Todos os picos de n-alcanos e de alcenos foram integrados, além do pico de α -colestano, para se obter a área de cada pico e determinar a relação da área do pico a ser quantificado pela área do pico do padrão interno (y). A partir da fórmula do modelo linear de curva de calibração citado anteriormente, foi possível determinar o valor de x, que corresponde à massa dos hidrocarbonetos encontrados na cutícula das abelhas. Para *F. varia*, o valor encontrado para cada CHC foi dividido por três, uma vez que três abelhas foram utilizadas para cada amostra. Para calcular as concentrações de compostos até C₂₄, utilizamos a curva do C₂₃; para compostos de C₂₅ a C₂₉, utilizamos a curva do C₂₅; para os compostos maiores que C₂₉ até C₃₅, utilizamos a curva do C₃₂. Em seguida, realizamos o teste de ANOVA citado neste tópico da metodologia, porém utilizando os valores brutos de quantidade absoluta de hidrocarbonetos e com isso estabelecemos se as variações nas quantidades de n-alcanos e CHCs insaturados (exceto para *F. varia* devido às concentrações muito baixas de CHCs insaturados) são significativas entre as fases do desenvolvimento para cada espécie.

Figura 3 - Curvas de calibração dos compostos: (a) C₂₃, (b) C₂₅ e (c) C₃₂.

4. Resultados

Para a melhor visualização das Figuras, recomendo acessar a versão .pdf da Tese no CD em anexo. Neste CD também estão presentes os demais arquivos suplementares e anexos.

4.1. RNA-seq

a. Expressão gênica no tegumento abdominal

A análise da expressão gênica global do tegumento revelou 13.200 genes para *A. mellifera*, 55.209 *contigs* para *F. varia* e 30.161 *contigs* para *C. analis*. Destes totais, foram encontrados 3.184 genes diferencialmente expressos em *A. mellifera* e 5.959 e 2.543 *contigs* diferencialmente expressos em *F. varia* e *C. analis*, respectivamente, considerando-se os seguintes critérios: $p \leq 0.05$, $fpm \geq 5$ e $\log_2 \text{fold change} > 1$ ou < -1 . As análises de distâncias entre os conjuntos de genes diferencialmente expressos nos tegumentos das fases do desenvolvimento de *A. mellifera* mostraram que as amostras das fases Pbm e Ne se agrupam em um *cluster* separado da fase Fg. Portanto, em termos de expressão gênica, o tegumento de operárias Fg de *A. mellifera* se distingue dos tegumentos das fases mais jovens (**Figura 4A**). Um resultado diferente foi encontrado para *F. varia* (**Figura 4B**) e *C. analis* (**Figura 4C**), onde Fg e Ne formaram um *cluster* separado de Pbm (**Figura 4**). Para *C. analis*, este resultado é consistente com a aceleração do processo de maturação cuticular que propicia a realização de atividades extra-nidais logo em seguida à emergência. Contudo, resultado similar foi obtido para a abelha eussocial *F. varia* que permanece na colônia por vários dias após a emergência.

Figura 4 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração os genes diferencialmente expressos. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

Para *A. mellifera*, dos 3.184 genes diferencialmente expressos, 473 e 567 deles foram mais expressos em Pbm que em Ne e Fg, respectivamente; 666 e 250 mais expressos em Ne que em Pbm e Fg, respectivamente; e 784 e 330 mais expressos em Fg que em Pbm e Ne, respectivamente. 161 genes foram mais expressos nas fases mais jovens (Pbm e Ne) e 470 nas fases mais avançadas (Ne e Fg) (**Arquivo Suplementar, Figura 5A**). A análise de GO indica que os genes envolvidos na formação e diferenciação do tegumento são mais expressos nas fases de Pbm e Ne (**Figura 6**). Os genes mais expressos nas fases adultas, em relação à formação da cutícula, estão relacionados com a síntese de CHC (**Figura 6**). Dos 5959 *contigs* de *F. varia* diferencialmente expressos, 1257 e 2341 deles foram mais expressos em Pbm que em Ne e Fg, respectivamente; 1663 e 1256 mais expressos em Ne que em Pbm e Fg, respectivamente; e 2361 e 954 mais expressos em Fg que em Pbm e Ne,

respectivamente. 752 *contigs* foram mais expressos nas fases mais jovens e 988 nas fases mais avançadas (**Arquivo Suplementar, Figura 5B**). Assim como para *A. mellifera*, a análise de GO indica que os genes envolvidos na formação e diferenciação estrutural do tegumento são mais expressos nas fases de Pbm e Ne, exceto pelos genes de vias de pigmentação não melanínicas do tegumento de abelhas, que são mais expressos no estágio adulto (**Figura 6**). Os demais genes mais expressos nas fases adultas e relacionados à formação da cutícula estão envolvidos na síntese de CHC (**Figura 5**). Dentre os *contigs* diferencialmente expressos de *C. analis*, 997 e 843 são mais expressos em Pbm que em Ne e Fg, respectivamente; 832 e 156 mais expressos em Ne que em Pbm e Fg, respectivamente; e 811 e 91 mais expressos em Fg que em Pbm e Ne, respectivamente. 49 *contigs* foram mais expressos nas fases mais jovens, enquanto 507 foram mais expressos nas fases mais velhas (**Arquivo Suplementar, Figura 5C**). Para esta espécie, genes envolvidos na organização das camadas de quitina (quitinases) foram mais expressos em Pbm e Ne, enquanto genes da via de síntese de CHC e de pigmentação não canônicas do tegumento de abelhas foram mais expressos em Ne e Fg (**Figura 6**). A análise de GO para cada comparação (por categoria) pode ser observada nos **Anexos A1** (*A. mellifera*), **A2** (*F. varia*) e **A3** (*C. analis*). Os dados sobre todos os genes/*contigs* encontrados estão no **Anexo B1**.

Adicionalmente, independente do nível de significância obtido nas comparações, analisamos os genes potencialmente envolvidos na formação das camadas da cutícula. As análises de clusterização apresentadas na **Figura 4** e, a seguir, nas **Figuras 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23** estão resumidas na **Figura 25**. A **Figura 7** mostra que o perfil de expressão dos genes codificadores de enzimas da via de pigmentação e esclerotização da cutícula aproximam as fases Pbm e Ne de *A. mellifera* (**Figura 7A**), enquanto para *F. varia* a fase Ne está mais próxima à Fg, porém ainda como um grupo distinto (**Figura 7B**). Esta aproximação entre Ne e Fg se repete para os dados de *C. analis* (**Figura 7C**). Assim, os padrões de distância considerando-se os genes codificadores de enzimas da via de pigmentação e esclerotização refletem aqueles obtidos da análise de todos os genes diferencialmente expressos (**Figura 4**).

A.

B.

C.

Figura 5 - Diagramas de Venn representando o número de genes mais expressos em cada comparação entre as fases do desenvolvimento para cada espécie. A. *mellifera* (A); *F. varia* (B); *C. analis* (C).

Figura 6 - Sumário das categorias obtidas nas análises de *Gene Ontology* (GO) relacionando os principais processos envolvidos na formação e diferenciação da cutícula adulta. *A. mellifera* (barras azuis escuras), *F. varia* (barras azuis claras) e *C. analis* (barras vermelhas). O eixo X apresenta o número de genes (ou *contigs*) obtidos para cada categoria (eixo Y – GO categories). Os genes mais expressos nas fases mais jovens (Pbm e Ne) do que na mais velha (Fg) estão agrupados na categoria Younger>Fg. Os genes mais expressos nas fases mais velhas (Fg e Ne) do que na mais nova (Pbm) estão agrupados na categoria Older>Pbm. O retângulo verde identifica as categorias de GO envolvidas na diferenciação da epiderme; o retângulo roxo identifica as categorias de GO envolvidas na formação e diferenciação da cutícula; o retângulo preto indica as categorias de GO envolvidas na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares; o retângulo amarelo indica as categorias de GO envolvidas em processos de pigmentação não melanínica na cutícula de abelhas. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Figura 7 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas da via de melanização e esclerotização da cutícula). As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores de suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

A **Figura 8** representa em heat maps os perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas da via de pigmentação e esclerotização da cutícula em *A. mellifera* (**Figura 8A**), *F. varia* (**Figura 8B**) e *C. analis* (**Figura 8C**). Para todas as espécies ocorre aumento de expressão de alguns genes no tegumento da fase Ne, especificamente, genes *tan*, *TH* e *Dat* em *A. mellifera*, genes *tan*, *TH* e *yellow-y* em *F. varia* e genes *ebony*, *TH* e *Dat* em *C. analis*. Ressalte-se que a expressão destes e dos demais genes da **Figura 8** se mantém ou se reduz na fase Fg para as três espécies de abelhas, exceto o gene *Dat* que apresentou aumento significativo de expressão na fase Fg de *A. mellifera*. Importante, os perfis de expressão dos genes *tan* e *ebony* mostraram-se positivamente correlacionados entre as espécies sociais (*tan*: $P = 0,0002548$, $r = 0,93181$; *ebony*: $P = 5,39E-06$, $r = 0,97763$) (ver **Anexo B2** para os dados de correlação da expressão gênica), mas não entre cada uma

delas e a espécie solitária, sugerindo função no processo de heterocronia do desenvolvimento cuticular associado ao estilo de vida.

Figura 8 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas da via de melanização e esclerotização. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Genes: Dopamina N-acetiltransferase (*Dat*), *tan*, Tirosina hidroxilase (*TH*), *ebony*, Dopa-decarboxilase (*Ddc*), Laccase2 (*Lac2*) e Yellow (*yellow-y*). Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

A expressão dos genes codificadores de enzimas da via do metabolismo de quitina em *A. mellifera* agrupa Pbm e Ne. Fg apresenta-se como um grupo mais distante das demais fases do desenvolvimento. Em *F. varia* e *C. analis*, mais uma vez, Ne e Fg estão mais próximas, com Pbm apresentando-se como um grupo distinto (**Figura 9**). A análise da expressão destes genes da via do metabolismo de quitina também reflete os padrões de distância entre as fases do desenvolvimento obtidos com o conjunto dos genes diferencialmente expressos (**Figura 4**) e com os genes codificadores de enzimas da via de pigmentação e esclerotização (**Figura 7**).

Figura 9 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas da via do metabolismo de quitina. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicação de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

A **Figura 10** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo de quitina em *A. mellifera* (**Figura 10A**), *F. varia* (**Figura 10B**) e *C. analis* (**Figura 10C**). Também neste caso, a expressão de poucos genes aumenta na fase

Ne de *A. mellifera* (*AmCht5*) e de *C. analis* (*CaIdgf4-like*) e se verifica que a expressão destes genes é mantida ou se reduz nas forrageiras, com exceção do gene *AmlIdgf4-like* cuja expressão aumenta significativamente na fase Fg de *A. mellifera*. Os perfis de expressão de três destes genes são consistentes com a hipótese deste trabalho: *Idgf4-like* ($P = 0,05258$, $r = 0,66096$), *Cda5* ($P = 0,008964$, $r = 0,80429$) e *chitooligosacchariodolytic-domain-like* ($P = 0,0058$, $r = 0,8281$) (**Anexo B2**). A modulação da expressão destes genes nas fases do desenvolvimento mostrou-se positivamente correlacionada entre *A. mellifera* e *F. varia*, mas não entre cada uma destas espécies e *C. analis*.

Figura 10 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas do metabolismo da quitina. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Cht = quitinase; Cda=quitina desacetilase. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Os padrões de distância obtidos da análise de expressão dos genes que codificam proteínas cuticulares estruturais com domínios RR1 se mostraram similares nas espécies eussociais. Assim, em *A. mellifera* e *F. varia* (**Figuras 11A, B**), as análises de distância agruparam as fases Pbm e Ne, sendo que todos os *clusters* apresentaram suporte estatístico. Para a espécie *C. analis* (**Figuras 11C**), um *cluster* estatisticamente significativo reuniu as três amostras de Pbm com duas das amostras de Ne (Ne2 e Ne3); o outro *cluster* agrupou a amostra Ne1 com as amostras Fg. Este padrão de distância gerado pela expressão dos genes RR1 (**Figura 11**), similar para as espécies eussociais aqui analisadas, difere do padrão exibido pelo conjunto dos genes diferencialmente expressos (**Figura 4**) e pelas classes de genes de pigmentação e esclerotização cuticular (**Figura 7**) e do metabolismo de quitina (**Figura 9**), o qual aproxima as fases Pbm e Ne somente para a espécie *A. mellifera* enquanto reúne as fases Ne e Fg de cada das outras duas espécies. A **Figura 12** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores proteínas cuticulares estruturais RR1. Em geral, em *A. mellifera* (**Figura 12A**) e *F. varia* (**Figura 12B**), a expressão destes genes diminui da fase Pbm para a Ne, com exceção do aumento significativo da expressão de *AmCPR19* e *AmCPR27*. A expressão dos genes RR1 se mantém baixa ou é ainda menor na fase Fg de ambas espécies, exceto os genes *Am49Ah-like* e *AmCPR13*, com aumento significativo nesta fase. Portanto, alguns genes cuticulares estruturais mostraram aumento de expressão mesmo na cutícula madura da fase Fg. Nove entre os 15 genes RR1 de *C. analis* (**Figura 12C**) não mostraram variação significativa de expressão entre as fases analisadas, mas os níveis de expressão de *CaSgAbd1-like* aumentaram nas fases Ne e Fg. Quatro dos genes RR1 mostraram perfis de expressão positivamente correlacionados entre as fases do desenvolvimento das espécies eussociais, mas não entre estas espécies e a solitária: *CPR14* ($P = 0,00099$, $r = 0,89856$), *CPR17* ($P = 5,58E-06$, $r = 0,97718$), *CPR18* ($P = 0,009351$, $r = 0,80177$) e *CPR25* ($P = 8,39E-05$, $r = 0,95063$) (**Anexo B2**). Os perfis de expressão destes genes é condizente com a hipótese de heterocronia da maturação cuticular entre espécies de hábito social ou solitário.

Os perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas RR2 aproximaram as fases Ne e Fg nas espécies eussociais; o padrão de distâncias mostrou-se semelhante em *C. analis*, embora uma das amostras de Ne (Ne2) desta espécie tenha se agrupado com as amostras de Pbm (**Figura 13**). A **Figura 14** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores proteínas cuticulares estruturais RR2 em *A. mellifera* (**Figura 14A**), *F. varia* (**Figura 14B**) e *C. analis* (**Figura 14C**). Ressalte-se o gene *AmUnCPR-RR2-5* que mostra aumento de expressão nas fases Ne e Fg (**Figura 14A**) e o gene *CaUnCPR-RR2-1*, comparativamente mais expresso na fase Pbm (**Figura 14C**). Dois dos genes da classe RR2 mostraram perfis de expressão positivamente correlacionados entre as fases do desenvolvimento das espécies sociais e condizentes com a

hipótese deste trabalho: *CPR23* ($P = 0,00267$, $r = 0,86399$) e *CPR26* ($P = 0,00083$, $r = 0,90355$) (**Anexo B2**).

Os genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais de outras famílias que não as RR aproximam as fases Ne e Fg de *A. mellifera* (**Figura 15A**) e de *C. analis* (**Figura 15C**) e as fases Pbm e Ne de *F. varia* (**Figuras 15B**). O padrão de distâncias obtido com estes genes difere dos padrões obtidos com as classes de genes citadas anteriormente, um deles reunindo o conjunto dos genes diferencialmente expressos, genes de pigmentação e esclerotização cuticulares e genes do metabolismo de quitina, e os outros dois obtidos das análises de expressão dos genes RR1 e RR2, respectivamente. A **Figura 16** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais que não possuem o domínio RR. Em *A. mellifera*, a maioria destes genes diminui sua expressão na fase Ne em relação à fase Pbm, e a expressão de alguns deles continua em declínio na fase Fg. Exceções são os genes *AmApd-1*, *AmUnCPR* e *AmUnCPF-2* com maior expressão em Ne, e *Ampap1-2* com maior expressão em Fg que em Ne (**Figura 16A**). Similarmente, em *F. varia*, a maioria destes genes mostrou diminuição da expressão da fase Pbm para Fg. Mas o gene *FvUnCP-8* é mais expresso na fase Ne e o gene *FvApd-1* é mais expresso na fase Fg que em Pbm (**Figura 16B**). Ressalte-se em *C. analis* os genes mais expressos em Fg (*CaUnCpap-4*, *CaUnCpap-3*, *CaCpap3-e*), em Ne (*CaUnCPR-1*, *CaApd-1*) e nestas duas fases (*CaUnCpap-9*, *CaApd-2*) que em Pbm (**Figura 16C**). Ressalte-se dois genes cuja expressão foi positivamente correlacionada entre as espécies eussociais, mas não entre elas e a solitária: *Apd-3* ($P = 3,49E-10$, $r = 0,9986$) e *Apd-like* ($P = 1,27E-05$, $r = 0,97139$) (**Anexo B2**).

Os genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas na via dos hidrocarbonetos cuticulares que compõem o envelope aproximam as fases Ne e Fg para todas as espécies analisadas (**Figura 17**), porém para *C. analis* uma amostra da fase Pbm agrupou com as fases mais velhas. A **Figura 18** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas na síntese de CHC em *A. mellifera* (**Figura 18A**), *F. varia* (**Figura 18B**) e *C. analis* (**Figura 18C**). Em *A. mellifera*, 12 de 23 genes mostraram maior expressão nas fases mais velhas (Ne e Fg). Exceção foram os genes *AmDesat-GB51236* e *AmElo-GB40681* com expressão significativamente maior na fase jovem, Pbm (**Figura 18A**). Quatro de 15 destes genes de *F. varia* mostraram maior expressão nas fases mais velhas e três foram mais expressos em Pbm (**Figura 18B**). Em *C. analis*, 13 de 18 destes genes mostraram maior expressão nas fases mais velhas e nenhum na fase mais jovem, Pbm (**Figura 18C**). Os seguintes genes codificadores de desaturases (Desat) e elongases (Elo) mostraram perfis de expressão positivamente correlacionados entre as espécies sociais, mas não entre elas e a espécie solitária: *Desat-GB40659* ($P = 0,002337$, $r =$

0,86923), Elo-GB46038 ($P = 0,01462$, $r = 0,77281$), Elo-GB54302 ($P = 9,84E-06$, $r = 0,97341$), Elo-GB54401 ($P = 0,001571$, $r = 0,88377$) e Elo-GB45596 ($P = 0,01463$, $r = 0,77276$) (**Anexo B2**).

Figura 11 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR1. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*). Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Figura 12 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR1. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Figura 13 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR2. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

Figura 14 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais RR2. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Figura 15 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A.), *F. varia* (B.) e (C) *C. analis* levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais não pertencentes às famílias RR1 ou RR2. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

Figura 16 - *Heat maps* representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais não pertencentes às famílias RR1 ou RR2. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Continuação da Figura 16.

Figura 17 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A) e *F. varia* (B) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas na biossíntese de CHC). As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

Figura 18 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de enzimas (desaturases e elongases) potencialmente envolvidas na via de biossíntese dos CHC. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

No que se refere aos genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento, para as espécies eussociais, seus respectivos perfis de expressão agrupam Ne e Fg, além de discriminar significativamente todas as fases analisadas. Para a espécie solitária, estes perfis agrupam Pbm e Ne, embora apenas as amostras de Pbm formem um grupo distintamente significativo. Este padrão de clusterização ocorreu somente para os dados de expressão destes genes reguladores, distinguindo-os das demais classes de genes (**Figura 19**).

Figura 19 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento. As setas indicam os *clusters* estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do *cluster* (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de *bootstrap* - BP). Em cinza os limites dos ramos (*Edges*).

A **Figura 20** representa em *heat maps* os perfis de expressão dos genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento em *A. mellifera* (**Figura 20A**), *F. varia* (**Figura 20B**) e *C. analis* (**Figura 20C**). Os perfis de expressão dos seguintes genes foram positivamente correlacionados entre as espécies eussociais, mas não entre elas e *C. analis*: *Ethr* ($P = 7,54E-06$, $r = 0,97537$), *E74* ($P = 0,005965$, $r = 0,82696$), *Hr4* ($P = 0,00264$, $r = 0,86445$), *Hr38* ($P = 0,00651$, $r = 0,82234$), *FTZ-F1* ($P = 0,006273$, $r = 0,82432$), *Rickets* ($P = 0,00884$, $r = 0,80510$) e *Ptx-1* ($P = 0,03922$, $r = 0,69116$) (**Anexo B2**). Portanto, estes genes mostram perfis de expressão correlatos no intervalo de tempo estudado, mas somente entre as espécies eussociais.

Figura 20 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes codificadores de fatores de transcrição, hormônios e neuropeptídeos envolvidos na metamorfose do tegumento. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Considerando-se que há relação entre a atividade de genes do ciclo circadiano e a deposição da cutícula, como já observado em *D. melanogaster* (Ito *et al.*, 2008) e no Hemiptera *Riptortus pedestris* (Ikeno *et al.*, 2011), comparamos a expressão destes genes entre as três espécies estudadas. Para este grupo de genes, os perfis de expressão agruparam as fases Ne e Fg de *A. mellifera* similarmente às de *C. analis*. Em contraste, a expressão destes genes agrupou as fases Pbm e Ne de *F. varia* (**Figura 21**). Interessante, este padrão de distância foi similar ao obtido da expressão dos genes codificadores de proteínas cuticulares desprovidas de domínios RR. A expressão destes genes está representada na **Figura 22**. Com exceção de *Cry* em *F. varia*, nós detectamos a expressão de todos os genes envolvidos no ciclo circadiano no tegumento de todas as espécies de abelhas estudadas. *AmCyc* e *AmVri* apresentaram maior expressão no tegumento de Fg. *AmPdp1* foi mais expresso no tegumento das fases mais velhas, Ne e Fg. Os demais genes mostraram menor expressão nas fases mais velhas (Ne e Fg) (**Figura 22A**). Para *F. varia*, *FvCyc* foi o único gene do ciclo circadiano diferencialmente expresso, sendo mais expresso em Fg (**Figura 22B**). Em *C. analis*, o gene *CaPdp1* é mais expresso na fase Ne que em Pbm, e o gene *CaCyc* é mais expresso nas fases mais velhas, Ne e Fg (**Figura 22C**). Entre estes genes, *Tim2* mostrou perfil de expressão positivamente correlacionado ($P = 0,01072$, $r = 0,79333$) entre as espécies eussociais, mas não entre elas e a espécie solitária (**Anexo B2**).

Analizamos também genes de vias de pigmentação que levam a outros padrões de coloração, diferente daquela causada pela deposição de melanina. Para todas as espécies estudadas, Pbm apresenta-se como uma fase significativamente distinta. As fases das espécies eussociais estão diferentemente agrupadas, Pbm com Ne (com inclusão de uma amostra Fg) em *A. mellifera*, e Ne e Fg em *F. varia*. Para *F. varia*, a fase Ne também se apresenta como um grupo bem discriminado. Para *C. analis*, é marcante a sobreposição entre Ne e Fg (**Figura 23**). O perfil de expressão para estes genes pode ser observado na **Figura 24**. Entre os genes de *A. mellifera*, *Amferrochetalase*, *Amdhd-like*, *AmALAS*, *Amhenna-like* e *Amvermillion-like* estão mais expressos nas fases mais velhas, Ne e Fg, ou em Fg (**Figura 24A**). Similarmente, em *F. varia*, a maioria dos genes desta classe encontra-se mais expresso nas fases mais velhas (Ne e Fg). Mas cinco destes genes (*Fvcardinal-like*, *Fvwhite-like*, *Fvlight*, *Fvpinta-like*, *Fvhenna-like*) se distinguem pela maior expressão em Ne, e dois deles (*Fvferrochetalase* e *Fvvermillion-like*) se distinguem pela maior expressão em Fg (**Figura 24B**). Genes mais expressos nas fases mais velhas das abelhas eussociais também estão mais expressos nestas fases de *C. analis* (*Cavermillion-like*, *Cahenna-like*, *Capinta-like*). Os genes *Cascarlet* e *Cabrown-like* mostraram maior expressão em Pbm e Ne, respectivamente (**Figura 24C**). Entre os genes desta classe, somente o gene *ALAS* mostrou perfil de

expressão positivamente correlacionado entre as duas espécies eussociais, mas não entre qualquer uma delas e a espécie solitária ($P = 0,08254$, $r = 0,66077$) (**Anexo B2**).

Um resumo das análises de clusterização previamente apresentadas nas **Figuras 4, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23** é representado na **Figura 25**.

Figura 21 - Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes do ciclo circadiano no tegumento. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).

Figura 22 - Heat maps representativos dos perfis de expressão dos genes relacionados ao ciclo circadiano como osciladores periféricos no tegumento. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Figura 23 -Distâncias entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (A), *F. varia* (B) e *C. analis* (C) levando-se em consideração a expressão de genes de vias de pigmentação não melânica no tegumento. As setas indicam os clusters estatisticamente significativos com ao menos uma fase completamente representada pelas 3 amostras. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Em vermelho estão os valores de suporte do cluster (AU). Em verde estão os valores do suporte dos ramos (10.000 replicações de bootstrap - BP). Em cinza os limites dos ramos (Edges).

Figura 24 - *Heat maps* representativos dos perfis de expressão dos genes relacionados à vias de pigmentação não melanínicas no tegumento. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre fases do desenvolvimento para uma espécie. Genes agrupados pelo perfil de expressão.

Gene expression	Pbm	Ne	Fg	Species
Global expression				<i>Apis mellifera</i>
				<i>Frieseomelitta varia</i>
				<i>Centris analis</i>
Differentially expressed genes	●	●		<i>Apis mellifera</i>
		★	★	<i>Frieseomelitta varia</i>
		●	●	<i>Centris analis</i>
Melanization sclerotization	●	●		<i>Apis mellifera</i>
		★	★	<i>Frieseomelitta varia</i>
		●	●	<i>Centris analis</i>
Chitin metabolism	★	★		<i>Apis mellifera</i>
		★	★	<i>Frieseomelitta varia</i>
		★	★	<i>Centris analis</i>
RR1 structural proteins	●	●		<i>Apis mellifera</i>
	★	★		<i>Frieseomelitta varia</i>
				<i>Centris analis</i>
RR2 structural proteins		★	★	<i>Apis mellifera</i>
		●	●	<i>Frieseomelitta varia</i>
				<i>Centris analis</i>
Non RR1/RR2 structural proteins		●	●	<i>Apis mellifera</i>
	●	●	●	<i>Frieseomelitta varia</i>
		●	●	<i>Centris analis</i>
CHC pathway		★	★	<i>Apis mellifera</i>
		●	●	<i>Frieseomelitta varia</i>
		★	★	<i>Centris analis</i>
Regulatory genes		●	●	<i>Apis mellifera</i>
		●	●	<i>Frieseomelitta varia</i>
	●	●		<i>Centris analis</i>
Circadian clock genes		★	★	<i>Apis mellifera</i>
	●	●		<i>Frieseomelitta varia</i>
		★	★	<i>Centris analis</i>
Non-melanization pigmentation	★	★		<i>Apis mellifera</i>
		●	●	<i>Frieseomelitta varia</i>
				<i>Centris analis</i>

Figura 25 - Resumo das análises de clusterização realizadas com base na expressão gênica. A coluna da esquerda indica o processo analisado; as três colunas centrais representam as fases do desenvolvimento estudadas (Pbm, Ne e Fg); a coluna da direita indica as espécies estudadas. Os retângulos preenchidos (amarelo para Pbm, vermelho para Ne e azul para Fg) indicam que as três amostras da fase representada agruparam com suporte de clusterização ≥ 95 . As estrelas indicam as fases que se agruparam com suporte de clusterização ≥ 95 . Os círculos indicam as fases que se agruparam com suporte de clusterização < 95 . As linhas pontilhadas separam processos diferentes.

A **Figura 26** mostra em forma de gráficos os perfis de expressão de 76 genes de interesse (**Anexo B2**) mais o gene codificador de Ddc, isto é, potencialmente envolvidos na formação e maturação cuticular nas três espécies de abelhas aqui analisadas. Entre estes genes, 25 mostraram perfis de expressão positivamente correlacionados entre as duas espécies eussociais, mas não entre qualquer delas e a espécie solitária. Resumidamente, estes genes têm função na via de melanização e esclerotização (*tan*, *ebony*), na via de metabolismo de quitina (*Idgf4*, *Cda5*, *chitooligosaccharylhydrolase-like*), na estruturação da cutícula (*CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR23*, *CPR26*, *Apd-3*, *Apd-like*), na biossíntese de CHCs (*Desat-GB40659*, *Elo-GB46038*, *Elo-GB54302*, *Elo-GB54401*, *Elo-GB45596*), na regulação do processo de desenvolvimento cuticular e ecdise (*Ethr*, *E74*, *Hr4*, *Hr38*, *FTZ-F1*, *Rickets*, *Ptx-1*), no ciclo circadiano que influi na formação das camadas cuticulares (*Tim2*) e no processo de pigmentação não-melanínica (*ALAS*). Estes genes foram aqui considerados como “genes da heterocronia da maturação cuticular”, com potencial envolvimento em processos que ocorrem no tegumento e levam à aceleração da maturação cuticular nas abelhas solitárias (que estão prontas para o contato com o ambiente externo ao ninho já na emergência), ou desaceleração da maturação cuticular nas eussociais (que permanecem por certo tempo no ninho antes de empreender as atividades de vôo).

Figura 26 - Perfis de expressão dos genes de interesse significativamente correlacionados entre as espécies. Apesar de *Ddc* não ser significativamente correlacionado nós o adicionamos para completar o *pool* essencial de genes da via de melanização/esclerotização. Legenda de cores no final da figura. Melhor visualizada em pdf.

b. Expressão gênica no cérebro de *A. mellifera*

Nós detectamos a expressão de 13.174 genes nos dados de RNA-seq provenientes do cérebro das fases Pbm, Ne e Fg de *A. mellifera*. Destes, verificamos que 1.424 são mais expressos em Pbm, 828 são mais expressos em Ne e 826 são mais expressos em Fg ($fpkm \geq 5$ e $\log_2 \text{fold change} < -2$ ou > 2). A análise de GO para estes dados pode ser observada no **Anexo A4**. Dentre os genes mais expressos, destacamos aqueles (neuropeptídeos e neurohormônios) potenciais reguladores de genes com função no desenvolvimento da cutícula (**Figura 27**). Mais detalhes sobre a função destes genes são apresentados na discussão.

Figura 27 - Perfil de expressão, no cérebro de operárias de *A. mellifera*, de genes potencialmente envolvidos na regulação da formação e maturação da cutícula. *AmEth* (Ecdysis triggering hormone), *AmEthR* (Ecdysis triggering hormone Receptor), *AmEh* (Eclosion hormone), *AmCCAP* (Crustacean Cardioactive Peptide), *AmCCAPR* (Crustacean Cardioactive Peptide Receptor), *Ambursβ* (bursicon, subunidade β), *Ambursa* (bursicon, subunidade α).

c. Sítios de interação para fatores de transcrição e redes de co-expressão

Todos os genes de interesse analisados, ou seja, aqueles com função associada ao desenvolvimento e maturação da cutícula, apresentam sítios de ligação para os fatores caup, Optix e mirr. O fator Ptx1 apresenta sítio de ligação nos genes *AmDat*, *Amtan* e *Amebony* da via de pigmentação/esclerotização e mais direcionados para a formação de esclerotina incolor e amarelada. O fator de transcrição hairy apresenta sítios para os genes *AmTH*, *Amyellow-y* e *AmLac2* desta mesma via. A representação gráfica das matrizes de posição para os sítios de ligação dos fatores de transcrição encontra-se na **Figura 28**.

Figura 28 - Representação gráfica das matrizes de posição encontradas para os sítios de ligação na região promotora (até 3000 pb de distância na região 5' UTR) dos genes envolvidos na formação e maturação da cutícula em *A. mellifera*.

Para cada uma das espécies com o transcriptoma do tegumento analisado, geramos redes de co-expressão. Para estes dados, foram consideradas significativas as interações cuja correlação de Pearson foi maior ou igual a 0.95 ($p < 0.05$). Estas redes de co-expressão podem ser vistas nas **Figuras 29, 30 e 31** (com base nas correlações positivas para *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis*, respectivamente). Para todas elas destacamos a existência de co-expressão entre genes da formação da cutícula e genes reguladores e do ciclo circadiano.

Comparando-se essas redes, percebemos como pontos comuns entre as espécies sociais a co-expressão entre genes reguladores da muda (*FTZ-F1*, *E74*, *Hr4* e *Hr46*), *Lac2* e codificadores de proteínas CPR, *Apd-3* e *Apd-like*, e destas com a elongase *Elo-GB54302*, além da co-expressão entre diferentes *Cdas* (*serp*, *verm* e *Cda5*) (**Figura 32**). Já a comparação *A. mellifera* com *C. analis* apresentou apenas a interação *yellow-y/Cpap3-a*, enquanto entre *F. varia* e *C. analis* as interações *CPR16/Eh-like* e *tan/Elo-GB45596* foram comuns.

Figura 29 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas dos genes do tegumento de *A. mellifera* envolvidos com a formação da cutícula.

Figura 30 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas dos genes do tegumento de *F. varia* envolvidos com a formação da cutícula.

Figura 32 - Interações comuns às redes de co-expressão gênica nos tegumentos de *A. mellifera* e *F. varia*.

Para os dados de expressão no cérebro de *A. mellifera* com relação ao tegumento, as redes de co-expressão foram desenhadas para $r \geq 0.99999$ (correlação positiva) ou $r \leq -0.99999$ (correlação negativa). Utilizamos, portanto, critério mais estrigente, uma vez que não temos réplicas de RNA-seq de cérebro. Curiosamente não houve nenhum tipo de correlação significativa entre os neuropeptídeos analisados e genes da via de esclerotização/melanização. Destaque para a interação (co-expressão) entre os genes *brainAmEthr* e *brainAmEh* (**Figura 33**).

Figura 33 - Redes de co-expressão baseadas em correlações positivas entre a expressão de neuropeptídeos no cérebro e de genes envolvidos na formação e maturação do tegumento de *A. mellifera*.

As interações comuns entre as redes de co-expressão de *A. mellifera* e *F. varia*, incluindo genes reguladores da maturação cuticular, *Lac2*, genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula, uma elongase da via dos CHCs e genes codificadores de Cdas, podem ser marcadores do *timing* de formação e maturação cuticular das espécies eussociais, pelo menos das duas espécies aqui abordadas. O fato de haver interação entre *A. mellifera* e *C. analis* envolvendo o gene *yellow-y*, positivamente correlacionado entre estas espécies (**Anexo B2, Figura 26**), indica que pelo menos este gene da via de melanização conservou o *timing* de expressão nestas espécies.

4.2. MET

Os dados de MET referentes a *A. mellifera* mostram que a cutícula da abelha operária Fg desta espécie é mais espessa que as cutículas das fases de desenvolvimento mais jovens, Ne e Pbm. Ne apresenta a cutícula de espessura similar à de Pbm (**Tabela 3**). Os dados referentes à outra espécie de abelha social, *F. varia*, não mostram diferenças quanto à espessura da cutícula em nenhuma comparação entre as fases (**Tabela 4**).

A espécie de abelha solitária *C. analis* apresenta dados opostos aos de *A. mellifera*. Em *C. analis*, as cutículas de Fg e Ne têm espessuras similares, maiores que as de Pbm (**Tabela 5**). Os tegumentos das três espécies de abelhas, nas três fases trabalhadas, estão representados na **Figura 34** e reforçam os dados estatísticos.

Adicionalmente, também foram medidos os tegumentos de outras duas espécies sociais pertencentes aos Apidae corbiculados (*B. brasiliensis* e *E. cordata*) (Tabelas 6 e 7) e de mais uma espécie solitária (*T. diversipes*) (Tabela 8). As ultraestruturas dos tegumentos analisados são apresentadas na Figura 34.

Assim como os dados moleculares, as análises de MET apontam diferenças entre as espécies eussociais analisadas e sugerem que a deposição da cutícula da abelha adulta não está finalizada na Ne de *A. mellifera*, diferentemente das demais espécies analisadas. Estes dados também sugerem que a operária de *F. varia* apresenta toda a sua cutícula depositada já no estágio de adulto farato, enquanto a espécie solitária *C. analis* tem a deposição da cutícula finalizada entre Pbm e Ne.

Tabela 3 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera*.

Medidas da espessura da cutícula de <i>A. mellifera</i>				
Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão	Comparação	P-valor ajustado
Pbm (n=4)	7.744083333 ± 1.391928169		Ne-Fg	0.0001149
Ne (n=3)	7.189222222 ± 0.525833342		Pbm-Fg	0.0001027
Fg (n=4)	16.50558333 ± 2.024735655		Pbm-Ne	0.8844107

Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Tabela 4 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de *F. varia*.

Medidas da espessura da cutícula de <i>F. varia</i>				
Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão	Comparação	P-valor ajustado
Pbm (n=3)	3.2166667 ± 0.349042022		Ne-Fg	0.9092987
Ne (n=3)	3.644 ± 0.111433089		Pbm-Fg	0.6170525
Fg (n=3)	3.547222222 ± 0.32584085		Pbm-Ne	0.4010813

Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Tabela 5 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de *C. analis*.

