UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Genes cuticulares diferencialmente expressos
durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera*

Michelle Prioli Miranda Soares

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO -SP

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Genes cuticulares diferencialmente expressos
durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera*

Michelle Prioli Miranda Soares

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Maria Gentile Bitondi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO -SP

2012

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.

Soares, Michelle Prioli Miranda

Genes cuticulares diferencialmente expressos durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera*. RIBEIRÃO PRETO 2012.

159p.: il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

Orientadora: Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. metamorfose 2. genes cuticulares 3. exoesqueleto
4. *Apis mellifera* 5. ecdisteróides

Foto capa: Mark Berkery

*U*_m dia,

uma pequena abertura apareceu em um casulo. Um homem sentou e observou a borboleta por várias horas conforme ela se esforçava para fazer com que seu corpo passasse através daquele pequeno buraco. Então pareceu que ela parou de fazer qualquer progresso. Parecia que ela tinha ido o mais longe que podia, e não conseguia ir mais longe. Então o homem decidiu ajudar a borboleta, ele pegou uma tesoura e cortou o restante do casulo. A borboleta então saiu facilmente. Mas seu corpo estava murcho e era pequeno e tinha as asas amassadas.

O homem continuou a observar a borboleta porque ele esperava que, a qualquer momento, as asas dela se abrissem e esticassem para serem capazes de suportar o corpo, que iria se afirmar a tempo.

Nada aconteceu. Na verdade, a borboleta passou o resto da sua vida rastejando com um corpo murcho e asas encolhidas. Ela nunca foi capaz de voar. O que o homem, em sua gentileza e vontade de ajudar, não compreendia era que o casulo apertado e o esforço necessário à borboleta para passar através da pequena abertura era o modo com que Deus fazia com que o fluido do corpo da borboleta fosse para as suas asas de modo que ela estaria pronta para voar uma vez que estivesse livre do casulo.

Algumas vezes, o esforço é justamente o que precisamos em nossa vida. Se Deus nos permitisse viver nossa vida sem quaisquer obstáculos nós não iríamos ser tão fortes como poderíamos ter sido. Nós nunca poderíamos voar.

Maria Salette e Wilma Ruggeri
(Conto: A lição da Borboleta)

Dedicatória

Ao meu pai, Francisco Carlos, fonte de minha admiração, meu ponto de apoio.

À minha mãe, Maria Regina, companheira e dedicada, meu porto seguro.

Aos meus maiores exemplos de vida, que
inspiram meu caminho, **dedico ...**

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos à Prof^ª Dr^a Márcia Maria Gentile Bitondi, que me acolheu em seu laboratório e me orientou no desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação, compreensão e seriedade são características que sempre me fizeram admirá-la, não apenas como pesquisadora, mas também, como pessoa.

Ao Prof^º Angel Roberto Barchuk pela coorientação na elaboração e desenvolvimento de meu doutorado, além de todo suporte na realização dos experimentos de *microarray*. Suas instruções e conselhos foram muito valiosos.

À Prof^ª Dr^a Zilá Luz Paulino Simões pelas valiosas contribuições, por todo suporte e convivência.

À Vera Lucia Castelo Figueiredo pelo suporte indispensável no laboratório e ao Luis Roberto Aguiar pela obtenção do material biológico no apiário experimental do Departamento de Genética (FMRP-USP).

Ao Prof^º Dr. Marco Antônio Zago (Laboratório de Hematologia, HC-FMRP-Ribeirão Preto) e à Prof^ª Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos (Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas, FCAV-Unesp-Jaboticabal) que permitiram o uso do aparelho para escanear as lâminas dos *microarrays*.

À Prof^ª Dr^a Ana Carolina Quirino Simões (Universidade Federal do ABC) pelo processamento computacional e análises estatísticas dos dados dos *microarrays*.

Aos queridos amigos, Rodrigo Pires Dallacqua e Livia Maria Moda, por toda ajuda na realização das hibridações *in situ* e pelo manuseio do microscópio confocal para obtenção das imagens.

À Ana Durvalina Bontorim, companheira na realização dos *microarrays* e análises dos dados, juntas enfrentamos este novo desafio.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA), em especial aos amigos Moysés Elias-Neto, Flávia Freitas, Aline Aleixo, Francis Nunes, Tathyana Mello, Karina Lazzarini, Marcela Laure, Claudinéia Costa, Vanessa Bonatti, Omar (Xexe) Martínez, Tiago Falcon e Luiza Canhos, pelo convívio dia-a-dia ao longo destes

anos e pela companhia nos congressos por quais participamos. À minha querida amiga Fernanda Andrade Silva Torres, que também já fez parte desta turma de *abelhudos*, por todos os momentos de conforto e reflexão.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada e, em especial, às secretárias, Renata Andrade Cavallari e Vera Cassia Cicilini de Lucca, por sua competência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2007/04314-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo suporte científico e financeiro.

Aos professores, Prof^o Dr. Xavier Bellés e da Prof^a Dr^a Maria Dolors Piulachs, pela oportunidade em realizar um estágio no Institut de Biologia Evolutiva (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universitat Pompeu Fabra) em Barcelona, Espanha. Aos alunos de pós-graduação Mercedes Rubio, Alba Herraiz e Jesus Lozano por me acolherem como membro da equipe do laboratório e, em especial, ao Jia-Hsin Huang e a Érica Tanaka por todo o suporte nos árduos experimentos de hibridação *in situ* e pelos momentos de descontração.

À minha família, pelo apoio e carinho. Em especial aos meus pais (Francisco e Regina), à minha irmã (Poliana), ao meu avô (Eraldo Prioli) e a todos os meus tios, tias e primos. Também não poderia deixar de agradecer à Rita, parte de nossa família de coração, sua dedicação ao longo desses 20 anos é de valor inestimável.

Aos meus pais, minha imensa gratidão por me darem a oportunidade de estudar com qualidade, sempre me incentivando em meus desafios. Seu apoio e dedicação tornaram possível a conclusão de mais um ciclo da minha vida acadêmica.