Medidas da espessura da cutícula de <i>C. analis</i>				
Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão	Comparação	P-valor ajustado
Pbm (n=4)	8.367333333 ± 1.585934962		Ne-Fg	0.7978988
Ne (n=4)	24.53483333 ± 4.251054497		Pbm-Fg	0.0002672
Fg (n=3)	26.16544444 ± 3.514686114		Pbm-Ne	0.0003049

Pbm = adulta farata com tegumento de pigmentação intermediária; Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Tabela 6 - Medidas da espessura da cutícula das fases do desenvolvimento de *B. brasiliensis*.

Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão
Ne (n=2)	39.95 ± 4.41659	
Fg (n=2)	28.46 ± 4.48211	

Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Tabela 7 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de *E. cordata*.

Medidas da espessura da cutícula de <i>E. cordata</i>				
Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão	Comparação	P-valor ajustado
Ne (n=3)	36.16789	± 3.20211	Ne-Fg	0.8867291
Fg (n=3)	36.95456	± 8.38840		

Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Tabela 8 - Medidas da espessura da cutícula e níveis de significância das comparações entre as fases do desenvolvimento de *T. diversipes*.

Medidas da espessura da cutícula de <i>T. diversipes</i>				
Amostra	Média (µm)	Desvio Padrão	Comparação	P-valor ajustado
Ne (n=3)	22.77767	± 11.79025	Ne-Fg	0.903437
Fg (n=3)	21.89033	± 1.58074		

Ne = recém emergida; Fg = forrageira.

Figura 34 – MET de tegumentos das abelhas sociais (*A. mellifera*, *F. varia*, *B. brasiliensis* e *E. cordata*) e solitárias (*C. analis* e *T. diversipes*). (A, B e C): esquerda:Pbm; meio: Ne; direita: Fg. (D, E e F): esquerda: Ne; direita: Fg. (A) *A. mellifera*: aumento de 10kx. (B) *F. varia*: aumento de 40kx. (C) *C. analis*: aumento de 4kx. (D) *B. brasiliensis*: aumento 5kx. (E) *E. cordata*: aumento 4kx. (F) *T. diversipes*: aumento 4kx. Cu=cutícula; Ep=epiderme. Figuras alinhadas na junção cutícula epiderme para facilitar as comparações. Escalas na posição inferior direita de cada figura.

4.3. Análises dos perfis de CHCs

a. Proporções das classes de CHCs detectadas nas espécies de abelhas sociais e solitárias

Os níveis de n-alcanos, CHC insaturados e ramificados detectados em *A. mellifera*, *F. varia*, *C. analis* e *T. diversipes* estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12, respectivamente. Em *A. mellifera*, os níveis destas classes de hidrocarbonetos são similares entre Pbm e Ne. Fg tem maior proporção de n-alcanos e CHCs insaturados, porém menor proporção de CHCs ramificados. *F. varia* apresenta proporção semelhante de n-alcanos quando comparamos Ne com Fg, mas como em *A. mellifera*, as Fg de *F. varia* têm maior proporção de CHCs insaturados e menor de ramificados do que as fases mais jovens. Diferentemente das espécies de abelhas sociais, *C. analis* não diferencia suas fases do desenvolvimento significativamente através dos perfis de CHCs. As fases do desenvolvimento de *T. diversipes*, apesar do baixo número amostral, também não se diferenciam quando comparamos as classes de CHCs.

Dessa forma, observamos que as proporções das três classes de CHCs diferenciam Fg das demais fases de *A. mellifera*, o que não foi observado para os n-alcanos de *F. varia* e nem para as mesmas classes nas espécies solitárias.

Tabela 9 - Proporção média das classes de CHCs de *A. mellifera*.

Média e Desvio Padrão das classes de CHCs de <i>A. mellifera</i>												
Classes de CHCs	Pbm (n=15)				Ne (n=15)				Fg (n=15)			
	Média	±	DP	Sig.	Média	±	DP	Sig.	Média	±	DP	Sig.
n-alcanos	54.595741	±	3.3525815	a	52.080248	±	4.4672109	a	74.690468	±	6.5691809	b
insaturados	5.0379307	±	2.5856206	a	5.7141345	±	2.971799	a	18.754373	±	4.0115828	b
ramificados	40.366328	±	4.1820963	a	42.206618	±	5.0435619	a	6.5554917	±	7.0446318	b

Desvio Padrão (DP). Letras vermelhas diferentes na coluna de significância (Sig.) representam dados estatisticamente significativos (teste ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's HSD) entre as fases do desenvolvimento

Tabela 10 - Proporção média das classes de CHCs de *F. varia*.

Média e Desvio Padrão das classes de CHCs de <i>F. varia</i>												
Classes de CHCs	Pbm (n=15)				Ne (n=15)				Fg (n=15)			
	Média	±	DP	Sig.	Média	±	DP	Sig.	Média	±	DP	Sig.
n-alcanos	79.13357	±	10.629225	a	88.786349	±	4.5727378	b	85.512497	±	5.4474394	ab
insaturados	2.4163779	±	1.7667233	a	4.8101229	±	1.5278507	a	14.129197	±	5.4231754	b
ramificados	18.450052	±	9.8483629	a	6.4035276	±	3.4868966	b	0.3583061	±	0.2403354	c

Desvio Padrão (DP). Letras vermelhas diferentes na coluna de significância (Sig.) representam dados estatisticamente significativos (teste ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's HSD) entre as fases do desenvolvimento

Tabela 11 - Proporção média das classes de CHCs de *C. analis*.

Média e Desvio Padrão das classes de CHCs de <i>C. analis</i>												
Classes de CHCs	Pbm (n=4)				Ne (n=7)				Fg (n=7)			
	Média	±	STD	Sig.	Média	±	STD	Sig.	Média	±	STD	Sig.
N-alcanos	40.4243834	±	6.69132761	a	40.2422451	±	6.23342624	a	33.4885047	±	3.80798446	a
insaturados	58.639068	±	6.63350033	a	59.4582213	±	6.3339471	a	65.2612041	±	3.54504345	a
ramificados	0.93654861	±	0.22123957	a	0.29953365	±	0.19680038	a	1.25029124	±	1.08569211	a

Desvio Padrão (DP). Letras vermelhas diferentes na coluna de significância (Sig.) representam dados estatisticamente significativos (teste ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's HSD) entre as fases do desenvolvimento

Tabela 12 - Proporção média das classes de CHCs de *T. diversipes*.

Média e Desvio Padrão das classes de CHCs de <i>T. diversipes</i>						
Classes de CHCs	Ne (n=2)			Fg (n=4)		
	Média	±	DP	Média	±	DP
n-alcanos	49.0416518	±	4.1297201	55.1800248	±	9.6877892
insaturados	44.8747310	±	5.9973402	42.8164104	±	6.9992126
ramificados	6.0836172	±	1.8676201	2.0035648	±	2.7127222

Desvio Padrão (DP).

b. Diferenças nos perfis de CHCs entre as cutículas em formação e maduras das espécies sociais e solitária

Inicialmente, todos os CHCs quantificados foram analisados em conjunto, independentemente do tipo e classe. Para as abelhas sociais *A. mellifera* (**Figura 35A**) e *F. varia* (**Figura 35B**) e a espécie de abelha solitária *C. analis* (**Figura 35C**), os dados do perfil total de CHCs claramente diferenciam Fg das fases mais jovens Ne e Pbm (suporte de FG: AU = 100% em ambos os casos). As distâncias entre as fases mais jovens não são aparentes em *A. mellifera*. Em *C. analis* Pbm e Ne se agrupam (AU = 96%) e Fg gera dois grupos, um com suporte AU = 96% e outro com AU=97%. Adicionalmente, em *F. varia*, o perfil total de CHCs discrimina Ne (AU = 95%) de Pbm (apesar do valor de AU = 94%, o valor de BP=87, que é, no mínimo, um valor de moderado a alto para o suporte de BP e está geralmente associado a valores de probabilidade posterior de análises Bayesianas $\geq 95\%$ (Zander, 2004) (**Figura 35**).

As proporções dos picos de CHCs nos cromatogramas, o nível de significância de cada pico e a contribuição destes picos para discriminar as fases do desenvolvimento nas espécies de abelhas sociais e solitária estão apresentados no **Anexo C**. Para a espécie de abelha solitária *T. diversipes*, apenas dados descritivos são apresentados na planilha **Supplementary Table 1D** deste anexo. Para cada espécie, os picos que explicam mais de 5% da variância encontrada são: um pico de alcadieno (ZZ-?-C₃₁) e três de metil-alcanos (11-MeC₂₃ / 2-MeC₂₆ / 2-MeC₂₈) para *A. mellifera*; cinco picos de CHCs insaturados (Z-?-C_{25a} / Z-?-C_{31a} / Z-?-C_{31b} / Z-?-C_{31c} / Z-?-C_{33a}), três picos de CHCs ramificados (13-MeC₂₇ / 11-MeC₂₉ / 13-;15-MeC₃₃) e o pico do n-alceno C₂₀ para *F. varia*. Dois picos de alcenos (Z-?-C₂₁ / Z-5-C₂₃) foram detectados apenas na fase Fg de *F. varia*; para *C. analis*, apenas o pico do alceno Z-?-C_{23c} explica mais de 5% da variância.

CHCs insaturados e ramificados foram mais importantes na explicação das principais diferenças entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* e *F. varia*. Os compostos insaturados são os mais indicados para explicar as diferenças entre as fases em *C. analis*. O pico do n-alceno é crítico para explicar as diferenças entre Ne e Pbm nesta abelha (**Anexo D**).

Nós também realizamos análises individualizadas para cada classe de CHC (n-alcanos, insaturados e ramificados). Quando analisados separadamente, os n-alcanos diferenciam as forrageiras de *A. mellifera* e as fases Pbm e Ne, e agrupam estas duas fases (**Figura 36A**). Assim como em *A. mellifera*, os n-alcanos também discriminam Fg (AU = 97%) de Pbm e Ne em *F. varia*, agrupando estas fases mais jovens (AU = 98%) (**Figura 36B**). Em *C. analis*, esta classe de CHC não diferencia as fases do desenvolvimento estudadas (**Figura 36C**).

Os dados de CHCs insaturados de *A. mellifera* não nos fornece um suporte significativo para diferenciar as fases aqui analisadas. Contudo, há um grande grupo formado por amostras de Ne (14 de 15 amostras) e Pbm (12 de 15 amostras) com suporte AU = 99% e outro grupo composto por 12 das 15 amostras Fg com suporte AU = 95% (**Figura 37A**). Em *F. varia*, todas as fases são diferenciadas pelos CHCs insaturados com AU = 99% em todos os casos, sendo Pbm e Ne estatisticamente próximas (**Figura 37B**). Esta classe de compostos também é a responsável pela separação de Pbm e Ne (AU = 96%) de Fg em *C. analis* (**Figura 37C**).

Os perfis de CHCs ramificados claramente separam Fg (AU = 97%) de Pbm e Ne (AU = 100%) de *A. mellifera* (**Figura 38A**), mas não em *F. varia* (**Figura 38B**). Estes compostos diferenciam a fase Fg (um grande grupo com AU = 97%) das fases mais jovens (outro grande grupo, porém englobando todas as amostras destas fases, com AU = 99%) na abelha solitária *C. analis* (**Figura 38C**).

Assim, observamos que dentre as classes de CHCs as proporções de n-alcanos, mais importantes para a estruturação do envelope cuticular, diferenciam as fases jovens da adulta nas

espécies eussociais, mas não na solitária, enquanto os compostos insaturados e ramificados, associados à comunicação química, são úteis para discriminar indivíduos jovens do adulto maduro em todas as espécies. Portanto, no que se refere à estruturação cuticular, os n-alcanos corroboram a hipótese de heterocronia da maturação cuticular.

A. Total CHC of *A. mellifera*

B. Total CHC of *F. varia*

C. Total CHC of *C. analis*

Figura 35 - *Clusters* das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* baseados no perfil total de CHCs e distância Euclidiana. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam *clusters* estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos *clusters* (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de *clusters* maiores. AU (valores em vermelho): suporte do *cluster*; BP (valores em verde): suporte de *bootstrap*; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.

A. n-Alkanes of *A. mellifera*

B. n-Alkanes of *F. varia*

C. n-Alkanes of *C. analis*

Figura 36 - *Clusters* das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* baseados no perfil total de n-alcenos e distância Euclidiana. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam *clusters* estatisticamente significantes com 95% de confiança (os retângulos vermelhos incluem Fg na Figura 38A com AU = 94% de confiança e BP = 84). AU (valores em vermelho): suporte do *cluster*; BP (valores em verde): suporte de *bootstrap*; Edges (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.

A. Unsaturated CHCs of *A. mellifera*

B. Unsaturated CHCs of *F. varia*

C. Unsaturated CHCs of *C. analis*

Figura 37 - *Clusters* das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* baseados no perfil de CHCs insaturados e distância Euclidiana. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam *clusters* estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos *clusters* (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de *clusters* maiores. AU (valores em vermelho): suporte do *cluster*; BP (valores em verde): suporte de *bootstrap*; *Edges* (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageira.

A. Branched CHCs of *A. mellifera*

B. Branched CHCs of *F. varia*

C. Branched CHCs of *C. analis*

Figura 38 - *Clusters* das fases do desenvolvimento (Pbm, Ne, Fg) de *A. mellifera*, *F. varia* e *C. analis* baseados no perfil de CHCs ramificados e distância Euclidiana. (A) *A. mellifera*. (B) *F. varia*. (C) *C. analis*. Fotos das fases utilizadas estão posicionadas no canto superior direito de cada figura. Os retângulos vermelhos indicam *clusters* estatisticamente significantes com 95% de confiança. As setas indicam os suportes dos *clusters* (AU e BP) que discriminam as fases do desenvolvimento dentro de *clusters* maiores. AU (valores em vermelho): suporte do *cluster*; BP (valores em verde): suporte de *bootstrap*; *Edges* (valores cinzas): limites dos ramos. Pbm: abelha adulta farata com olho escuro e pigmentação cuticular intermediária; Ne: abelha adulta recém emergida; Fg: abelha adulta forrageadora.

Detalhando a análise dos CHCs para verificar se realmente a abelha solitária *C. analis* difere das sociais (*A. mellifera* e *F. varia*) no *timing* de maturação cuticular, neste caso, deduzida da concentração de n-alcenos no envelope, realizamos a quantificação absoluta destes compostos. Este dado nos mostrou que as abelhas sociais tem maior massa destes compostos nas Fg que em Ne e Pbm, enquanto nas solitárias essa massa não varia significativamente (**Tabela 10**). Portanto, considerando-se os CHCs estruturais, n-alcenos, e consistente com a hipótese da heterocronia da maturação cuticular, o processo de maturação da cutícula da abelha solitária mostrou-se mais acelerado que das abelhas sociais. Os dados da quantificação absoluta também possibilitaram detectar, através do padrão interno utilizado, o CHC C₃₂ em *A. mellifera*. Os dados referentes às quantidades absolutas de cada n-alceno estão apresentados no **Anexo E**. Para os compostos insaturados, a quantificação absoluta mostrou que em *A. mellifera*, a fase Fg apresenta maior concentração que as fases Ne e Pbm, enquanto para *C. analis* a fase Fg, com quantidades significativamente maiores destes compostos que a fase Pbm, não difere estatisticamente da fase Ne. Portanto, também para os compostos insaturados, em *C. analis* as forrageiras não diferem das recém emergidas, dando suporte à hipótese deste trabalho. (**Tabela 11, Anexo F**).

Estes dados de quantificação absoluta contradizem o encontrado com dados proporcionais para *F. varia* na **Tabela 10**, e reforçam a hipótese de que estruturalmente nem mesmo o envelope cuticular ainda não está totalmente preparado nas espécies eussociais no momento da emergência do adulto, como também observado pela análise de clusterização (**Figura 36**).

Tabela 13 – Diferenças na quantidade total de n-alcenos (µg) para cada fase do desenvolvimento de cada espécie de abelha estudada.

Quantidade total de n-alcenos (µg)			
<i>A. mellifera</i>			
Fase	Média	± DP	Sig.
Pbm	9.359659385	± 2.892754207	a
Ne	7.362726688	± 1.445354983	a
Fg	18.23603142	± 4.358774175	b
<i>F. varia</i>			
Pbm	1.633244364	± 0.153904266	a
Ne	3.401424072	± 1.353872307	a
Fg	9.283370766	± 3.038393585	b
<i>C. analis</i>			
Pbm	6.565494127	± 1.624570124	a
Ne	14.83499472	± 0.326106087	b
Fg	13.32738484	± 5.078309242	ab

DP: Desvio padrão; Letras vermelhas diferentes na coluna de significância (Sig.) representam diferenças significantes (teste ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's HSD) entre as fases do desenvolvimento de cada espécie.

Tabela 14 - Diferenças na quantidade total de CHCs insaturados (μg) para cada fase do desenvolvimento de cada espécie.

Quantidade total de CHC insturados (μg)				
<i>Apis mellifera</i>				
Fase	Média	$\pm$	DP	Sig
Pbm	0.600420389	$\pm$	0.172102424	a
Ne	0.924217689	$\pm$	0.090478639	a
Fg	6.554311798	$\pm$	2.382070669	b
<i>Centris analis</i>				
Fase	Média	$\pm$	DP	Sig
Pbm	9.249547195	$\pm$	2.485787565	a
Ne	19.24200005	$\pm$	2.405163037	ab
Fg	28.3380901	$\pm$	11.85500302	b

DP: Desvio padrão; Letras vermelhas diferentes na coluna de significância (Sig.) representam diferenças estatisticamente significantes (teste ANOVA associado ao teste *post hoc* Tukey's HSD) entre as fases do desenvolvimento de cada espécie.

5. Discussão

5.1. RNA-seq

a. Abordagem geral

Quando focamos somente os genes diferencialmente expressos (**Figura 4**), evidenciamos que o tegumento da operária Ne de *A. mellifera* ainda está em formação, uma vez que os dados gerados agrupam Ne com a fase mais jovem Pbm. Para a abelha *F. varia*, a fase Ne aparece mais próxima à Fg, resultado similar ao encontrado para a espécie solitária. Estes resultados para *A. mellifera* e *C. analis* são consistentes com a hipótese da heterocronia da maturação cuticular. Para *F. varia*, no entanto, esperávamos um padrão de agrupamento das fases similar ao de *A. mellifera*.

A análise de GO (**Figura 6**) refina os dados e atribui função aos genes diferencialmente expressos. Para *A. mellifera* e *F. varia*, esta análise indica que os genes envolvidos na esclerotização e pigmentação cuticular, bem como os genes da morfogênese da epiderme do tegumento são mais expressos nas fases mais jovens (Pbm e Ne). Para *C. analis*, as categorias de genes envolvidos na organização da camada de quitina, em especial os codificadores de quitinases, são mais expressos nas fases mais jovens. Em todas as espécies analisadas, os genes envolvidos em vias metabólicas relacionadas à biossíntese de CHCs são mais expressos nas fases adultas (Ne e Fg), juntamente com genes relacionados à manutenção da atividade celular (Anexo A). Assim, a análise de GO no que se refere às categorias envolvidas na diferenciação da epiderme e formação e diferenciação da cutícula, pode indicar que em *C. analis* a epiderme e seu produto (a cutícula) finalizam estes processos e adquirem estabilidade antes da emergência do adulto que em relação às outras espécies aqui estudadas. Genes envolvidos em vias não melanínicas da pigmentação cuticular aproximam Ne de Fg tanto para *F. varia* como para *C. analis*.

Quando direcionamos as análises para certas categorias de genes, independente do nível de expressão, mas potencialmente envolvidos na formação e maturação da cutícula, tais como aqueles codificadores de enzimas da via de pigmentação e esclerotização, codificadores de proteínas estruturais das famílias RR1 e RR2, codificadores de enzimas da via da quitina (o principal carboidrato da cutícula), codificadores de elongases e desaturases envolvidas na biossíntese de CHCs, codificadores de hormônios, fatores de transcrição e neuropeptídeos reguladores de muda (em especial a metamórfica), osciladores periféricos (ciclo circadiano) e vias de pigmentação não melanínicas, notamos mais claramente as diferenças entre as espécies aqui estudadas. Assim, padrões similares de distâncias entre as fases do desenvolvimento das três espécies de abelhas foram observados para os genes das vias de melanização e esclerotização (**Figura 7**), do

metabolismo de quitina (**Figura 9**) e de pigmentação não melanínica (**Figura 23**). A expressão destes conjuntos de genes em *A. mellifera* e *C. analis* é consistente com a hipótese da heterocronia da maturação cuticular, pois não diferencia as recém emergidas das forrageiras em *C. analis*, mas as diferencia em *A. mellifera*. No entanto, a comparação de cada uma destas espécies com *F. varia* não dão suporte à hipótese. O mesmo ocorreu para a totalidade dos genes diferencialmente expressos (**Figura 4**). Um segundo padrão derivou das análises de expressão dos genes codificadores de proteínas estruturais sem domínios RR (**Figura 15**) e genes do ciclo circadiano (**Figura 21**). Neste caso, a expressão destes conjuntos de genes é consistente com a hipótese da heterocronia da maturação cuticular quando se compara *F. varia* e *C. analis* (pois separa as forrageiras de *F. varia* das demais fases e agrupa as recém-emergidas e forrageiras de *C. analis*), mas não quando se compara *A. mellifera* e *C. analis*. Um terceiro padrão emergiu da expressão de reguladores associados à muda e metamorfose, que distinguiu as abelhas sociais das solitárias (**Figura 19**), sugerindo que o *timing* de regulação da maturação cuticular é similar entre as espécies eussociais. Os outros grupos de genes, i.e., codificadores de proteínas com domínios RR1 (**Figura 11**) e RR2 (**Figura 13**), e enzimas associadas à formação dos CHCs do envelope (**Figura 17**) mostraram padrões similares de distância entre as fases do desenvolvimento das três espécies estudadas, inconsistentes com a hipótese de trabalho.

Dado que *A. mellifera* e *F. varia* apresentam-se em ramos filogenéticos representativos de evolução eussocial independente (Danforth *et al.*, 2013), podemos inferir que as diferenças encontradas entre estas espécies em relação à expressão dos genes da via de maturação cuticular podem ser reflexo destas diferentes origens de eussocialidade. No decorrer da discussão, analisaremos caso a caso a expressão dos genes envolvidos na maturação cuticular e apontaremos quais genes seriam potencialmente responsáveis pelas variações na maturação do tegumento entre as espécies de abelhas aqui estudadas.

b. Via da pigmentação e esclerotização cuticular

De forma simplificada, durante a esclerotização/melanização cuticular, o aminoácido tirosina é inicialmente hidroxilado formando DOPA (Andersen, 2010), por ação da enzima TH. Sequencialmente, a enzima DDC atua sobre seu substrato DOPA (True *et al.*, 1999), convertendo-a em dopamina, que pode ser *N*-acetilada pela enzima dopamina *N*-acetiltransferase em NADA e NBAD que serão oxidadas nas orto-quinonas correspondentes, destacando-se a ação da laccase2 nestas reações. Estes processos levam ao enrijecimento da cutícula (Arakane *et al.*, 2009a; Andersen, 2010). Para gerar NBAD é necessário o produto do gene *ebony*, que possibilita a reação da dopamina com a β -alanina. Este processo pode ser revertido através da hidrólise de NBAD

gerando dopamina, em reação catalisada pelo produto do gene *tan*. Já a adição do grupo acetil à dopamina para formação de NADA é catalisada pela enzima dopamina N-acetiltransferase, codificada pelo gene *Dat* (revisado em Andersen, 2010; Shamim *et al.*, 2014).

A via de pigmentação (neste caso melanização) é similar à de esclerotização. DOPA pode ser convertida a partir da ação do produto do gene *yellow* ou *laccase2* em DOPA-melanina, pigmento de cor acinzentada. Dopamina, também a partir da ação do produto destes genes, pode ser convertida em dopamina-melanina, pigmento de cor preta ou marrom. A esclerotina NADA é incolor, enquanto a esclerotina NBAD é amarelada. A síntese de NADA e NBAD a partir da dopamina ocorre por ação dos produtos dos genes *Dat* e *ebony*, respectivamente (revisado em Shamim *et al.*, 2014).

Na etapa de conversão de tirosina em DOPA, Gorman e Arakane (2010) verificaram, em amostras de corpo inteiro do besouro *Tribolium castaneum*, que a expressão de *TH* é maior após a apólise pupal e decai progressivamente, em adultos faratos de 5 dias, adultos com 7 dias e nos besouros adultos mais velhos. Utilizando imuno-histoquímica estes autores detectaram TH na cutícula dorsal do élitro, mas não nas asas nem no tegumento abdominal dorsal (região cuticular considerada flexível e menos rígida). O silenciamento do gene *TH* mediado por RNA de fita dupla (dsRNA) afetou a via de pigmentação e esclerotização e, conseqüentemente, a cutícula deste besouro, inclusive a cutícula da porção ventral do abdome. Estudando-se o processo de melanização no inseto hemimetábolo *Oncopeltus fasciatus*, foi observado que o silenciamento de *TH* mediado por dsRNA, impede a formação de pigmentos pretos nas regiões da cabeça, tórax, asas e abdome. Isto mostra que, neste inseto, o pigmento preto é formado exclusivamente pela via da melanização (Liu *et al.*, 2014). Em fêmeas do Hymenoptera eussocial, a formiga *Diacamma* sp., o gene codificador de TH apresenta pico de expressão no tegumento torácico e abdominal (Miyazaki *et al.*, 2014), em fase do desenvolvimento equivalente à de adulta farata tardia de *A. mellifera*. No tegumento torácico de *A. mellifera*, a expressão de *TH* aumenta significativamente durante o declínio dos níveis de ecdisteróides na fase Pbm e na fase seguinte, de adulta farata tardia (Pbd), que precede a fase Ne (Canhos, 2010). Em nossos dados de transcriptoma do tegumento abdominal, as três espécies de abelhas apresentaram expressão significativamente maior de *TH* em Ne, e positivamente correlacionada. (**Figura 26 e Anexo B2**). Assim, a expressão de *TH* não diferencia as espécies sociais da solitária e, portanto, não pode ser considerada um fator associado à heterocronia da maturação cuticular.

DOPA pode servir de substrato para o produto do gene *Ddc*, sendo convertida em dopamina (revisado em Wright, 1992). No tegumento larval de *Manduca sexta*, a atividade enzimática de DDC aumenta no começo da ecdise e atinge o ápice logo após a ecdise, gerando um aumento da

concentração de dopamina. Este aumento está relacionado ao início da melanização, por sua vez dependente do declínio dos níveis de ecdisteróides (Hiruma *et al.*, 1985). Assim como ocorre com *TH* em *T. castaneum*, neste besouro *Ddc* tem maior expressão em adultos faratos de 5 dias que nos adultos com até 7 dias (Arakane *et al.*, 2009a). O silenciamento do gene *Ddc* em *O. fasciatus* mostrou mais uma vez que a pigmentação de cor preta foi drasticamente reduzida, reforçando que a via de melanização deste inseto envolve a síntese de dopamina. Porém, melanina também pode originar-se por conversão direta de DOPA por uma fenoloxidase (Liu *et al.*, 2014). Em fêmeas de *Diacamma* sp, *Ddc* é mais expresso na fase de adulto farato tardio, tanto no tórax como no abdome (Miyazaki *et al.*, 2014). No tegumento torácico de *A. mellifera*, *Ddc* apresentou o mesmo perfil de expressão de *TH*, com aumento significativo em Pbm e Pbd (Canhos, 2010). Conforme pudemos verificar, no tegumento abdominal desta abelha, a expressão de *Ddc* foi significativamente maior na fase Pbm, não apresentando diferenças entre Ne e Fg (**Figura 8A**), sendo observado um perfil semelhante às amostras do corpo inteiro de *T. castaneum*. Já em *F. varia* a expressão foi significativamente maior em Pbm e Ne (sem diferença estatística entre estas fases) que em Fg (**Figura 8B**), enquanto nenhuma variação estatisticamente significativa tenha sido observada entre as fases de *C. analis* (**Figura 8C**). Não houve correlação significativa na expressão de *Ddc* entre as três espécies (**Figura 26 e Anexo B2**).

O gene *yellow-y* é expresso nas células epidérmicas associadas às áreas melanizadas do tegumento abdominal e no tórax de *Drosophila melanogaster* (Wittkopp *et al.*, 2002), sendo mais expresso no período em que ocorrem a pigmentação e a esclerotização da cutícula adulta. Nos estágios de adulto farato, a expressão do gene *yellow-y*, bem como seu produto proteico, são detectados na cápsula cefálica, tórax, pernas e dorso abdominal de *D. melanogaster* (Walter *et al.*, 1991). Este gene também apresenta maior expressão com o início da pigmentação no adulto farato de *Diacamma* sp. decaindo com o avanço do desenvolvimento, tanto no tórax como no abdome e é o principal responsável pelo alto grau de melanização de fêmeas desta espécie de formiga (Miyazaki *et al.*, 2014). Aqui também encontramos maior expressão de *yellow-y* na adulta farata de *A. mellifera*, com níveis de expressão reduzidos conforme o desenvolvimento progride (**Figura 8A**). *AmDdc* e *Amyellow-y* são co-expressos (**Figura 29**), reforçando o perfil encontrado. Já *Fvyellow-y* aumenta significativamente de Pbm para Ne, caindo a níveis basais em Fg (**Figura 8B**). O nível de expressão deste gene não difere significativamente entre as fases de *C. analis*, mas é pouco expresso após a emergência do adulto (**Figura 8C**) e mostrou correlação positiva com *A. mellifera* (**Figura 26 e Anexo B2**). Assim, o pico de expressão do gene *yellow-y* em Ne é consistente com o início tardio da melanização em *F. varia* se comparado à *A. mellifera* e *C. analis*. Em Meliponini, é generalizado o baixo grau de melanização em abelhas recém-emergidas. Como

em *A. mellifera* a expressão é relativamente alta em Ne, pode-se supor que este processo ainda não cessou após a emergência.

O gene codificador da enzima laccase2 também apresenta maior expressão em adultos-faratos de *T. castaneum*. A expressão deste gene ainda é elevada no besouro adulto que recém emergiu. O silenciamento deste gene faz com que o besouro adulto, geralmente marrom, não apresente pigmentação (Arakane *et al.*, 2005a). Em *O. fasciatus*, o silenciamento do gene codificador da laccase2 afeta tanto a melanização como a pigmentação alaranjada deste inseto (Liu *et al.*, 2014). Em operárias de *A. mellifera* foi demonstrado que o gene *laccase2* está sob regulação dos níveis de ecdisteróides. Os níveis de expressão deste gene aumentam com a redução dos níveis de ecdisteróides, logo após a apólise da cutícula pupal e se mantêm elevados até a fase Pbm, tanto no tórax como no abdome, decaindo progressivamente a seguir. O silenciamento deste gene na abelha causa redução da espessura da cutícula e do nível de pigmentação (Elias-Neto *et al.*, 2010). Consistente com estes resultados, também encontramos expressão significativamente maior do gene *laccase2* no tegumento abdominal da fase Pbm de *A. mellifera* e *F. varia*, com diminuição progressiva nas fases Ne e Fg. Estes perfis mostraram-se significativamente e positivamente correlacionados. Embora sem comprovação estatística, o perfil de expressão deste gene em *C. analis* mostrou-se similar ao das espécies sociais (**Figuras 8 e 26, Anexo B2**). Assim, a expressão de *laccase2* não mostra perfil heterocrônico, ou seja, não distingue as espécies eussociais da solitária.

Mutantes de *D. melanogaster* para o gene *ebony* não conseguem utilizar a β -alanina para gerar NBAD e compactar as camadas de quitina (Jacobs e Brubaker, 1963; Jacobs, 1978). Estes mutantes apresentam aumento na concentração de dopamina no momento da emergência (Hodgetts e Konopka, 1973). O gene *ebony* é amplamente expresso nas células do tegumento abdominal e torácico do adulto farato de *D. melanogaster* até o momento próximo à emergência (Wittkopp *et al.*, 2002). Em *Diacamma* sp. *ebony* é pouco expresso, mas o nível de expressão mais alto é encontrado no tórax de adultas faratas iniciais e no abdome da fase equivalente à Pbm de *A. mellifera*. O alto grau de melanização da fêmea adulta desta formiga, dependente da expressão de *yellow*, explica a baixa expressão de *ebony* no tegumento. Já os machos desta espécie, menos melanizados, apresentam pico de expressão mais altos para *ebony* (Miyazaki *et al.*, 2014). Para os ortólogos de *ebony* em *A. mellifera* e *F. varia*, nós também verificamos maior expressão nas fases Pbm e Ne que em Fg (**Figura 8A, B**), e correlação positiva entre os perfis de expressão destas duas espécies (**Figura 26 e Anexo B2**), sugerindo maior atividade da via de esclerotização/pigmentação no que se refere à síntese de NBAD nas fases jovens. Já o perfil de expressão de *Caebony* (**Figura 8C**) não mostrou correlação positiva com os perfis de *Amebony* e *Fvebony* (**Anexo B2**), assim distinguindo

as espécies eussociais da solitária. Além disto, o aumento da expressão de *ebony* nas recém emergidas de *C. analis* sugere contribuição para a rápida maturação da cutícula.

O gene *tan* atua reciprocamente à *ebony* na organização do padrão de melanização de *D. melanogaster*. A hidrolase oriunda da expressão deste gene converte NBAD em dopamina no tegumento do inseto e sua expressão ectópica está associada à melanização ectópica nesta mosca (True *et al.*, 2005). Após a apólise da cutícula pupal, a formiga *Diacamma* sp. apresenta maior expressão de *tan* na fase equivalente à Pbm de *A. mellifera*, decaindo no adulto farato tardio (Miyazaki *et al.*, 2014). Em *A. mellifera* e *F. varia*, encontramos maior expressão em Ne (**Figura 8A, B**), e estes perfis estão positivamente e significativamente correlacionados, sugerindo que a melanização/esclerotização da cutícula desta abelha está em pleno progresso na emergência. O perfil de expressão de *tan* em *C. analis* (**Figura 8C**) não mostrou correlação com os das abelhas eussociais, sugerindo diferenças temporais no processo de maturação cuticular.

A produção de NADA é coordenada pela enzima dopamina N-acetiltransferase (aril-alquil-N-acetiltransferase) codificada pelo gene *Dat*, mais expresso em regiões mais esclerotizadas da cutícula larval de *Bombyx mori*. Este gene tem função no padrão de pigmentação do inseto e a esclerotina final gerada a partir de NADA é incolor. Mutantes com perda de função deste gene apresentam aumento na concentração de dopamina, substrato da enzima (Dai *et al.*, 2010). Em moscas, este gene também é fundamental para o padrão de pigmentação, podendo ser relacionado a divergências evolutivas entre as espécies e é responsável pela cutícula menos escura nestes insetos (Ahmed-Braimah e Sweigart, 2015). Para *A. mellifera*, encontramos um aumento significativo, progressivo, de Pbm a Fg, na expressão deste gene (**Figura 8A**). Para *F. varia*, *Dat* tem seu pico de expressão em Pbm, caindo significativamente em Ne e Fg (**Figura 8B**). Esta observação está de acordo com o que foi discutido sobre *yellow*, mostrando que a fase mais jovem (Pbm) de *F. varia* tem maior intensidade de expressão de *Dat* que *yellow*, e o oposto ocorre em Ne, diferentemente de *A. mellifera*, favorecendo a idéia de que a melanização (ao menos a expressão dos genes relacionados a esta via bioquímica) se intensifica mais cedo em *A. mellifera*, enquanto a esclerotização se intensifica mais cedo em *F. varia*. *AmDat* e *FvDat* são negativamente correlacionados (**Figura 26, Anexo B2**). O perfil de expressão de *Dat* em *C. analis* não mostrou correlação significativa com os das espécies eussociais (**Figura 8C**). A expressão deste gene, portanto, distingue cada uma das espécies analisadas. Mas o súbito aumento da expressão de *CaDat* nas recém emergidas pode, possivelmente, concorrer para a rápida maturação da cutícula.

Concluindo, a expressão de *yellow-y* aproxima *A. mellifera* de *C. analis* no processo de melanização. A expressão de *Dat* se apresenta como um candidato para a diferença entre as espécies eussociais quanto à esclerotização. Adicionalmente, os perfis de expressão de *ebony* e *tan* são

positivamente correlacionadas nas espécies eussociais e diferenciam a espécie solitária, fornecendo suporte à hipótese da heterocronia da maturação cuticular. Nossos dados também mostram que os genes desta via continuam ativos nas abelhas forrageadoras sugerindo função na manutenção da cutícula mesmo após sua completa formação.

c. Deposição e organização da quitina

A quitina é o principal constituinte da cutícula (procutícula) dos insetos além de compor parte da matriz peritrófica que reveste internamente o intestino médio e traqueias destes animais (revisado em Kramer e Koga, 1986; Merzendorfer e Zimoch, 2003). Aqui encontramos três tipos principais de enzimas envolvidas no metabolismo da quitina: as quitinases, as quitina desacetilases e as quitina sintases. Como mencionado anteriormente, o padrão de expressão dos respectivos genes aproximam as fases Pbm e Ne de *A. mellifera* e as fases Ne e Fg de *F. varia* e de *C. analis* (**Figura 9**), assim como verificado para o conjunto dos genes diferencialmente expressos (**Figura 4**) e para os genes das vias de melanização e esclerotização (**Figura 7**), o que torna estas análises consistentes.