À minha irmã, que me acolheu com seu enorme coração, por sua atenção, carinho, descontração e por todos os momentos especiais que compartilhamos.

De maneira muito especial ao Felipe Grande Martelli, que me surpreendeu com sua maturidade, sinceridade, amizade e amor, pelas vibrações positivas e pelas intensas reflexões. Seu apoio e confiança foram imprescindíveis para a conclusão desta etapa de minha vida.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram na elaboração deste trabalho de doutorado, mas cujos nomes não foram mencionados. Sua contribuição foi de igual significância, de forma que, além de meus agradecimentos, ficam registradas minhas sinceras desculpas.

RESUMO

SOARES, M. P. M. Genes cuticulares diferencialmente expressos durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera*. Ph.D. Thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A cutícula dos insetos é composta principalmente por uma variedade de proteínas que interagem com filamentos de quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, para formar um envoltório rígido que protege e dá forma ao organismo. O crescimento dos insetos depende da renovação periódica da cutícula, que se desprende durante a apólise e é digerida enquanto a epiderme sintetiza uma nova cutícula substituta. Tal renovação caracteriza a muda e metamorfose e é coordenada por hormônios, com destaque para os ecdisteróides. O atual trabalho objetivou caracterizar a expressão diferencial de genes do tegumento (cutícula e epiderme subjacente), além de elucidar aspectos de regulação e função no contexto da muda e metamorfose, com foco nos genes codificadores de proteínas estruturais e enzimas cuticulares. Para este fim, utilizamos o tegumento de fases específicas da muda pupal-adulta, isto é, de pupas (Pw), de pupas em apólise (Pp) e de adultas faratas (Pbl) para análises de *microarrays* de cDNA.

As análises dos *microarrays* mostraram 761 e 1173 genes diferencialmente expressos nos tegumentos de adultas faratas (Pbl) em comparação com pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp), respectivamente. A categorização destes genes, segundo os critérios do *Gene Ontology*, distinguiu totalmente o tegumento de adultas faratas (Pbl) dos tegumentos de pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp) tanto em relação ao critério “Processo Biológico” quanto em relação à “Função molecular”, evidenciando grande mudança na expressão gênica durante a construção do exoesqueleto definitivo nas adultas faratas (Pbl).

Os *microarrays* mostraram aumento estatisticamente significativo da expressão de 24 genes cuticulares no tegumento de adultas faratas. Este resultado foi validado por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para 23 destes genes (*AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, *AmelCPR30*, *apd-1*, *apd-2*, *apd-3*, *CPLCP1*, *Am-C*, *Am-D*, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2*, *GB12449*, *GB12811* e *GB11550*), e por RT-PCR semiquantitativa

para o gene *Amlac2*. Além disto, a maior expressão de outros 2 genes cuticulares (*AmelCPR1* e *AmelCPR2*) em adultas faratas foi demonstrada por qRT-PCR. Estes genes cuticulares positivamente regulados no tegumento de adultas faratas (Pbl) devem estar envolvidos com a formação e diferenciação do exoesqueleto definitivo. O aumento da expressão gênica neste período da muda (Pbl) é regulado pela variação do título de ecdisteróides e ocorre enquanto o título deste hormônio decai, após ter atingido o pico indutor da apólise na fase de desenvolvimento precedente (Pp).

Ao contrário, as análises por qRT-PCR mostraram que 2 outros genes cuticulares (*AmelCPF1* e *AmelCPR1*) são negativamente regulados no tegumento de adultas faratas em comparação com pupas, sugerindo que são específicos de cutícula pupal. Estes genes foram inibidos pelo aumento dos níveis de ecdisteróides, que induz a apólise.

Vinte e um entre os 24 genes cuticulares diferencialmente expressos nos *microarrays* codificam proteínas pertencentes às famílias CPF, CPR, Apidermina, CPLCP, Análoga a peritrofina e Tweedle. Os outros 3 genes diferencialmente expressos (*GB12449*, *GB12811*, *GB11550*) não tinham sido ainda caracterizados como genes cuticulares. Dois deles, *GB12449* e *GB12811*, foram sequenciados para validação da predição e para a caracterização das respectivas estruturas genômicas. Experimentos de hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) nos permitiram localizar altos níveis de transcritos destes genes no citoplasma de células da epiderme de adultas faratas, sugerindo fortemente sua natureza cuticular e envolvimento na construção do exoesqueleto definitivo.

O presente estudo consiste na primeira análise global de expressão de genes do tegumento de uma espécie de himenóptero social. Os resultados apresentados levaram à identificação de genes com expressão associada à muda pupal-adulta e formação do exoesqueleto definitivo. Este trabalho contribui com novos dados moleculares para o aprofundamento do conhecimento da metamorfose de *A. mellifera*.

ABSTRACT

SOARES, M. P. M. Microarray analysis of genes expressed in the context of *Apis mellifera* metamorphosis. Ph.D. Thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The insect cuticle is mainly composed of proteins that interact with chitin filaments to form a rigid structure that protects and shapes the organism. Insects grow through the periodic renewal of the cuticle, which is shed at each apolysis episode, and subsequently digested while the epidermis synthesizes the cuticle of the next stage. These molting events are coordinated by hormones, mainly ecdysteroids. The current work aimed to characterize differential gene expression in the integument (cuticle and underlying epidermis) during the ecdysteroid-regulated pupal-to-adult molt. Special attention was given to the structure and expression of genes encoding proteins and enzymes involved in cuticle formation and differentiation. To achieve these goals, we used thoracic integument of newly-ecdysed pupae (Pw), pupae in apolysis (Pp) and pharate adults (Pbl) in cDNA microarray analyses.

The microarray analysis showed 761 and 1173 differentially expressed genes in the pharate adult integument (Pbl) in comparison to pupae (Pw) or pupae in apolysis (Pp), respectively. Gene Ontology terms for “Biological Process” and “Molecular Function” completely distinguished the integument of pharate adults (Pbl) from the integument of pupae (Pw) or pupae in apolysis (Pp).

The microarray analysis discriminated 24 cuticular genes with a significant expression increase in the pharate adult integument. This was validated by real time RT-PCR analysis (qRT-PCR) for 23 of these genes (*AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, *AmelCPR30*, *apd-1*, *apd-2*, *apd-3*, *CPLCP1*, *Am-C*, *Am-D*, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2*, *GB12449*, *GB12811* and *GB11550*), and by semiquantitative RT-PCR for *Amlac2*. In addition, the increased expression of other two cuticular genes (*AmelCPR1* and *AmelCPR2*) was confirmed by qRT-PCR. These up-regulated cuticular genes in pharate adult integument apparently are involved in adult cuticle formation and differentiation, which occurs while the ecdysteroids titers decay, after reaching the peak that induces apolysis in the preceding phase (Pp).

In contrast, two cuticular genes (*AmelCPF1* e *AmelCPR1*) were confirmed by qRT-PCR analysis as negatively regulated in the integument of pharate adults compared to pupae, suggesting that they are specific to pupal cuticle. Therefore, these genes were inhibited by the increasing ecdysteroid levels that induce apolysis.

Twenty one of the 24 cuticular genes differentially expressed in the microarrays encode proteins belonging to the CPF, CPR, Apidermin, CPLCP, Analogous to peritrofin and Tweedle families. The other three differentially expressed genes (*GB12449*, *GB12811*, *GB11550*) had not yet been assigned as cuticular genes. Two of them (*GB12449* and *GB12811*) were sequenced, thus allowing prediction validation and gene structure characterization. *In situ* hybridization experiments using fluorescent probe (FISH) localized high expression of these genes in the pharate adult epidermis, strongly suggesting their involvement in the construction of the adult exoskeleton.

This study is the first global gene expression analysis of the integument from a social hymenopteran species. The expression of genes in the integument was associated to the molting process and to the adult exoskeleton formation. This work contributes with new molecular data for a deeper understanding of *A. mellifera* metamorphosis.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Aspecto externo e idade cronológica das fases de desenvolvimento de abelhas operárias <i>A. mellifera</i> utilizadas no presente trabalho	36
Tabela II - Desenho experimental dos <i>microarrays</i> utilizando amostras do tegumento de <i>A. mellifera</i>	43
Tabela III - Sequências e temperatura de pareamento dos <i>primers</i> utilizados nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa e quantitativa	46
Tabela IV - Sequências e temperaturas de pareamento dos <i>primers</i> utilizados nos experimentos de hibridação <i>in situ</i>	52
Tabela V - Número de genes do tegumento diferencialmente expressos nas comparações entre Pw/Pp, Pbl/Pw e Pbl/Pp utilizando-se o valor de <i>Fold</i> como critério.	58
Tabela VI - Genes codificadores de proteínas cuticulares diferencialmente expressos no tegumento de abelhas <i>A. mellifera</i> durante a muda pupal-adulta, e similaridade com sequências de proteínas de insetos depositadas no NCBI.....	70
Tabela VII - Características dos 24 genes cuticulares de <i>A. mellifera</i> diferencialmente expressos nos <i>microarrays</i> , tamanho dos respectivos RNAs mensageiros e identificação das famílias de proteínas que codificam	72
Tabela VIII - Características das proteínas cuticulares deduzidas dos 24 genes diferencialmente expressos nos <i>microarrays</i>	73
Tabela IX - Dados de expressão dos genes codificadores de proteínas e enzimas cuticulares detectados nos experimentos de <i>microarrays</i> nas comparações entre pupas (Pw) <i>versus</i> pupas em apólise (Pp), adultas faratas (Pbl) <i>versus</i> pupas (Pw) e adultas faratas (Pbl) <i>versus</i> pupas em apólise (Pp).....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Eventos que levam à formação de uma nova cutícula em relação à variação do título de ecdisteróides. **A.** O tegumento antes da muda; **B.** O aumento nos níveis de ecdisteróides culmina no evento denominado apólise, ou seja, separação entre a cutícula e a epiderme, e criação do espaço exuvial; **C.** Secreção do fluido de muda; **D.** A digestão da cutícula velha e o crescimento da nova cutícula ocorrem quando o título de ecdisteróides diminui; **E.** Ecdise, eliminação da cutícula velha. Os esquemas foram redesenhados de Riddiford (1985) e Klowden (2007).22
- Figura 2** - O desenvolvimento da abelha *A. mellifera*. **A.** Os estágios larval, pupal e adulto são delimitados por ecdises (pontas de flechas) e caracterizados pelo tipo de cutícula externa. **B.** As apólises (flechas) separam as larvas, pupas e adultos de acordo com o tipo de cutícula interna (aderida à epiderme). Durante o período farato, que se estende da apólise até a ecdise, uma nova cutícula é sintetizada e se diferencia embaixo da cutícula precedente. **C.** Fotografias dos estágios do desenvolvimento de *Apis mellifera*. O esquema foi redesenhado de Elias-Neto *et al.* (2008).22
- Figura 3** - Vias bioquímicas da esclerotização cuticular. A tirosina é hidroxilada pela tirosina hidroxilase em 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA), a qual é descarboxilada pela dopa-decarboxilase formando dopamina. A dopamina originará tanto os agentes esclerotizantes, N-acetildopamina (NADA) ou N-β-alanildopamina (NBAD), quanto os pigmentos de melanina. Os precursores da esclerotização cuticular (NADA e NBDA) são enzimaticamente oxidados a *o*-quinonas, que podem reagir espontaneamente com grupos nucleofílicos (HX) de proteínas ou podem ser isomerizados a compostos mais reativos, *p*-quinonas. Estes compostos ainda podem ser isomerizados a dehidro-acildopaminas, que depois de oxidados a quinonas podem reagir com catecóis e originar derivados de dihidroxifenil- dihidrobenzodioxina. As reações químicas envolvidas na esclerotização da cutícula de insetos foram obtidas de Andersen (2005).25
- Figura 4** - Cascata de regulação gênica da metamorfose de *Drosophila* induzida por 20-hidroxiecdisona. Quando 20E se liga ao complexo receptor EcR/USP são acionados os genes de resposta primária (*E74*, *E75A* e *Broad*) que ativarão os genes tardios. Além disto, os genes primários acionarão uma série de outros genes, cujos produtos são fatores de transcrição que ativarão o gene *βFTZ-F1*. O produto deste gene modifica a cromatina de tal modo que, no próximo pulso de 20E, um novo conjunto de genes tardios será ativado. Representação esquemática modificada (Gilbert, 2010; King-Jones *et al.*, 2005).27
- Figura 5** - Desenho dos experimentos de *microarrays*. Comparações diretas entre duas amostras, Pw *versus* Pp (A), Pbl *versus* Pw (B) e Pbl *versus* Pp (C), com *dye swap*, perfazendo um total de dois *arrays* para cada comparação. As flechas ligam as duas amostras que foram co-hibridadas no mesmo *array*, de maneira que, a ponta da flecha representa a marcação com corante Cy3 e a extremidade oposta da flecha indica marcação com o corante Cy5.56