No tegumento, as quitinases (Cht) (incluindo *Cht*, *Chitotriosidase* e *Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase*) estão ativas no fluido de muda e degradam parte da cutícula prestes a ser substituída pela nova cutícula (Kramer e Koga, 1986). Em amostras de corpo inteiro de *T. castaneum*, Zhu *et al.* (2008) caracterizaram o perfil de expressão gênica de 16 Cht do tegumento do adulto entre 0 e 6 dias. Estes autores mostraram, com o uso de dsRNA, que o silenciamento do gene *Cht5* impede a eclosão do adulto. O gene *Cht10*, quando silenciado, impede as mudas, metamórficas ou não, inviabilizando inclusive o desenvolvimento do embrião. O silenciamento do gene *Cht7* impede a contração abdominal típica da ecdise e a expansão das asas/élitros. O silenciamento do gene *TcIDGF4*, um gene *Cht-like*, pode afetar a emergência do adulto. O pico de expressão de genes codificadores de quitinases ocorre no momento da apólise, seguido de redução acentuada (Kramer *et al.*, 1985). Tanto em *A. mellifera* como em *F. varia* observamos expressão variada dos genes codificadores de Cht entre as fases do desenvolvimento estudadas (**Figura 10A-B**), sugerindo que podem estar envolvidas na ecdise ou em outros processos que ocorrem no tegumento. Para *C. analis*, muitos genes de quitinases não sofreram variação significativa de expressão (**Figura 10C**). Curiosamente, o gene codificador da Cht *Idgf4* apresentou alto nível de expressão em todas as fases para todas as espécies aqui analisadas, porém positivamente correlacionada somente entre as espécies eussociais (**Figura 26, Anexo B2**). Recentemente foi demonstrado que as quitinases são fundamentais não só para a estruturação mas também para a manutenção da cutícula e também proporcionam uma barreira para a epiderme

subjacente. O silenciamento destes genes em *D. melanogaster* causou formação de cutículas duplas e deformação das estruturas cuticulares por todo o corpo do animal, podendo resultar até mesmo em cutículas mais finas. O silenciamento de alguns destes genes (por exemplo o silenciamento de *DmCht2* e *DmIdgf6*) pode impedir a formação das zonas de expansão da nova cutícula (Pesch *et al.*, 2016). Assim é coerente que os genes codificadores de quitinases se expressem mesmo na fase adulta dos insetos. Em relação aos ortólogos de *Cht5*, verificamos que *AmCht5* tem seu pico de expressão em Ne (**Figura 10A**), enquanto *FvCht5* tem expressão não variável (**Figura 10B**) e *CaCht5* também, mas próxima de níveis basais (**Figura 10C**). O aumento da expressão de *AmCht5* em Ne pode estar associado ao aumento da espessura cuticular após a emergência.

As quitina desacetilases (Cdas) convertem quitina em quitosan por meio da retirada do grupo acetil do polissacarídeo. O quitosan apresenta propriedades eletrostáticas diferentes da quitina, o que otimiza a afinidade do polissacarídeo por proteínas cuticulares (revisado em Muthukrishnan *et al.*, 2012). Quatro genes codificadores de Cdas foram analisados em um estudo com o inseto hemimetábolo *Nilaparvata lugens*. Três destes genes mostraram pico de maior expressão no tegumento (*NICDA1*, *NICDA2* e *NICDA4*) do que no intestino, órgão reprodutivos, glândulas salivares e corpo gorduroso de machos e fêmeas. *NICDA1* e *NICDA2* foram mais expressos horas antes da mudança de um estágio do desenvolvimento para outro (ocorrência de muda), tendo menor expressão no adulto. *NICDA3* seguiu o mesmo padrão de expressão citado, porém mostrou-se mais expresso no intestino. O padrão de expressão de *NICDA4* diferiu dos outros genes codificadores de Cdas (Xi *et al.*, 2014). Em *Drosophila*, duas Cdas foram mais estudadas: Serpentine e Vermiform. Estas enzimas são importantes para a elongação das traqueias, formação da matriz peritrófica e, como mostrado através do aumento da expressão de seus genes codificadores, têm relação com propriedades mecânicas do exoesqueleto (Luschnig *et al.*, 2006). Em *T. castaneum*, os genes *TcCDA1*, *TcCDA2* e *TcCDA5* são expressos no tegumento. *TcCDA1* e *TcCDA2* são expressos imediatamente após os eventos de muda, e a expressão é detectável inclusive no adulto recém emergido (dia 0) (Arakane *et al.*, 2009b). Os quatro genes codificadores de Cdas aqui encontrados em *A. mellifera*, incluindo os ortólogos de *serpentine* e *vermiform*, apresentaram expressão significativamente maior em Pbm e Ne do que em Fg (**Figura 10A**). Esse padrão se repete em *F. varia* (**Figura 10B**, **Figura 26**, **Anexo B2**). *C. analis* apresentou um perfil de expressão semelhante ao das espécies sociais (**Figura 10C**, **Figura 26**, **Anexo B2**) exceto para *CaCda5*. É um padrão semelhante ao descrito para o besouro *T. castaneum* e que indica que nas fases do desenvolvimento mais jovens do tegumento adulto as camadas de quitina estão se moldando para a associação com grupos específicos de proteínas, como já sugerido pela nossa análise de GO (**Figura 8**).

A quitina sintase (ChS) é a última enzima da via de síntese de quitina. Sua atividade aumenta no período após a muda, aumentando assim a síntese de quitina (Kramer *et al.*, 1985). O gene *ChS* é expresso na pupa e no adulto da mosca *Lucilia cuprina*, em especial no tegumento, intestino e traqueias (Tellam *et al.*, 2000). Em *D. melanogaster*, dois genes codificam estas enzimas (*DmChSA* e *DmChSB*), ambos são altamente expressos pouco antes do início da muda metamórfica, na fase de pré-pupa (pupa farata) (Gagou *et al.*, 2002). O gene *DmChSB* (também conhecido como *DmChS1* ou *kkv*) tem função associada à correta formação da procutícula na mosca, estabilizando também a epicutícula, porém não tem sido associado à matriz peritrófica (Moussian *et al.*, 2005). No Lepidoptera *Choristoneura fumiferana*, a expressão de quitina sintase aumenta um dia antes da eclosão do adulto, no estágio equivalente ao de adulto farato (Ampasala *et al.*, 2011). A expressão de dois destes genes também foi detectada em pupas e adultos (estes com até 3 dias) de fêmeas de *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2004). O silenciamento de *ChS1* em *T. castaneum* é letal, afeta o desenvolvimento da cutícula impedindo os eventos de muda. A expressão deste gene é intensa ainda no adulto farato. O silenciamento de *ChS2* neste besouro afeta a formação da matriz peritrófica (Arakane *et al.*, 2005b). Nós detectamos a expressão de um gene codificador de ChS em *A. mellifera*, possível ortólogo de *kkv* (**Figura 10A**). Este gene apresentou maior expressão na fase Pbm, com redução significativa até a fase Fg, quando atinge níveis basais. O outro gene de *A. mellifera*, *AmChS6*, mostrou nível de expressão basal no tegumento. Sua expressão pode estar mais relacionada à quitina da matriz peritrófica. Duas quitina sintases também foram encontradas em *F. varia*, uma com expressão basal em todas as fases (*FvChS6*) e outra com maior expressão em Pbm, decaindo progressivamente em Ne e Fg (*FvChS6*), similar ao padrão de expressão de *Chitin-Synthase kkv-like (Amkkv)* de *A. mellifera*. Para *C. analis* encontramos três *CaChskkv-like* e uma *CaChS6-like*. *CaChSkkv-like1* e *CaChS6-like* apresentaram maior expressão em Pbm e são positivamente correlacionadas com *Amkkv* e *FvChS6*, respectivamente (**Figura 26, Anexo B2**). Os demais genes não sofreram variação significativa nos níveis de expressão.

Estes dados sugerem que para as espécies analisadas, a expressão dos genes envolvidos na formação e organização das camadas de quitina da cutícula é mais intensa nas fases jovens. *Cda5*, *Idgf4* e *chitooligosacchariodolytic-domain-like* são genes potencialmente envolvidos na heterocronia da maturação cuticular em abelhas, enquanto *Cht5* pode estar envolvido na formação das camadas adicionais de quitina em *A. mellifera*.

d. Proteínas cuticulares estruturais

A atenção às proteínas cuticulares (CP) não é recente. Rebers e Riddiford (1988) verificaram que estas proteínas são evolutivamente conservadas ao se comparar a CP larval de *Manduca sexta* (LCP14) com as CPs do Lepidoptera *Hyalophora cecropia* e de duas espécies de Diptera, *D. melanogaster* e *Sarcophaga* sp. Previamente, para *A. mellifera*, eram conhecidas seis famílias de CPs: família contendo o domínio descrito por Rebers e Riddiford (CPR, com 32 representantes); família CPF (com três representantes); família Tweedle (TWDL) com dois representantes; Apiderminas, exclusivas de Hymenoptera, com três representantes; CPs de baixa complexidade ricas em resíduos de prolina (CPLCP), com dois representantes; e CPs análogas às peritrofinas com três domínios de ligação à quitina do tipo ChtBD2 (CPAP3), com cinco representantes. Adicionalmente, outros grupos de proteínas, com regiões semelhantes às CPs e associadas à estabilidade cuticular, também estão presentes em *A. mellifera*. São eles: (1) os grupos de proteínas que apresentam uma região específica de 18 aminoácidos, (2) as CPs contendo repetidas sequências dos aminoácidos alanina-alanina-prolina (AAP), (3) as proteínas dumpy e (4) resilinas (revisado em Willis, 2010).

Aqui, com o auxílio do software online CutProtFam-Pred (<http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/search.php>) (Ioannidou *et al.*, 2014), identificamos em *A. mellifera* os genes codificadores de 38 CPRs, duas CPF, duas TWDL, quatro apiderminas, duas CPLCP, cinco CPAP3, duas CPAP1, dumpy e uma potencial resilina, além de sete potenciais CPs até hoje não caracterizadas para *A. mellifera*. Já para *F. varia*, identificamos genes codificadores de 32 CPRs (inclui uma potencial resilina), uma CPF, uma TWDL, três apiderminas, duas CPAP1, duas CPAP3 e nove CPs (uma similar à CPR27 de *A. mellifera*), estes genes sendo aqui identificados pela primeira vez. Para *C. analis*, também identificamos pela primeira vez genes codificadores de 35 CPRs, uma CPF, duas TWDL, três apiderminas, sete CPAP3, 12 CPAP1, 11 CPAPs e outras oito CPs (uma similar à CPR27 e duas similares a CPRs cujos domínios RRs não foram identificados pelo CutProtFam-Pred).

Andersen (1998), comparou as sequências de proteínas da endocutícula abdominal do Orthoptera *Schistocerca gregaria* e observou que a região N-terminal continha dois resíduos de glicina altamente conservados além de uma terceira glicina que estava presente em 13 das 15 sequências que analisou. Estas proteínas foram descritas como RR-1 (Rebers & Riddiford tipo 1) e pareciam integrar principalmente cutículas menos rígidas, mais flexíveis e hidratadas como as de larvas de Diptera e Lepidoptera, e membranas intersegmentais e endocutícula de gafanhotos. Outro subgrupo da família CPR, RR-2, contém o motivo GFNAVV e não apresenta o resíduo de ácido glutâmico na sequência consenso RR, nem os dois resíduos de prolina na região C-terminal.

Proteínas RR-2 aparentemente estão mais presentes na composição de cutículas rígidas e esclerotizadas, indicando uma correlação entre os tipos de proteínas e as propriedades mecânicas da cutícula (Andersen, 1998). Outra possível correlação é a maior presença de CPR-RR2 na exocutícula e de CPR-RR1 na endocutícula (Andersen, 2000), o que estaria de acordo com o perfil de expressão encontrado para estas proteínas em *Anopheles gambiae*. Neste mosquito, os *clusters* exclusivos de genes codificadores de CPR-RR2 claramente apresentaram maior expressão na fase de adulto farato, estando assim envolvidos na formação da exocutícula. Parte dos *clusters* de genes codificadores de CPR-RR1 também se expressaram no adulto farato, mas alguns *clusters* foram expressos exclusivamente após a ecdise, relacionando o consenso RR1 à formação da endocutícula (Togawa *et al.*, 2008). Assim, para os genes codificadores das CPs da família CPR, podemos relacionar o momento da expressão com a camada da cutícula que está sendo formada, por exemplo, para os genes que são expressos somente após a ecdise pode-se presumir que a proteína estará na endocutícula (revisado em Willis, 2010).

Entre os 17 genes *CPR-RR1* de *A. mellifera*, *AmCPR12*, *AmCPR13* e *AmCPR21* apresentaram maior expressão na fase Fg, *AmCPR19* e *AmCPR27* apresentaram maior expressão em Ne e apenas *AmCPR18* não apresentou variação significativa de expressão entre as fases de desenvolvimento. Outros 11 genes *AmCPRs* foram mais expressos em Pbm (**Figura 12A**). Já entre os 15 genes *CPR-RR1* de *F. varia*, *FvCPR18*, *FvCPR21*, *FvCPR25*, *FvNewCPR9* e *FvNewCPR18* não apresentaram variação significativa nos níveis de expressão; *FvCPR19* foi mais expresso em Ne e os demais foram mais expressos em Pbm, decaindo até Fg (**Figura 12B**). Para *C. analis*, apenas *CaSgAbd2-like* e *CaUnCPR-RR1-3* foram mais expressos em Pbm, *Ca97Ea-like* e *CaCPR24* foram mais expressos em Pbm e Ne, e *CaSgAbd1-like* foi mais expresso nas fases Ne e Fg. Os demais genes não mostraram variação significativa de expressão entre as fases (**Figura 12C**).

Dentre os 21 genes codificadores de CPRs-RR2 no tegumento abdominal de *A. mellifera*, com exceção de *AmCPR5*, mais expresso em Ne, *AmUnCPR-RR2-5* mais expresso em Fg seguido de Ne, e *AmCPR6*, *AmCPR9*, *AmCPR20* e *AmUnCPR-RR2-4* sem diferença significativa de expressão nas fases de desenvolvimento analisadas, todas os demais genes *CPRs-RR2* tiveram maior expressão em Pbm, com acentuada redução dos níveis de transcritos nas fases seguintes (**Figura 14A**). Em *F. varia*, os genes *FvCPR20*, *FvResilin-like*, *FvNewCPR-5* e *FvNewCPR-10* não sofreram variações significativas nos respectivos perfis de expressão, enquanto os demais *CPR-RR2* foram mais expressos nas fases mais jovens, a maioria em Pbm, decaindo significativamente até Fg (**Figura 14B**). Já em *C. analis*, seis genes tiveram variação significativa de expressão, com maior nível em Pbm se comparado a Ne (*CaUnCPR-RR2-8*, *CaCPR-16*, *CaUnCPR-RR2-10*, *CaCPR1*, *CaUnCPR-RR2-4* e *CaUNCPR-RR2-1*).

Destacamos que dentre os genes codificadores de RR1 e de RR2 muitos genes se mantêm expressos mesmo na fase Fg, indicando que suas proteínas são necessárias na fase adulta. Nossos dados também sugerem que em abelhas estas proteínas participam da formação tanto da exo- como da endocutícula abdominal, o que não está de acordo com os dados de Togawa *et al.* (2008) em *A. gambiae*.

Os dados de *T. castaneum* reforçam a importância de algumas proteínas CPR-RR2 em cutículas mais rígidas. TcCPR27 e TcCPR18 são proteínas cuticulares que apresentam o motivo RR-2 relacionado a cutículas rígidas, e são os principais componentes protéicos das cutículas do élitro, dorso torácico e ventre abdominal de *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2012; Noh *et al.*, 2016)) e dos canais de poro (Noh *et al.*, 2014; Noh *et al.*, 2016). Quando os respectivos genes foram silenciados por meio de dsRNA, verificou-se a presença de élitros reduzidos, finos e muito frágeis naqueles besouros tratados com ds*TcCPR27*, e élitros não alongados naqueles besouros tratados com ds*TcCPR18*. Isto ocorre porque estas proteínas são necessárias para a organização das fibrilas de quitina dos canais de poros da cutícula. Com os canais malformados, a ultraestrutura da cutícula rígida é comprometida e a arquitetura de suas lâminas horizontais torna-se desorganizada. A ultraestrutura das cutículas da parede torácica e das pernas apresentou efeitos similares. A cutícula do dorso abdominal não mostrou essas características por não possuir fibrilas dos canais de poro e por apresentar menor número de lâminas horizontais, sendo mais macia, flexível e menos pigmentada (Noh *et al.*, 2014; Noh *et al.*, 2016). Outra CPR, só que RR1, a TcCPR4, também é importante para a formação destes canais (Noh *et al.*, 2014; Noh *et al.*, 2016). Mais recentemente, Mun *et al.* (2015), mostraram que uma proteína cuticular de *T. castaneum*, TcCP30, de baixa complexidade (CPLC), interage com as proteínas TcCPR27 e TcCPR18 para realizar as ligações com as lâminas de quitina do dorso do tegumento do élitro e este processo é provavelmente mediado pela enzima laccase2. Erros neste processo podem prejudicar a muda do besouro para o estágio adulto. Aparentemente TcCP30 não possui ortólogos em Hymenoptera. Aqui encontramos o gene codificador de uma CPR-RR2, *CPR23*, co-expresso com *Lac2* nas espécies eussociais, juntamente com o gene codificador de uma CPR-RR1, *CPR24* (**Figura 32**). *Lac2* também é co-expresso com genes codificadores de CPLC e Cpap em todas as espécies de abelhas analisadas (**Figuras 29, 30 e 31**). A associação entre a expressão de proteínas estruturais da cutícula e o momento de intensificação da melanização já havia sido mostrada em amostras de tórax de operárias de *A. mellifera* (Soares *et al.*, 2007; 2013). Adicionalmente, comparando-se as três espécies de abelhas, a expressão dos ortólogos codificadores de algumas CPRs-RR1 (CPR14, CPR17, CPR18, CPR25) e CPRs-RR2 (CPR23, CPR26) diferenciam as eussociais da solitária (**Figura 26, Anexo B2**).

As proteínas TWDL podem se ligar à quitina (revisado em Willis *et al.*, 2010). Os perfis de expressão dos dois genes codificadores destas proteínas em *A. mellifera* já foram caracterizados (Soares *et al.*, 2011). Tanto no tegumento do dorso torácico como no do dorso abdominal, *AmTwdl1* e *AmTwdl2* mostraram alto nível de expressão em fases iniciais e intermediárias (Pbm) de abelhas adultas faratas (Soares *et al.*, 2011). Possivelmente estas proteínas são importantes para formar tanto as cutículas mais rígidas como as mais flexíveis. No tegumento abdominal total de *A. mellifera*, comparando-se as fases Pbm com Ne e Fg, também encontramos maior expressão para ambos os genes codificadores de TWDL na fase Pbm, com acentuada redução da expressão já na fase de Ne (**Figura 16A**). Possivelmente esta redução já vem da fase de adulta farata tardia (Pbd), como indicado por Soares *et al.* (2011), e processo semelhante deve ocorrer em *F. varia* dado o perfil de *FvTwdl2* nesta abelha (**Figura 16B**). Em *C. analis* a expressão dos genes *Twddl1* e *Twddl2* é baixa e sem diferença entre Pbm e Ne (**Figura 16C**), porém a expressão de *CaTwdl(Grp)* (**Figura 26, Anexo B2**) é positivamente correlacionada à de *AmTwdl(Grp)*, sendo *Twddl(Grp)* codificador de uma CPLC co-expressa com *CaLac2* (**Figura 31**).

As proteínas CPF não se ligam à quitina e possivelmente estão relacionadas à formação da epicutícula, porém é possível que estas proteínas exerçam algum papel na exocutícula, ao menos em *A. gambiae*. Neste mosquito, dois genes codificadores de CPFs (*AgCPF3* e *AgCPF4*) apresentaram maior expressão na fase de adulto farato e níveis basais de expressão no adulto logo após a ecdise (Togawa *et al.*, 2007). No tegumento torácico de *A. mellifera* um único gene codificador de CPF foi encontrado (*AmCPF1*) e apresentou baixo nível de expressão no estágio de adulta farata inicial em comparação com fases do desenvolvimento mais adiantadas (Soares *et al.*, 2013). No tegumento abdominal de *A. mellifera*, nós detectamos a expressão dos genes *AmCPF1* e *AmCPF2*, ambos mais expressos na fase Pbm, com redução significativa dos níveis de transcritos na fase Ne, diferente do encontrado para *FvCPF1*, que não apresenta variação significativa de expressão, assim como o único gene codificador de CPF encontrado na espécie de abelha solitária (**Figura 16**). Esses dados indicam que estes genes provavelmente têm função mais específica na formação do tegumento abdominal que do tegumento torácico de *A. mellifera*. A alta expressão no abdome de Pbm de *A. mellifera* fortalece a possibilidade de CPFs estarem também relacionadas à exocutícula desta abelha.

Os genes codificadores de CPLCP em *A. gambiae* apresentaram maior expressão na fase de adulto farato que no adulto (Cornman e Willis, 2009). Em *A. mellifera*, a expressão de um único gene codificador de CPLCP foi detectada no tegumento torácico: *AmCPLCP1* apresentou maior expressão na fase de adulta farata se comparado à pupa (Soares *et al.*, 2013). Similar ao verificado em *A. gambiae*, no tegumento abdominal, *AmCPLCP1* foi mais expresso na adulta farata que na

abelha adulta. Adicionalmente, encontramos transcritos do gene *AmCPLCP2* com o mesmo perfil de expressão no abdome (**Figura 16A**). Não identificamos transcritos de *CPLCP* em *F. varia* ou *C. analis*.

Dos genes codificadores de Cpaps, ao menos seis estão envolvidos diretamente com alguma estrutura cuticular em *T. castaneum*. *TcCpap1-c*, *TcCpap1-h* e *TcCpap1-j*, quando silenciados causam deformações da cutícula que recobre a epiderme, com os dois últimos afetando também os élitros. *TcCpap3-c* afeta a formação da cutícula epidérmica, enquanto *TcCpap3-d1* e *TcCpap3-d2* afetam o tamanho e rugosidade dos élitros. Estes genes apresentam um padrão de expressão relativamente constante durante o desenvolvimento do besouro, reduzindo o nível de transcritos apenas no besouro adulto maduro e isto foi verificado em amostras de corpo inteiro (Jasrapuria *et al.*, 2012). Dois genes desta família foram encontrados nos *arrays* de tegumento torácico de *A. mellifera* e foram denominados *AmC* e *AmD*, ambos mais expressos durante o declínio dos níveis de ecdisteróides (Soares *et al.*, 2013). Em nossos dados de RNA-seq do tegumento abdominal desta abelha nós detectamos a expressão de cinco genes *AmCpap3*, três com maior expressão em Pbm e dois com maior expressão em Ne, e todos com baixa expressão em Fg. Também encontramos altos níveis de transcritos de *AmCpap1* e *Chitin binding peritrophin A-domain* em Pbm, decaindo a níveis basais em Fg (**Figura 16A**). Os genes *Cpaps* de *F. varia* apresentaram perfis de redução significativa de expressão com o avanço do desenvolvimento (**Figura 16B**). Em *C. analis* os genes codificadores de Cpaps geralmente são mais expressos em Pbm ou não variam a expressão significativamente. Os perfis de expressão destes genes estão de acordo com os perfis de expressão de genes codificadores de CPs indicando que devem atuar como em *T. castaneum*, não sendo marcadores da heterocronia.

Três genes codificadores de apiderminas, exclusivas de Hymenoptera, foram previamente identificados. *AmApd1* e *AmApd3*, são expressos no tegumento abdominal de adultas-faratas intermediárias (Pbm) e tardias, e têm a expressão reduzida após a emergência para o estágio adulto. *AmApd3* foi associado a cutículas não pigmentadas. *AmApd2* foi associado a cutículas de tecidos internos, como traqueias e intestino, por exemplo (Kucharski *et al.*, 2007). Todos esses três genes foram detectados no tegumento torácico de *A. mellifera* e apresentaram o padrão de aumento de expressão conforme o desenvolvimento progride, da pupa para a adulta farata inicial (Soares *et al.*, 2013). No tegumento abdominal, detectamos transcritos destes três genes, mais transcritos do gene *AmApd-like*, com perfis de expressão variáveis (**Figura 16A**). *AmApd-2*, *AmApd-3* e *AmApd-like*, apresentaram maior expressão em Pbm, seguida de redução até Fg, porém a diferença entre Pbm e Ne para a expressão de *AmApd-2* não é significativa. *AmApd-1* apresentou maior expressão na fase Ne, enquanto *AmApd-3* é mais expresso nas cutículas menos pigmentadas como sugerido por

Kucharski *et al.* (2007). Para *Fvaria* detectamos *FvApd1*, *FvApd3* e *FvApd-like*, onde *FvApd1* foi mais expresso em Fg que em Pbm, enquanto os demais foram mais expressos em Pbm, seguido de Ne e Fg. *FvApd3* e *FvApd-like* apresentaram o mesmo perfil de expressão que seus respectivos ortólogos em *A. mellifera* (**Figura 16B**). Em *C. analis*, *CaApd1* apresentou alto nível de expressão em Ne (sugerindo um momento de pigmentação intensa e rápida), enquanto *CaApd2* é mais expresso em Ne e Fg. *CaApd-like* não variou sua expressão significativamente entre as fases do desenvolvimento analisadas (**Figura 16C**). A expressão de *Apd3* e *Apd-like* mostrou-se positivamente correlacionada entre as espécies eussociais, mas não entre estas e a espécie solitária (**Figura 26, Anexo B2**).

A proteína Dumpy é provavelmente uma organizadora das camadas mais internas da cutícula e se destaca por apresentar domínio característico de proteínas da zona pelúcida que envolve os ovócitos de mamíferos. Está presente na formação das cutículas de *D. melanogaster* e do nemátodo *Caenorhabditis elegans* (revisado em Willis, 2010). Em *A. mellifera* verificamos que a expressão de *Amdp* (**Figura 16A**) segue o padrão de genes codificadores de CPs, com maior expressão em Pbm seguido de decaimento dos níveis de transcritos até Fg, devendo estar associada à organização das camadas de quitina enquanto são depositadas durante o desenvolvimento da cutícula.

Duas outras CPs também parecem importantes para a manutenção da cutícula das abelhas. Assim como em *D. melanogaster* (Moussian *et al.*, 2006), a proteína Retroactive em *T. castaneum*, TcRtv, é importante tanto para a manutenção da procutícula, como para prevenir a degradação de quitina durante a metamorfose. Esta proteína é essencial para a localização da proteína Knickkopf (TcKnk), facilitando seu transporte à cutícula (Chaudhari *et al.*, 2013). TcKnk tem a função de proteger a cutícula recém formada da ação das quitinases. *TcRtv* é expresso no tegumento do besouro adulto farato e adulto, assim como *TcKnk* (Chaudhari *et al.*, 2011; 2013). Em *A. mellifera*, a expressão de ambos genes, *AmRtv* e *AmKnk*, é concomitante (**Figura 16A e Figura 29**), com maior expressão em Pbm e decaindo até Fg, podendo também estar relacionada à estabilidade das camadas primeiramente formadas na cutícula adulta da abelha. Soma-se a isso o fato destes genes serem co-expressos (**Figura 29**). Não conseguimos detectar seus ortólogos em *F. varia*. Em *C. analis*, *Caknk* não apresentou variação significativa na expressão.

Com base no que foi apresentado sobre a expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais, conseguimos estabelecer que, em abelhas sociais, proteínas CPR-RR1 e CPR-RR2 podem atuar em ambas as camadas da procutícula, exocutícula e endocutícula. Conseguimos detectar a expressão de genes com potencial envolvimento com a formação da epicutícula. A dificuldade de se detectar a expressão de genes codificadores de CPs com domínios

atípicos em *F. varia* e *C. analis* pode se dar pelo fato de nossos dados para estas espécies serem resultantes de uma análise *de novo*, pois não há o referencial do genoma.

Resumidamente, a expressão dos seguintes genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula *Apd-3*, *Apd-like*, *CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR23*, *CPR26*, *Apd-3* e *Apd-like* é consistente com a hipótese de heterocronia da maturação cuticular ao se correlacionar de forma significativa, positivamente, entre as espécies eussociais e não entre estas e a espécie solitária. Não detectamos o ortólogo de *Apd-3* em *C. analis*. Adicionalmente, a expressão de *CPR22* diferencia *A. mellifera* de *C. analis*.

e. Via de biossíntese dos CHCs

A biossíntese de hidrocarbonetos ocorre nos enócitos associados à epiderme (Piek, 1964) e as enzimas desaturases e elongases têm função neste processo. A variação na expressão de um gene codificador de desaturase já foi previamente observada em outra espécie de Hymenoptera. Larvas de rainhas e operárias da abelha *Bombus terrestris* mostraram diferenças de expressão do gene codificador da enzima acil-CoA desaturase (similar à $\Delta 9$ desaturase AF417841 de *Musca domestica*). Este gene é expresso mais intensamente e mais cedo em rainhas, durante o primeiro estágio larval. Já no 4º estágio larval, a abundância dos transcritos é um pouco maior em operárias (Pereboom *et al.*, 2005).

Recentemente, caracterizamos os perfis de expressão de genes codificadores de desaturases e elongases durante o período de formação e diferenciação da cutícula da abelha operária de *A. mellifera*. Em paralelo, os CHCs foram identificados e suas quantidades relativas foram correlacionadas à expressão destes genes (Falcón *et al.*, 2014). Entre os seis genes de desaturases estudados, cinco apresentaram aumento de expressão com o avanço da maturação cuticular, sendo mais expressos na fase Fg. A expressão destes genes foi principalmente correlacionada ao aumento da proporção dos CHCs insaturados. Também avaliamos a expressão de dez genes de elongases, sendo que dois deles nos chamaram a atenção: o gene identificado como GB40681 no genoma, com maior expressão em Pbm, e o gene GB54399, o único gene com expressão correlacionada positivamente aos CHCs metilados. A flutuação dos níveis de transcritos destes genes quantificados por RT-qPCR (Falcón *et al.*, 2014), mostrou-se similar aos dados aqui obtidos por meio de RNA-seq. Outros genes codificadores de elongases, não detectados em nosso trabalho anterior (Falcón *et al.*, 2014), apresentaram expressão significativamente maior na fase Pbm de *A. mellifera* (**Figura 18A**). Adicionalmente, caracterizamos por meio de RNA-seq os níveis de transcritos de mais três genes de desaturases e quatro de elongases de *A. mellifera* para os quais não tinha sido possível desenhar *primers*.

Para *F. varia*, identificamos seis genes codificadores de desaturases, dois deles sem ortólogos em *A. mellifera*. Destes, apenas *FvDesat-GB48195* mostrou significante expressão diferencial entre as fases do desenvolvimento, com aumento de expressão progressivo de Pbm a Fg. *FvDesat-New2* foi significativamente mais expresso em Ne que em Pbm. Dos nove genes de elongases encontrados em *F. varia*, três foram significativamente mais expressos em Pbm (*FvElo-GB46038*, *FvElo-102655009* e *FvElo-GB54302*), três apresentaram-se sem variação significativa na expressão (*FvElo-GB51249/GB51250*, *FvElo-GB54399* e *FvElo-GB54401/GB54400*) e os três restantes foram significativamente mais expressos nas fases adultas (*FvElo-GB45596*, *FvElo-GB54404* e *FvElo-GB51247*) (**Figura 18B**). Para *C. analis*, nenhum dos genes codificadores de elongases ou desaturases foi significativamente mais expresso na fase Pbm. Dois genes de elongases (*CaElo-GB54302* e *CaElo-GB54401/GB54400*) e dois genes de desaturases sem ortólogo em *A. mellifera* (*CaUnDesat-2* e *CaUnDesat-3*) não sofreram variação significativa na expressão. Os demais foram mais expressos em Ne e Fg, com pouca ou nenhuma variação entre estas fases do desenvolvimento (**Figura 18C**). Dentre os genes codificadores de elongases e desaturases, chama a atenção os ortólogos Elo-GB54401, Elo-GB54302, Elo-GB45596, Elo-GB46038 e Desat-GB40659, positivamente correlacionados nas espécies eussociais e negativamente ou não correlacionados na comparação destas com a espécie solitária (**Figura 26, Anexo B2**).

Nossos dados mostram que a expressão de genes envolvidos na formação do envelope da cutícula da abelha social adulta, tais como os genes de desaturases e elongases, ocorre concomitantemente à formação da cutícula, porém a diferenciação do envelope é mais tardia e relacionada à atividade desempenhada ou idade da abelha. Uma vez em contato com o meio externo, é necessário a reposição dos CHCs. Porém, os ortólogos dos genes codificadores de elongases (GB54401, GB54302, GB45596, GB46038) e de uma desaturase (GB40659) apresentaram diferenças entre as espécies eussociais e solitária, o que pode estar relacionado ao perfil químico a discutir, coerente com a nossa hipótese.

f. Regulação da expressão gênica – hormônios e fatores de transcrição

Pouco antes da liberação de hormônios da muda, ecdisteróides, há um pico de concentração de PTTH no cérebro. Este hormônio age nas células da glândula protorácica e causa a liberação dos ecdisteróides por estas células (Smith e Rybczynski, 2012). As mudas são reguladas pelos níveis de JH e ecdisteróides. Em condições de altos níveis de JH, especialmente nas fases larvais, os sucessivos picos de ecdisteróides causam a muda de um estágio larval para outro. Com a redução dos níveis de JH e em presença de mais um pico de ecdisteróides há a transformação da larva em

pupa e, posteriormente, níveis basais de JH, e um outro pico de ecdisteróides causam a transformação da pupa em adulto jovem (revisado em Riddiford, 1976).

Receptores de ecdisteróides (EcR) permitem aos tecidos que os expressam responder a estes hormônios. EcR se liga aos ecdisteróides e ao DNA nos sítios chamados de elementos de resposta à ecdisona, afetando a expressão dos genes regulados por estes sítios, como *E74* e *E75* (Koelle *et al.*, 1991). Esta capacidade de EcR em se ligar ao DNA depende de outro fator de transcrição codificado pelo gene *ultraspiracle* (*usp*), formando o heterodímero EcR/USP. Soma-se a isto o fato dessa resposta ser regulada pela competição entre EcR e outros possíveis pares de USP (Yao *et al.*, 1992). EcR é necessário para a regulação de quitina sintases de *Spodoptera exigua* (Yao *et al.*, 2010). Tanto *Ecr* como *usp* foram associados à origem da eussocialidade em abelhas (Kapheim *et al.*, 2015). Em ambas as espécies de abelhas sociais, *Ecr* não sofreu variação significativa em sua expressão, assim como *Fvusp*. Porém, o perfil de expressão de *FvEcr* apresentou correlação negativa significativa com relação ao de *AmEcr*; *Fvusp* mostrou perfil de expressão negativamente correlacionado com ambos os ortólogos das espécies aqui estudadas.

Regulado pelos ecdisteróides, o gene *DmE74* de *Drosophila* codifica duas proteínas reguladoras nucleares, *DmE74A* e *DmE74B*, que apresentam diferentes regiões N-terminais e similares regiões C-terminais, sendo estas também similares às das proteínas codificadas pelos proto-oncogenes *est-1* e *est-2* (Burtis *et al.*, 1990). Dentre outros tecidos, a expressão de *DmE74A* foi detectada nos discos imaginais e histoblastos abdominais, responsáveis pela formação dos tegumentos torácico e abdominal, respectivamente. A expressão de *DmE74A* foi também detectada no núcleo de células epidérmicas durante o final do 3º instar larval de *D. melanogaster*, pouco antes do início da metamorfose, coincidente com o primeiro pulso de ecdisteróides (Boyd *et al.*, 1991). Já *DmE74B* é expresso quando o título de ecdisona começa a aumentar e é reprimido com a elevação da concentração deste hormônio (Karim e Thummel, 1991), porém sua expressão é reativada durante o decaimento da concentração do hormônio e então aumenta até o final do desenvolvimento pupal, quando cessa (Thummel *et al.*, 1991). A expressão de *E74* foi detectada tanto em *A. mellifera* como em *F. varia* e é maior na fase Pbm, momento de intensa expressão de genes envolvidos na formação e maturação da cutícula, sugerindo papel regulador neste processo. Os perfis de expressão de *AmE74* e de *FvE74* mostrou correlação positiva e isto não ocorreu para *CaE74* (**Figura 26, Anexo B2**) sugerindo que este gene pode estar relacionado à heterocronia da maturação cuticular em abelhas.

A expressão de um gene induzido por ecdisteróides em *Manduca sexta*, *MsE75A*, foi detectada no início da elevação da concentração destes hormônios e variou de acordo com o tipo de muda. Em presença de JH há maior expressão de *MsE75A*. A expressão da isoforma *MsE75B*

coincidiu com o pico e subsequente decaimento dos níveis de ecdisteróides. Estes mRNAs foram detectados na epiderme dorsal abdominal de larvas de 5º instar e de pupas (Zhou *et al.*, 1998a). O produto do ortólogo em *D. melanogaster*, DmE75B, não apresenta o domínio de ligação ao DNA e se une à proteína DmHR3 (ortólogo em *A. mellifera*: Gene ID - 408586) no promotor de *DmβFTZ-F1* para regulá-lo, reprimindo-o (White *et al.*, 1997). Transcritos de *DmβFTZ-F1*, *DmHr38*, *DmE74A* e *DmE75B*, foram detectados na pupa e até mesmo no adulto (caso de *DmHr38*) (revisado em Charles, 2010). Aqui, a expressão de *AmE75* foi significativamente mais baixa em Ne se comparada a Pbm e Fg, enquanto *FvE75B-like* não sofreu variação significativa em sua expressão. Em todas as espécies de abelhas aqui analisadas, *Hr46* (*DmHR3-like*) foi mais expresso em Pbm, entretanto sem diferença significativa em *C. analis*, decaindo a níveis basais nas fases adultas (**Figura 26, Anexo B2**). Assim, a expressão destes genes reguladores potencialmente envolvidos na repressão de *βFTZ-F1*, é mais intensa na fase Pbm das abelhas sociais.

No tegumento abdominal dorsal de *M. sexta*, foi verificada a expressão de *E74B* antes da expressão de *Br-C*, pouco antes do início da metamorfose, enquanto a expressão de *E74A* coincidiu com o declínio do pico de ecdisteróides nas mudas larvais e pupal (Stilwell *et al.*, 2003). Em *Drosophila*, *E74A* é considerado um regulador dos genes de expressão tardia, isto é, aqueles que são ativados secundariamente por produtos (proteínas reguladoras) de genes induzidos por ecdisteróides (Fletcher *et al.*, 1995). A expressão de *Br-C* foi detectada na epiderme abdominal de larvas e nos discos imaginais das asas de *M. sexta* no momento do comprometimento com a muda metamórfica (presença de 20E e nível basal de JH) (Zhou *et al.*, 1998b; Zhou e Riddiford, 2001). Sua expressão provavelmente é um dos primeiros eventos moleculares do comprometimento pupal tanto na epiderme como nos discos das asas (Zhou e Riddiford, 2001). Erros na expressão de *DmBr-C* afetam a formação da cutícula pupal. Transcritos de *DmBr-C* não foram detectados durante a formação da cutícula adulta de *M. sexta* e *Drosophila* (Zhou e Riddiford, 2002). Porém, durante a muda metamórfica, DmBr-C age em conjunto com DmEcR para ativar a expressão de *DmDdc* (Chen *et al.*, 2002). Em *Apis cerana cerana* o gene codificador da proteína cuticular AccCPR1 (RR-2) apresenta cinco sítios de ligação para o fator de transcrição E74 e quatro para Br-C e é regulado pelos pulsos de ecdisteróides. No tegumento torácico, *AccCPR1* apresenta nível basal de expressão em operárias na fase Pp (momento do pico de ecdisteróides) e expressão elevada nas fases de adultas-faratas (Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd), decaindo em Ne. Em abelhas Fg sua expressão é tão baixa quanto em Pp, porém ainda assim é detectada. Este gene, em Ne, também apresenta expressão elevada no tegumento abdominal, dentre outros tecidos. AccCPR1 é ortólogo de AmCPR26 (Gene ID: 726451) (Sun *et al.*, 2013). Aqui, para *AmCPR26* foram encontrados dois sítios de ligação para Br-C, mas nenhum para E74. Em *C. analis* a expressão de *CaCPR26* não varia significativamente

entre as fases de desenvolvimento. Apesar de *AmBr-C* apresentar maior expressão em Pbm, este nível é muito baixo. O ortólogo em *F. varia* não foi detectado e o de *C. analis* se expressou constitutivamente em níveis basais.

O gene codificador do fator de transcrição FTZ-F1 está envolvido na formação da exocutícula associada à epiderme originada dos discos imaginais das pernas e asas de *D. melanogaster* (Murata *et al.*, 1996). FTZ-F1, além de estar envolvido na regulação de genes durante a metamorfose dos insetos, pode exercer auto-regulação e sua isoforma β tem seu nível de expressão aumentado após o pico de ecdisteróides iniciador da muda metamórfica (Lavorgna *et al.*, 1993). Dm β FTZ-F1 é necessário para a ocorrência das mudas larvais de *D. melanogaster* e sua expressão fora do momento correto resulta em má formação da cutícula, ocasionando falhas na ecdise do 2° para o 3° instar larval (Yamada *et al.*, 2000). Esta isoforma regula positivamente a expressão do gene codificador da proteína cuticular DmEdg78E no final do estágio de pré-pupa de *D. melanogaster*, nas regiões da cabeça e tórax (Kawasaki *et al.*, 2002). Em *T. castaneum*, a expressão de *TcFTZ-F1* é necessária para a formação da cutícula das regiões torácica e abdominal da larva (Heffer *et al.*, 2013). Em nossos dados, *Ftz-F1* foi significativamente mais expresso na fase Pbm, associado ao momento de maior expressão da maioria das proteínas cuticulares de *A. mellifera* e *F. varia*, estando sua expressão positivamente correlacionadas nestas espécies (**Figura 26, Anexo B2**). Porém para *C. analis* não sofreu variação estatisticamente significativa na expressão entre as fases do desenvolvimento.

Durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila* a expressão do fator de transcrição DmHR3 é necessária para a expressão de *Dm β FTZ-F1* e este regula positivamente a expressão dos genes codificadores dos fatores *DmBr-C*, *DmE74A*, *DmE75A* (Lam *et al.*, 1999; Ruaud *et al.*, 2010), diferente de *DmHr3* que regula negativamente *DmE74A*, *DmE75A* e *DmBr-C* no início da metamorfose (Lam *et al.*, 1997). A baixa expressão de *Dm β FTZ-F1* nesta etapa resulta em má formação da cutícula larval que apresenta dentículos menores e não pigmentados (Lam *et al.*, 1999; Ruaud *et al.*, 2010). Já DmHR3 tem função na formação da cutícula das traqueias, afetando a expressão de genes codificadores de quitinase como *DmIdgf5* e quitina sintase *Dmkkv* (Ruaud *et al.*, 2010). Como já observado para as três espécies de abelhas, a maior expressão do ortólogo de *DmHr3* (*Hr46*), ocorre na fase Pbm (porém sem variação estatisticamente significativa em *C. analis*) e condiz com o perfil de expressão de *Amkkv* (**Figura 29**), mas não com a expressão de *FvChS-like*, aqui indicada como ortóloga de *kkv*, e de *CaChS-kkv-like1*. O gene de quitinase *DmIdgf5* é mais similar aos ortólogos *Idgf4* das abelhas, que apresentam perfis semelhantes de expressão, mas que não condizem com o perfil de expressão de genes positivamente regulados por *Hr46*.

Outro gene regulador de muda em *Drosophila*, *DmHr4*, teve sua expressão induzida diretamente por um pulso de 20-hidroxiecdisona no início da metamorfose. Larvas tratadas com RNAi para este gene geraram prepupas menores, disformes, algumas não realizaram a eversão da cabeça, podem não esvaziar o intestino e tiveram expressão prolongada dos genes *DmEcR*, *DmE74A*, *DmE74B*, *DmE75A* e *E75B*, além de iniciarem precocemente a formação da prepupa e apresentarem redução nos níveis de β FTZ-F1. Estes dados demonstram que *DmHr4* contribui para a interação dos processos regulatórios destes receptores nucleares na prepupa. Assim, os genes *DmHr3*, *Dm β FTZ-F1* e *DmHr4* dirigem a resposta biológica ao pulso de ecdisona em prepupas de *Drosophila*. *Desat1*, um gene codificador de proteína estrutural constituinte da cutícula pupal, três genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula larval e *yellow-c* tiveram sua expressão induzida com o tratamento de RNAi para *DmHr4* (King-Jones *et al.*, 2005). Em *Bombyx mori*, *BmHr3*, *BmHr4*, *BmE74A* e *Bm β FTZ-F1* estão positivamente relacionados à expressão dos genes codificadores das proteínas cuticulares *BmCPH5*, *BmCPR34*, *BmCPR23* e *BmCPR99*, respectivamente. Neste processo, o gene *BmHr3* é o limitante na via reguladora (Ali *et al.*, 2013). A expressão de *Hr4* ocorre após a expressão de *Hr3* e antes da expressão de β FTZ-F1 em todos os insetos (Bonneton e Laudet, 2012). Diferente do encontrado para outros insetos, porém considerando-se que não analisamos todos os estágios de adulto farato, *Hr4* apresentou maior expressão na fase Pbm, concomitante à expressão de *Hr3* (*Hr46*) nas abelhas sociais, seguido de decaimento até Fg, estando inclusive significativamente co-expressos em *A. mellifera* (**Figura 29**). Adicionalmente, o sistema de regulação envolvendo a expressão de *E74*, *FTZ-F1*, *Hr4* e *Hr46* é congruente entre as espécies eussociais (**Figura 32**).

O fator de transcrição Met regula positivamente a expressão do gene da esterase do hormônio juvenil (JHE) e de *Kr-h1*, uma vez que os níveis destes transcritos decaem significativamente após o tratamento com dsRNA para Met em larvas de *T. castaneum*, causando problemas na metamorfose, na ecdise da cutícula pupal e desenvolvendo precocemente algumas estruturas do adulto, tais como pernas, asas, antenas e olhos (Parthasarathy *et al.*, 2008). Em *A. mellifera*, *AmMet* foi mais expresso em Pbm, enquanto em *F. varia* *FvMet* apresentou maior expressão em Ne, assim como para *C. analis*, porém neste caso sem variação significativa na expressão. Regulado por Met, *DmKr-h1* é expresso nos tecidos que respondem à ecdisona até pouco antes do início da metamorfose de *Drosophila* (Beck *et al.*, 2005). No abdome desta mosca e sob efeito de JH exógeno, *DmKr-h1* tem sua expressão aumentada na epiderme imaginal e prolonga a expressão de *DmBr-C* nestas células (Minakuchi *et al.*, 2008). Em *Bombyx mori*, *BmKr-h1* é expresso na epiderme larval e sua expressão é induzida pelo JH secretado pelos *corpora allata* no penúltimo estágio larval. Em construções transgênicas de *B. mori* que expressam *BmKr-h1*, mas em

ausência dos *corpora allata*, foi demonstrado que este fator é necessário para a regulação da metamorfose, reprimindo-a, mas essa regulação não ocorre por meio da modulação dos fatores de transcrição iniciais. Também foi demonstrado que *BmKr-h1* não regula as mudas larvais (Kayukawa *et al.*, 2014). Essa expressão de *Kr-h1* em todas as fases jovens, porém atuando como regulador apenas na metamorfose é válida tanto para holometábolos como hemimetábolos (Smykal *et al.*, 2014). Em todas as espécies de abelhas houve um aumento significativo, positivamente correlacionado, da expressão de *Kr-h1*, sendo que em Pbm esta expressão ocorre em níveis basais. Isto está de acordo com os níveis mais elevados de JH em Fg do que nas fases Pbm e Re, por exemplo (Elekonich *et al.*, 2001), condizendo com a indução de *Kr-h1* por este hormônio.

O receptor nuclear Hr38 compete com EcR na ligação com USP. Soma-se a isso o fato de Hr38 não ser regulado por 20E e poder se ligar a outros ecdisteróides (Bonneton e Laudet, 2012). *DmHr38* é expresso em embriões de *Drosophila* entre 8h-12h até indivíduos adultos, tendo seu pico de expressão no estágio pupal. *DmHr38* também regula a expressão do gene codificador da proteína cuticular ACP65A nas células epidérmicas das regiões de articulações e membranas intertergais de adultos faratos e recém-emergidos de *D. melanogaster* (Bruey-Sedano *et al.*, 2005). Outros genes codificadores de proteínas cuticulares também são positivamente regulados por *DmHr38*: *DmCPR49Ae*, *DmCPR92A* e *DmAcpl* (Kozlova *et al.*, 2009). Curiosamente, *DmCpr92A* e *DmAcpl* apresentam o domínio RR-2, enquanto *DmACP65A* e *DmCpr49Ae* são RR-1. Em ambas as espécies de abelhas sociais, *Hr38* apresenta perfil similar ao de várias proteínas cuticulares (maior expressão em Pbm, seguido de decaimento até Fg), condizendo com os dados já referenciados para *D. melanogaster*. Por este motivo, é um potencial candidato a regulador da expressão de CPRs em abelhas. Em *C. analis* este gene não sofreu variação significativa em sua expressão nas fases do desenvolvimento aqui estudadas. Em *A. mellifera*, *AmHr38* apresenta co-expressão com proteínas estruturais não RR, com o gene da desacetilase *Amverm* e com o de uma quitinase-like, conforme deduzido da correlação positiva entre os perfis de expressão destes genes e *Hr38* (**Figura 29**). Já *FvHr38* está co-expresso com o gene codificador de uma CPR-like (**Figura 30**). *CaHr38* não apresenta co-expressão significativa com nenhum outro gene aqui identificado.

O fator de transcrição E93 (ortólogo em *A. mellifera*: Gene ID - 408521) é fundamental para a metamorfose tanto em insetos hemimetábolos como, por exemplo, a barata *Blattella germanica*, como em holometábolos como *T. castaneum* e *D. melanogaster*. Nestes insetos, E93 regula negativamente a expressão de *Kr-h1* e *Br-C* e afeta a formação da cutícula adulta. dsRNA para *E93* aplicado em *B. germanica* mantém as características ninfais e impede a formação do adulto. Em *T. castaneum* uma segunda cutícula pupal é formada e previne a morfogênese do adulto. Prova disso é a ausência de expressão do gene específico de cutícula adulta, *TcCPR27*, que

normalmente ocorre durante a muda da pupa em adulto. A deleção do gene *E93* impede a expressão do gene da proteína cuticular específica de adulto *DACP65A* em *D. melanogaster* (Ureña *et al.*, 2014). Detectamos *E93* em *A. mellifera*, mas não em *F. varia*, e com expressão significativamente reduzida em Ne. Os níveis de expressão em Pbm e Fg são similares. Em *C. analis* não há variação de expressão deste gene.

Em *Drosophila*, a expressão de *Dmyellow* é regulada diretamente pelo produto do gene Hox *DmAbd-B*, controlando assim o padrão de pigmentação desta mosca (Jeong *et al.*, 2006). *AmAbd-B* foi significativamente mais expresso em Pbm, assim como *Amyellow-y*. *FvAbd-B* não teve variação significativa de expressão, assim como *CaAbd-B*. Apesar de não haver co-expressão positiva, para nenhuma das espécies, entre a expressão de *AmAbd-B* e de genes da via de melanização/esclerotização, *AmDdc*, *Amyellow-y*, *AmLac2*, *AmDat* e *Amtan* apresentam, em suas 5' UTRs, 3, 3, 5, 2 e 7 sítios de ligação para Abd-B, respectivamente. Outro destaque é a expressão dos ortólogos do gene *hairy*. Foram encontrados sítios de ligação para este fator de transcrição nos genes envolvidos na melanização em *A. mellifera*, mas não nos genes envolvidos apenas na esclerotização, como *Dat* por exemplo. *Amhairy* e *Cahairy* são positivamente correlacionados entre si e negativamente correlacionados com *Fvhairy*. *Hairy* é um gene *pair-rule* associado à polaridade da segmentação em embriões de *Drosophila* (Carroll *et al.*, 1988) e vertebrados (Stern e Vasilias, 1998). Como pode ser observado na **Figura 34**, a melanização é polarizada nos segmentos abdominais.

Por ocasião da emergência (ecdise) do adulto, durante o decaimento dos níveis de ecdisteróides, ocorre um aumento da expressão de corazonin no cérebro do inseto. Corazonin estimula a expressão do hormônio indutor da pré-ecdise (PETH) e do hormônio indutor de ecdise (ETH) nas células Inka do sistema endócrino epitraqueal. ETH, por sua vez, interage com seu receptor (ETHR) nos neurônios ventromediais do cérebro, estimulando a produção do hormônio de eclosão (EH), que é importante para a ativação da ecdise. Tudo indica que o fator de transcrição que regula ETH é β FTZ-F1. Após a ecdise, a ação do neuropeptídeo bursicon é fundamental para os processos de esclerotização e pigmentação da nova cutícula (para revisão ver Zitnam e Adams, 2012). *AmEth* apresenta um sítio de ligação para β FTZ-F1 em sua 5' UTR e a expressão de *Ethr* foi positivamente correlacionada entre *A. mellifera* e *F. varia* (**Figura 26**, **Anexo B2**). Bursicon é composto por duas subunidades, é liberado dos gânglios torácicos e abdominais e interage nos tecidos alvo através de seu receptor Rickets. Bursicon regula a maturação da cutícula controlando a expressão de genes como *laccase2* (ver Song, 2012). Isto é observado na rede de co-expressão do tegumento de *A. mellifera* (**Figura 29**). Para *F. varia*, *FvRickets* não apresenta co-expressão positiva com genes da via de melanização/esclerotização. Já em *C. analis*, destacamos a co-expressão

positiva de *CaRickets* com *CaChS6*, *CaChS-kkv-like1* e *CaCda-like1* (**Figura 31**). A expressão de *Rickets* apresentou correlação positiva significativa entre os ortólogos das espécies eussociais, mas não destas com a espécie solitária (**Figura 26, Anexo B2**), sugerindo que a regulação via bursicon é importante para a hipótese de heterocronia da maturação cuticular.

Os dados de redes de interação gênica envolvendo o cérebro (**Figura 33**) de *A. mellifera* reforçam interações como a co-expressão entre *brainEthr* e *brainEh*, passos sequenciais na via de sinalização da ecdise do adulto (para revisão ver Zitnam e Adams, 2012). Outra importante relação foi a co-expressão entre *brainEth* e *AmEh-like* no tegumento abdominal.

Concluindo, estes dados sobre reguladores da expressão gênica demonstram que existem particularidades na regulação do processo de maturação da cutícula entre as espécies de abelhas aqui analisadas, especialmente no que se refere aos perfis de expressão gênica nas fases do desenvolvimento. As interações gênicas resultantes das redes de co-expressão das espécies eussociais referentes aos genes *FTZ-F1*, *E74*, *Hr46* e *Hr4* e a correlação positiva entre a expressão de *Rickets* e outros reguladores (*Ethr*, *E74*, *Hr4*, *Hr38*, *FTZ-F1* e *Ptx-1*) em *A. mellifera* e *F. varia* suportam a hipótese de que o *timing* de regulação da maturação da cutícula é comum entre estas espécies e diferente da espécie solitária. A variação encontrada na expressão dos ortólogos de *usp* e do gene regulador da polaridade dos segmentos, *hairy*, pode estar associada a diferenças na via de melanização.

g. Osciladores periféricos no tegumento abdominal

O ciclo circadiano é um sistema bem conservado responsável por regular uma variedade de processos fisiológicos, metabólicos e comportamentais, permitindo aos organismos se adaptar às variações diárias e sazonais (Ko e Takahashi, 2006; Bellet e Corsi, 2010). O relógio central do ciclo circadiano reside em células do sistema nervoso central, sendo composto por uma variedade de genes que interagem em sistema de *feedback* em nível de transcrição e tradução (Schibler e Sassoni-Corse, 2002). Além do sistema nervoso central, outros tecidos também apresentam a capacidade oscilatória independente do relógio central, como as antenas, olhos compostos, asas e pernas de insetos (para revisão veja Ito *et al.*, 2008).

Genes do ciclo circadiano possuem a importante função de determinar o número e a espessura das camadas cuticulares (Ito *et al.*, 2008; Ikeno *et al.*, 2011). Nós encontramos variações na expressão gênica (**Figura 22**) que podem estar associadas à morfologia cuticular. Diferentemente de *A. mellifera*, as camadas cuticulares de *F. varia* já aparecem bem determinadas na fase Pbm, enquanto para *C. analis* as cutículas das fases Ne e Fg são similares em espessura (**Figura 34A, B e C**). Em *D. melanogaster*, a deposição da cutícula torácica é potencialmente regulada pelos

osciladores periféricos em células epidérmicas, mas não pelo relógio circadiano central. Perturbações no sistema periférico podem afetar os arranjos de quitina, perdendo a estruturação em camadas da endocutícula (Ito *et al.*, 2008). Um trabalho antigo de Neville (1965) indica que em gafanhotos a formação da endocutícula também é regulada pelo ritmo circadiano, com deposição de quitina durante os períodos de luz e organização das camadas de lamelas nos momentos escuros. Quando se desenvolvem em luz e temperatura constantes, há a formação de uma espessa camada escura de cutícula observável sob microscopia de luz polarizada. O padrão lamelar é recuperado com a oscilação da temperatura. Em *D. melanogaster*, Ito *et al.* (2008) observaram resultados semelhantes, sob microscopia com contraste interferencial, onde as camadas eram percebidas quando os animais se desenvolviam em ciclos de luz e escuro (*Zeitgeber period*), o que não foi percebido quando se desenvolviam no escuro, onde apenas uma camada espessa e clara foi detectada. Nesta mosca, o ritmo circadiano periférico dependeu apenas da expressão dos genes *DmPer*, *DmTim*, *DmCyc*, e *DmClk*.

Diferentemente de *D. melanogaster*, onde o gene *DmCry* não apresenta função na formação das camadas cuticulares (Ito *et al.* 2008), no Hemiptera *Riptortus pedestris*, RpCRY é antagonista de RpPER. Quando RpCRY está presente, há uma redução na expressão de *RpPer* e as camadas cuticulares são formadas, enquanto na situação oposta apenas uma camada escura é formada. Em outro caso, o tratamento com dsRNA para *RpCyc* criou uma camada única e clara (Ikeno *et al.*, 2011). Devido à expressão de *AmClk*, *AmPer* e *AmCry* em Pbm e também que em *F. varia* as camadas já aparecem bem definidas nesta fase, nós sugerimos que estes genes tem função na formação das camadas cuticulares em abelhas. Entretanto, a deposição de quitina aparentemente continua ocorrendo após a emergência do adulto em *A. mellifera*, porém sem a formação de camadas bem definidas (**Figura 34**). Possivelmente o gene *FvClk*, que é negativamente correlacionado com *AmClk* e *CaClk*, é importante para essa diferenciação. A expressão de *FvCry* não foi detectada, mas *AmCry* pode ser importante nos estágios iniciais de adulto farato uma vez que as camadas/espessura da cutícula de Pbm são similares às de Ne nesta espécie.

Apenas para *A. mellifera* observamos co-expressão entre *AmPer* e o gene codificador de uma proteína cuticular, *Amknk* (**Figura 29**). Em *T. castaneum*, *Tcknk* está associado à estabilização laminar da cutícula (Chaudhari *et al.*, 2014) e proteção contra a ação do fluido de muda (Moussian *et al.*, 2006; Chaudhari *et al.*, 2011). Além disso, mosquitos *Anopheles gambiae* expostos à luz em diferentes períodos e coletados em diferentes momentos do dia, apresentaram variações nos níveis de mRNA para os genes que codificam as proteínas cuticulares CPF3, CPF4, CPLCG3 e CPLCG4 (Vannini *et al.*, 2014). Dando suporte a esta informação, *AmPer* e *Amknk* são co-expressos com genes codificadores de Cht, *Amchitotriosidase1-like2*, proteínas estruturais como *AmCpap3-a*,

AmTwdl(Grp), *AmUnCPR-RR2-2*, *AmCPR26*, *Am49Ah-like*, *AmSgAbd2-like*, e genes da via de melanização *Amyellow-y* e o regulador *AmHr46* (**Figura 29**), o que sugere a participação de *AmPer* na formação das camadas cuticulares desta abelha.

Assim, sugerimos que a expressão de *Clk* e *Cry* está relacionada à deposição da cutícula e a expressão de *Clk*, *Cry* e *Per* se relaciona com a organização das camadas de quitina. Apesar da função pouco conhecida em abelhas, a expressão do gene *Tim2*, positivamente correlacionada entre *A. mellifera* e *F. varia*, mas não entre estas espécies e *C. analis*, também suporta a nossa hipótese.

h. Vias de pigmentação não melanínicas

As análises de GO (**Figura 6**) nos revelaram a presença de expressão diferencial de genes envolvidos em pigmentação não melanínica no tegumento abdominal de abelhas. O destaque fica para as vias de formação de pterinas e omocromos. O conjunto dessas vias deve gerar pigmentos avermelhados, amarelos, marrons ou até mesmo pretos e estas vias interagem entre si, podendo os produtos da via de pterinas atuar como cofatores na via de omocromos. Dentre os genes destas vias detectamos *scarlet*, *cardinal*, *brown*, *white*, *vermillion*, *light*, *garnet*, *sepia*, *henna* (este último age tanto na formação de bipterina como na formação de tirosina para a via de melanização). Os pigmentos omocromos podem estar envolvidos na redução da toxicidade causada por triptofano e as pterinas podem atuar como pigmentos corporais em Hymenoptera (revisado em Shamim *et al.*, 2014). Dado o perfil de expressão geral encontrado para estes genes, subentende-se que eles são mais importantes na fase adulta das abelhas.

Em nossos dados, destaca-se a expressão de *scarlet* e *cardinal*. Estes genes estão envolvidos na formação de omocromos em *B. mori* (Osanai-Futahashi *et al.*, 2016), que estão relacionados à formação de pigmentos marrons e vermelhos (Sugumaran, 2009). Adicionalmente, um dos genes cuja proteína está envolvida na formação dos grânulos de pigmentos é *light* (Lloyd *et al.*, 1998), que também tem a expressão de seus ortólogos positivamente correlacionada entre *F. varia* e *C. analis*. Entretanto, a expressão dos ortólogos de *ALAS*, envolvidos na formação de pigmentos heme (revisado em Hamza e Dailey, 2012; Stubenhaus *et al.*, 2016) aproxima as espécies eussociais. Em *Drosophila*, *ALAS* não apresenta o domínio de ligação ao íon de ferro, como observado em vertebrados, e pode estar envolvido em processo de desintoxicação em insetos (Mena *et al.*, 1999). A expressão dos ortólogos de *scarlet*, *cardinal* e *light* em abelhas nos mostra um padrão que correlaciona positivamente *F. varia* e *C. analis* no que se refere à pigmentação de cor vermelha e marrom, diferenciando-as de *A. mellifera*. Logo, estes genes são importantes para o padrão de coloração do inseto, mas não podem ser associados à heterocronia da maturação cuticular. Enquanto isso a expressão dos ortólogos de *ALAS* apresenta similaridade entre *A. mellifera* e *F. varia*.

5.2. MET

Nossos dados mostraram diferenças na espessura da cutícula da abelha eussocial *A. mellifera* e da abelha solitária *C. analis*. Para a primeira espécie, a fase Fg apresentou cutícula mais espessa que as fases Ne e Pbm (**Tabela 3, Figura 34A**), enquanto as fases Ne e Fg da espécie solitária apresentaram cutículas de espessuras semelhantes, maiores que Pbm (**Tabela 5, Figura 34C**). As diferenças entre as cutículas das fases Pbm, Ne e Fg da espécie eussocial *F. varia* aparentemente se restringem à pigmentação (**Tabela 4, Figura 34B**). Adicionalmente, abelhas Ne das espécies *B. brasiliensis* (social, pertencente à Bombini), *E. cordata* (facultativamente social, pertencente à Euglossini) e *T. diversipes* (solitária, Tetrapedini) não apresentam variação significativa na espessura do tegumento se comparadas à Fg (**Tabelas 6 a 8; Figura 34D a F**).

Elias-Neto *et al.* (2013) observaram, que a cutícula torácica de abelhas forrageiras (Fg) das tribos Apini (inclui *A. mellifera*) e Meliponini (inclui *F. varia*) é mais pigmentada e esclerotizada que nas abelhas Ne. Para *F. varia*, estes autores observaram apenas uma variação na melanização, refletida na ausência de uma camada superficial de pigmentos em Ne, que no entanto já está presente nesta fase do desenvolvimento de *A. mellifera*, apesar de não estar ainda completamente formada. Mesmo na espécie considerada primitivamente eusocial, *Bombus morio*, esta camada melanizada é menos espessa em Ne que na Fg. Em fêmeas de formigas *Diacamma* sp. o processo de pigmentação só é concluído uma semana após a emergência do adulto (Miyazaki *et al.*, 2014). Nas abelhas solitárias *C. analis* e *T. diversipes*, Ne e Fg se assemelham quanto ao grau de melanização e esclerotização da cutícula torácica, conforme observado por microscopia de luz (Elias-Neto *et al.*, 2013), assim como observamos através de MET para a medida da espessura do tegumento abdominal.

Assim, utilizando abelhas na fase Pbm como um controle referencial de comparação, reforçamos a hipótese da heterocronia da maturação cuticular em termos morfológicos. A cutícula abdominal das abelhas sociais é menos espessa (em Apini) e/ou melanizada/esclerotizada no momento da ecdise (fase Ne) que a da abelha solitária *C. analis*. Neste aspecto, a espécie facultativamente eussocial *E. cordata* mostrou-se semelhante às espécies solitárias, conforme demonstramos aqui..

Essas comparações corroboram os dados da análise da via de pigmentação e esclerotização e via de síntese de quitina aqui relatados. Sugerimos que a diferença encontrada entre as espécies de abelhas sociais é causada pela variação na expressão de *yellow-y*, *Dat*, *tan* e *ebony* (diferenças no nível de melanização e esclerotização no momento da emergência do adulto), genes codificadores de quitina deacetilases e quitinases e de osciladores periféricos no que se refere à deposição e

organização das camadas de quitina. Mais uma vez o tegumento reflete variações que podem estar associadas à evolução da socialidade, sendo que o aumento da espessura da cutícula observado em *A. mellifera*, pode ser uma característica dos Apini.

5.3. Análises de CHCs

Nós observamos que os CHC estruturais (n-alcanos) diferenciam Fg de Ne e Pbm nas espécies de abelhas sociais (**Figura 36A, B**), *A. mellifera* e *F. varia*, mas não na espécie de abelha solitária *C. analis* (**Figura 36C**). Estes dados foram reforçados pela quantificação absoluta destes compostos (**Tabela 13**). O conjunto de hidrocarbonetos insaturados, sabidamente úteis para a comunicação química, não corrobora as diferenças encontradas entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* (**Figura 37A**), mas discriminam todas as fases de *F. varia* (**Figura 37B**). CHCs insaturados separam Fg de Pbm e Ne em *C. analis* (**Figura 37C**). Os CHCs ramificados também contribuem para a diferenciação entre Fg e as fases jovens tanto em *A. mellifera* como em *C. analis*, mas não em *F. varia* (**Figura 38**).

A hipótese de que os n-alcanos são os lipídios estruturais da cutícula dos insetos tem suporte no trabalho de Gibbs e Pomonis (1995). Eles examinaram o comportamento de fase da camada lipídica com base no conteúdo de CHC por meio da transformação infravermelha de Fourier. Estes autores demonstraram que os CHCs geralmente presentes na cutícula dos insetos variam suas temperaturas de fusão de acordo com suas classes (n-alcanos, metil-alcanos e alcenos). A temperatura de fusão aumenta com o tamanho da cadeia do CHC para todas as classes, já a presença de um grupo metil ou de uma insaturação reduz a temperatura de fusão. Em uma revisão posterior, Gibbs (1998) apontou para a correlação singular entre a composição de CHCs e perda de água. O autor associou CHCs insaturados e metilados com a maior permeabilidade da cutícula e reforçou a idéia de que CHCs de maior tamanho de cadeia tem maior temperatura de fusão.

Alcanos lineares compõem o envelope de muitas ordens de insetos (Lockey, 1988). Estes compostos variam geralmente de C21 a C31 ou C33. Os n-alcanos com cadeia de carbono <C20 podem atuar como feromônios de contato (revisado em Blomquist, 2010). A maioria dos n-alcanos >C20 se fundem em temperaturas maiores que 35°C (Gibbs e Pomonis, 1995). Como os CHCs aparecem em misturas no envelope, a fusão parcial dos n-alcanos tende a ocorrer misturando-os com outras classes de CHCs (revisado em Gibbs, 1998). Isso é benéfico para os insetos, colaborando para o resfriamento por evaporação, permitindo a dispersão dos lipídios na cutícula e aumentando a comunicação química como feromônios de contato. Os compostos usados para a função de feromônio de contato são geralmente metilados ou insaturados (Dani *et al.*, 2001; revisado em Gibbs, 2002; Châline *et al.*, 2005). Neste sentido, Gibbs (2002) descreveu um modelo

hipotético onde a camada lipídica apresenta diferentes fases físicas de hidrocarbonetos. Estas fases são uma estrutura cristalina composta principalmente por n-alcanos e, talvez, alguns CHCs metilados menos permeáveis, e uma fase líquida composta basicamente por feromônios insaturados acessíveis aos quimiorreceptores. De acordo com Dani *et al.* (2005), este modelo também contempla a importância dos alcenos, mas não de n-alcanos $\geq C_{21}$, como assinaturas de reconhecimento na abelha *A. mellifera*. A modificação da composição do envelope através da aplicação de n-alcanos não altera o reconhecimento entre vespas *Polistes dominulus*, mas a introdução de alcenos e CHCs ramificados afetam este processo (Dani *et al.*, 2001). Também na formiga *Lenepithema humile* os n-alcanos são destacadamente estruturais (van Wilgenburg *et al.*, 2012).

Os perfis dos CHCs estruturais (n-alcanos) não apenas separam Fg de Ne e Pbm como ainda agrupam Ne e Pbm nas duas espécies de abelhas sociais, diferentemente de *C. analis*. A diferença na proporção (e também na quantidade) dos n-alcanos quando comparamos Fg e Ne é significativa para *A. mellifera* (**Tabelas 9 e 13**), já para *F. varia* esta diferença na proporção não é significativa (**Tabela 10**), enquanto a quantificação absoluta separa claramente as duas fases (**Tabela 13**). A análise individual dos picos obtidos dos cromatogramas de *F. varia* indica um grande aumento na proporção/quantidade de C_{22} , C_{27} e C_{29} em Fg, mas os picos dos outros n-alcanos diminuem (**Anexos C e E**). Em *A. mellifera* os n-alcanos de maior proporção em Fg que em Ne são C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{29} , C_{31} e C_{33} , com os picos de C_{25} e C_{27} apresentando as maiores proporções (**Anexo C**) e quantidades absolutas (**Anexo E**). Todos estes n-alcanos também aumentam suas proporções em *Melipona marginata* na fase de Fg quando comparada à fase Ne, exceto para o C_{27} , que se mantém estável (Ferreira-Caliman, 2010) e C_{33} , que não foi encontrado nesta espécie. As proporções/quantidades absolutas dos n-alcanos em *C. analis* não diferenciam Fg de Ne (**Tabelas 11 e 13**). O mesmo ocorre para a outra espécie de abelha solitária *T. diversipes* (**Tabela 12**). Os n-alcanos também não variam significativamente na abelha solitária *Megachile rotundata*, onde os alcenos são os principais responsáveis pelas variações encontradas no perfil químico comparando-se fêmeas jovens e velhas (provavelmente acasaladas) (Paulmier *et al.*, 1999), assim como encontramos para *C. analis* (**Anexo C**).

Comparando os perfis de CHCs de operárias de *A. mellifera* nas fases de Ne (até 24h), *nurse* e Fg, Kather *et al.* (2011) observaram um aumento na proporção de n-alcanos e alcenos em Fg com relação a Ne. A abelha sem-ferrão *M. marginata* também apresenta proporções ascendentes de n-alcanos comparando-se Ne (1 dia após a eclosão do adulto), *nurse* (10 dias) e Fg (>20 dias) (Ferreira-Caliman *et al.*, 2010). Formigas também apresentam diferenças em seus perfis de n-alcanos dependendo se realizam tarefas intra ou extranidais. Em *Pogonomyrmex barbatus*,

forrageiras e guardas apresentam maior proporção de n-alcanos que aquelas que realizam atividades dentro da colônia (Wagner *et al.*, 1998). A exposição ao ambiente externo é o suficiente para aumentar os níveis de n-alcanos nestas formigas. Os fatores ambientais associados a essas variações são a temperatura ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa (tão baixa quanto 8%) (Wagner *et al.*, 2001).

Após a emergência, as abelhas sociais se mantêm dentro da colônia e continuam o processo de maturação da cutícula, enquanto as abelhas solitárias imediatamente abandonam seus ninhos. A cutícula completamente desenvolvida das abelhas solitárias permite a atividade de voo e as protege contra a dessecação. O ambiente ao redor pode, de alguma forma, afetar a via de biossíntese de CHCs. No fígado de carpas, baixas temperaturas induzem a atividade de Δ -9 desaturases e aumentam a expressão dos genes codificadores destas enzimas, aumentando assim as proporções de ácidos graxos mono e poliinsaturados (Tiku *et al.*, 1996). A expressão de genes de desaturases já foi correlacionada com as proporções de CHCs insaturados em *A. mellifera* (Falcón *et al.*, 2014). Isto nos ajuda a tentar explicar os aumentos nos níveis (proporcionais e absolutos) de CHCs insaturados em abelhas Fg desta espécie em comparação às abelhas Ne. Como a temperatura no interior da colônia da abelha Africanizada é geralmente maior que 30°C (Toledo e Nogueira-Couto, 1999), portanto, frequentemente maior que a temperatura ambiente, possivelmente a maior proporção de CHCs insaturados em Fg que em Ne é devido ao aumento da expressão dos genes codificadores de desaturases. Infelizmente, nós não podemos estender esta hipótese para *F. varia*, uma vez que não há registro sobre a temperatura do ninho para esta espécie. Contudo, um estudo com uma abelha colombiana do mesmo gênero, *F. nigra*, mostrou que as temperaturas dentro da colônia são maiores que as ambientais (Torres *et al.*, 2009). Estas observações, porém, são contrárias às relatadas para as abelhas melíferas europeias, onde as *nurse*, que realizam atividades intranidais, apresentam maior proporção de CHCs insaturados que Fg (Kather *et al.*, 2011). Soma-se a isto o fato de que dependendo da subespécie, a temperatura da colônia pode ser consideravelmente menor que a do ambiente. Por exemplo, a temperatura num ninho de *A. mellifera carnica* pode variar de $<15^{\circ}\text{C}$ a 25°C (Toledo e Nogueira-Couto, 1999).