Figura 6 - Proporção de genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* que correspondem às sequências do *Official Gene Set* (OGS) de um total de 995 e 1497 nas respectivas comparações: Pbl *versus* Pw (EXPERIMENTO B) e Pbl *versus* Pp (EXPERIMENTO C). As demais sequências foram lançadas na categoria ‘Outros’.....60

Figura 7 - Proporção de genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* de um total de 761 e 1173 nas respectivas comparações entre etapas distintas do desenvolvimento: adulta farata (Pbl) *versus* pupa (Pw) e adulta farata (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp). A presença ou não de ortólogos em *D. melanogaster* está indicada nas respectivas legendas.....61

Figura 8 - Classificação dos genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* segundo critérios do *Gene Ontology*. A análise foi realizada com os genes que apresentaram ortólogos putativos em *D. melanogaster* nas categorias Processos Biológicos, Funções Moleculares e Componentes Celulares, nas seguintes comparações: (A, B, C) Adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw) e (D, E, F) Adultas faratas (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp).....67

Figura 9 - Representação esquemática dos grupos 2.7 (de 39.000 a 123.500 nucleotídeos), 4.7 (de 1.650.000 a 1.674.000 nucleotídeos) e Un41 (de 36.800 a 48.000 nucleotídeos), perfazendo 8 genes cuticulares na versão 4.0 do genoma de *A. mellifera*: as grandes setas indicam a direção da transcrição. A estrutura dos genes detectados em cada grupo segue anotada. Logo abaixo da anotação gênica, a estrutura dos transcritos segue representada, sendo que os éxons e íntrons estão identificados como caixas e linhas, respectivamente, e o número de nucleotídeos está indicado acima ou abaixo destas representações. A posição dos *primers* usados para quantificar (por RT-PCR em tempo real) ou localizar (por meio de hibridação *in situ*) os transcritos no tegumento está identificada por pequenas flechas de cor preta ou cinza, respectivamente.....74

Figura 10 - Representação esquemática dos 16 genes cuticulares que não se organizam em *clusters* (versão 4.0 do genoma de *A. mellifera*). A estrutura dos genes detectados segue anotada, de maneira que os éxons e íntrons estão identificados como caixas e linhas, respectivamente, e o número de nucleotídeos está indicado acima ou abaixo destas representações. A flecha abaixo da figura indica a direção da transcrição. A posição dos *primers* usados para quantificar (por RT-PCR em tempo real) ou localizar (por meio de hibridação *in situ*) os transcritos no tegumento está identificada por pequenas flechas de cor preta ou cinza, respectivamente.75

Figura 11 - Sequenciamento do GB12449 para resolução das inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2. A. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do GB12449, do banco de dados OGS_preRelease2, com as sequências NP_001167615.1 e XP_001122844.1 do NCBI. B. Sequência nucleotídica do GB12449 validada por sequenciamento e o produto de tradução predito. A região 5’UTR está sublinhada. Em cinza estão localizados os *primers* utilizados para o sequenciamento deste gene.77

Figura 12 - Sequenciamento do GB12811 para resolução das inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2. A. Alinhamento entre a sequência de aminoácidos deduzida do GB12811, constante do banco OGS_preRelease2, e a sequência XP_393452.3 do NCBI. B. Sequência nucleotídica do GB12811 validada por sequenciamento e respectivo produto de tradução predito. A sequência sublinhada corresponde à região 5'UTR. Em cinza estão localizados os *primers* utilizados para o sequenciamento deste gene.....78

Figura 13 – Inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2 para as sequências correspondentes a AmelCPR6, AmelCPR24 e AmelCPR29. Alinhamento entre as sequências similares que constam nos dois bancos de dados. Os símbolos (*), (:) e (.) indicam, respectivamente, aminoácidos idênticos, substituições conservadas e semi-conservadas.....79

Figura 14 - Perfis de expressão (*heatmap*) dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais de *A. mellifera*, de outros possíveis genes codificadores de proteínas cuticulares identificados nos experimentos de *microarrays* e de enzimas envolvidas na diferenciação da cutícula adulta. O *heatmap* foi obtido utilizando a distância euclidiana e método de aglomeração “*complete linkage*”. As cores no mapa indicam a variação na expressão, sendo que o vermelho indica baixa expressão, preto indica expressão intermediária e verde indica alto nível de expressão. A escala das cores está na parte superior esquerda da figura.84