Adicionalmente, verificamos os CHCs ramificados, que podem estar envolvidos em ambas as funções (estrutural e comunicação) (Dani *et al.*, 2001; revisado em Gibbs, 2002). Os CHCs ramificados agrupam as fases Ne e Pbm de *A. mellifera*; as Fg formam um grupo distinto. Essa distinção entre as fases do desenvolvimento não foram observadas para *F. varia*, com algumas Fg incluídas no grupo de Ne e Pbm. Os CHCs ramificados também diferenciam as fases mais jovens da fase Fg das abelhas *C. analis*.

Nas abelhas sociais, mas não em *C. analis*, os CHCs ramificados apresentaram uma redução na proporção na fase de Fg. Assim, estes compostos se apresentam como potenciais sinais mais

informativos nas fases jovens das abelhas sociais, em um contraste evidente aos CHCs insaturados, que estão em maior proporção na cutícula madura (Fg). Tais informações aqui apresentadas para as duas espécies de abelhas sociais, *A. mellifera* e *F. varia*, confirmam e ampliam nosso estudo inicial com *A. mellifera* (Falcón *et al.*, 2014).

Concluindo estas análises, as distâncias Euclidianas calculadas com base nos dados de proporção dos CHCs identificados, e a quantificação absoluta aplicadas aos perfis químicos, mostraram que as cutículas jovens e maduras das abelhas sociais *A. mellifera* e *F. varia* diferem significativamente nas quantidades de n-alcanos, o que não ocorre na abelha solitária *C. analis*. Possivelmente por efeito da expressão dos ortólogos dos genes de elongases GB54401, GB54302 e GB45596. Enquanto as variações nos CHCs insaturados podem ser associadas à expressão dos ortólogos da desaturase GB40659, similar nas espécies eussociais e não detectado em *C. analis*. Isto pode ser interpretado como uma variação relacionada à socialidade. As abelhas que se mantêm dentro do ambiente social (colônia) após a emergência não se apresentam com a cutícula estruturalmente pronta para enfrentar o ambiente externo à colônia, enquanto na abelha solitária, que ao emergir já se depara com o ambiente externo, a cutícula não difere estruturalmente (perfil de n-alcanos) em relação à abelha forrageira. Assim, estes resultados são consistentes com a hipótese de que a heterocronia da maturação cuticular está associada à evolução da socialidade.

5.4. Considerações finais

A cutícula garante a sobrevivência e a adaptabilidade dos insetos, possibilitando sua existência como um dos grupos de maior sucesso do reino animal (Qiao *et al.*, 2014). Isso por si só, seria o suficiente para justificar os estudos dessa estrutura. As propriedades da cutícula e do tecido que a secreta, a epiderme, variam durante o desenvolvimento bem como ela apresenta características próprias nas diversas partes do exoesqueleto do organismo, tornando os genes codificadores de proteínas cuticulares, e de outras proteínas ou enzimas envolvidas na formação, manutenção e função da cutícula, um modelo atrativo para se estudar processos de diferenciação. O fato da principal camada da cutícula, a procutícula, só ser depositada durante o declínio do título de ecdisteróides na hemolinfa mostra um modo particular de regulação hormonal da síntese e diferenciação dos componentes cuticulares (revisado em Charles, 2010). Tal diferenciação se completa com a esclerotização e melanização da cutícula, assim concluindo a metamorfose do tegumento (Kozlova *et al.*, 1998). Soma-se também a idéia de que a variação fenotípica da cutícula entre as espécies de abelhas possa refletir possíveis adaptações aos seus estilos de vida (solitário e eussocial) (Elias-Neto *et al.*, 2013).

A análise do transcriptoma do tegumento, dentro de fases do desenvolvimento cuidadosamente escolhidas, permite *insights* sobre o processo de desenvolvimento e maturação da cutícula. Avaliamos os genes envolvidos no processo de maturação cuticular e verificamos que a expressão dos genes *ebony* e *tan* diferencia as espécies eussociais da solitária na via de melanização/esclerotização. Já as expressões dos ortólogos de *yellow-y* e *Dat*, nesta via, diferenciam as abelhas eussociais (*A. mellifera* e *F. varia*). Observamos, também, variações na expressão de *AmCht5* na via do metabolismo de quitina que podem estar relacionadas ao aumento da espessura da cutícula enquanto a abelha *A. mellifera* se desenvolve de Ne em Fg, o que não se verifica nas demais espécies. A análise comparativa da ultraestrutura da cutícula das três espécies fortalece este achado. Adicionalmente, a expressão dos ortólogos dos genes codificadores da quitina desacetilase *Cda5*, e das quitinases *Idgf4* e *chitooligosaccharylolytic-domain-like* estão potencialmente relacionados à heterocronia da maturação cuticular em abelhas.

As redes de interação gênica também indicam processos de regulação comuns entre as espécies eussociais, com a co-expressão de *FTZ-F1*, *E74*, *Hr46* e *Hr4*. Os perfis de expressão de *Rickets* apresentaram correlação positiva entre as espécies eussociais e sugeriram variação no *timing* da regulação da maturação cuticular entre as espécies eussociais e a solitária. Já a expressão dos ortólogos de *hairy*, com sítios de ligação nos genes de melanização, e de *usp*, são positivamente correlacionados entre as espécies em que a melanização inicia-se mais cedo, *A. mellifera* e *C. analis*, e negativamente correlacionados com a expressão de seus ortólogos em *F. varia*, o que pode estar associado à variação no *timing* da melanização cuticular entre as espécies. As intersecções entre as redes de co-expressão sugerem pontos comuns de regulação para a diferenciação do tegumento adulto em abelhas eussociais, o que não se verifica em relação a *C. analis*. Essas variações no *timing* da expressão gênica destes reguladores fornecem subsídio para a nossa hipótese.

Dentre as proteínas estruturais, destacamos a expressão de *Apd-3*, mais relacionada a cutículas menos pigmentadas (Kucharski *et al.*, 2007), *Apd-like*, *CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR23* e *CPR26* que aproxima as espécies eussociais e as diferenciam da solitária. *AmCPR22* mostrou-se negativamente correlacionada com *CaCPR22*, diferenciando estas espécies.

Quanto à expressão de genes do ciclo circadiano, *FvClk* é negativamente correlacionado com a expressão de *AmClk* e *CaClk*, e sugere participação na manutenção da cutícula da abelha forrageadora de *F. varia*. Já em *A. mellifera*, *AmCry*, negativamente correlacionado com *CaCry*, pode ser importante, juntamente com *AmClk*, para a deposição da cutícula enquanto a abelha se desenvolve de Ne para Fg. Já a expressão dos ortólogos de *Per* pode estar relacionada à organização das camadas de quitina (e talvez à deposição deste polissacarídeo) e pode estar influenciando a

expressão de *knk* em *A. mellifera*. Para *F. varia* este processo deve ocorrer antes da fase Pbm e para *C. analis* possivelmente ocorre entre as fases Pbm e Ne. A expressão dos ortólogos de *Tim2* corrobora a nossa hipótese.

Os dados das análises da via de biossíntese de CHCs (compostos fundamentais para a formação do envelope cuticular), juntamente com os perfis de variação destes compostos durante o desenvolvimento, reforçam a hipótese da heterocronia da maturação cuticular, destacando-se a correlação encontrada para a expressão das elongases GB54401, GB54302, GB45596 e GB46038 e a variação na concentração de n-alcanos. Já a diferença na expressão dos ortólogos de Desat-GB40659 pode estar relacionada às variações nas concentrações dos compostos insaturados.

Quanto às vias de pigmentação não melanínicas, a expressão dos genes de formação de pigmentos amarronzados e avermelhados diferencia *A. mellifera* de *F. varia* e *C. analis*, porém essa diferença pode se dar devido à variação de pigmentos entre as espécies de abelhas, não necessariamente ao *timing* da expressão.

Ao abordar o processo de desenvolvimento do tegumento em diferentes organismos, nosso trabalho passa a ter um foco em Evo-Devo, ou seja, a área da biologia que trata da evolução do desenvolvimento. Neste aspecto, nosso trabalho diferencia-se de publicações marcantes em nossa área de atuação (Danforth *et al.*, 2013; Woodard *et al.*, 2013; Kapheim *et al.*, 2015) que compararam verticalmente genomas e transcriptomas de dez espécies de abelhas, mas sem a abordagem horizontal do processo de desenvolvimento, a qual tem o potencial de mostrar variações heterocrônicas adaptativas.

Nós não detectamos variação fenotípica da cutícula entre Ne e Fg de *E. cordata* (facultativamente social). Segundo Michener (1974), em Bombini (primitivamente eussocial), o tempo de pigmentação é menor que em Apini e Meliponini, e também em outro grupo de abelhas sociais (Allodapini), que não pertence à Apidae corbiculado, o processo de pigmentação pode durar muitos dias após a emergência do adulto. Outros insetos, mesmo solitários, como odonatas (Klass, 2008) e o besouro *T. castaneum* (Arakane, 2004) também necessitam de alguns dias para finalizar o enrijecimento e pigmentação do tegumento. A maturação cuticular em espécies solitárias e facultativamente sociais de abelhas é precoce. Um resumo dos principais achados é apresentado na **Figura 39**, a seguir.

Figure 39 - Genes (arrows) showing expression profiles consistent with the hypothesis of cuticle maturation heterochrony related to the solitary or social way of life (the question marks indicate inferences non-supported by experimentation). The three first series show the gene lists and electron micrographs of the developing integument (epidermis and cuticle) of *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis*, respectively. The genes listed in the two series below were extrapolated for the social and solitary/facultatively social species. The onset of adult cuticle formation is regulated by the decrease in the ecdysteroid titer after the apolysis-triggering peak. Bee images were taken at the following developmental stages: pupal (Pw); pupa undergoing apolysis (Pp); pharate-adults (Pbm and Pbd); newly-emerged bee (Ne); forager (Fg).

6. Conclusões

- 1 - A análise de RNA-seq nos permitiu verificar variações de expressão gênica relacionadas à heterocronia da maturação cuticular, incluindo genes da via de melanização e esclerotização, do metabolismo da quitina, de proteínas cuticulares estruturais, de elongases e desaturases envolvidas na biossíntese de CHCs, bem como genes reguladores da formação e maturação cuticular, genes do ciclo circadiano (a deposição das camadas de cutícula depende do ritmo circadiano) e de vias de pigmentação não melanínicas;
- 2 - As variações encontradas nas vias de pigmentação não melanínicas podem representar variações do tipo de pigmento, não podendo ser associadas à heterocronia;
- 3 - As análises por MET revelaram variações no desenvolvimento e espessura da cutícula entre as espécies eussociais e solitárias, e mesmo entre as eussociais;
- 4 – As análises químicas por meio de cromatografia de gás/espectrometria de massas reforçam o papel estrutural dos n-alcanos em diferenciar a cutícula das espécies eussociais da espécie solitária;
- 5 – Em conjunto, os dados obtidos revelam um panorama abrangente das diferenças do transcriptoma e ultraestrutura do tegumento e composição química do envelope cuticular de espécies sociais e solitárias de abelhas, além de identificar genes, componentes químicos e aspectos da morfologia com potencial de contribuir para a heterocronia da maturação cuticular.

Referências Bibliográficas

- Abramoff, M. D.; Magalhães, P. J.; Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11, 36 - 42.
- Ahmed-Braimah, Y.; Sweigart, A. L. (2015). A single gene causes interspecific difference in pigmentation in *Drosophila*. *Genetics* 115, DOI: 10.1534/genetics.115.174920 .
- Ali, M. S.; Iwanaga, M.; Kawasaki, H. (2013). Ecdysone-responsive transcriptional regulation determines the temporal expression of cuticular protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. *Gene* 512, 337-347.
- Alves-dos-Santos, I.; Melo, G. A. R.; Rozen Jr., J. G. (2002). Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates* 3377, 45 pp.
- Ampasala, D. R.; Zheng, S.; Zhang, D.; Ladd, T.; Doucet, D.; Krell, P. J.; Retnakaran, A.; Feng, Q. (2011). An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning, characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 76, 83-96.
- Analytical Methods Committee. (1995). Internal quality control of analytical data. *Analyst* 120, 29-34.
- Andersen, S. O. (1998). Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 421-434.
- Andersen, S.O. (2000). Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 569-577.
- Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 166-178.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
- Arakane, Y.; Hogenkamp, D. G.; Zhu, Y. C.; Kramer, K. J.; Specht, C. A.; Beeman, R. W.; Kanost, M. R.; Muthukrishnan, S. (2004). Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 291-304.
- Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W.; Kanost, M. R.; Kramer, K. J. (2005a). *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Science* 102, 11337-11342.
- Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K. J.; Specht, C. A.; Tomoyasu, Y.; Lorezen, M. D.; Kanost, M. R.; Beeman, R. W. (2005b). The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology* 14, 53-463.

- Arakane, Y.; Lomakin, J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S.; Gehrke, S. H.; Kanost, M. R.; Kramer, K. J. (2009a). Molecular and functional analyses of amino acids decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16584-16594.
- Arakane, Y.; Dixit, R.; Begum, K.; Park, Y.; Specht, C. A.; Merzendorfer, H.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W. (2009b). Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 355-365.
- Arakane, Y.; Lomakin, J.; Gehrke, S.H.; Hiromasa, Y.; Tomich, J.M.; Muthukrishnam, S.; Beeman, R.W.; Kramer, K.J.; Kanost, M.R. (2012). Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins. *PLOS Genetics* 8, e100682.
- Bai, H.; Palli, S. R. (2010). Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology* 344, 248-258.
- Bardou, P.; Mariette, J.; Escudié, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, DOI: 10.1186/1471-2105-15-293 .
- Beck, Y.; Dauer, C.; Richards, G. (2005). Dynamic localisation of KR-H during an ecdysone response in *Drosophila*. *Gene Expression Patterns* 5, 403-409.
- Bellet, M. M.; Sassoni-Corsi, P. (2010). Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *Journal of Cell Science* 123, 3837-3848.
- Bitondi, M. M. G.; Mora, I. M.; Simões, Z. L. P.; Figueiredo, V. L. C. (1998). The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *Journal of Insect Physiology* 44, 499-507.
- Blomquist, G. J.; Chu, A. J.; Remaley, S. (1980). Biosynthesis of wax in the honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry* 10, 313-321.
- Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In G. J. Blomquist e A. G. Bagnères (Ed.), *Insect Hydrocarbons* (pp. 19-34). Cambridge University Press, New York.
- Boleli, I. C.; Simões, Z. L. P.; Bitondi, M. M. G. (1999). Cell death in ovarioles causes permanente sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *Journal of Morphology* 242, 271-282.
- Bonneton, F.; Laudet, V. (2012). Evolution of nuclear receptors in insects. In: *Insect endocrinology*. Gilbert, L. I. (Ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, 219-252.
- Boyd, L.; O'Toole, E.; Thummel, C. S. (1991). Patterns of E74A RNA and protein expression at the onset of metamorphosis in *Drosophila*. *Development* 112, 981-995.
- Bruey-Sedano, N.; Alabouvette, J.; Lestrade, M.; Hong, L.; Girard, A.; Gervasio, E.; Quennedey, B.; Charles, J. P. (2005). The *Drosophila ACP65A* cuticle gene: deletion scanning analysis of cis-regulatory sequences and regulation by DHR38. *Genesis* 43, 17-27.

Burtis, K. C.; Thummel, C. S.; Jones, C. W.; Karim, F. D.; Hogness, D. S. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two *ets*-related proteins. *Cell* 61, 85-99.

Camilo, E. (2005). Nesting biology of four *Tetrapedia* species in trap-nests (Hymenoptera: Apidae: Tetrapediini). *Revista de Biología Tropical* 53, 175-186.

Canhos, L. L. (2010). Caracterização de mudanças subcelulares e da expressão dos genes codificadores das enzimas tirosina hidroxilase e dopadescarboxilase no tegumento em diferenciação da abelha *Apis mellifera*. (p. 60). Monografia-Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Carroll, S. B.; Laughon, A.; Thalley, B. S. (1988). Expression, function, and regulation of the hairy segmentation protein in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development* 2, 883-890.

Châline, N.; Sandoz, J. C.; Martin, S. J.; Ratnieks, F. L. W.; Jones, G. R. (2005). Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honey bees (*Apis mellifera*). *Chemical Senses* 30, 327-335.

Charles, J. P. (2010). The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 205-213.

Chaudhari, S. S.; Arakane, Y.; Specht, C. A.; Moussian, B.; Boyle, D. L.; Park, Y.; Kramer, K. J.; Beerman, R. W.; Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Science* 108, 17028-17033.

Chaudhari, S. S.; Arakane, Y.; Specht, C. A.; Moussian, B.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W. (2013). Retroactive maintains cuticle integrity by promoting trafficking of Knickkopf into the procuticle of *Tribolium castaneum*. *PLoS Genetics* 9, e1003268.

Chaudhari, S. S.; Moussian, B.; Specht, C. A.; Arakane, Y.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S. (2014). Functional specialization among members of Knickkopf family of proteins in insect cuticle organization. *PLoS Genetics* 10, e1004537.

Chen, L.; O'Keefe, S. L.; Hodgetts, R. B. (2002). Control of Dopa decarboxylase gene expression by the Broad-complex during metamorphosis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 119, 145-156.

Cornman, R. S.; Willis, J. H. (2009). Annotation and analysis of low-complexity protein families of *Anopheles gambiae* that are associated with cuticle. *Insect Molecular Biology* 18, 607-622.

Costa, C. P. (2012). Bursicon e seu papel no contexto da metamorfose em *Apis mellifera*. (p. 128). Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Dai, F.; Qiao, L.; Tong, X.; Cao, C.; Chen, P.; Chen, J.; Lu, C.; Xiang, Z. (2010). Mutations of an arylalkylamine-*N*-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 19553-19560.

- Danforth, B. N.; Cardinal, S.; Praz, C.; Almeida, E. A. B.; Michez, D. (2013). The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Reviews Entomology* 58, 57-78.
- Dani, F. R.; Jones, G. R.; Destri, S.; Spencer, S. H.; Turillazzi, S. (2001). Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Animal Behaviour* 62, 165-171.
- Dani, F. R.; Jones, G. R.; Corsi, S.; Beard, R.; Pradella, D.; Turillazzi, S. (2005). Nestmate recognition cues in the honey bee: differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chemical Senses* 30, 477-489.
- Davis, M. M.; O'Keefe, S. L.; Primrose, D. A.; Hodgetts, R. B. (2007). A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development* 134, 4395- 4404.
- Drumond, P. M.; Zucchi, R.; Mateus, S.; Bego, L. R.; Yamane, S.; Sakagami, S. F. (1996). Oviposition behavior of the stingless bees. XVII. *Plebeia (Plebeia) droryana* and an ethological comparison with other meliponine taxa (Hymenoptera, Apidae). *Japanese Journal of Entomology* 64, 384-400.
- Elekonich, M. M.; Schulz, D. J.; Bloch, G.; Robinson, G. E. (2001). Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation. *Journal of Insect Physiology* 47, 1119-1125.
- Elias-Neto, M.; Soares, M. P. M.; Bitondi, M. M. G. (2009). Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie* 40, 29-39.
- Elias-Neto, M.; Soares, M. P. M.; Simões, Z. L. P.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G. (2010). Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 241-251.
- Elias-Neto, M.; Nascimento, A. L. O.; Bonetti, A. M.; Nascimento, F. S.; Mateus, S.; Garófalo, C. A.; Bitondi, M. M. G. (2013). Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie* 45, 397-408.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8, 175-185.
- Ewing, B.; Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Research* 8, 186-194.
- Falcón, T.; Ferreira-Caliman, M. J.; Nunes, F. M. F.; Tanaka, E. D.; Nascimento, F. S.; Bitondi, M. M. G. (2014). Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50, 68-81.
- Faustino, C. D.; Silva-Matos, E. V.; Mateus, S.; Zucchi, R. (2002). First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Insectes Sociaux* 49, 111-113.

- Ferreira-Caliman, M. J.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2010). The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology* 56, 800-804.
- Fletcher, J. C.; Burtis, K. C.; Hogness, D. S.; Thummel, C. S. (1995). The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* 121, 1455-1465.
- Free, J. B. (1987). Pheromones of social bees (p. 218). Ithaca: Comstock.
- Gagou, M. E.; Kapsetaki, M.; Turberg, A.; Kafetzopoulos, D. (2002). Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 141-146.
- Gibbons, F. D.; Roth, F. P. (2002). Judging the quality of gene expression-based clustering methods using gene annotation. *Genome Research* 12, 1574-1581.
- Gibbs, A.; Pomonis, J. G. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B, 243-249.
- Gibbs, A. G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* 38, 471-482.
- Gibbs, A. G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology* 48, 391-400.
- Gleason, J.M.; James, R.A.; Wicker-Thomas, C.; Ritchie, M.G. (2009). Identification of quantitative trait loci function through analysis of multiple cuticular hydrocarbons differing between *Drosophila simulans* and *Drosophila schellia* females. *Heredity* 103, 416-424.
- Gorman, M. J.; Arakane, Y. (2010). Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 67-273.
- Grabherr, M. G.; Haas, B. J.; Yassour, M.; Levin, J. Z.; Thompson, D. A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; Chen, Z.; Mauceli, E.; Hacohen, N.; Gnirke, A.; Rhind, N.; di Palma, F.; Birren, B. W.; Nusbaum, C.; Lindblad-Toh, K.; Friedman, N.; Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 15, 644-652.
- Hashimoto, K.; Yoshizawa, A. C.; Okuda, S.; Kuma, K.; Goto, S.; Kanehisa, M. (2008). The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *Journal of Lipid Research* 49, 2008.
- Haas, B. J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P. D.; Bowden, J.; Couger, M. B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; Macmanes, M. D.; Ott, M.; Orvis, J.; Pochet, N.; Strozzi, F.; Weeks, N.; Westerman, R.; William, T.; Dewey, C. N.; Henschel, R.; Leduc, R. D.; Friedman, N.; Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494-1512.

- Hamza, I.; Dailey, H. A. (2012). One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1617-1632.
- Heffer, A.; Grubbs, N.; Mahaffey, J.; Pick, L. (2013). The evolving role of the orphan nuclear receptor ftz-fl, a pair-rule segmentation gene. *Evolution & Development* 15, 406-417.
- Hepburn, H.R. (1985). Structure of integument. In G.A. Kerkut e L.I. Gilbert (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3 (pp. 1-58). Pergamon Press, Oxford.
- Herb, B. R.; Wolschin, F.; Hansen, K. D.; Aryee, M. J.; Langmead, B.; Irizarry, R.; Amdam, G. V.; Feinberg, A. P. (2012). Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nature Neuroscience* 15, 1371-1373.
- Hiruma, K.; Riddiford, L. M.; Hopkins, T. L.; Morgan, T. D. (1985). Roles of dopa decarboxylase and phenoloxidase in the melanization of the tobacco hornworm and their control by 20-hydroxyecdysone. *Journal of Comparative Physiology B* 155, 659-669.
- Hodgetts, R. B.; Konopka, R. J. (1973). Tyrosine and catecholamine metabolism in wild-type *Drosophila melanogaster* and a mutant, *ebony*. *Journal of Insect Physiology* 19, 1211-1220.
- Hornett, E. A.; Wheat, C. W. (2012). Quantitative RNA-Seq analysis in non-model species: assessing transcriptome assemblies as a scaffold and the utility of evolutionary divergent genomic reference species. *BioMed Central Genomics* 13:361.
- Howard, R. W.; Blomquist, G. J., (2005). Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50, 371-393.
- Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols* 4, 44-57.
- Huang, D. W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R. A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37, 1-13.
- Ikeno, T.; Katagiri, C.; Numata, H.; Goto, S. G. (2011). Causal involvement of *mammalian-type cryptochrome* in the circadian cuticle deposition rhythm in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Insect Molecular Biology* 20, 409-415.
- Imperatriz-Fonseca, V. L.; Kleinert, A. M. P. (1996). Worker reproduction in a stingless bee, *Plebeia (friesella) schrottkyi* (Apidae, Meliponinae). *Anais do II Encontro Sobre Abelhas*, pp. 159.
- Ioannidou, Z. S.; Theodoropoulou, M. C.; Papandreou, N. C.; Willis, J. H.; Hamodrakas, S. J. (2014). CutProtFam-Pred: detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile Hidden Markov Models. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 52, 51-59.
- Ito, C.; Goto, S. G.; Shiga, S.; Tomioka, K.; Numata, H. (2008). Peripheral circadian clock for the cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science* 105, 8446-8451.

- Jacobs, M. E.; Brubaker, K. K. (1963). Beta-alanine utilization of *ebony* and non-*ebony Drosophila melanogaster*. *Science* 139, 1282-1283.
- Jacobos, M. E. (1978). β -Alanin tanning of *Drosophila* cuticles and chitin. *Insect Biochemistry* 8, 37-41.
- Jasrapuria, S.; Specht, C. A.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S. (2012). Gene families of cuticular proteins analogous to peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* have diverse functions. *PLoS One* 7, e49844.
- Jeong, S.; Rokas, A.; Carroll, S. B. (2006). Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell* 125, 1387-1399.
- Jesus, B. M. V.; Garófalo, C. A. (2000). Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie* 31, 503-515.
- Kapheim, K. M.; *et al.* (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science*, DOI: 10.1126/science.aaa4788 .
- Karim, F. D.; Thummel, C. S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of *E74A* and *E74B* transcription in *Drosophila*. *Genes & Development* 5, 1067-1079.
- Kather, R.; Drijfhout, F. P.; Martin, S. J. (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* 37, 205-212.
- Kawasaki, H.; Hirose, S.; Ueda, H. (2002). β FTZ-F1 dependent and independent activation of *Edg78E*, a pupal cuticle gene, during the early metamorphic period in *Drosophila melanogaster*. *Development, Growth and Differentiation* 44, 419-425.
- Kayukawa, T.; Murata, M.; Kobayashi, I.; Muramatsu, D.; Okada, C.; Uchino, K.; Sezutsu, H.; Kiuchi, M.; Tamura, T.; Hiruma, K.; Ishikawa, Y.; Shinoda, T. (2014). Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental Biology* 388, 48-56.
- King-Jones, K.; Charles, J. P.; Lam, G.; Thummel, C. S. (2005). The ecdysone-induced *DHR4* orphan nuclear receptor coordinates growth and maturation in *Drosophila*. *Cell* 121, 773-784.
- Klass, K. D. (2008). The female abdomen of ovipositor-bearing Odonata (Insecta: Pterygota). *Arthropod Systematics & Phylogeny* 66, 45-142.
- Klowden, M. (2007). *Physiological Systems in Insects*. Academic Press.
- Ko, C. H.; Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15, R271-277.
- Koedam, D.; Velthausz, P. H.; Krift, T. V. D.; Dohmen, M. R.; Sommeijer, M. J. (1996). Morphology of reproductive and trophic eggs and their controlled release by workers in *Trigona (Tetragonisca) angustula* Illiger (Apidae, Meliponinae). *Physiological Entomology* 21, 289-296.

- Koelle, M. R.; Talbot, W. S.; Segraves, W. A.; Bender, M. T.; Cherbas, P.; Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77.
- Kolattukudy, P. E. (1968). Biosynthesis of surface lipids. *Science* 159, 498-505.
- Kozlova, T.; Pokholkova, G. V.; Tzertzinis, G.; Sutherland, J. D.; Zhimulev, I. F.; Kafatos, F. C. (1998). *Drosophila* Hormone Receptor 38 functions in metamorphosis: a role in adult cuticle formation. *Genetics* 149, 1465-1475.
- Kozlova, T.; Lam, G. T.; Thummel, C. S. (2009). *Drosophila* DHR38 nuclear receptor is required for adult cuticle integrity at eclosion. *Developmental Dynamics* 238, 701-707.
- Kramer, J. K.; Dziadik-Turner, C.; Koga, D. (1985). Chitin metabolism in insects. In G. A. Kerkut e L. I. Gilbert (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3 (pp 75-115). Pergamon Press, Oxford.
- Kramer, K. J.; Koga, D. (1986). Insect chitin: physical state, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochemistry* 16, 851-877.
- Kramer, J. K.; Muthukrishnan, S. (2005). Chitin metabolism in insects. In L. I. Gilbert (Ed.). *Insect development: morphogenesis, molting and metamorphosis*, (pp497-530). Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Kucharski, R.; Maleszka, J.; Maleszka, R. (2007). Novel cuticular proteins revealed by the honey bee genome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 128-134.
- Lam G. T.; Jiang, C.; Thummel, C. S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.
- Lam, G.; Hall, B. L.; Bender, M.; Thummel, C. S. (1999). *DHR3* is required for the prepupal–pupal transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 212, 204-216.
- Lanças, F. M. Cromatografia em Fase Gasosa. São Carlos, Acta, 1993. p.254.
- Lavorgna, G.; Ueda, H.; Clos, J.; Wu, C. (1991). FTZ-FI, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu*. *Science* 252, 848-851.
- Lavorgna, G.; Karim, F. D.; Thummel, C. S.; Wu, C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 3004-3008.
- Liu, J.; Lemonds, T. R.; Popadić, A. (2014). The genetic control of aposematic black pigmentation in hemimetabolous insects: insights from *Oncopeltus fasciatus*. *Evolution & Development* 16, 270-277.
- Lloyd, V.; Ramaswami, M.; Krämer, H. (1998). Not just pretty eyes: *Drosophila* eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends in Cell Biology* 8, 257-259.

- Locke, M. (1961). Pore canals and related structures in insect cuticle. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 10, 589-618.
- Locke, M.; Krishnan, N. (1971). The distribution of phenoloxidases and polyphenols during cuticle formation. *Tissue & Cell* 3, 103-126.
- Locke, M.; Huie, P. (1979). Apolysis and turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue & Cell* 11, 277-291.
- Locke, M. (2001). The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *Journal of Insect Physiology* 47, 495-507.
- Lockey, K. H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 89, 595-645.
- Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.
- Luo, C. W.; Dewey, E. M.; Sudo, S.; Ewer, J.; Hsu, S. Y.; Honegger, H. W.; Hsueh, A. J. W. (2005). Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cysteine knot protein that activates G protein- coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Science* 102, 2820-2825.
- Luschnig, S.; Bätz, T.; Armbruster, K.; Krasnow, M. A. (2006). *serpentine* and *vermiform* encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Current Biology* 16, 186-194.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10-12.
- Martins, J. R.; Bitondi, M. M. G. (2016). The HEX 110 hexamerin is a cytoplasmic and nucleolar protein in the ovaries of *Apis mellifera*. *PLoS One* 11, e0151035.
- Mena, I. R.; Fernández-Moreno, M. A.; Bornstein, B.; Kaguni, L. S.; Garesse, R. (1999). Structure and regulated expression of the δ -aminolevulinate synthase gene from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 37321-37328.
- Merzendorfer, H.; Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology* 206, 4393-4412.
- Micas, A. F. D.; Ferreira, G. A.; Laure, H. J.; Rosa, J. C.; Bitondi, M. M. G. (2016). Proteins of the integumentary system of the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, DOI: 10.1002/arch.21336.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees*. Harvard University Press, Massachusetts.
- Michener, C. D. (2007). *The bees of the world*. 2 Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

- Minakuchi, C.; Zhou, X.; Riddiford, L. M. (2008). *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* 125, 91-105.
- Miyazaki, S.; Okada, Y.; Miyakawa, H.; Tokuda, G.; Cornette, R.; Koshikawa, S.; Maekawa, K.; Miura, T. (2014). Sexually dimorphic body color is regulated by sex-specific expression of *Yellow* gene in ponerine ant, *Diacamma* sp. *PLoS One* 9, e92875.
- Morin, R. D.; Bainbridge, M.; Fejes, A.; Hirst, M.; Krzywinski, M.; Pugh, T. J.; McDonald, H.; Varhol, R.; Jones, S. J. M.; Marra, M. A. (2008). Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massive parallel short-read sequencing. *BioTechniques* 45, 81-94.
- Moss, E. G. (2007). Heterochronic genes and the nature of developmental time. *Current Biology* 17, R435-R434.
- Moure, J. S. (1960). Notes of the types of the Neotropical bees described by Fabricius (Hymenoptera: Apoidea). *Studia Entomologica* 3, 97-160.
- Moussian, B.; Schwarz, H.; Bartoszewski, S.; Nüsslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology* 264, 117-130.
- Moussian, B.; Tång, E.; Tonning, A.; Helms, S.; Schwarz, H.; Nüsslein-Volhard, C.; Uv, A. E. (2006). *Drosophila* Knickkopf and Retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle differentiation through their specific requirement for chitin filament organization. *Development* 133, 163-171.
- Mun, S.; Noh, M. Y.; Dittmer, N. T.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K. J.; Kanost, M. R.; Arakane, Y. (2015). Cuticular protein with a low complexity sequence becomes cross-linked during insect cuticle sclerotization and is required for the adult molt. *Scientific Reports* 5, 10484.
- Murata, T.; Kageyama, Y.; Hirose, S.; Ueda, H. (1996). Regulation of the *EDG84A* gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 16, 6509-6515.
- Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H.; Arakane, Y.; Kramer, K. J. (2012). Chitin metabolism in insects. In: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I. (Ed). Elsevier Academic Press, San Diego, 193-235.
- Neville, A. C. (1965). Circadian organization of chitin in some insect skeletons. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 106, 315-325.
- Noh, M.Y.; Kramer, K.J.; Muthukrishnam, S.; Kanost, M.R.; Beeman, R.W.; Arakane, A. (2014). Two major cuticular proteins are required for assembly of horizontal laminae and vertical pore canals in rigid cuticle of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 53, 22-29.
- Noh, M.Y.; Muthukrishnam, S.; Kramer, K.J.; Arakane, Y. (2015). *Tribolium castaneum* RR-1 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle. *PLOS Genetics* 11, e1004963.

- Noh, M. Y.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K. J.; Arakane, Y. (2016). Cuticle formation and pigmentation in beetles. *Current Opinion in Insect Science* 17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.004>.
- Nunes, T.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2008). Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Animal Behaviour* 75, 1165-1171.
- Osanai-Futahashi, M.; Tatematsu, K. I.; Futahashi, R.; Narukawa, J.; Takasu, Y.; Kayukawa, T.; Shinoda, T.; Ishige, T.; Yajima, S.; Tamura, T.; Yamamoto, K.; Sezutsu, H. (2016). Positional cloning of a *Bombyx* pink-eyed whit egg locus reveals the major role of cardinal in ommochrome synthesis. *Heredity* 116, 135-145.
- Paulmier, I.; Bagnères, A. G.; Afonso, C. M. M.; Dusticier, G.; Rivière, G.; Clément, J. L. (1999). Alkenes as sexual pheromone in the alfalfa leaf-cutter bee *Megachile rotundata*. *Journal of Chemical Ecology* 25, 471-490.
- Parthasarathy, R.; Tan, A.; Palli, S. R. (2008). bHLH-PAS family transcription factor methoprene-tolerant plays a key role in JH action in preventing the premature development of adult structures during larval-pupal metamorphosis. *Mechanisms of Development* 125, 601-616.
- Pereboom, J. J. M.; Jordan, W. C.; Sumner, S.; Hammond, R. L.; Bourke, A. F. G. (2005). Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumble- bees. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 1145-1152.
- Pesch, Y. Y.; Riedel, D.; Patil, K. R.; Loch, G.; Behr, M. (2016). Chitinases and imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. *Nature Scientific Reports* 6, article number:18340.
- Piek, T. (1964). Synthesis of wax in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 10, 563-572.
- Pinto, L. Z.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P. (2002). Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of Insect Physiology* 48, 783-790.
- Qiao, L.; Xiong, G.; Wang, R.; He, S.; Chen, J.; Tong, X.; Hu, H.; Li, C.; Gai, T.; Xin, Y.; Liu, X.; Chen, B.; Xiang, Z.; Lu, C.; Dai, F. (2014). Mutation of a cuticular protein, *BmorCPR2*, alters larval body shape and adaptability in silkworm, *Bombyx mori*. *Genetics* 196, 1103-1115.
- Ramsay, J. A. (1935). The evaporation of water from the cockroach. *Journal of Experimental Biology* 12, 373-383.
- Rasmussen, E. M. K.; Amdam, G. V. (2015). Cytosine modifications in the honey bee (*Apis mellifera*) worker genome. *Frontiers in Genetics* 8, Article 8.
- Ratnieks, F. L. W.; Visscher, P. K. (1989). Worker policing in the honeybee. *Nature* 342, 796-797.
- Ratnieks, F. L. W. (1993). Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32, 191-198.

- Ratnieks, F. L. W.; Helanterä, H. (2009). The evolution of extreme altruism and inequality in insect societies. *Physiological Transactions of The Royal Society B* 364, 3169-3179.
- Rebers, J. E.; Riddiford, L. M. (1988). Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *Journal of Molecular Biology* 203, 411-423.
- Reimand, J.; Kull, M.; Peterson, H.; Hansen, J.; Vilo, J. (2007). g:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Research* 35, W193-W200.
- Reimand, J.; Arak, T.; Vilo, J. (2011). g:Profiler - a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Research* 39, W307-W315.
- Riddiford, L. M. (1976). Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. *Nature* 259, 115-117.
- Riddiford, L. M. (1985). Hormone action at the cellular level. In: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I., (Ed.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (pp. 2-84), Vol. 8. Pergamon, Oxford.
- Robinson, M. D.; Smyth, G. K. (2008). Small sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9, 321–332.
- Roig-Alsina, A.; Michener, C. D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin* 55, 124-162.
- Ruaud, A. F.; Lam, G.; Thummel, C. S. (2010). The *Drosophila* nuclear receptors DHR3 and β FTZ-F1 control overlapping developmental responses in late embryos. *Development* 137, 123-131.
- Santos, A. E.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P. (2001). Hormone-dependent protein patterns in integument and cuticular pigmentation in *Apis mellifera* during pharate adult development. *Journal of Insect Physiology* 47, 1275-1282.
- Schibler, U.; Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell* 111, 919-922.
- Schmieder, R.; Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11, 287–293.
- Shamim, G.; Ranjan, S. K.; Pandey, D. M.; Ramani, R. (2014). Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology* 111, 149-164.
- Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13, 2498-2504.