Figura 15 - Perfis de expressão (*heatmap*) dos genes envolvidos na formação e diferenciação da cutícula adulta. O *heatmap* acima apresenta os dados das réplicas técnicas, representadas pela inversão dos corantes Cy3 e Cy5, em cada uma das comparações: Pupas (Pw) *versus* pupas em apólise (Pp), adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw), e adultas faratas (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp). Este *heatmap* foi obtido utilizando a distância euclidiana e método de aglomeração “*complete linkage*”. As cores no mapa indicam a variação na expressão, sendo que o vermelho indica baixa expressão, preto indica expressão intermediária e verde indica alto nível de expressão. A escala das cores está na parte superior esquerda da figura.....85

Figura 16 - Quantificação dos níveis de RNAm de 26 genes cuticulares expressos nos experimentos de *microarrays*. Os níveis de transcritos foram quantificados por RT-PCR em Tempo Real usando três amostras independentes do tegumento de cada fase do desenvolvimento: pupas (Pw), pupas em apólise (Pp) e adultas faratas (Pbl). As análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ considerando como referência 1, o valor de expressão de Pw. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* qbasePLUS (Biogazelle).87

- Figura 17** - Imunofluorescência evidenciando a presença de transcritos do gene GB12449 na epiderme de adultas faratas Pbl (A, B e C) e em adultas faratas mais jovens, em fase Pb (D) Hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) em verde e marcação com diamidino-2-fenilindole (DAPI) em azul. À esquerda vê-se marcação com sonda para o gene GB12449 + DAPI, no centro, apenas marcação com a sonda para o gene GB12449 e à direita, apenas DAPI. 89
- Figura 18** - Imunofluorescência evidenciando a presença de transcritos do gene GB12811 na epiderme de adultas faratas Pbl (A, B e C) e em adultas faratas mais jovens, Pb (D) Hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) em verde e marcação com diamidino-2-fenilindole (DAPI) em azul. À esquerda vê-se marcação com sonda para o gene GB12811 + DAPI, no centro, apenas marcação com a sonda para o gene GB12811 e à direita, apenas DAPI. 90
- Figura 19** - Representação esquemática da estrutura primária das proteínas cuticulares da família CPR. PS corresponde ao peptídeo sinal. 93
- Figura 20** - Fases do desenvolvimento de *A. mellifera* eleitas para os experimentos de *microarray* e cortes histológicos dos respectivos tegumentos torácicos. Imagens de Elias-Neto *et al.*, 2009. cut – cutícula; ep – epiderme; n – núcleo; mf – fluido de muda. 98

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1.	METAMORFOSE DOS INSETOS	20
1.2.	ESTRUTURA DO TEGUMENTO DOS INSETOS	23
1.3.	GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS CUTICULARES	26
1.4.	PROTEÍNAS CUTICULARES.....	29
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1.	GERAIS.....	34
2.2.	ESPECÍFICOS	34
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.2.	DISSECÇÃO DO TEGUMENTO	36
3.3.	EXPERIMENTOS DE <i>MICROARRAY</i>	37
3.3.1	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	37
3.3.2	PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	37
3.3.3	QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	38
3.3.4	PREPARAÇÃO DE SONDAS DE RNA	38
3.3.4.1.	TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA	38
3.3.4.2.	SÍNTESE DA SEGUNDA FITA DE cDNA.....	39
3.3.4.3.	PURIFICAÇÃO DO cDNA	39
3.3.4.4.	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA SINTETIZAR O <i>AMINO ALLYL-MODIFIED</i> aRNA	40
3.3.4.5.	PURIFICAÇÃO DO aRNA	40
3.3.4.6.	REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO aRNA AO CORANTE.....	41
3.3.4.7.	PURIFICAÇÃO DO aRNA CORADO.....	41
3.3.5	HIBRIDIZAÇÃO DE <i>MICROARRAY</i> DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	42
3.3.6	OBTENÇÃO DOS DADOS E ANÁLISES	43
3.3.7	NORMALIZAÇÃO E ESTATÍSTICAS	43
3.4.	ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR.....	44
3.4.1	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	44

3.4.2	SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA	44
3.4.3	AMPLIFICAÇÃO POR PCR	45
3.4.4	ANÁLISE POR ELETROFORESE EM AGAROSE	45
3.4.5	RT-PCR EM TEMPO REAL.....	46
3.4.6	SEQUENCIAMENTO.....	48
3.4.6.1	PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO.....	48
3.4.6.2	LIGAÇÃO	48
3.4.6.3	TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO	49
3.4.6.4	EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO.....	49
3.4.6.5	DIGESTÃO	50
3.4.6.6	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	50
3.4.6.7	PRECIPITAÇÃO DO DNA PARA O SEQUENCIAMENTO.....	50
3.4.7	ANOTAÇÃO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	51
3.5.	LOCALIZAÇÃO ESPACIAL DOS TRANSCRITOS DE GENES CUTICULARES PUTATIVOS NO TEGUMENTO POR HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> COM SONDA FLUORESCENTE (FISH).....	52
3.5.1	COLETA E FIXAÇÃO DO TEGUMENTO.....	52
3.5.2	PRODUÇÃO DA SONDA FLUORESCENTE	52
3.5.3	PROCEDIMENTOS DE HIBRIDAÇÃO E PÓS-HIBRIDAÇÃO	54
4.	RESULTADOS	55
4.1.	PANORAMA GERAL DA INFORMAÇÃO GENÔMICA DINAMICAMENTE ORGANIZADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO EXOESQUELETO ADULTO.....	56
4.2.	GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS CUTICULARES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO TEGUMENTO DURANTE A MUDA PUPAL-ADULTA	68
4.3.	ANOTAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CUTICULARES.....	71
4.4.	PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO EXOESQUELETO ADULTO DE <i>A. mellifera</i>	80
4.5.	LOCALIZAÇÃO ESPACIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES GB12449 E GB12811	88
5.	DISCUSSÃO.....	91
5.1.	ARQUITETURA DOS GENES CUTICULARES	92
5.2.	PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS CUTICULARES.....	93