- Smith, K. K. (2003). Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. *International Journal of Developmental Biology* 47, 613-621.
- Smith, W.; Rybczynski, R. (2012). Prothoracicotropic hormone. In L. I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology* (pp. 253-309). Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo.
- Smykal, V.; Daimon, T.; Kayukawa, T.; Takaki, K.; Shinoda, T.; Jindra, M. (2014). Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Developmental Biology* 390, 221-230.
- Soares, M. P. M.; Elias-Neto, M.; Simões, Z. L. P.; Bitondi, M. M. G. (2007). A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1272-1282.
- Soares, M. P. M.; Silva-Torres, F. A.; Elias-Neto, M.; Nunes, F. M. F.; Simões, Z. L. P.; Bitondi, M. M. G. (2011). Ecdysteroid-dependent expression of the *Tweedle* and *Peroxidase* genes during adult cuticle formation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Plos One* 6, e20513.
- Soares, M. P. M. (2012). Genes cuticulares diferencialmente expressos durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera* (p. 158). Tese - Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Soares, M. P. M.; Barchuk, A. R.; Simões, A. C. Q.; Cristino, A. S.; Freitas, F. C. P.; Canhos, L. L.; Bitondi, M. M. G. (2013). Genes involved in thoracic exoskeleton formation during the pupal-to-adult molt in a social insect model, *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 14, 576.
- Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. (2005). Química Orgânica, (Vol. 1). 8a ed. LTC, Rio de Janeiro.
- Song, Q. (2012). Bursicon, a neuropeptide hormone that controls cuticle tanning and wing expansion. In L. I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology* (pp. 93-105). Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo.
- Sonnhammer, E. L. L.; Östlund, G. (2014). InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Research* 43, D234-D239.
- Sperling, P.; Ternes, P.; Zank, T. K.; Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68, 73-95.
- Stern, C. D.; Vasilias, D. (1998). Clocked gene expression in somite formation. *BioEssays* 20, 528-531.
- Stilwell, G. E.; Nelson, C. A.; Weller, J.; Cui, H.; Hiruma, K.; Truman, J. W.; Riddiford, L.M. (2003). E74 exhibits stage-specific hormonal regulation in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 258, 6-90.

- Stubenhaus, B. M.; Dustin, J. P.; Neverett, E. R.; Beaudry, M. S.; Nadeau, L. E.; Burk-McCoy, E.; He, X.; Pearson, B. J.; Pellettieri, J. (2016). Light-induced depigmentation in planarians models the pathophysiology of acute porphyrias. *eLife* 5, e14175.
- Sugumaran, M. (2009). Complexities of cuticular pigmentation in insects. *Pigment Cell & Melanoma Research* 22, 523-525.
- Sun, R.; Zhang, Y.; Xu, B. (2013). Characterization of the response to ecdysteroid of a novel cuticle protein R&R gene in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 166, 73-80.
- Suzuki, R.; Shimodaira, H. (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540-1542.
- Tanaka, E. D.; Hartfelder, K. (2004). The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure & Development* 33, 431-442.
- Tellam, R. L.; Vuocolo, T.; Johnson, S. E.; Jarmey, J.; Pearson, R. D. (2000). Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *European Journal of Biochemistry* 267, 6025-6042.
- Terada, Y. (1974). Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae) (p. 94). Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Thummel, C. S.; Burtis, K. C.; Hogness, D. S. (1991). Spatial and temporal patterns of *E74* transcription during *Drosophila* development. *Cell* 61, 101-111.
- Tiku, P. E.; Gracey, A. Y.; Macartney, A. I.; Beynon, R. J.; Cossins, A. R. (1996). Cold-induced expression of $\Delta 9$ -Desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815-818.
- Togawa, T.; Dunn, W. A.; Emmons, A. C.; Willis, J. (2007). CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 675-688.
- Togawa, T.; Dunn, W. A.; Emmons, A. C.; Nagao, J.; Willis, J. H. (2008). Developmental expression patterns of cuticular protein genes with the R&R Consensus from *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 508-519.
- Toledo, V. A. A.; Nogueira-Couto, H. (1999). Thermoregulation in colonies of Africanized and hybrids with caucasian, italian and carniolan *Apis mellifera* honey bees. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42, DOI: 10.1590/S1516- 89131999000400007.
- Torres, A.; Hoffmann, W.; Lamprecht, I. (2009). Thermal investigations of a nest of the stingless bee *Trigona (Frieseomelitta) nigra paupera* proovancher in Colombia. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 95, 737-741.
- Trapnell, C.; Pachter, L.; Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111.

- Trapnell, C.; Williams, B. A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M. J.; Salzberg, S. L.; Wold, B. J.; Pachter, L. (2010). Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology* 28, 511-515.
- Trapnell, C.; Roberts, A.; Goff, L.; Pertea, G.; Kim, D.; Kelley, D. R.; Pimentel, H.; Salzberg, S. L.; Rinn, J. L.; Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* 7, 562-578.
- True, J. R.; Edwards, K. A.; Yamamoto, D.; Carroll, S. B. (1999). *Drosophila* wing melanin patterns form by vein-dependent elaboration of enzymatic prepatterns. *Current Biology* 9, 1382-1391.
- True, J. R.; Yeh, S. D.; Hovemann, B. T.; Kemme, T.; Meinertzhagen, I. A.; Edwards, T. N.; Liou, S. R.; Han, Q.; Li, J. (2005). *Drosophila tan* encodes a novel hydrolase required in pigmentation and vision. *PLoS Genetics* 1, e63.
- Tucker, K. W. (1958). Automimic parthenogenesis in the honey bee. *Genetics* 43, 299-316.
- Ureña, E.; Manjón, C.; Franch-Marro, X.; Martín, D. (2014). Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 7024-7029.
- van Benthem, F. D. J.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Velthuis, H. H. W. (1995). Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. *Insectes Sociaux* 42, 71-87.
- van Wilgenburg, E.; Felden, A.; Choe, D. H.; Sulc, R.; Luo, J.; Shea, K. J.; Elgar, M. A.; Tsutsui, N. D. (2012). Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. *Animal Behaviour* 8, 17-20.
- van Zweden, J. S.; d'Ettorre, P. (2010). Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In G. J. Blomquist e A. Bagnères (Ed.). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology* (pp. 222-243). Cambridge University Press, Cambridge.
- Vannini, L.; Reed, T. W.; Willis, J. H. (2014). Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasites & Vectors* 7:24, DOI: doi:10.1186/1756-3305-7-24 .
- Wagner, D.; Brown, M. J. F.; Broun, P.; Cuevas, W.; Moses, L. E.; Chao, D. L.; Gordon, D. M. (1998). Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of the harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Chemical Ecology* 24, 2021-2037.
- Wagner, D.; Tissot, M.; Gordon, D. (2001). Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology* 27, 1805-1819.
- Walter, M. F.; Black, B. C.; Afshar, G.; Kermabon, A. Y.; Wright, T. R. F.; Biessmann, H. (1991). Temporal and spatial expression of the *Yellow* gene in correlation with cuticle formation and DOPA Decarboxylase activity in *Drosophila* development. *Developmental Biology* 147, 32-45.

- Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews* 10, 57-63.
- Wang, L.; Wang, S.; Li, W. (2012). RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28, 2184-2185.
- Warnes, G. R.; Bolker, B.; Bonebakker, L.; Gentleman, R.; Liaw, W. H. A.; Lumley, T.; Maechler, M.; Magnusson, A.; Moeller, S.; Schwartz, M.; Venables, B. (2015). gplots: various R programming tools for plotting data. R package version 2.16.0. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=gplots>>.
- Weaver, N. (1955). Rearing of honey bee larvae on royal jelly in the laboratory. *Science* 121, 509-510.
- Wheeler, D. E. (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *The American Naturalist* 128, 13-34.
- White, K. P.; Hurban, P.; Watanabe, T.; Hogness, D. S. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* 276, 114-117.
- Willis, J. H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature and sequence characteristics in the genomic era. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 189-204.
- Wilson, E. O. (1975). Sociobiology. *The New Synthesis*. Harvard University Press, Cambridge.
- Winston, M. L. (2003). *A biologia da abelha*. Trad. Carlos A. Osowski. Magister, Porto Alegre.
- Wittkopp, P. J.; True, J. R.; Carroll, S. B. (2002). Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* 129, 1849-1858.
- Woodard, S. H.; Fischman, B. J.; Venkat, A.; Hudson, M. E.; Varala, K.; Cameron, S. A.; Clark, A. G.; Robinson, G. E. (2011). Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. *Proceedings of the National Academy of Science* 108, 7472-7477.
- Wright, T. R. F. (1992). Phenotypic analysis of the *Dopa decarboxylase* gene cluster mutants in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity* 87, 175-190.
- Xi, Y.; Pan, P. L.; Ye, Y. X.; Yu, B.; Zhang, C. X. (2014). Chitin deacetylase family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology* 23, 695-705.
- Yamada, M.; Murata, T.; Hirose, S.; Lavorgna, G.; Suzuki, E.; Ueda, H. (2000). Temporally restricted expression of transcription factor β FTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 127, 5083-5092.
- Yao, T. S.; Segreaves, W. A.; Oro, A. E.; McKeown, M.; Evans, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63-72.

Yao, Q.; Zhang, D.; Tang, B.; Chen, J.; Chen, J.; Lu, L.; Zhang, W. (2010). Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PloS ONE* 5, e14058.

Zander, R.H. (2004). Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. *PhyloInformatics* 2, 1-13.

Zhou, B.; Hiruma, K.; Jindra, M.; Shinoda, T.; Segraves, W. A.; Malone, F.; Riddiford, L. M. (1998a). Regulation of the transcription factor E75 by 20- hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Developmental Biology* 193, 127-138.

Zhou, B.; Hiruma, K.; Shinoda, T.; Riddiford, L. M. (1998b). Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of Broad Complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 203, 233-244.

Zhou, B.; Riddiford, L. M. (2001). Hormonal regulation and patterning of the broad- complex in the epidermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 231, 125-137.

Zhou, X.; Riddiford, L. M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the ‘status quo’ action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 129, 2259-2269.

Zhu, Q.; Arakane, Y.; Beeman, R. W.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S. (2008). Functional specialization among insect chitinase Family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Science* 105, 6650-6655.

Zitnam, D.; Adams, M. E. (2012). Neuroendocrine regulation of ecdysis. Gilbert, L. I. (Ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, 253-309.

Zufelato, M. S.; Lourenço, A. P.; Simões, Z. L. P.; Jorge, J. A.; Bitondi, M. M. G. (2004). Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honeybee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1257-1268.

MANUSCRITO

Figuras, Figuras suplementares, tabelas suplementares e arquivos suplementares no CD em anexo.

Adult cuticle maturation in bees: a heterochronic process related to the way of life?

2

3

4 Tiago Falcon^{1*}, Daniel G. Pinheiro², Maria Juliana Ferreira-Caliman³, Izabel C. C. Turatti⁴, Fabiano
5 C. Pinto de Abreu¹, Juliana S. Galaschi-Teixeira³, Juliana R. Martins¹, Moysés Elias-Neto³, Michelle
6 P. M. Soares¹, Marcela B. Laure¹, Vera L. C. Figueiredo³, Norberto Peporine Lopes⁴, Zilá L. P.
7 Simões³, Carlos A. Garófalo³, Márcia M. G. Biondi^{3*}

8

9 ¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
10 Ribeirão Preto, Brazil;

11 ²Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade
12 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brazil;

13 ³Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
14 Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil;

15 ⁴Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
16 Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

17

18 *Corresponding authors:

19 E- mail: tiagofalcon@usp.br (TF); mmgbit@usp.br (MMGB)

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35 **Abstract**

36 Differences in the timing of exoskeleton pigmentation and sclerotization are evident when
 37 comparing the external morphology of social and solitary bee species. To these differences in adult
 38 cuticle maturation, we named cuticular maturation heterochrony. Social bees remain inside the
 39 colony for many days before starting outside nest activities while the solitary bees start these
 40 activities immediately after ecdysis. We propose that in the social bees, protected by the colony
 41 environment, the cuticle reaches maturity later than in the solitary bees. To address this issue, we
 42 used large-scale RNA sequencing (RNA-seq), transmission electron microscopy (TEM) and gas
 43 chromatography/mass spectrometry in comparative studies of the integument (cuticle plus its
 44 underlying epidermis) of eusocial bees, *Apis mellifera* and *Frieseomelitta varia*, and a solitary bee,
 45 *Centris analis*. The expression of genes involved in the melanization/sclerotization pathway (*ebony*,
 46 *tan*), chitin metabolism (*chitin deacetylase-5*, *Idgf4-like*, *chitooligosaccharidolytic-domain-like*),
 47 and genes encoding cuticular proteins (*CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*, *CPR26*, *Apd-3*, *Apd-like*),
 48 as well as the expression of regulators of cuticle renewal (*Ethr*, *E74*, *Hr4*, *Hr38*, *FTZ-F1*, *Rickets*),
 49 differentiated the eusocial from the solitary species. We also highlighted the genes with roles in
 50 cuticular hydrocarbon (CHC) biosynthesis, such as desaturase and elongase genes, circadian rhythm
 51 genes, which are related to cuticle layers deposition, and genes encoding pigments other than
 52 melanin. In addition, we characterized the differences between the cuticle of the social and solitary
 53 bee species through CHC quantifications and TEM analysis, for which we included the cuticle of
 54 other bee species (the primitively eusocial *Bombus brasiliensis*, the facultatively social *Euglossa*
 55 *cordata*, and the solitary *Tetrapedia diversipes*). Together, our data provided new insights on the
 56 process of cuticle maturation regarding gene expression, ultrastructure, and chemical analysis.
 57 Furthermore, our data highlighted the differences that may have contributed to the heterochrony of
 58 cuticle maturation-dependent on the social or solitary way of life.

59 **Author Summary**

60 From our previous observation that bees with distinct habits of life (social and solitary) emerges
 61 with different degrees of cuticular maturation, we decided to analyzed the genetic signatures and
 62 ultrastructure of the integument, and the cuticular hydrocarbons (CHC) profiles that could be
 63 involved in this developmental change in the timing of cuticle maturation. We verified a
 64 heterochronic pattern of expression of genes involved in cuticle melanization/sclerotization, chitin
 65 metabolism, cuticle structure, circadian rhythm, and also transcription factors related to cuticle
 66 renewal, that might be grounded the differences among the eusocial and solitary bees species.
 67 Genes associated with the non-melanin pigmentation pathway seem essential for the qualitative

differences in pigmentation, but not for the cuticle maturation heterochrony. The electron micrographs showed differences in the timing of cuticle deposition even for the eusocial species and the CHC profiles supported our hypothesis.

Introduction

In addition to the intense synthesis of cuticular proteins, enzymes, lipids, sclerotizing agents and other compounds, the synthesis of melanin is crucial for the exoskeleton (cuticle) formation in insects. The first reaction in the melanin biosynthetic pathway comprises the conversion of tyrosine into dopaquinone by the action of a tyrosinase. In insects, the next step of this process is similar to the neuromelanin formation in mammals and involves the conversion of dopaquinone into dopamine by a decarboxylation reaction. Intermediate catechols in the next reactions of the melanin biosynthetic pathway are also converted into sclerotizing agents that make the cuticle hard and rigid. (for review see Solano, 2014). Thus, melanization occurs concomitantly to sclerotization in a same bifurcating pathway, and both processes are fundamental for the exoskeleton development (Locke, 2001; Andersen, 2010). The exoskeleton of insects is possibly responsible for the worldwide colonization by this animal group. This structure works as the interface between the insect and the environment. It is necessary for muscles attachment, for protection against predators, injuries, pathogens and desiccation (for review see Hopkins and Kramer, 1992), and its thickness is also positively correlated with the resistance to some types of insecticides (for an example see Wood *et al.*, 2010). The exoskeleton comprises an inner procuticle formed by endocuticle and exocuticle layers, an outer epicuticle and a superficial layer, the envelope. The procuticle consists of a variety of proteins and chitin, which is a polymer of the glucose-derived N-acetylglucosamine (Locke, 2001). The epicuticle does not contain chitin, but contains proteins and lipids and is rich in quinones, which are oxidized derivatives of aromatic compounds (Locke and Krishnan, 1971; Locke, 2001). The main components of the envelope are the cuticular hydrocarbons (CHC) (Hepburn, 1985) that play roles in chemical communication (unsaturated CHC) (Gibbs, 2002; Howard and Blomquist, 2005) and act as a barrier against insect desiccation by preventing water loss (mainly n-alkanes) (reviewed in Edney, 1967; Gibbs, 2002).

In insects in general, the maturation of the definitive, or adult, cuticle depends on the synthesis of melanin and sclerotization agents, and is triggered by the reduction in the titer of circulating ecdysteroids (Hiruma *et al.*, 1985; Zufelato *et al.*, 2000). This initiates a cascade of gene expression activation/deactivation regulated by the central nervous system. The most important neurohormone related to the regulation of adult cuticle maturation is bursicon (Luo *et al.*, 2005; Arakane *et al.*, 2008; Bai and Pali, 2010; Song, 2012). The interaction of this hormone with its

receptor (Rickets) activates the enzyme tyrosine hydroxylase and is related to the elevation of dopaquinone concentration, which is then converted into dopamine (Davis *et al.*, 2007), the precursor of melanin and sclerotization agents (for review see Shamim *et al.*, 2014). Additionally, we recently demonstrated that cuticle envelope CHC profiles, as well as the expression of genes putatively involved in CHC biosynthesis, undergo significant changes during the period of adult cuticle formation and maturation (Falcón *et al.*, 2014).

In this context, we draw our attention to the fact that insects greatly vary in the grade of cuticle melanization/sclerotization at the eclosion (adult ecdysis) time. In a previous study on the morphology of the maturing cuticle, we observed (Elias-Neto *et al.*, 2013) that the cuticle of social bees, which after eclosion spend some days performing inside nest activities, would mature later in comparison to solitary species, which have the cuticle prepared for foraging activities at the eclosion time. This shift in the timing of cuticle maturation seems a case of heterochrony, which is defined as a change in the timing of the development of a tissue or anatomical part relative to an ancestor or between taxa (West-Eberhard, 2005). If this assumption proves to be true, it can entail a link between the rate of cuticle maturation and the evolution of sociality in insects.

Among bees, we can distinguish the solitary, facultatively social, and eusocial species. The social organization is grounded on the division of labor between fertile queens and more or less sterile, or completely sterile workers, which are responsible for nest maintenance activities (eusocial species) (Michener, 1974; Wilson, 1975). The search for genomic signatures of eusociality evolution of bees has grown since the publication of the *A. mellifera* genome (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) and gained force with the recent release of two *Bombus* species genomes (Sadd *et al.*, 2015) and the work of Kapheim *et al.* (2015) comparing the genomes of ten bee species.

Here, we used the integument (cuticle and its subjacent epidermis) in an approach based on RNA sequencing (RNA-Seq), transmission electron microscopy (TEM) and CHC profiles characterization to describe the adult cuticle maturation of two eusocial bee species, *Apis mellifera* (Apini) and *Frieseomelitta varia* (Meliponini), and a solitary bee species, *Centris analis* (Centridini). TEM was also used for studying the ultrastructure of a primitively eusocial bee, *Bombus brasiliensis* (Bombini) and a facultatively social bee, *Euglossa cordata* (Euglossini). This combined approach allowed us to compare the cuticle maturation process among evolutionary related organisms with the purpose of characterizing the differences that could explain the heterochrony of cuticle maturation, and whether this process could be associated to eusociality evolution. Among the genes expressed in the integument, we focused on those involved in the melanization/sclerotization pathway, non-melanin pigmentation processes, chitin metabolism and

CHC pathway, or those genes encoding structural cuticular proteins, regulatory hormones with functions in exoskeleton development, and circadian clock genes with potential roles in determining the rhythm of cuticle layers deposition (Ito *et al.*, 2008; Ikeno *et al.*, 2011). As considered for vertebrates (reviewed in Wilson and Werneburg, 2014), heterochrony seems to be an important issue to the phylogenetic framework of eusociality and might reflect an adaptive context. Our Evo-Devo approach gave us back the discovery of distinct genetic signatures of the integument that might reflect the evolution of eusociality in bees. In the case of *A. mellifera* and *F. varia*, the differences consisted not only in the timing of cuticle maturation but also in the timing of cuticle deposition.

Results

Differentially expressed genes and contigs in the integument of the bee species

We identified the expression of 13,200 genes in the developing integument of *A. mellifera*, and 55,209 and 30,161 contigs in the developing integument of *F. varia* and *C. analis*, respectively (S1 File). The data obtained from the triplicate samples of the three developmental phases of each bee species were used in Pearson correlation analysis in order to check reproducibility of the biological triplicates. A hierarchical clustering on pairwise correlation between these samples is shown in S1 Figure. When filtering this analysis for the differentially expressed genes (DEGs), or contigs (DECs), between the developmental phases, we found 3,184 DEGs for *A. mellifera*, 5,959 DECs for *F. varia* and 2,543 DECs for *C. analis*. Among the *A. mellifera* DEGs, 473 and 567 were upregulated in Pbm in comparison to Ne and Fg, respectively; 666 and 250 were upregulated in Ne in comparison to Pbm and Fg; 784 and 330 were more expressed in Fg than Pbm and Ne. In *F. varia*, 1,257 and 2,341 DECs were upregulated in Pbm compared to Ne and Fg, respectively; 1,663 and 1,256 DECs were more expressed in Ne than in Pbm and Fg; 2,361 and 954 DECs showed higher expression in Fg than in Pbm and Ne. In *C. analis*, Pbm showed higher expression for 997 and 843 DECs than Ne and Fg, respectively; 832 and 156 DECs were upregulated in Ne in comparison to Pbm and Fg; 811 and 91 DECs were more expressed in Fg than Pbm and Ne (Fig 1 and S2 File).

Gene Ontology analysis

The Gene Ontology annotation of DEGs and DECs indicated that in the three bee species,

the functional categories related to the integument (cuticle + epidermis) formation and differentiation were more represented in the younger phases (Pbm and Ne). In the case of *C. analis*, these functional categories were mainly related to chitin metabolism and binding, and structural molecule activity. Functional categories that could be related to the epidermis (epithelium development, epithelial cell differentiation and development, and others) were also more represented in the younger bees, but only of the eusocial species.. In the older phases (Ne and Fg) of the three bee species, the significantly represented GO categories could be tentatively related to the CHC biosynthetic pathway, and for *F. varia* and *C. analis*, functional categories related to the non-melanin pigmentation pathway were also significantly represented (Fig 2; see also S2 Fig for all GO categories highlighted in the comparisons between developmental phases). These GO results highlighted the differences in terms of gene expression and functional attributes between the developmental phases and bee species.

We then used the DEGs and DECs in a distance correlation analysis in order to measure the clustering potential of the studied developmental phases for each bee species. These results are shown in S3 Fig and summarized in Fig 3. This strategy allowed us to explore the relationship, or association, between variables, in our specific case, the gene expression patterns obtained from the Pbm, Ne and Fg developmental phases. The hypothesis tested was that the integuments of the Ne and Fg phases would be more related in terms of gene expression in *C. analis* than in the eusocial species. The distance correlation analysis using DEGS grouped the Pbm and Ne phases in *A. mellifera*, the Fg phase forming a separate cluster. For *C. analis*, the Ne phase was closer to the Fg phase for both classes of genes, this being consistent with our hypothesis. However, in *F. varia*, which shows a cuticular melanization pattern very different at the adult emergency and foraging age, we also observed a statistically supported cluster formed by the Ne and Fg phases, like in *C. analis*. We then extracted from the gene list those genes pertaining to the following categories that could be related to integument development: melanization/sclerotization pathway, chitin metabolism, cuticle protein genes, CHC pathway, regulators with roles in the integument, circadian rhythm genes, and non-melanin pigmentation. For all these groups of genes, we applied the distance correlation analysis. We found that the expression of genes related to the melanization/sclerotization pathway and chitin metabolism grouped the developmental phases of the three bee species in distance correlation patterns that were similar to those observed when using DEGs and DECs. Together, these results show that distance correlation based on DEGs/DECs, and genes of the melanization/sclerotization pathway and chitin metabolism, clustered together the Ne and Fg phases of *C. analis*, as should be expected if according our hypothesis, the integument (cuticle) of the solitary species is completely formed at the emergence. Consistent with this reasoning, the Pbm and

Ne phases were clustered together in *A. mellifera*. However, against our hypothesis, the expression of these gene sets in *F. varia* was similar to *C. analis*.

The distance correlation analysis based on the expression of genes encoding the RR1 structural proteins grouped the Pbm and Ne phases of both eusocial species, thus indicating that they are more related to each other than to the Fg phase. For *C. analis*, the clustering was not so clear, with a statistically supported cluster formed by the Pbm samples plus two Ne samples, and the other Ne sample grouping with the Fg samples with a low statistical support. In contrast, the expression of the RR2 genes clustered the Ne and Fg phases of the eusocial species. The RR2 genes in *C. analis*, like the RR1 genes, also resulted in a correlation distance pattern grouping Ne samples with both Pbm and Fg samples. The expression of the non-RR encoding genes clustered the Ne and Fg phases in *A. mellifera* and *C. analis*, and the Pbm and Ne phases in *F. varia*. For the genes acting as regulators of cuticle formation and maturation, the eusocial species presented similar distance patterns, with Ne and Fg clustering together. In contrast, Pbm was closer to Ne in *C. analis*. Interestingly, although the distance patterns of the RR1, RR2 and regulatory genes have not validated our hypothesis, they showed similar clustering patterns for the eusocial species, which differed from the solitary one.

The data for the CHC pathway genes expression clustered the Ne and Fg phases in the three species analyzed. The expression of the genes encoding peripheral oscillators (circadian rhythm genes) significantly clustered Ne and Fg in *A. mellifera* and *C. analis*, and clustered Pbm and Ne in *F. varia*. The expression of genes potentially involved in non-melanin pigmentation clustered Pbm and Ne in *A. mellifera*, and Ne and Fg in *F. varia* and *C. analis*. The distance correlation based on the expression of these gene sets (CHC pathway, circadian rhythm and non-melanin pigmentation genes) does not give support to our hypothesis.

227

228

229 **Correlated expression profiles in the developing integument of the three bee species**

230

We also established the expression profiles of the classes of genes above mentioned in the search for differences that could explain the slow maturation of the cuticle in the eusocial species, and the fast maturation in *C. analis*. Heatmaps representing the expression profiles were constructed and shown in S4 Fig. Pearson's correlation was used to measure the strength of the linear association between gene expression profiles between the bee species. Significant correlations ($r \geq 0.6$ and $p \leq 0.1$) are identified in S1 Table. Fig 4 shows the gene expression profiles that were correlated between the bee species.

Therefore, the expression profiles of individual genes encoding proteins and enzymes in the melanization/sclerotization pathway, chitin metabolism, cuticular structural proteins containing the RR1 or RR2 domain, or lacking these domains, enzymes (desaturase, elongase) of the CHC pathway, regulators of cuticle development, a circadian rhythm gene and a gene in the non-melanization pathway are consistent with our hypothesis, suggesting that they have roles in the heterochrony of cuticle development associated to the bee life style. Together, these results support the idea of timing variation in gene expression in the eusocial versus the solitary bees, which could be related with differences in cuticle development and maturation.

Gene co-expression network

Gene co-expression networks were constructed for each species and we also verified interactions between the networks. Positive interactions ($r \geq 0.95$ and $p \leq 0.05$) were verified between genes in the melanization/sclerotization pathway, chitin metabolism, cuticle structure, CHC pathway, circadian rhythm genes, non-melanin pigmentation and genes with roles in the regulation of integument development (S5-S7 Figs). The intersection revealed only one interaction between *A. mellifera* and *C. analis* networks (*yellow-y/Cpap3-a*) and two for *F. varia* and *C. analis* networks (*CPR16/Eh-like*, and *tan/Elo-GB45596*). The intersection between the eusocial species networks highlighted regulatory elements (*FTZ-F1*, *E74*, *Hr4*, *Hr46*), structural cuticle proteins, the elongase *Elo-GB54302*, chitin deacetylases (*verm*, *serp*, *Cda5*) and *Lac2* encoding genes (Fig 5). This result revealed the similarities in the co-expression networks in the two eusocial species, besides highlighting that integument formation and maturation require many more gene interactions in the eusocial than in the solitary species.

Transmission electron microscopy from the abdominal integuments of social and solitary bee species

Cuticle thickness measurements demonstrated that *A. mellifera* has a thicker cuticle at the Fg phase in comparison with the Pbm and Ne phases. *F. varia* showed no variation through the developmental phases. *C. analis* showed a significant increase in cuticle thickness between the Pbm and Ne phases, and no significant difference between the Ne and Fg phases. The cuticle thickness of another solitary bee species, *Tetrapedia diversipes*, an oil-collecting bee, and of two primitively eusocial bee species, *Bombus brasiliensis* and *Euglossa cordata* were also measured and did not show significant variation in the comparison of Ne versus Fg. The developmental morphology of the cuticle of these bee species and thickness measurements are shown in Fig 6A-F. Additionally,

we checked for how long does *A. mellifera* worker's cuticle take to attain its maximal thickness, which is at least three days after emergence (Fig 6A). As the cuticle measurements in the groups of bees aging 0, 24, 48, 72 and 96 h post-emergence and in foragers (Fg) ($n = 3$ for each group) do not have a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test, $p = 0.00736$) we used the Kruskal-Wallis test associated with the *post hoc* Conover-Iman test and Bonferroni correction to compare the sample collection data. We found that at emergence (0 h) the cuticle is significantly ($p < 0.05$) less thick than at 72h and 96h and in foragers. At 24h and 48h the cuticle is still significantly less thick ($p < 0.05$) than in foragers (Fg).

These data reveals that the cuticle of the solitary species, *C. analis* and *T. diversipes*, and primitively eusocial species, *B. brasiliensis* and *E. cordata*, are complete at the time of adult emergence, since there was not significant variation in thickness, or ultrastructure, in comparison with forager bees. In contrast, *A. mellifera* is still depositing and maturing its cuticle after the Ne phase and this process takes at least three days. Surprisingly, the thickness of the cuticle of the eusocial *F. varia* species did not undergo significant variation in thickness or ultrastructure from the Pbm to the Fg phase, although a great increase in pigmentation had been easily noticed.

Cuticular hydrocarbons profiles

The CHC composition of the superficial cuticle layer, the envelope, was determined as another strategy potentially able to uncover differences between the studied species that could be associated to the cuticle maturation heterochrony. The proportion of CHCs in the chromatograms, the significance level of each peak and the contribution of these peaks for discriminating the developmental phases of the eusocial and solitary species are shown in S3 File. The Euclidean distances clustering analysis applied to the total CHC quantification data clearly discriminated the Fg phase from the earlier Pbm and Ne phases in the eusocial bees, *A. mellifera* and *F. varia*, as well as in the solitary *C. analis*. In *A. mellifera* and *C. analis*, Pbm and Ne grouped together with AU= 100% and 96%, respectively. In *F. varia* the Ne samples clustered separately (AU=95%) from the Pbm samples (AU=94% and BT=87, which is a moderate to high BP value usually associated with Bayesian posterior probabilities $\geq 95\%$; Zander, 2004) (Table 1 and S8 Fig).

When we analyzed separately the CHC classes, n-alkanes discriminated the *A. mellifera* foragers (Fg) (AU=94%; BT=84) from the Pbm and Ne developmental phases, and clustered together these two younger phases. As in *A. mellifera*, n-alkanes also discriminated the *F. varia* foragers (Fg) as a separate group (AU= 97%), and the Ne and Pbm phases were clustered together (AU=98%). However, the n-alkanes did not significantly differentiate any developmental phase of *C. analis* (Table 1 and S8 Fig).

The unsaturated CHCs data from *A. mellifera* do not give us back a strong support for distinguishing the developmental phases. However, a significant group clustering together the Ne and Pbm phases received a strong support (AU=99%), and twelve of the fifteen foragers (Fg) clustered together (AU=96%.) The unsaturated CHCs discriminated all developmental phases of *F. varia* (AU=99%) and differentiated the younger Pbm and Ne phases (AU=96%) from the Fg phase in *C. analis* (Table 1 and S8 Fig).

Branched CHCs from *A. mellifera* clearly clustered the Fg samples (AU=97%) and separated the Ne and Pbm phases in a single well-supported group (AU=100%). In *F. varia*, separation of Fg from the earlier phases was not so clear: some Fg samples integrated the Pbm and Ne group. In the solitary *C. analis*, the branched CHCs clustered six of the seven Fg bees in a single group (AU= 97%) and nine of the eleven Pbm and Ne bees in another well-supported group (AU=99%) (Table 1 and S8 Fig).

Table 1. The average proportion of CHC classes per developmental phase of *A. mellifera*, *F. varia*, and *C. analis*.

Mean and Standard Deviation of CHCs classes from <i>A. mellifera</i>												
CHC class	Pbm (n=15)				Ne (n=15)				Fg (n=15)			
	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.
n-alkanes	54.5957408	±	3.3525815	a	52.0802478	±	4.46721092	a	74.6904685	±	6.56918093	b
unsaturated	5.03793073	±	2.58562056	a	5.71413452	±	2.971799	a	18.7543734	±	4.01158276	b
branched	40.3663284	±	4.18209634	a	42.2066176	±	5.04356188	a	6.55549168	±	7.04463175	b
Mean and Standard Deviation of CHCs classes from <i>F. varia</i>												
CHC class	Pbm (n=15)				Ne (n=15)				Fg (n=15)			
	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.
n-alkanes	79.1335699	±	10.6292253	a	88.7863494	±	4.5727378	b	85.5124973	±	5.44743937	ab
unsaturated	2.41637793	±	1.7667233	a	4.81012292	±	1.52785075	a	14.1291966	±	5.42317542	b
branched	18.4500521	±	9.84836291	a	6.40352764	±	3.4868966	b	0.35830609	±	0.24033544	c
Mean and Standard Deviation of of CHCs classes from <i>C. analis</i>												
CHC class	Pbm (n=4)				Ne (n=7)				Fg (n=7)			
	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.	Mean	±	STD	Sig.
n-alkanes	40.4243834	±	6.69132761	a	40.2422451	±	6.23342624	a	33.4885047	±	3.80798446	a
unsaturated	58.639068	±	6.63350033	a	59.4582213	±	6.3339471	a	65.2612041	±	3.54504345	a
branched	0.93654861	±	0.22123957	a	0.29953365	±	0.19680038	a	1.25029124	±	1.08569211	a

Standard deviation (STD). Different red letters in significance (Sig.) column represent statistical significance (ANOVA associated to Tukey's HSD post hoc test) between developmental phases of a species.

For the solitary bee species *T. diversipes*, descriptive data is given in S2 Table and S3 File. The values of their CHC proportion overlap between Ne and Fg, like in *C. analis* data.

Detailing the analysis, we calculated the absolute quantities of n-alkanes and unsaturated CHCs per bee (CHC µg/bee), which revealed that the Fg bees of the eusocial species have significantly higher quantities of n-alkanes than the Ne and Pbm bees, which is not true for *C.*

analys. The absolute quantities (mass) of the unsaturated compounds are in agreement with the respective data on the relative quantities (proportions) of CHCs in the integument of *A. mellifera* and *C. analis* (Table 2; S3 File) (for *F. varia*, the mass of unsaturated compounds could not be quantified due to their very low quantities). Taken the CHC results together, especially those results concerning to the n-alkanes profiles, they support the cuticular heterochrony hypothesis.

Table 2. Quantification of n-alkanes and unsaturated CHCs (µg/bee) per developmental phase per species. N=3 samples/phase/species.

N-alkanes				
<i>A. mellifera</i>				
Phase	Mean	±	STD	Sig.
Pbm	9.35965938	±	2.89275421	a
Ne	7.36272669	±	1.44535498	a
Fg	18.2360314	±	4.35877417	b
<i>F. varia</i>				
Phase	Mean	±	STD	Sig.
Pbm	1.63324436	±	0.15390427	a
Ne	3.40142407	±	1.35387231	a
Fg	9.28337077	±	3.03839358	b
<i>C. analis</i>				
Phase	Mean	±	STD	Sig.
Pbm	6.56549413	±	1.62457012	a
Ne	14.8349947	±	0.32610609	b
Fg	13.3273848	±	5.07830924	ab
Unsaturated CHC				
<i>A. mellifera</i>				
Phase	Mean	±	STD	Sig.
Pbm	0.60042039	±	0.17210242	a
Ne	0.92421769	±	0.09047864	a
Fg	6.5543118	±	2.38207067	b
<i>C. analis</i>				
Phase	Mean	±	STD	Sig.
Pbm	9.24954719	±	2.48578756	a
Ne	19.242	±	2.40516304	ab
Fg	28.3380901	±	11.855003	b

Standard deviation (STD). Different red letters in significance (Sig.) column represent statistical significance (ANOVA associated to Tukey's HSD post hoc test) between developmental phases of a species.