5.3.	EXPRESSÃO ESTÁGIO-ESPECÍFICA DOS GENES CUTICULARES E REGULAÇÃO POR HORMÔNIOS	96
6.	CONCLUSÃO	103
7.	BIBLIOGRAFIA.....	106
8.	APÊNDICE.....	115
8.1.	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA COMPARAÇÃO Pbl <i>versus</i> Pw	116
8.2.	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA COMPARAÇÃO Pbl <i>versus</i> Pp	128
8.3.	ARTIGO PUBLICADO.....	147

1. INTRODUÇÃO

1.1. METAMORFOSE DOS INSETOS

A metamorfose dos insetos consiste em uma fascinante e bem sucedida adaptação biológica (Truman e Riddiford, 1999). Em seu sentido literal, a palavra metamorfose (do grego, transformação) significa mudar a forma, ser transfigurado. No sentido biológico, a metamorfose se refere à transformação da forma imatura em uma forma sexualmente madura (Nijhout, 1994). Os insetos desenvolveram três estratégias para alcançar o estágio adulto, as quais foram denominadas de acordo com o grau de divergência anatômica entre imaturos e adultos (Grimaldi e Engel, 2005). Os ametábolos não apresentam mudanças visíveis em sua forma conforme crescem, exceto pelo desenvolvimento dos órgãos reprodutivos. Os hemimetábolos correspondem ao grupo de insetos com metamorfose incompleta, ou seja, os imaturos diferem dos adultos pela ausência de asas funcionais e órgãos sexuais. Nos insetos holometábolos, a metamorfose é completa, e a larva que eclode do ovo se transforma na pupa e depois no adulto. O desenvolvimento dos apêndices segmentares, asas e olhos que estava reprimido durante os estágios larvais (Nijhout, 1994), tem início a partir de grupos de células relativamente indiferenciadas, os discos imaginais. As quatro maiores ordens dos holometábolos (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera) representam atualmente mais de 80% de todas as espécies de insetos (Grimaldi e Engel, 2005). Uma das explicações para este enorme sucesso incide na própria metamorfose, que permitiu às formas larvais e adultas explorar diferentes habitats e fontes de alimentos (Truman e Riddiford, 1999).

Nos holometábolos, o processo metamórfico consiste em um período de intensa reorganização em que tecidos larvais degeneram, enquanto os tecidos dos adultos são formados e se diferenciam (Goodisman *et al.*, 2005) a partir dos discos imaginais e de ninhos de histoblastos e outras células imaginais localizados nas larvas (Gilbert, 2010). Toda essa transformação ocorre durante o estágio pupal, um período do ciclo de vida em que o inseto não se movimenta ou se alimenta e parece inativo. Essa aparente inércia, no entanto, encobre um intenso processo de formação e diferenciação de tecidos, órgãos e sistemas orgânicos que preparam o inseto para um novo modo de existência.

O crescimento dos insetos é marcado por ciclos de muda, que consistem em uma sequência elaborada de eventos que culminarão na construção de uma cutícula nova dentro dos limites da cutícula velha (Nijhout, 1994) e subsequente eliminação desta cutícula. O que diferencia a muda larval das mudas metamórfica e imaginal é a natureza da cutícula que será formada. A muda larval resulta em outra cutícula larval, embora de maior tamanho. As mudas metamórfica e imaginal levam à formação, respectivamente, da cutícula pupal e adulta, cuja estrutura, frequentemente é muito mais complexa que a estrutura de uma cutícula larval. Há duas explicações plausíveis para esta mudança de padrão cuticular durante a muda

metamórfica: as células epidérmicas larvais podem alterar seu comprometimento e, assim a síntese e secreção de componentes cuticulares, ou estas células podem ser substituídas por novas células que formarão estruturas radicalmente diferentes (Klowden, 2007). A segunda alternativa é a plausível, considerando-se que a metamorfose de insetos se caracteriza essencialmente pela morte de tecidos larvais e sua substituição por proliferação de populações de células imaginais (Truman e Riddiford, 1999).

Os ciclos de muda são iniciados e regulados pelo sistema endócrino. O início da muda é estimulado pelo cérebro quando as células neurosecretoras liberam o hormônio protoracicotrópico (PTTH) em resposta a sinais neuronais, hormonais ou ambientais. O PTTH estimula a produção de ecdisona pela glândula protorácica, que nos tecidos periféricos será modificada em 20-hidroxiecdisona (20E) (Gilbert, 2010). O hormônio 20E, em interação com o hormônio juvenil (HJ), coordenarão a atividade das células epidérmicas para a produção de uma nova cutícula (Klowden, 2007).

Independente do tipo de muda, seja ela larval, metamórfica ou imaginal, a primeira manifestação deste processo é a separação entre a camada de células epidérmicas e a cutícula que a recobre, fenômeno denominado apólise, formando-se um espaço que, subsequente, será preenchido pelo fluido de muda. Este fluido contém enzimas, que serão ativadas e irão digerir as camadas mais internas da velha cutícula, de maneira que seus componentes não esclerotizados possam ser recuperados e reciclados para a nova cutícula (Nijhout, 1994). A apólise leva à formação da larva, pupa ou adulto faratos, isto é, encobertos, que ainda não se libertaram da velha cutícula. Assim, por exemplo, o adulto farato já desenvolveu o fenótipo do inseto adulto, mas ainda está encoberto pela velha cutícula pupal que será eliminada em seguida (Zitnan e Adams, 2005). Na sequência ocorre a ecdise, ou seja, os eventos envolvidos na eliminação da velha cutícula, os quais incluem a absorção do fluido de muda e a expansão e enrijecimento da nova cutícula. Todo este processo ocorre enquanto os níveis de ecdisteróides decaem (Riddiford, 1985). A correlação entre o título de ecdisteróides e os eventos acima mencionados está evidenciada na Figura 1.

Como todos os insetos holometábolos, as abelhas desenvolvem-se no contexto dos ciclos de muda, passando pelos estágios de larva, pupa e adulto (Figura 2). O estágio larval é, basicamente, um período de alimentação e crescimento. A transição larva-pupa ou muda metamórfica, consiste em um período de complexa reorganização e formação de tecidos e estruturas dos adultos. Após a ecdise pupal, o adulto farato passa por um período de diferenciação de seus tecidos e culmina na muda imaginal, revelando um adulto recém-emergido (Snodgrass, 1956).

Figura 1 - Eventos que levam à formação de uma nova cutícula em relação à variação do título de ecdisteróides. **A.** O tegumento antes da muda; **B.** O aumento nos níveis de ecdisteróides culmina no evento denominado apólise, ou seja, separação entre a cutícula e a epiderme, e criação do espaço exuvial; **C.** Secreção do fluido de muda; **D.** A digestão da cutícula velha e o crescimento da nova cutícula ocorrem quando o título de ecdisteróides diminui; **E.** Ecdise, eliminação da cutícula velha. Os esquemas foram redesenhados de Riddiford (1985) e Klowden (2007).

Figura 2 - O desenvolvimento da abelha *A. mellifera*. **A.** Os estágios larval, pupal e adulto são delimitados por ecdises (pontas de flechas) e caracterizados pelo tipo de cutícula externa. **B.** As apólises (flechas) separam as larvas, pupas e adultos de acordo com o tipo de cutícula interna (aderida à epiderme). Durante o período farato, que se estende da apólise até a ecdise, uma nova cutícula é sintetizada e se diferencia embaixo da cutícula precedente. **C.** Fotografias dos estágios do desenvolvimento de *Apis mellifera*. O esquema foi redesenhado de Elias-Neto *et al.* (2008).

1.2. ESTRUTURA DO TEGUMENTO DOS INSETOS

O exoesqueleto cuticular, ou cutícula, que recobre os insetos é uma estrutura extracelular composta por filamentos de quitina em interação com uma matriz de proteínas diversas. A cutícula possui natureza multifuncional e confere forma aos insetos, meios de locomoção, proteção contra a perda de água e, além disso, constitui a principal barreira contra parasitas e doenças (Vincent e Wegst, 2004).

Os componentes da cutícula são, em sua grande maioria, secretados pela epiderme subjacente que geralmente consiste de uma única camada de células que se apóia em uma membrana basal mais interna (Hepburn, 1985). Esta membrana separa as células epidérmicas da hemolinfa circulante e consiste basicamente de uma camada de fibras de colágeno, mas com muitos poros que permitem a passagem de grandes proteínas e outras moléculas da hemolinfa para a epiderme (Nation, 2002). A cutícula se dispõe em camadas que diferem consideravelmente em relação ao tipo de proteínas que as compõem (Hopkins *et al.*, 2000).

Conforme a nomenclatura revisada e simplificada de Locke (2001), a cutícula dos insetos pode ser dividida, essencialmente, em três camadas – envelope, epicutícula e procutícula. Durante a sucessão de eventos que leva à formação da cutícula, o envelope é primeiramente depositado sobre a superfície da membrana plasmática das células epidérmicas. O envelope reveste a superfície externa de todos os artrópodes e constitui a interface entre o ambiente e o organismo. A epicutícula é em seguida depositada abaixo do envelope e resulta da exocitose de compostos sintetizados pela epiderme. Esta camada é desprovida do principal polissacarídeo cuticular, quitina, e sobrepõe a procutícula. Os componentes da epicutícula possuem grande afinidade entre si, formando uma camada homogênea, estabilizada por quinonas, o que dificulta sua extração e separação para análise. A procutícula é então formada entre a epicutícula e a epiderme. A procutícula é centenas de vezes mais espessa que as duas outras camadas, possuindo estrutura e composição bem mais complexa, caracterizada principalmente pela presença de fibras de quitina em interação com uma variedade de proteínas. Nela se distinguem duas camadas: a mais externa, formada antes da ecdise, denominada pré-ecdisial ou exocutícula, e a mais interna, depositada em seguida à ecdise, sendo denominada pós-ecdisial ou endocutícula.

As propriedades da cutícula são definidas tanto pelo arranjo dos filamentos de quitina e dos graus de esclerotização e hidratação, como também por uma precisa combinação de

proteínas nessa matriz cuticular. Estes compostos orgânicos não se distribuem homogeneamente por toda a cutícula. Diferenças regionais têm sido observadas e impõem arquitetura própria e propriedades mecânicas e funcionais distintas às partes específicas do exoesqueleto (Andersen *et al.*, 1995).

A esclerotização cuticular é um processo bioquímico em que certas regiões macias e flexíveis da cutícula são transformadas irreversivelmente em estruturas mais rígidas e sólidas, caracterizadas pela diminuição da deformabilidade, diminuição da extratibilidade da matriz de proteínas e pelo aumento da resistência à degradação enzimática. Em geral, durante a esclerotização, a cor da cutícula muda de incolor para tons de marrom ou torna-se completamente preta (Andersen, 2005). As mudanças no padrão de cor da cutícula de *A. mellifera* podem ser observadas na Figura 2C, onde se verifica que a cutícula adulta em formação progressivamente escurece (melanização) e torna-se intensamente enrijecida, ou esclerotizada.

As reações químicas envolvidas nos processos de esclerotização e melanização foram detalhadamente abordadas por Andersen (2005; 2010) e Sugumaran (2002; 2009). De um modo geral o processo de esclerotização inicia-se no citoplasma das células epidérmicas, onde o aminoácido tirosina é hidroxilado a 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) pela enzima tirosina-hidroxilase. Em seguida, a DOPA é convertida em dopamina por descarboxilação pela dopa-decarboxilase (Ddc). A dopamina, por sua vez, será utilizada na produção de N-acetildopamina (NADA), N- β -alanildopamina (NBAD) e melanina, agentes precursores dos processos de esclerotização e de pigmentação cuticular (Andersen, 2005). Estes compostos serão liberados na cutícula em desenvolvimento, onde serão oxidados a *o*-quinonas por fenoloxidasas, como por exemplo, a lacase (Moussian, 2010). A oxidação destes compostos resulta no aparecimento de verdadeiras pontes covalentes entre proteínas estruturais da cutícula, e mesmo entre estas e polímeros de quitina, e por meio delas ocorre a formação de uma malha molecular entrelaçada, resistente e inerte (Suderman *et al.*, 2006). A Figura 3 mostra o modelo proposto para a esclerotização cuticular.