Discussion

The genes involved in adult cuticle formation and maturation in general have higher expression soon after the ecdysteroid peak that signalizes apolysis and the beginning of cuticle biosynthesis (Soares *et al.*, 2011, 2013). However, we found genes, including structural cuticle protein genes and genes related to pigmentation, which showed higher expression at the Ne and Fg phases. This finding supports the idea that the adult cuticle as a whole is not a static, but a dynamic structure. We highlight below the genes involved in adult cuticle formation and maturation, which are distinguished by differential expression in the bee species here studied.

Melanization and sclerotization processes

Concerning to melanization/sclerotization processes, we found in the RNA-seq libraries seven genes involved in the biosynthesis of melanin and sclerotizing compounds (see a representation of the melanin/sclerotin biosynthetic pathway in Shamim *et al.*, 2014). The expression patterns of the first gene in this pathway, *TH*, were positively correlated in the three bee species, and apparently did not contribute to the differential timing of cuticle pigmentation (cuticle maturation heterochrony). However, the expression profiles of *ebony* and *tan*, whose protein products act in a reversible reaction between dopamine and NBAD sclerotin (Wright, 1987), were positively correlated exclusively between the eusocial species. Thus, the expression of *ebony* and *tan* clearly differentiated the social from the solitary species, suggesting roles in cuticle maturation heterochrony linked to the social/solitary ways of life. The expression profiles of the remaining genes in the melanization/sclerotization pathway did not show such correlation pattern and did not distinguish the eusocial from the solitary species.

Genes in the melanization/sclerotization pathway have been studied in some insect species, in general during the pharate adult stage, where they reach high expression levels. This was reported for *ebony* and *yellow* in *D. melanogaster* (Wittkopp *et al.*, 2002), *ebony*, *tan*, *TH*, *Ddc* and *yellow* in the ant *Diacamma* sp. (Miyazaki *et al.*, 2014), *TH*, *Ddc* and *Lac2* in *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2005a; Arakane *et al.*, 2009a; Gorman and Arakane, 2010), *Lac 2* in *A. mellifera* (Elias-Neto *et al.*, 2010), and *Dat* in Lepidoptera (Dai *et al.*, 2010) and flies (Ahmed-Braimah and Sweigart, 2015). In the three bee species, these genes displayed different expression dynamics from the pharate adult phase (Pbm) up to the newly-emerged phase (Ne), with increase, decrease or maintenance of the transcript levels. Sometimes the three bee species showed a regular pattern, as for example, increasing *tan* expression and decreasing *Lac2* expression from the Pbm to the Ne phase. However, contrasting expression profiles were also observed, for example, decreasing expression of *Dat* in *F. varia* and increasing expression in *A. mellifera* and *C. analis* in the transition from the Pbm to the Ne phase.

In *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2009a; Gorman and Arakane, 2010) and *Diacamma* sp (Miyazaki *et al.*, 2014) the expression of *TH* was reduced soon after emergence. Lower levels of *TH* transcripts were verified for the forager bees of the three species here studied, which is consistent with a reduction in transcripts levels after emergence like reported for *T. castaneum*. This pattern was repeated for the other genes in the melanization/sclerotization pathway, except *Dat*, which showed significantly increased expression in *A. mellifera* foragers, and *tan* expression that tended to increase in *C. analis* foragers.

In summary, we found species-specific differences in the expression profiles dynamics of the genes in the melanization/sclerotization pathway. The expression of *ebony* and *tan* clearly differentiate the social from the solitary species, thus giving support to the cuticular heterochrony maturation hypothesis.

Chitin metabolism

We found 17, 16 and 33 genes encoding enzymes with roles in chitin synthesis, modification and degradation in *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis*, respectively. Eight among these genes, including those encoding chitinases (*Idgf4-like* and *chitooligosaccharidolytic-domain-like*), chitin deacetylases (*Cda4*, *Cda5*, *Serp* and *Verm*), and chitin synthases (*ChS6* and *ChS-kkv-like*) showed expression profiles significantly correlated at least between two of the three bee species. The expression profiles of two chitinase orthologues, *Idgf4-like* and *chitooligosaccharidolytic-domain-like*, and a deacetylase orthologue, *Cda5*, were positively correlated between the eusocial bees, but not between each one and the solitary bee, thus serving as potential markers for timing differences in cuticle maturation dependent on the life style.

Chitinases are important in the molt fluid for degradation of the old cuticle (Kramer and Koga, 1986). Their roles have also been related to the abdominal contraction, wing/elytra extension and adult emergence event in *T. castaneum* (Zhu *et al.*, 2008). In *D. melanogaster*, the silencing of chitinase genes led to the development of double, thinner, and deformed cuticles (Pesch *et al.*, 2016). The chitin deacetylase enzymes (Cdas) convert chitin into chitosan, a molecule with different electrostatic properties, which might bind to cuticular proteins others than those binding chitin (Muthukrishnan *et al.*, 2012). In *Drosophila*, Cdas encoding genes have a strict relationship with the mechanical properties of the exoskeleton (Lusching *et al.*, 2006). Chitin synthases (ChS) catalyze the last step in the synthesis of chitin and have been implied in procuticle formation and stabilization of the epicuticle (Moussian *et al.*, 2005; Arakane *et al.*, 2005b).

As expected, a high expression of genes encoding chitinases, chitin deacetylases and chitin synthases in insect species were detected during the molting events leading to cuticle renewal.

Therefore, in general, the expression of these genes was related to apolysis and pharate adult development, but was also detected in newly-emerged adults, although in reduced levels (Kramer *et al.*, 1985; Xi *et al.*, 2014; Arakane *et al.*, 2004, 2009b; Tellam *et al.*, 2000; Gagou *et al.*, 2002; Ampasala *et al.*, 2011). This was also observed in the bee species here studied, but with variations: the expression of *Idgf4-like* increased in *C. analis* during the emergence, and like reported for *T. castaneum* (Zhu *et al.*, 2008), this expression may be important for the transition to the adult stage. Interestingly, the expression of *Idgf4-like* increased significantly in *A. mellifera* foragers. The high transcript levels detected in the Pbm phase of *F. varia* was maintained up to the forager phase, supporting roles in the adult cuticle structure. Therefore, the decay in the expression of chitin-related genes in adults seem not a standard pattern.

Circadian rhythm genes

In insects, the cuticle is rhythmically deposited as alternating dark and light layers. Cuticle deposition rhythm in *Drosophila* is regulated by a peripheral circadian oscillator in the epidermal cells, which requires the expression of clock genes (*Per*, *Tim*, *Cyc*, and *Clk*). Mutations in these genes affect the morphological pattern of cuticular layers (Ito *et al.*, 2008). Although in *Drosophila*, the gene *Cry* was not involved in cuticle deposition rhythm (Ito *et al.*, 2008), in *Riptortus pedestris*, this gene was associated with the reduction in the expression of *Per* and cuticular layers formation (Ikeno *et al.*, 2011).

Here we compared the expression of seven circadian rhythm genes (*Clk*, *Cyc*, *Per*, *Tim2*, *Cry*, *Vri* and *Pdp1*) in the developing integument, considering that the timing of cuticle deposition is peculiar to the studied bee species. TEM revealed that the process of cuticle deposition ends earlier in *F. varia* than in the other bee species. Cuticle thickness in this species did not vary from the Pbm to the Fg phase. In contrast, the solitary bees, *C. analis* and *T. diversipes*, and even the primitively eusocial bees, *B. brasiliensis* and *E. cordata*, have a fully deposited cuticle as soon as they emerge (Ne phase). In *A. mellifera*, cuticular deposition is extended through the initial adult stage. Interestingly, consistent with the differences in the timing of cuticle deposition between the bee species, the expression profile of *FvClk* was negatively correlated with those of *AmClk* and *CaClk*. Similarly, the expression profiles of *Cry* in *A. mellifera* and *C. analis* were also negatively correlated. Interestingly, *AmPer* was co-expressed with the *Amknk* gene. In *T. castaneum*, *Tcknk* was associated with cuticular lamina stabilization (Chaudhari *et al.*, 2014). In addition, *AmPer* and *Amknk* were co-expressed with structural proteins such as *AmCpap3-a*, *AmTwll(Grp)*, *AmUnCPR-RR2-2*, *AmCPR26*, *Am49Ah-like* and *AmSgAbd2-like*, and the melanization-related gene *Amyellow-y*. Together, these data suggest that *Per* participates in the cuticular stabilization, and this was

specifically observed in *A. mellifera*, whose sequenced genome gives more support for gene co-expression network construction.

Based on the clock genes expression profiles, we suggest that *AmClk* and *AmCry* are involved in cuticle deposition, and that the expression of *Per* is related to cuticle layers organization. In addition, *Tim2* expression profiles were positively correlated between the eusocial species, but not with them and the solitary one, thus supporting our main idea.

Structural cuticular proteins encoding genes

A variable number of genes encode the different classes of structural cuticular proteins in the integument of the three bee species and other hymenopterans (**S3 Table**). Identification of the cuticular protein families is based on conserved amino acid sequences (Willis, 2010). Members of the CPR family mainly contain one of the two main types of RR Consensus, RR1 and RR2 (Rebers and Riddiford, 1988; Andersen, 1998). Previous studies have associated the expression of RR1 genes to the formation of the post-ecdysial endocuticle. The RR2 genes were associated to the formation of the pre-ecdysial exocuticle following the ecdysteroid pulse-induced apolysis (Andersen, 2000; Togawa *et al.*, 2008). In the three bee species, the expression of both RR1 and RR2 genes was higher during the pre-ecdysial period (Pbm phase), when the adult cuticle is being constructed. However, there were exceptions, and some of these genes were significantly more expressed at the Ne phase and even at the Fg phase, as the RR1 genes *AmCPR13*, *AmCPR19*, *AmCPR27*, *FvUnCPR-1*, *CaSgAbdl-like*, and the RR2 gene *AmUnCPR-RR2-5*, suggesting additional roles in the bee cuticle.

CPR genes may have more specific roles in the cuticle besides encoding structural proteins. In *T. castaneum*, the function of some CPR genes was associated to pore canals formation and organization (Noh *et al.*, 2014, 2015). This recent finding and the quantity of CPR genes identified up to now suggest that specific functions are yet to be discovered for members of this gene class.

Among the non-CPR genes, we identified genes in the *Twdl*, *CPLCP*, *CPF*, *Cpap* and *Apd* classes. The expression of *Twdl* genes encoding chitin-binding proteins was firstly described in *Drosophila* (Guan *et al.* 2006; Willis, 2010). Two *Twdl* genes were previously identified in the thorax of *A. mellifera* (Soares *et al.*, 2011), and now in the abdomen of the three bee species indicating that *Twdl* proteins participate of both rigid and more flexible cuticles. Like *A. mellifera*, *C. analis* has two *Twdl* genes, but only one was identified in *F. varia*. Excepting *CaTwdl2*, which is expressed at the same level during the studied developmental phases, the *Twdl* genes in the bee species were more expressed during cuticle deposition in the Pbm phase. Two *CPLCP* genes were here detected exclusively in *A. mellifera*, and were also more expressed in the Pbm phase, as

observed for the *CPLCP* genes in *A. gambiae* (Cornman and Willis, 2009). CPF proteins were associated to the outer cuticle layers of *A. gambiae* and, apparently, do not bind chitin (Togawa *et al.*, 2007). Three *CPF* genes were previously reported for *A. mellifera* (Willis, 2010) and one of them, *AmCPF1*, was validated in the thoracic integument through microarrays (Soares *et al.*, 2011). Here we found a higher expression of *AmCPF1* and *AmCPF2* transcripts in the abdominal integument of the Pbm stage. The expression of the single *CPF* gene in *F. varia* (*FvCPF1*) and *C. analis* (*CaCPF*) did not significantly vary through the stages here studied. Genes encoding for *Cpap1* and *Cpap3* are essential for the correct formation of the cuticular exoskeleton and elytra in *T. castaneum*, and showed reduced expression after adult emergence (Jasrapuria *et al.*, 2012). Genes pertaining to the *Cpap* family were not detected in the microarrays performed with *A. mellifera* thoracic integuments (Soares *et al.*, 2013). Our current data on abdominal integuments highlighted a number of these genes in the three bee species, all showing higher levels at the Pbm phase. *Apd* genes seem exclusive of hymenopterans and three of these genes were first identified in *A. mellifera* (Kucharski *et al.*, 2007). Their transcript levels in the thoracic integument were higher in pharate-adults compared to earlier developmental phases (Soares *et al.*, 2013). Here, we detected one more *Apd* gene in *A. mellifera*, *AmApd-like*, and three *Apd* genes in *F. varia* and *C. analis*. The four *Apd* genes in *A. mellifera* showed higher expression at the Pbm or Ne phases. Different expression profiles were detected in *F. varia* and *C. analis*, with genes showing a higher expression at the Pbm phase (*FvApd-3*, *FvApd-like*) or at the Ne and/or Fg phases (*FvApd-1*, *CaApd-1*, *CaApd-2*), and *CaApd-like* displaying a constitutive expression. The expression of other cuticular protein genes, *dumpy*, *knk* and *Rtv*, was also identified. *Dumpy* play roles in cuticle formation in *D. melanogaster* (Willis, 2010). Consistent with this finding, the levels of *dumpy* transcript (*Amdp*) were higher in the Pbm phase of *A. mellifera*, when the adult cuticle is being formed. Transcripts for this gene were not detected in the integument of the other two bee species. The genes *knk* and *Rtv* are involved in cuticle stabilization (Moussian *et al.*, 2006). In *T. castaneum*, *Rtv* activity is essential for localization of the *Knk* protein, facilitating its transport to the cuticle (Chaudhari *et al.*, 2011; 2013). In *A. mellifera*, *AmRtv* is co-expressed with *Amknk*, supporting their interaction, as verified in *T. castaneum*. *Rtv* transcripts were not detected in *F. varia* and *C. analis*.

Together, the analysis of all cuticular protein genes showed a variety of expression profiles, mostly with higher expression when the cuticle is being deposited (Pbm phase), although higher expression has also been verified for some genes at the emergence (Ne phase) and in forager (Fg) bees. Among these genes, we observed significant differences in the expression timing of three RR1 genes (*CPR14*, *CPR17*, *CPR18*, *CPR25*), one RR2 gene (*CPR26*), and two non-RR genes (*Apd-3* and *Apd-like*) in the comparisons between the social and the solitary species, suggesting roles in

cuticular maturation heterochrony. Another RR1 gene, *AmCPR22*, also presented a contrasting expression profile when compared to its putative orthologous *CaCPR22*.

Cuticular hydrocarbons: genes and chemical profiles

CHC biosynthesis occurs in epidermis-associated oenocytes (Piek, 1964) and is mediated by elongases and desaturases enzymes. Previously, we characterized the expression profiles of genes encoding these enzymes in the developing integument of *A. mellifera* (Falcón *et al.*, 2014). Our RNA-seq data confirmed these findings, besides identifying three more desaturases and four elongases encoding genes.

For all three bee species here analyzed, the general expression profiles of desaturase genes reflected a progressive increase in transcript levels up to the Fg phase, except for *AmDesat-GB40659* and *FvDesat-GB40659*, which showed a low expression through all phases. Among the desaturases and elongases encoding genes, we highlight the expression profiles of *Desat-GB40659*, *Elo-GB54401*, *Elo-GB54302*, *Elo-GB45596* and *Elo-GB46038* orthologues, which were positively correlated exclusively between the eusocial species.

Concerning to the CHC profiles, we observed that the proportions of n-alkanes discriminated the Fg phase from the younger Pbm and Ne phases in the eusocial species, but not in the *C. analis* solitary species. Unsaturated CHCs, known to be useful for chemical communication, strongly support younger developmental phases distinction from Fg in *A. mellifera* and *F. varia*, but not in *C. analis*. Also, branched CHCs differentiated the Fg phase from the younger phases in both *A. mellifera* and *F. varia*.

The n-alkanes detected in higher proportions in *A. mellifera* foragers than in the newly-emerged were C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₉, C₃₁ and C₃₃, the C₂₅ and C₂₇ n-alkanes showing the highest proportions (S3 File). The analysis of the individual CHC peaks obtained from *F. varia* also showed higher proportions of C₂₂, C₂₇ and C₂₉ in the foragers. All these n-alkanes, except C₂₇ and C₃₃, also showed increased proportions in the eusocial bee *Melipona marginata* at the Fg phase when comparing to the Ne phase (Ferreira-Caliman, 2010). Together, these data are consistent with previous reports on higher proportions of n-alkanes in *A. mellifera* foragers (Kather *et al.*, 2011) and in foragers of an ant species, *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner *et al.*, 1998). In contrast, in *C. analis*, the proportions and absolute quantities of n-alkanes did not differentiate foragers from the newly-emerged (Tables 1 and 2). The same was verified for the other solitary species, *T. diversipes* (S2 Table). The proportions of n-alkanes also did not change significantly in the leafcutter bee *Megachile rotundata*, another solitary species (Paulmier *et al.*, 1999).

The hypothesis that n-alkanes are the structural lipids in insect cuticles is well supported

(Gibbs and Pomonis, 1995). Linear alkanes compose the envelope of a variety of insect orders (Lockey, 1988). They usually range from C21 to C31 or C33. Those n-alkanes with carbon chain <C20 can act as contact pheromones (reviewed in Blomquist, 2010). However, the compounds used as contact pheromones are usually methylated, or unsaturated (Dani *et al.*, 2001; reviewed in Gibbs, 2002; Châline *et al.*, 2005). Gibbs (2002) described a hypothetical model where the cuticular lipid layer has different physical phases made of hydrocarbons. One of these phases is formed by a crystal structure composed mostly by n-alkanes and possibly by some less permeable methyl-alkanes. The other is a liquid phase composed mainly by permeable unsaturated pheromones accessible to chemoreceptors. This model also supports the importance of alkenes, but not n-alkanes $\geq$ C21, as recognition signature in *A. mellifera* (Dani *et al.*, 2005). Modifying the envelope composition through application of n-alkanes does not alter recognition cues in the wasp *Polistes dominulus*. An inverse result was obtained when using alkenes and branched hydrocarbons (Dani *et al.*, 2001). Also in the ant *Lenepithema humile*, n-alkanes have no noticeable importance in the recognition signature (van Wilgenburg *et al.*, 2012).

Additionally, we analyzed the branched hydrocarbons, which might be involved in both functions (cuticle structure and chemical communication) (Dani *et al.*, 2001; reviewed in Gibbs, 2002). The branched CHCs clustered together the Ne and Pbm developmental phases of *A. mellifera*; the foragers (Fg) formed a well-supported separate group. Such discrimination between developmental phases was not so evident in *F. varia*, with some foragers (Fg) interspersed in the cluster of Ne and Pbm bees. Branched CHC compounds also discriminated the *C. analis* earlier phases (Pbm and Ne) from the forager. In the eusocial bees, but not in *C. analis*, branched CHCs showed decreased proportions in the Fg phase. Thus, branched CHCs seem the most informative semiochemicals in the younger stages of eusocial bees, in a clear contrast to the unsaturated CHCs that exist in higher proportions in the mature (Fg) cuticle. Such data here obtained for the two eusocial species, *A. mellifera* and *F. varia*, confirm and extend our previous study on *A. mellifera* (Falcón *et al.*, 2014).

In summary, the Euclidean distances applied to cuticular chemical profiles showed that the younger and mature cuticles of the eusocial *A. mellifera* and *F. varia* bees significantly differ in n-alkanes, whereas this does not occur in the solitary *C. analis* species. Four elongases genes might be associated with this difference, *Elo-GB54302*, *Elo-GB54401*, *Elo-GB45596*, and *Elo-GB46038*. This finding may be interpreted as the solitary bee having an accelerated process of cuticle maturation in comparison to the eusocial ones. At the adult emergence, the solitary bee has the chemical profile needed for a prompt interaction with the environment outside the nest. These results, therefore, reinforce the hypothesis of cuticle maturation heterochrony related to evolution of

sociality in bees.

Regulatory genes

The adult cuticle is progressively deposited as the ecdysteroid titer decreases after the pulse that triggers the apolysis, in conditions of absence of juvenile hormone (Riddiford, 1976). The ecdysteroid receptor (EcR) allows the tissues that express it to respond to the ecdysteroids. EcR and its partner, *ultraspiracle* (*usp*), binds to ecdysteroids and this complex regulate a cascade of regulatory genes involved in cuticle renewal. Genes in this cascade are well described for the metamorphic molt in *Drosophila*, but they are also susceptible to the ecdysteroid peak that triggers the pupal cuticle apolysis and drives the adult cuticle synthesis (Lavorgna *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1997, 1999; King-Jones *et al.*, 2005). Those genes that are immediately activated by the binding of the ecdysone receptors are known as early responsive genes while those activated by the early genes' products are known as late responsive genes (Ashburner, 1990). We here detected the expression of several of these genes (S5 Fig). *E74* (Thummel *et al.*, 1991), *E75* (Zhou *et al.*, 1998a) and *Broad* (Zhou *et al.*, 1998b; Zhou and Riddiford, 2001, 2002) are known as the early genes responding to ecdysteroids. Their products activate a series of late genes, one of them encoding the FTZ-F1 protein, which modifies the chromatin thus allowing the expression of a second set of late genes (Lavorgna *et al.*, 1993). DHR3 (its orthologue in bees is *Hr46*) is necessary for the expression of *FTZ-F1* (Lam *et al.*, 1999), which positively regulates the expression of *Br-C* and the expression of *E74A* and *E75A* isoforms (Lam *et al.*, 1999; Ruaud *et al.*, 2010) while HR3 negatively regulates these genes (Lam *et al.*, 1997). *Hr4* is also induced by the ecdysteroid pulse. RNAi against this gene interferes in the expression of the following genes in the ecdysteroid-triggering cascade: *Ecr*, *E74A*, *E74B*, *E75A*, *E75B* and β *FTZ-F1*. The *Kr-h1* gene is expressed in ecdysone responsive tissues and is regulated by the juvenile-hormone receptor, Met (methoprene-tolerant) (Beck *et al.*, 2005), which was also suggested as involved in the ecdysone-signaling pathway (Lozano and Belles, 2014). The nuclear receptor HR38 competes with EcR to bind Usp (Bonneton and Laudet, 2012). *E93* negatively regulates the expression of *Kr-h1* and *Br-C*. Therefore, all these genes are involved in the regulation of cuticle formation. Additional regulatory genes play roles in cuticular melanization patterns, as examples, the Hox gene *Abd-B*, which regulates *yellow* in the pigmentation/sclerotization pathway (Jeong *et al.*, 2006). *Hairy* is a pair-rule gene in the *Drosophila* embryos (Carroll *et al.*, 1988) and may be involved in the polarity of segment melanization. The heterodimeric neuropeptide bursicon, composed by the products of *bursa* and *burs β* , is responsible for the regulation of genes such as *laccase2* and is crucial for the melanization/sclerotization of the newly formed cuticle. It is released by the thoracic and abdominal

ganglia, and interacts with the target tissue through its receptor, Rickets (Song, 2012). Other regulators are part of the signaling cascade underlying ecdysis, such as *CCAP* (crustacean cardioactive peptide), *Eth* (ecdysis triggering hormone) and its *Ethr* receptor, and the eclosion hormone, *Eh* (Zitnam and Adams, 2012).

Mainly for *D. melanogaster*, but also for other insect species, there is evidence that certain genes in this cascade control the activity of genes involved in cuticle formation and maturation. Thus, it was reported that EcR regulates the expression of chitin synthase encoding genes (Yao *et al.*, 2010), and acts together with Br-C to positively regulate *Ddc* expression (Chen *et al.*, 2002); HR3 regulates the expression of a chitinase (*Idgf5*) and a chitin synthase (*kkv*) genes (Ruaud *et al.*, 2010). The expression of the *Desat1* desaturase, *yellow-c* and also of a gene encoding a structural cuticular protein was induced by RNAi treatment against Hr4 (King-Jones *et al.*, 2005). Other regulators, such as β FTZ-F1, HR3, E74A, HR38 and E93 were reported as involved in the regulation of CPR genes and other genes encoding structural cuticle proteins (Kawasaki *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2013; Bruey-Sedano *et al.*, 2005; Kozlova *et al.*, 2009; Ureña *et al.*, 2014).

Interestingly, among the regulators, the expression profiles of *Ethr*, *E74*, *Hr4*, *Hr38*, *FTZ-F1*, *Rickets* and *Ptx1* genes were positively correlated between the eusocial *A. mellifera* and *F. varia*, and non-correlated between them and *C. analis* (S1 Table), suggesting that the dislocation in the timing of cuticle maturation during evolution is dependent on modifications in the regulator expression profiles.

Our gene co-expression networks reconstructions for *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis* clearly showed the interplay between the genes involved in cuticle formation and maturation, including the genes related to the melanization/sclerotization, chitin metabolism, CHC and non-melanin pigmentation pathways, structural cuticle protein genes, circadian rhythm genes and regulators. The networks greatly differed between the bee species. We identified common gene interactions in the networks of the eusocial species, which do not occur when we compared these species with the solitary one.

Non-melanin pigmentation related gene expression

Among the genes related to non-melanin pigmentation pathways, such as those involved in pterin and ommochromes formation, we detected *cardinal*, *brown*, *vermillion*, *light*, *sepia*, and *henna* (this one involved in both biopterin and tyrosine formation for melanization process) as more expressed at the Ne and/or Fg phases, indicating that they are necessary in the adult cuticle. The gene *cardinal* and another gene in this pathway, *scarlet*, are both necessary for ommochromes formation in *B. mori* (Osanai-Futahashi *et al.*, 2016) and are associated to the formation of red and

brown pigments (Sugumaran, 2009). The *light* product is necessary for the formation of pigment granules (Lloyd *et al.*, 1998). The expression profiles of their orthologues were positively correlated between *F. varia* and *C. analis*, which might be related to the brownish and reddish color pattern typical of the cuticle of these two species. The expression profiles of one gene in the non-melanin pigmentation pathway, *ALAS*, were positively correlated exclusively between the eusocial species, *F. varia* and *A. mellifera*. *ALAS* might be involved in detoxification, as suggested for *D. melanogaster* (for review see Hamza and Dailey, 2012; Stubenhaus *et al.*, 2016).

Fig 7 is a summary of the main findings obtained from the comparison of gene expression profiles, chemical profiles and ultrastructure using RNA-seq, GC/MS and TEM and integument samples from different developmental phases and eusocial and solitary bee species.

The morphological, physiological and biochemical properties of cuticle and epidermis vary considerably during animal development. These features place the exoskeleton as an attractive structure to study the developmental mechanisms of differentiation, a process that ends with the completion of the melanization and sclerotization. Additionally, the variation in the timing of cuticle maturation among bee species might represent adaptations to their habits, social and solitary (Elias-Neto *et al.*, 2013), and may reveal interesting aspects of eusociality evolution. Integument transcriptome analysis underscored the genetics of cuticular formation and maturation, besides highlighting contrasting gene expression profiles between the eusocial and solitary bees. Additionally, gene co-expression networks comprising genes involved in cuticle formation and maturation, and their regulators, revealed common expression patterns exclusively for the eusocial species. Quantifications of CHCs also differentiated the eusocial bees from the solitary bee and gave support to the cuticular maturation heterochrony hypothesis. TEM analysis revealed that the cuticle of the solitary species, *C. analis* and *T. diversipes*, and primitively social species, *B. brasiliensis* and *E. cordata*, are complete at the time of adult emergence. In contrast, the cuticle of *A. mellifera* is still being deposited, and this process takes at least three days. These results are consistent with previous data on the primitively social Bombini bees, which take a shorter time to complete the cuticular pigmentation process than Apini and Meliponini bees. Furthermore, in another social bee group, Allodapini, the pigmentation process can take many days after adult emergence (Michener, 1974). Surprisingly, the ultrastructure and thickness of the cuticle of the eusocial *F. varia* did not undergo significant variation from the pharate adult to the forager phase, although we have observed a great increase in pigmentation during the adult life. In conclusion, our data disclosed transcriptomic, morphological and chemical features of the integumentary system of bee species that deep knowledge on exoskeleton formation and maturation.

678 **Materials and Methods**

679 **Sample collection**

680 We collected workers of *A. mellifera* (Africanized) and *F. varia* from colonies maintained in
 681 the Experimental Apiary of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São
 682 Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Trap-nests to collect samples of the solitary species *C. analis* and
 683 *T. diversipes* were made as described by Jesus and Garófalo (2000) and placed in the Experimental
 684 Apiary area. Additional bee species (*B. brasiliensis*, *E. cordata* and *T. diversipes*) were obtained
 685 from donations (see acknowledgments section).

686 We used females from three developmental phases: pharate adults in process of cuticle
 687 pigmentation (Pbm phase), newly emerged (Ne) adults and foragers. Carrying pollen bees from the
 688 solitary and social species, and building-nest females from the solitary species, were identified as
 689 foragers (Fg). The *B. brasiliensis*, *E. cordata* and *T. diversipes* species were exclusively used for
 690 cuticle morphology studies through TEM. In this case, we used the Ne and Fg phases.

691 **RNA extraction and sequencing**

692 For each developmental phase (Pbm, Ne and Fg) of *A. mellifera* and *F. varia*, we prepared
 693 three independent samples, each made with five abdominal integuments. For the corresponding
 694 developmental phases of *C. analis*, we prepared three independent samples, each containing three
 695 abdominal integuments. The RNA extractions were made using TRIzol® reagent (Invitrogen)
 696 following manufacturer's instruction. The extracted RNAs (2 µg/per sample) were sent to a facility
 697 (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida, Universidade
 698 Estadual de Campinas, Campinas, Brazil) to access sample quality through a 2100 Bioanalyzer and
 699 for library preparation (TruSeq™ RNA - Illumina®) and RNA sequencing in an Illumina HiSeq
 700 2500 equipment (paired-end reads, 2 x 100 bp read length). We obtained an average of 30 million
 701 reads per sample, with 90% of the bases showing quality scores > Q30. The RNA-seq data is being
 702 deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website.

703 **Adapters trimming and quality check**

704 We used the software Scythe v. 0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) for trimming 3'
 705 standard Illumina adapter sequence. We followed a Cutadapt v. 1.4.1 (Martin, 2011) trimming at 5'
 706 ends of the reads, and we filtered reads with Phred quality > 20. The trimmed sequences were
 707 filtered using the software PRINSEQ-lite v. 0.20.3 (Schmieder and Edwards, 2011) and sequence
 708 quality was evaluated through the software FastQC v. 0.11.2 (Andrews, 2010).

709 **Transcriptome assembly and gene expression**

710 We aligned the high quality reads from *A. mellifera* against its genome v. 4.5 using the
 711 software TopHat v. 2.0.9 (Trapnell *et al.*, 2009). The *A. mellifera* aligned sequences were quantified

and the developmental phases compared using the software Cufflinks v. 2.1.1 (Trapnell *et al.*, 2010). The extension Cuffmerge integrated the reads to the mapping results and the tool Cuffdiff checked the expression levels for each sample and the significance of comparisons. CuffmeRbund R package v. 2.8.2 allowed us to access all this information (Trapnell *et al.*, 2012).

For *F. varia* and *C. analis*, we used the software Trinity (trinityrnaseq_r2014717) (Grabherr *et al.*, 2011) as recommended by Hass *et al.* (2013). The N50 contig length (smallest contig length for which the sum of fewest contigs corresponds to 50% or more of the assembly – see Miller *et al.* (2010)) of all transcripts of *F. varia* was 2372 and of *C. analis* was 2440. Orthology search was performed through the software InParanoid 8 (Sonnhammer and Östlund, 2014). We only accepted those transcripts with higher similarity with *A. mellifera* than to *Drosophila melanogaster*. Statistical evaluation of these data was done with the R software v. 3.1.2, using the packages R DESeq2 v. 1.6.3 (Love *et al.*, 2014) and edgeR v. 3.8.6 (Robinson and Smyth, 2008). We considered as differentially expressed between developmental phases, those contigs with significant results for both R packages.

All heat maps were designed using the function heatmap.2 from gplots R package (Warnes *et al.*, 2015). For all groups of genes, we measured the clustering potential of the samples for each phase and species. For this approach, we used the R package pvclust v. 1.3.2 (Suzuki and Shimoidara, 2006) based on correlation distances, with a complete linkage method, and 10,000 bootstrap replication. We used unbiased p values (AU) and bootstrap values as measurements of clusters' significance. Clusters showing AU > 95% were considered statistically significant (Suzuki and Shimoidara, 2006).

Molecular and functional characterization of differentially expressed genes

For the analysis of gene expression in *A. mellifera*, we filtered the differentially expressed genes using the following thresholds: q-value < 0.05; Log 2 Fold Change ≤ -1 or ≥ 1 and Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (FPKM) ≥ 5 . In the case of the other two bee species, *F. varia* and *C. analis*, we used the parameters cited in the previous section. For the Gene Ontology (GO) enrichment analysis we used the *A. mellifera* gene IDs to look for *D. melanogaster* orthologues in Fly Base, through the support of the online softwares g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gorth.cgi>), and g:Orth function (Reimand *et al.*, 2007; Reimand *et al.*, 2011). The same was done for *F. varia* and *C. analis* but using *A. mellifera* orthologues. We filtered the *Drosophila* IDs to avoid ID repetition and used them to generate an input list for the software DAVID v. 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Huang *et al.*, 2009a; 2009b), used to perform the Gene Ontology analysis. The annotated functions belonged to Biological Process (BioP), Cellular Components (CC) and Molecular Function (MF) categories. Structural cuticular protein encoding

genes were classified in accordance with the software CutProtFam-Pred (<http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/home.php>) (Ioannidou *et al.*, 2014). Venn diagrams were plotted with the online version of the software jvenn (Bardou *et al.*, 2014) (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/example.html>).

750 **Transcription factor binding sites search with TRANSFAC®**

Transcription factors whose binding sites could be enriched in specific groups of *A. mellifera* gene models were searched using TRANSFAC® (Wingender *et al.*, 2000) against insects database. For this enrichment analysis, we searched the 5' UTR regions covering -3,000 bases relative to the transcription start sites of the genes involved in sclerotization/melanization processes, chitin metabolism, CHC biosynthetic pathway, regulation of cuticle formation and maturation, circadian rhythm, and non-melanization pigmentation pathways (see gene IDs S1 File). We excluded the genes with 5' UTR < 500 bases. We used the *A. mellifera* genes in this analysis once it is the only among the species here studied with an available reference genome. For the transcription factor FTZ-F1 binding sites, we used the TRANSFAC database (DROME\$FTZF1_01, DROME\$FTZF1_02, and DROME\$FTZF1_03 from *D. melanogaster*, and BOMMO\$CPR92_01, and BOMMO\$CPR92_02 from *B. mori*) to generate a positional matrix. Here, we only highlighted those transcript factor binding sites (TFBS), which could be relevant for insect cuticle formation and maturation (see **Discussion section**).

764 **Gene co-expression networks**

The networks were plotted based on the correlation of gene expression in the integument of the analyzed bee species. We used the software Cytoscape v. 3.3.0 (Shannon *et al.*, 2003) – for Linux, and its plugin ExpressionCorrelation App v. 1.1.0. We only accepted correlations $\geq \pm 0.95$ and $p \leq 0.05$.

769 **Transmission electron microscopy (TEM)**

We dissected the integument from the right anterior region of the third abdominal tergite of the studied bee species. The ultrastructure of the integument was compared between species and between the developmental phases (Pbm, Ne and Fg) using 11 *A. mellifera* integument pieces (4 from Pbm, 3 from Ne, and 4 from Fg phases), 9 integuments from *F. varia* (3 Pbm, 3 Ne, 3 Fg), 11 integuments from *C. analis* (4 Pbm, 4 Ne, 3 Fg), 4 integuments from *B. brasiliensis* (2 Ne, 2 Fg), 6 integuments from *E. cordata* (3 Ne, 3 Fg), and 6 integuments from *T. diversipes* (3 Ne, and 3 Fg). The Ne and Fg phases of *B. brasiliensis* were recognized based on the grade of body pigmentation criterium (less intense in the Ne bees) and for the Fg phase we also examined the wings in the search for erosion signals that could indicate intense foraging activity. The integument samples were fixed in 5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2, during 2 h under shaking,

washed 3X in the cacodylate buffer, fixed in osmium tetroxide 1% diluted in phosphate buffer 0.1M, pH 7.2, dehydrated in acetone and propylene oxide and embedded in resin. We used uranyl acetate for enhancing image contrast. The ultrathin sections were examined in a Jeol-Jem-100cx-II Electron Microscope and the software ImageJ v. 10.2 (Abramoff *et al.*, 2004) was used to measure integument thickness. Measurements were compared among the developmental phases and species using Analysis of Variance (ANOVA) associated with the Tukey's Honestly Significance Difference (Tukey's HSD) post hoc test in R software v. 3.1.2, except for the *A. mellifera* and *B. brasiliensis* data. As for *A. mellifera* the data did not present a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test) we used the Kruskal-Wallis test associated with the *post hoc* Conover-Iman test and Bonferroni correction, and for *B. brasiliensis* we used the Student's t-test as suggested in Fay and Gerow (2013).

Cuticular hydrocarbon profiles

The quantification of CHCs was based on their peak area in each chromatogram. For the analysis of relative peak area, we collected 15 bees per developmental phase for each of the highly eusocial species, while for *C. analis* we obtained four Pbm-staged bees, seven Ne and seven Fg bees. For *T. diversipes*, we sampled two Ne and four Fg bees. The *F. varia* hind legs were removed to avoid resin contamination. Except for this species, we bathed each sample in 1.5 ml of n-hexane 95% (Mallinckrodt Chemicals) for 1 min and 30 s to extract the CHCs. Due to the small size of *F. varia* species, we used 500 μ l of n-hexane to extract the CHCs (Nunes *et al.*, 2008). The extracts were dried under N₂ flow and resuspended in 160 μ l of n-hexane (100 μ l for *F. varia* extracts) before running the analysis. CHC identification was made in a Gas Chromatograph / Mass Spectrometer (GC-MS) system (Shimadzu GCMS model QP2010), equipped with a 30 m DB-5MS column using helium as the carrier gas (1 ml/min), through electronic ionization (EI) method. CHC relative quantification and normalization of the peak areas were performed following Falc3n *et al.* (2014) description. We also compared each developmental phase considering the classes of CHC (n-alkanes, unsaturated, and branched alkanes), repeating the normalization process for each case.

In order to verify differences between the developmental phases and between the bee species, we performed a clustering approach as described in the section **Transcriptome assembly and gene expression**, but using the Euclidean distance instead of the correlation distance. We also verified the compounds that better explained the detected differences. With this purpose, we performed a Principal Component Analysis (PCA) using the R software. The variation of each CHC peak area between the developmental phases was accessed through a Tukey's HSD test in R software.

Additionally, we calculated the absolute quantities of n-alkanes and unsaturated CHC per

bee for the species *A. mellifera*, *F. varia*, and *C. analis*. An analytical curve (as accepted by the Analytical Methods Committee, 1995) was built to establish the correlation between the quantities of the used standards and the CHCs. It is described by the equation: $y=ax +b$, where y is the known amount of the standard, x is the quantity of the unknown CHC, a is the peak area of the standard, and b is the area of the intercepted background. We prepared the curve based on the n-alkanes standards C_{23} , C_{25} , and C_{32} (Alltech Corporation) and using 1.25, 2.5, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of each alkane. To the standards solutions and to each sample, we added 100 μl of the internal standard α -colestane (6.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Sigma-Aldrich) under the previously cited chromatography conditions. The values of the correlation curve (R) between CHCs and standards were ≥ 0.99 . After curve preparation, CHCs were quantified in three independent samples, each prepared with individual bees, for each developmental phase and species. Due to the reduced body size of *F. varia*, we used pools of three bees for each one of the three independent samples per developmental phase and the obtained CHC values were corrected accordingly. To calculate the concentrations of compounds up to C_{24} , we used the curve of C_{23} ; for compounds from C_{25} up to C_{29} , we used the C_{25} curve; and for compounds larger than C_{29} up to C_{35} we used the curve of C_{32} . We followed an ANOVA associated with the *post hoc* Tukey's HSD test to compare the absolute quantity of each CHC (n-alkanes and unsaturated) between developmental phases. The absolute quantities of the *F. varia* unsaturated compounds were not calculated once their quantities are very low.

Acknowledgments

São Paulo Research Foundation (FAPESP): Grants to MMGB, ZLPS, NPL; Fellowships to TF (Process number: 2012/24284-5).

References

- Abramoff, M. D.; Magalhães, P. J.; Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11, 36-42.
- Ahmed-Braimah, Y.; Sweigart, A. L. (2015). A single gene causes interspecific difference in pigmentation in *Drosophila*. *Genetics* 115, DOI: 10.1534/genetics.115.174920 .
- Ali, M. S.; Iwanaga, M.; Kawasaki, H. (2013). Ecdysone-responsive transcriptional regulation determines the temporal expression of cuticular protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. *Gene* 512, 337-347.

847

848 Ampasala, D. R.; Zheng, S.; Zhang, D.; Ladd, T.; Doucet, D.; Krell, P. J.; Retnakaran, A.; Feng, Q.
 849 (2011). An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning,
 850 characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Archives of Insect*
 851 *Biochemistry and Physiology* 76, 83-96.

852

853 Analytical Methods Committee. (1995). Internal quality control of analytical data. *Analyst* 120, 29-
 854 34.

855

856 Andersen, S. O. (1998). Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert
 857 locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 421-434.

858

859 Andersen, S.O. (2000). Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta*
 860 *migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 569-
 861 577.

862

863 Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular*
 864 *Biology* 40, 166-178.

865

866 Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available in:
 867 <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.

868

869 Arakane, Y.; Hogenkamp, D. G.; Zhu, Y. C.; Kramer, K. J.; Specht, C. A.; Beeman, R. W.; Kanost,
 870 M. R.; Muthukrishnan, S. (2004). Characterization of two chitin synthase genes of the red flour
 871 beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development.
 872 *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 291-304.

873

874 Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W.; Kanost, M. R.; Kramer, K. J. (2005a). *Laccase 2* is
 875 the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of*
 876 *Science* 102, 11337-11342.

877

878 Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K. J.; Specht, C. A.; Tomoyasu, Y.; Lorezen, M. D.;
 879 Kanost, M. R.; Beeman, R. W. (2005b). The *Tribolium chitin synthase* genes *TcCHS1* and *TcCHS2*
 880 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular*

881 *Biology* 14, 53-463.

882

883 Arakane, Y.; Li, B.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W.; Kramer, K. J.; Park, Y. (2008). Functional
884 analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis
885 behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of Development* 125, 984-995.

886

887 Arakane, Y.; Lomakin, J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S.; Gehrke, S. H.; Kanost, M. R.;
888 Kramer, K. J. (2009a). Molecular and functional analyses of amino acids decarboxylases involved
889 in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16584-16594.

890

891 Arakane, Y.; Dixit, R.; Begum, K.; Park, Y.; Specht, C. A.; Merzendorfer, H.; Kramer, K. J.;
892 Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W. (2009b). Analysis of functions of the chitin deacetylase gene
893 family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 355-365.

894

895 Ashburner, M. (1990). Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell* 61, 1-3.

896

897 Bai, H.; Palli, S. R. (2010). Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide
898 analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology*
899 344, 248-258.

900

901 Bardou, P.; Mariette, J.; Escudié, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn
902 diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, DOI: 10.1186/1471-2105-15-293 .

903

904 Beck, Y.; Dauer, C.; Richards, G. (2005). Dynamic localisation of KR-H during an ecdysone
905 response in *Drosophila*. *Gene Expression Patterns* 5, 403-409.

906

907 Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In G. J. Blomquist e A. G.
908 Bagnères (Ed.), *Insect Hydrocarbons* (pp. 19-34). Cambridge University Press, New York.

909

910 Bonneton, F.; Laudet, V. (2012). Evolution of nuclear receptors in insects. In: Insect endocrinology.
911 Gilbert, L. I. (Ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, 219-252.

912

913 Bruey-Sedano, N.; Alabouvette, J.; Lestrade, M.; Hong, L.; Girard, A.; Gervasio, E.; Quennedey,
914 B.; Charles, J. P. (2005). The *Drosophila ACP65A* cuticle gene: deletion scanning analysis of cis-

- 915 regulatory sequences and regulation by DHR38. *Genesis* 43, 17-27.
 916
- 917 Carroll, S. B.; Laughon, A.; Thalley, B. S. (1988). Expression, function, and regulation of the hairy
 918 segmentation protein in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development* 2, 883-890.
 919
- 920 Châline, N.; Sandoz, J. C.; Martin, S. J.; Ratnieks, F. L. W.; Jones, G. R. (2005). Learning and
 921 discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honey bees (*Apis mellifera*). *Chemical*
 922 *Senses* 30, 327-335.
 923
- 924 Chaudhari, S. S.; Arakane, Y.; Specht, C. A.; Moussian, B.; Boyle, D. L.; Park, Y.; Kramer, K. J.;
 925 Beerman, R. W.; Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the
 926 newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Science* 108, 17028-
 927 17033.
 928
- 929 Chaudhari, S. S.; Arakane, Y.; Specht, C. A.; Moussian, B.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S.;
 930 Beeman, R. W. (2013). Retroactive maintains cuticle integrity by promoting trafficking of
 931 Knickkopf into the procuticle of *Tribolium castaneum*. *PLoS Genetics* 9, e1003268.
 932
- 933 Chaudhari, S. S.; Moussian, B.; Specht, C. A.; Arakane, Y.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.;
 934 Muthukrishnan, S. (2014). Functional specialization among members of Knickkopf family of
 935 proteins in insect cuticle organization. *PLoS Genetics* 10, e1004537.
 936
- 937 Chen, L.; O'Keefe, S. L.; Hodgetts, R. B. (2002). Control of Dopa decarboxylase gene expression
 938 by the Broad-complex during metamorphosis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 119, 145-
 939 156.
 940
- 941 Cornman, R. S.; Willis, J. H. (2009). Annotation and analysis of low-complexity protein families of
 942 *Anopheles gambiae* that are associated with cuticle. *Insect Molecular Biology* 18, 607-622.
 943
- 944 Dai, F.; Qiao, L.; Tong, X.; Cao, C.; Chen, P.; Chen, J.; Lu, C.; Xiang, Z. (2010). Mutations of an
 945 arylalkylamine-*N*-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant.
 946 *The Journal of Biological Chemistry* 285, 19553-19560.
 947
- 948 Dani, F.R.; Jones, G.R.; Destri, S.; Spencer, S.H.; Turillazzi, S. (2001). Deciphering the recognition

- signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Animal Behaviour* 62, 165-171.
- Dani, F. R.; Jones, G. R.; Corsi, S.; Beard, R.; Pradella, D.; Turillazzi, S. (2005). Nestmate recognition cues in the honey bee: differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chemical Senses* 30, 477-489.
- Davis, M. M.; O'Keefe, S. L.; Primrose, D. A.; Hodgetts, R. B. (2007). A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development* 134, 4395- 4404.
- Edney, E. B. (1967). Water balance in desert arthropods. *Science* 156, 1059-1065.
- Elias-Neto, M.; Soares, M. P. M.; Simões, Z. L. P.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G. (2010). Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 241-251.
- Elias-Neto, M.; Nascimento, A. L. O.; Bonetti, A. M.; Nascimento, F. S.; Mateus, S.; Garófalo, C. A.; Bitondi, M. M. G. (2013). Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie* 45, 397-408.
- Falcón, T.; Ferreira-Caliman, M. J.; Nunes, F. M. F.; Tanaka, E. D.; Nascimento, F. S.; Bitondi, M. M. G. (2014). Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50, 68-81.
- Fay, D. S.; Gerow, K. (2013). A biologist's guide to statistical thinking and analysis. In O. Hobert (Ed.). *Wormbook*. DOI: doi/10.1895/wormbook.1.159.1 .
- Ferreira-Caliman, M.J.; Nascimento, F.S.; Turatti, I.C.; Lopes, N.P.; Zucchi, R. (2010). The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology* 56, 800-804.
- Gagou, M. E.; Kapsetaki, M.; Turberg, A.; Kafetzopoulos, D. (2002). Stage-specific expression of

- the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 141-146.
- Gibbs, A.; Pomonis, J. G. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B, 243-249.
- Gibbs, A. G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology* 48, 391-400.
- Gorman, M. J.; Arakane, Y. (2010). Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 67-73.
- Grabherr, M. G.; Haas, B. J.; Yassour, M.; Levin, J. Z.; Thompson, D. A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; Chen, Z.; Mauceli, E.; Hacohen, N.; Gnirke, A.; Rhind, N.; di Palma, F.; Birren, B. W.; Nusbaum, C.; Lindblad-Toh, K.; Friedman, N.; Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 15, 644-652.
- Guan, X.; Middlebrooks, B. W.; Alexander, S.; Wasserman, S. A. (2006). Mutation of TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science* 103, 16794-16799.
- Haas, B. J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P. D.; Bowden, J.; Couger, M. B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; Macmanes, M. D.; Ott, M.; Orvis, J.; Pochet, N.; Strozzi, F.; Weeks, N.; Westerman, R.; William, T.; Dewey, C. N.; Henschel, R.; Leduc, R. D.; Friedman, N.; Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494-1512.
- Hamza, I.; Dailey, H. A. (2012). One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1617-1632.
- Hepburn, H. R. (1985). Structure of integument. In G.A. Kerkut e L.I. Gilbert (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3 (pp. 1-58). Pergamon Press, Oxford.

- 1017
- 1018 Hiruma, K.; Riddiford, L. M.; Hopkins, T. L.; Morgan, T. D. (1985). Roles of dopa decarboxylase
 1019 and phenoloxidase in the melanization of the tobacco hornworm and their control by 20-
 1020 hydroxyecdysone. *Journal of Comparative Physiology B* 155, 659-669.
- 1021
- 1022 Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of
 1023 the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931-949.
- 1024
- 1025 Hopkins, T. L.; Kramer, K. J. (1992). Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology*
 1026 37, 273-302.
- 1027
- 1028 Howard, R. W.; Blomquist, G. J., (2005). Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect
 1029 hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50, 371-393.
- 1030
- 1031 Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large
 1032 gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols* 4, 44-57.
- 1033
- 1034 Huang, D. W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R. A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths
 1035 toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37, 1-13.
- 1036
- 1037 Ikeno, T.; Katagiri, C.; Numata, H.; Goto, S. G. (2011). Causal involvement of *mammalian-type*
 1038 *cryptochrome* in the circadian cuticle deposition rhythm in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Insect*
 1039 *Molecular Biology* 20, 409-415.
- 1040
- 1041 Ioannidou, Z. S.; Theodoropoulou, M. C.; Papandreou, N. C.; Willis, J. H.; Hamodrakas, S. J.
 1042 (2014). CutProtFam-Pred: detection and classification of putative structural cuticular proteins from
 1043 sequence alone, based on profile hidden Markov models. *Insect Biochemistry and Molecular*
 1044 *Biology* 52, 51-59.
- 1045
- 1046 Ito, C.; Goto, S. G.; Shiga, S.; Tomioka, K.; Numata, H. (2008). Peripheral circadian clock for the
 1047 cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of*
 1048 *Science* 105, 8446-8451.
- 1049
- 1050 Jasrapuria, S.; Specht, C. A.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S. (2012). Gene

- 1051 families of cuticular proteins analogous to peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* have
 1052 diverse functions. *PLoS One* 7, e49844.
- 1053
- 1054 Jeong, S.; Rokas, A.; Carroll, S. B. (2006). Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B
 1055 Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell* 125, 1387-1399.
- 1056
- 1057 Jesus, B. M. V.; Garófalo, C. A. (2000). Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis*
 1058 (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie* 31, 503-515.
- 1059
- 1060 Kapheim, K. M.; *et al.* (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to
 1061 group living. *Science*, DOI: 10.1126/science.aaa4788 .
- 1062
- 1063 Kather, R.; Drijfhout, F. P.; Martin, S. J. (2011). Task group differences in cuticular lipids in the
 1064 honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* 37, 205-212.
- 1065
- 1066 Kawasaki, H.; Hirose, S.; Ueda, H. (2002). β FTZ-F1 dependent and independent activation of
 1067 *Edg78E*, a pupal cuticle gene, during the early metamorphic period in *Drosophila melanogaster*.
 1068 *Development, Growth and Differentiation* 44, 419-425.
- 1069
- 1070 King-Jones, K.; Charles, J. P.; Lam, G.; Thummel, C. S. (2005). The ecdysone-enduced *DHR4*
 1071 orphan nuclear receptor coordinates growth and maturation in *Drosophila*. *Cell* 121, 773-784.
- 1072
- 1073 Kozlova, T.; Lam, G. T.; Thummel, C. S. (2009). *Drosophila* DHR38 nuclear receptor is required
 1074 for adult cuticle integrity at eclosion. *Developmental Dynamics* 238, 701-707.
- 1075
- 1076 Kramer, J. K.; Dziadik-Turner, C.; Koga, D. (1985). Chitin metabolism in insects. In G. A. Kerkut e
 1077 L. I. Gilbert (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3 (pp
 1078 75-115). Pergamon Press, Oxford.
- 1079
- 1080 Kramer, K. J.; Koga, D. (1986). Insect chitin: physical state, degradation and metabolic regulation.
 1081 *Insect Biochemistry* 16, 851-877.
- 1082
- 1083 Kucharski, R.; Maleszka, J.; Maleszka, R. (2007). Novel cuticular proteins revealed by the honey
 1084 bee genome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 128-134.

1085

1086 Lam G. T.; Jiang, C.; Thummel, C. S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression
1087 by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.

1088

1089 Lam, G.; Hall, B. L.; Bender, M.; Thummel, C. S. (1999). *DHR3* is required for the prepupal–pupal
1090 transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental*
1091 *Biology* 212, 204-216.

1092

1093 Lavorgna, G.; Karim, F. D.; Thummel, C. S.; Wu, C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid
1094 receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proceedings of the*
1095 *National Academy of Sciences* 90, 3004-3008.

1096

1097 Lloyd, V.; Ramaswami, M.; Krämer, H. (1998). Not just pretty eyes: *Drosophila* eye-colour
1098 mutations and lysosomal delivery. *Trends in Cell Biology* 8, 257-259.

1099

1100 Locke, M.; Krishnan, N. (1971). The distribution of phenoloxidas and polyphenols during cuticle
1101 formation. *Tissue & Cell* 3, 103-126.

1102

1103 Locke, M. (2001). The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental problems in biology.
1104 *Journal of Insect Physiology* 47, 495-507.

1105

1106 Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative*
1107 *Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 89, 595-645.

1108

1109 Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S. (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for
1110 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.

1111

1112 Lozano, J.; Belles, X. (2014). Tole of Methoprene-tolerant (Met) in adult morphogenesis and in
1113 adult ecdysis of *Blattella germanica*. *PLoS One* 9, e103614.

1114

1115 Luo, C. W.; Dewey, E. M.; Sudo, S.; Ewer, J.; Hsu, S. Y.; Honegger, H. W.; Hsueh, A. J. W. (2005).
1116 Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cysteine knot protein that
1117 activates G protein- coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Science* 102,
1118 2820-2825.

- 1119
- 1120 Luschnig, S.; Bätz, T.; Armbruster, K.; Krasnow, M. A. (2006). *serpentine* and *vermiform* encode
- 1121 matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in
- 1122 *Drosophila*. *Current Biology* 16, 186-194.
- 1123
- 1124 Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
- 1125 *EMBnet.journal* 17, 10-12.
- 1126
- 1127 Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees*. Harvard University Press, Massachusetts.
- 1128
- 1129 Miller, J. R.; Koren, S.; Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for the next-generation sequencing
- 1130 data. *Genomics* 95, 325-327.
- 1131
- 1132 Miyazaki, S.; Okada, Y.; Miyakawa, H.; Tokuda, G.; Cornette, R.; Koshikawa, S.; Maekawa, K.;
- 1133 Miura, T. (2014). Sexually dimorphic body color is regulated by sex-specific expression of *Yellow*
- 1134 gene in ponerine ant, *Diacamma* sp. *PLoS One* 9, e92875.
- 1135
- 1136 Moussian, B.; Schwarz, H.; Bartoszewski, S.; Nüsslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in
- 1137 exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology* 264, 117-130.
- 1138
- 1139 Moussian, B.; Tång, E.; Tonning, A.; Helms, S.; Schwarz, H.; Nüsslein-Volhard, C.; Uv, A. E.
- 1140 (2006). *Drosophila* Knickkopf and Retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle
- 1141 differentiation through their specific requirement for chitin filament organization. *Development* 133,
- 1142 163-171.
- 1143
- 1144 Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H.; Arakane, Y.; Kramer, K. J. (2012). Chitin metabolism in
- 1145 insects. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Gilbert, L. I. (Ed). Elsevier Academic Press,
- 1146 San Diego, 193-235.
- 1147
- 1148 Noh, M.Y.; Kramer, K.J.; Muthukrishnam, S.; Kanost, M.R.; Beeman, R.W.; Arakane, A. (2014).
- 1149 Two major cuticular proteins are required for assembly of horizontal laminae and vertical pore
- 1150 canals in rigid cuticle of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 53, 22-
- 1151 29.
- 1152

- 1153 Noh, M.Y.; Muthukrishnam, S.; Kramer, K.J.; Arakane, Y. (2015). *Tribolium castaneum* RR-1
 1154 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle. *PLOS Genetics*
 1155 11, e1004963.
 1156
- 1157 Nunes, T. M.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2008). Nestmate
 1158 recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? .
 1159 *Animal Behaviour* 75, 1165-1171.
 1160
- 1161 Osanai-Futahashi, M.; Tatematsu, K. I.; Futahashi, R.; Narukawa, J.; Takasu, Y.; Kayukawa, T.;
 1162 Shinoda, T.; Ishige, T.; Yajima, S.; Tamura, T.; Yamamoto, K.; Sezutsu, H. (2016). Positional cloning
 1163 of a *Bombyx* pink-eyed whit egg locus revelas the major role of cardinal in ommochrome synthesis.
 1164 *Heredity* 116, 135-145.
 1165
- 1166 Paulmier, I.; Bagnères, A. G.; Afonso, C. M. M.; Dusticier, G.; Rivière, G.; Clément, J. L. (1999).
 1167 Alkenes as sexual pheromone in the alfalfa leaf-cutter bee *Megachile rotundata*. *Journal of*
 1168 *Chemical Ecology* 25, 471-490.
 1169
- 1170 Pesch, Y. Y.; Riedel, D.; Patil, K. R.; Loch, G.; Behr, M. (2016). Chitinases and imaginal disc
 1171 growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. *Nature*
 1172 *Scientific Reports* 6, article number:18340.
 1173
- 1174 Piek, T. (1964). Synthesis of wax in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*
 1175 10, 563-572.
 1176
- 1177 Rebers, J. E.; Riddiford, L. M. (1988). Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle
 1178 gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *Journal of Molecular Biology* 203, 411-423.
 1179
- 1180 Reimand, J.; Kull, M.; Peterson, H.; Hansen, J.; Vilo, J. (2007). g:Profiler—a web-based toolset for
 1181 functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Research* 35, W193-
 1182 W200.
 1183
- 1184 Reimand, J.; Arak, T.; Vilo, J. (2011). g:Profiler - a web server for functional interpretation of gene
 1185 lists (2011 update). *Nucleic Acids Research* 39, W307-W315.
 1186

- 1187 Riddiford, L. M. (1976). Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. *Nature*
1188 259, 115-117.
1189
- 1190 Robinson, M. D.; Smyth, G. K. (2008). Small sample estimation of negative binomial dispersion,
1191 with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9, 321–332.
1192
- 1193 Ruaud, A. F.; Lam, G.; Thummel, C. S. (2010). The *Drosophila* nuclear receptors DHR3 and β FTZ-
1194 F1 control overlapping developmental responses in late embryos. *Development* 137, 123-131.
1195
- 1196 Sadd, B. M.; *et al.* (2015). The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial
1197 organization. *Genome Biology* 16:76, DOI: 10.1186/s13059-015-0623-3 .
1198
- 1199 Schmieder, R.; Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.
1200 *Bioinformatics* 27, 863-864.
1201
- 1202 Shamim, G.; Ranjan, S. K.; Pandey, D. M.; Ramani, R. (2014). Biochemistry and biosynthesis of
1203 insect pigments. *European Journal of Entomology* 111, 149-164.
1204
- 1205 Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.;
1206 Schwikowski, B.; Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of
1207 biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13, 2498-2504.
1208
- 1209 Soares, M. P. M.; Silva-Torres, F. A.; Elias-Neto, M.; Nunes, F. M. F.; Simões, Z. L. P.; Bitondi, M.
1210 M. G. (2011). Ecdysteroid-dependent expression of the *Tweedle* and *Peroxidase* genes during adult
1211 cuticle formation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Plos One* 6, e20513.
1212
- 1213 Soares, M. P. M.; Barchuk, A. R.; Simões, A. C. Q.; Cristino, A. S.; Freitas, F. C. P.; Canhos, L. L.;
1214 Bitondi, M. M. G. (2013). Genes involved in thoracic exoskeleton formation during the pupal-to-
1215 adult molt in a social insect model, *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 14, 576.
1216
- 1217 Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more – types, structural models, biological
1218 functions, and formation routes. *New Journal of Science* 2014, Article ID 498276.
1219 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/498276> .
1220

- 1221 Song, Q. (2012). Bursicon, a neuropeptide hormone that controls cuticle tanning and wing
 1222 expansion. In L. I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology* (pp. 93-105). Academic Press, Amsterdam;
 1223 Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore;
 1224 Sydney; Tokyo.
- 1225
- 1226 Sonnhammer, E. L. L.; Östlund, G. (2014). InParanoid 8: ortology analysis between 273 proteomes,
 1227 mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Research* 43, D234-D239.
- 1228
- 1229 Stubenhaus, B. M.; Dustin, J. P.; Neverett, E. R.; Beaudry, M. S.; Nadeau, L. E.; Burk-McCoy, E.;
 1230 He, X.; Pearson, B. J.; Pellettieri, J. (2016). Ligh-induced depigmentation in planarians models the
 1231 pathphysiology of acute porphyrias. *eLife* 5, e14175.
- 1232
- 1233 Sugumaran, M. (2009). Complexities of cuticular pigmentation in insects. *Pigment Cell &*
 1234 *Melanoma Research* 22, 523-525.
- 1235
- 1236 Suzuki, R.; Shimodaira, H. (2006). Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in
 1237 hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540-1542.
- 1238
- 1239 Tellam, R. L.; Vuocolo, T.; Johnson, S. E.; Jarmey, J.; Pearson, R. D. (2000). Insect chitin synthase:
 1240 cDNA sequence, gene organization and expression. *European Journal of Biochemistry* 267, 6025-
 1241 6042.
- 1242
- 1243 Thummel, C. S.; Burtis, K. C.; Hogness, D. S. (1991). Spatial and temporal patterns of *E74*
 1244 transcription during *Drosophila* development. *Cell* 61, 101-111.
- 1245
- 1246 Togawa, T.; Dunn, W. A.; Emmons, A. C.; Willis, J. (2007). CPF and CPFL, two related gene
 1247 families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. *Insect Biochemistry*
 1248 *and Molecular Biology* 37, 675-688.
- 1249
- 1250 Togawa, T.; Dunn, W. A.; Emmons, A. C.; Nagao, J.; Willis, J. H. (2008). Developmental
 1251 expression patterns of cuticular protein genes with the R&R Consensus from *Anopheles gambiae*.
 1252 *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 508-519.
- 1253
- 1254 Trapnell, C.; Pachter, L.; Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-

- Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111.
- Trapnell, C.; Williams, B. A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M. J.; Salzberg, S. L.; Wold, B. J.; Pachter, L. (2010). Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology* 28, 511-515.
- Trapnell, C.; Roberts, A.; Goff, L.; Pertea, G.; Kim, D.; Kelley, D. R.; Pimentel, H.; Salzberg, S. L.; Rinn, J. L.; Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* 7, 562-578.
- Ureña, E.; Manjón, C.; Franch-Marro, X.; Martín, D. (2014). Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 7024-7029.
- Wagner, D.; Brown, M.J.F.; Broun, P.; Cuevas, W.; Moses, L.E.; Chao, D.L.; Gordon, D.M. (1998). Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of the harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Chemical Ecology* 24, 2021-2037.
- Warnes, G. R.; Bolker, B.; Bonebakker, L.; Gentleman, R.; Liaw, W. H. A.; Lumley, T.; Maechler, M.; Magnusson, A.; Moeller, S.; Schwartz, M.; Venables, B. (2015). gplots: various R programming tools for plotting data. R package version 2.16.0. Disponible en: <<http://CRAN.R-project.org/package=gplots>>.
- West-Eberhard, M. J. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proceedings of the National Academy of Science* 102, 6543-6549.
- Willis, J. H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature and sequence characteristics in the genomic era. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 189-204.
- Wilson, E. O. (1975). Sociobiology. *The New Synthesis*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wilson, L. A.; Werneburg, I. (2014). Quantifying evolutionary development using non-model

- organisms: integrating morphology, metrical frameworks, and gene expression. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 322, 555 – 557.
- Wingender, E.; Chen, X.; Hehl, R.; Karas, H.; Liebich, I.; Matys, V.; Meinhardt, T.; Prüß; Reuter, I.; Schacherer, F. (2000). TRANSFAC: and integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Research* 28, 316-319.
- Wittkopp, P. J.; True, J. R.; Carroll, S. B. (2002). Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* 129, 1849-1858.
- Wood, O. R.; Hanrahan, S.; Coetzee, M.; Koekemoer, L. L.; Brooke, B. D. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors* 3:67.
- Wright, T. R. F. (1987). The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics* 24, 127-222.
- Xi, Y.; Pan, P. L.; Ye, Y. X.; Yu, B.; Zhang, C. X. (2014). Chitin deacetylase family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology* 23, 695-705.
- Yao, Q.; Zhang, D.; Tang, B.; Chen, J.; Chen, J.; Lu, L.; Zhang, W. (2010). Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PloS ONE* 5, e14058.
- Zander, R. H. (2004). Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. *PhyloInformatics* 2, 1-13.
- Zhou, B.; Hiruma, K.; Jindra, M.; Shinoda, T.; Segraves, W. A.; Malone, F.; Riddiford, L. M. (1998a). Regulation of the transcription factor E75 by 20- hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Developmental Biology* 193, 127-138.
- Zhou, B.; Hiruma, K.; Shinoda, T.; Riddiford, L. M. (1998b). Juvenile hormone prevents

- ecdysteroid-induced expression of Broad Complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 203, 233-244.
- Zhou, B.; Riddiford, L. M. (2001). Hormonal regulation and patterning of the broad- complex in the epidermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 231, 125-137.
- Zhou, X.; Riddiford, L. M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the ‘status quo’ action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 129, 2259-2269.
- Zhu, Q.; Arakane, Y.; Beeman, R. W.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S. (2008). Functional specialization among insect chitinase Family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Science* 105, 6650-6655.
- Zitnam, D.; Adams, M. E. (2012). Neuroendocrine regulation of ecdysis. Gilbert, L. I. (Ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, 253-309.
- Zufelato, M. S.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P.; Hartfelder, K. (2000). The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod Structure and Development* 19, 111-119.
- Fig 1. Venn diagrams constructed with the genes and contigs differentially expressed in the integument of the developmental phases of (A) *A. mellifera*, (B) *F. varia*, and (C) *C. analis*. The number of genes upregulated in each pairwise comparison is indicated. Pbm: pharate adults (adult cuticle in process of melanization); Ne: newly-emerged bee; Fg: foragers.**
- Fig 2. Featured Gene Ontology (GO) categories related to integument development and maturation.** The X-axis indicates the number of genes (or contigs) found for each featured category (Y-axis). The functional categories more represented in the younger phases (Pbm and Ne) than in Fg are indicated as Younger>Fg, and those more represented in the older phases (Ne and Fg)

than in Pbm are reported as Older>Pbm. The green box indicates GO categories related to the epidermis differentiation. The purple box indicates GO categories related to cuticle formation and differentiation. The black box indicates GO categories related to the CHC pathway. The yellow box represents GO categories related to non-melanin pigmentation pathway.

Fig 3. Summary of the distance correlation analysis based on gene expression in the developing integument. The left column indicates the gene class analyzed; the three central columns represents the Pbm, Ne and Fg developmental phases; the bee species are at the right column. The color-filled rectangles (yellow for Pbm, red for Ne, and blue for Fg) indicate that the three samples of each developmental phase clustered together with a support ≥ 95 . The stars mark the developmental phases that clustered together with a support ≥ 95 while the circles mark the developmental phases clustering together with a support < 95 . Dotted lines separate the results for each gene class.

Fig 4. Genes showing correlated expression profiles through the developmental phases: pharate adults (Pbm), newly-emerged (Ne) and foragers (Fg). Color key in the bottom of figure. The basal line in some graphic representations indicates that the gene expression was not detected.

Fig 5. Intersection network representing the common interactions found in eusocial species systems.

Fig 6. TEM of abdominal integuments of eusocial (*A. mellifera*, *F. varia*), primitively eusocial (*B. brasiliensis*), facultatively social (*E. cordata*), and solitary (*C. analis*, *T. diversipes*) bees. (A-C): left, Pbm; middle, Ne; right, Fg. (D-F): left, Ne; right, Fg. (A) cuticle deposition of *A. mellifera* workers from 0h to 96h after adult emergence. (A-C) *A. mellifera*, *F. varia*, and *C. analis*. (D-F) *B. brasiliensis*, *E. cordata*, and *T. diversipes*. The junction cuticle/epidermis was used to align the cuticle images. The scales are on the bottom right of each image. Red values indicate the thickness $\pm$ standard deviation for each phase in μm . Different lowercase letters indicate significant statistical difference between the developmental phases of each species. The sample number of each phase is indicated by 'N' above each image. Adjusted p-values: (A) Pbm X Ne0h = 1; Pbm X Ne24h = 0.83542; Pbm X Ne48h = 1; Pbm X Ne72h = 0.01028; Pbm X Ne96h = 0.00183; Pbm X Fg = 0.00048; Ne0h X Ne24h = 0.23432; Ne0h X Ne48h = 0.65684; Ne0h X Ne72h = 0.00243; Ne0h X Ne96h = 0.00042; Ne0h X Fg = 0.00009; Ne24h X Ne48h = 1; Ne24h X Ne72h = 0.93256; Ne24h X Ne96h = 0.18624; Ne24h X Fg = 0.02787; Ne48h X Ne72h = 0.77729; Ne48h X Ne96h = 0.17012; Ne48h X Fg = 0.02497; Ne72h X Ne96h = 1; Ne72h X Fg = 1; Ne96h X Fg = 1; (B) Pbm X Ne = 0.4010813; Pbm X Fg = 0.6170525; Ne X Fg = 0.9092987; (C) Pbm X Ne = 0.0003049; Pbm X Fg = 0.0002672; Ne X Fg = 0.7978988; (D) Ne X Fg = 0.4192; (E) Ne X Fg = 0.8867291; (F) Ne X Fg = 0.903437.

Figure 7 - Genes (arrows) showing expression profiles consistent with the hypothesis of cuticle

maturation heterochrony related to the solitary or social way of life (the question marks indicate inferences non-supported by experimentation). The three first series show the gene lists and electron micrographs of the developing integument (epidermis and cuticle) of *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis*, respectively. The genes listed in the two series below were extrapolated for the social and solitary/facultatively social species. The onset of adult cuticle formation is regulated by the decrease in the ecdysteroid titer after the apolysis-triggering peak. Bee images were taken at the following developmental stages: pupal (Pw); pupa undergoing apolysis (Pp); pharate-adults (Pbm and Pbd); newly-emerged bee (Ne); forager (Fg).

Supporting information

S1 Fig. Samples' correlation heat maps from total RNA-seq data. (A) *A. mellifera*; (B) *F. varia*; (C) *C. analis*.

S2 Fig. GO results for the comparisons Younger>Fg and Older>Pbm from integument. Dashed lines separate the results per comparison/species. BP – Biological Process; CC – Cellular Component; and MF – Molecular Function.

S3 Fig. Distances between developmental phases in agreement with the gene expression/group of genes. For each group of expressed genes, there are figures: (A) *A. mellifera*; (B) *F. varia*; and (C) *C. analis*. Green values (AU) are the cluster support. Red values (BP) are the bootstrap support. For clusters significance, we considered AU values. In gray: branch edges. Arrows indicate the significant clusters with, at least, one developmental phase entirely represented. Pbm = pharate adult with dark eyes and medium body pigmentation. Ne = newly emerged. Fg = forager. Dashed lines separate each group of expressed genes.

S4 Fig. Representative heat maps of gene expression profiles per process involved in cuticle's formation. For each process: (A) *A. mellifera*; (B) *F. varia*; (C) *C. analis*. Different letters for each gene means significant statistical differences (see **Materials and Methods**) between the expression of the developmental phases of a species. Genes grouped per expression profile.

S5 Fig. Positive correlation co-expression networks for the genes putatively involved in adult cuticle formation/maturation of *A. mellifera*.

S6 Fig. Positive correlation co-expression networks for the genes putatively involved in adult cuticle formation/maturation of *F. varia*.

S7 Fig. Positive correlation co-expression networks for the genes putatively involved in adult cuticle formation/maturation of *C. analis*.

S8 Fig. Clusters of developmental phases of *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis* based on the

total CHC profile (top left), n-alkanes (top right), unsaturated CHC bottom (left), and branched CHC (bottom right). Red boxes indicate the main significant clusters with 95% of confidence. Arrows indicate significant cluster support (AU and BP values) that discriminate the developmental phases inside the larger clusters. AU (red values): clusters' support; BP (green values): bootstrap support; Edges (gray values): branches' edges. Pbm: pharate-adults with intermediate cuticle pigmentation; Ne: newly emerged adults; Fg: forager bees.

S1 Table. Genes that presented a significant correlation of expression profiles between species.

Blue values: a positive correlation. Red values: a negative correlation. Yellow highlighting: $0.05 < p\text{-value} < 0.1$.

S2 Table. The average proportion of CHC classes per developmental phase of *T. diversipes*.

S3 Table – Structural cuticular proteins from the different classes previously reported for *A. mellifera* and other hymenopterans (Willis, 2010; Sadd *et al.*, 2015) and now identified by the RNA-seq analysis of the integument of *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis*.

S1 File. List of genes found in RNA-seq analysis of *A. mellifera*, *F. varia* and *C. analis* integuments. This file contains gene abbreviations used in this paper, sequences ID and in the case of *de novo* assembly orthology relationships in comparison with *A. mellifera* genes.

S2 File. More expressed genes in each developmental phase comparison of each species.

S3 File. CHC profiles found per species and variable contribution (total and per comparison) and mass quantification.