Figura 3 - Vias bioquímicas da esclerotização cuticular. A tirosina é hidroxilada pela tirosina hidroxilase em 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA), a qual é descarboxilada pela dopa-descarboxilase formando dopamina. A dopamina originará tanto os agentes esclerotizantes, N-acetildopamina (NADA) ou N-β-alanildopamina (NBAD), quanto os pigmentos de melanina. Os precursores da esclerotização cuticular (NADA e NBDA) são enzimaticamente oxidados a *o*-quinonas, que podem reagir espontaneamente com grupos nucleofílicos (HX) de proteínas ou podem ser isomerizados a compostos mais reativos, *p*-quinonas. Estes compostos ainda podem ser isomerizados a dehidro-acildopaminas, que depois de oxidados a quinonas podem reagir com catecóis e originar derivados de dihidroxifenil- dihidrobendodioxina. As reações químicas envolvidas na esclerotização da cutícula de insetos foram obtidas de Andersen (2005).

1.3. GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS CUTICULARES

Como mencionado acima, a cutícula assume formas distintas ao longo da ontogênese dos insetos. Sua aparência, arquitetura e composição química podem mudar drasticamente durante a metamorfose (Andersen *et al.*, 1995). Assim, diferentes tipos de cutícula apresentam propriedades mecânicas distintas influenciadas pela proporção de quitina, pelo grau de esclerotização e tipo de proteínas constituintes (Iconomidou *et al.*, 2005). Basicamente, as cutículas podem ser classificadas como macias ou flexíveis e duras ou resistentes. Em pupas de abelhas, por exemplo, a cutícula que recobre o abdômen é mais flexível que a torácica. Geralmente, cutículas macias possuem proteínas hidrofílicas e pouco esclerotizadas, enquanto que nas cutículas duras as proteínas são modificadas pela incorporação de uma quantidade de produtos oxidados, tornando-se mais esclerotizadas (Andersen *et al.*, 1995).

As proteínas cuticulares são sintetizadas e secretadas pela epiderme em momentos precisos durante a formação da cutícula. A atividade das células epidérmicas é coordenada por hormônios que induzem uma cascata de regulação gênica complexa atuante nos ciclos de mudas e metamorfose. Estas circunstâncias tornam as proteínas cuticulares e os genes que as codificam modelos muito atrativos para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular tempo e espaço-específicos durante o desenvolvimento de insetos (Binger e Willis, 1994; Gagou *et al.*, 2002; Lampe e Willis, 1994; Nakato *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2001).

De acordo com o modelo proposto por Ashburner, a ação dos hormônios ecdisteróides é mediada pelo receptor de ecdisona (EcR) que acoplado à proteína Ultraspiracle (USP) induz a transcrição de um pequeno conjunto de genes (*early genes*), que por sua vez codificam proteínas trans-reguladoras que induzem secundariamente a transcrição de um conjunto muito maior de genes, os *late genes* (Ashburner, 1990). Este conhecimento derivou de estudos em glândulas salivares de *Drosophila*, cujos cromossomos politênicos mostram padrões de *puffs* (áreas do cromossomo onde o DNA está sendo ativamente transcrito) regulados por ecdisteróides. Os *puffs* se formam poucos minutos após a exposição aos ecdisteróides, indicando expressão gênica, ou seja, expressão de *early genes*. Pouco mais tarde, um novo conjunto de *puffs* (*late genes*) é induzido, e isto requer a ação de proteínas. Ashburner (1990) hipotetizou que os *early genes* codificavam proteínas com dupla função: ativar os *late genes* e inibir sua própria transcrição. Esta hipótese foi confirmada por experimentos de biologia molecular.

A cascata gênica, simplificada, ativada por 20E durante a metamorfose de *Drosophila* está esquematizada na Figura 3. Ao final do desenvolvimento larval, o hormônio 20E liga-se ao complexo EcR/USP, ativando os genes de resposta primária, incluindo *E74*, *E75A*, *Broad* e o gene *EcR*. Os fatores de transcrição codificados por estes genes ativam uma série de genes de resposta secundária, tais como *E75B*, *DHR4* e *DHR3*. Os produtos destes genes também são fatores de transcrição que em conjunto irão ativar o gene β FTZ-F1. A proteína β FTZ-F1 modifica a cromatina, de modo que um novo conjunto de genes, ou genes tardios, possa responder ao segundo pulso de 20E, o qual sinaliza a transição da pupa farata (prepupa) em pupa (Gilbert, 2010).

Figura 4 - Cascata de regulação gênica da metamorfose de *Drosophila* induzida por 20-hidroxiecdisona. Quando 20E se liga ao complexo receptor EcR/USP são acionados os genes de resposta primária (*E74*, *E75A* e *Broad*) que ativarão os genes tardios. Além disto, os genes primários acionarão uma série de outros genes, cujos produtos são fatores de transcrição que ativarão o gene β FTZ-F1. O produto deste gene modifica a cromatina de tal modo que, no próximo pulso de 20E, um novo conjunto de genes tardios será ativado. Representação esquemática modificada (Gilbert, 2010; King-Jones *et al.*, 2005).

Em recente revisão sobre a regulação dos genes codificadores de proteínas cuticulares, Charles (2010) revelou que a maioria destes genes é regulada pelo pulso de ecdisteróides, ou seja, sua transcrição requer a estimulação pelo aumento e, subsequente, diminuição do título dos ecdisteróides. Neste modelo, os genes codificadores de proteínas cuticulares podem ser classificados como *late genes* ou genes tardios. Este tipo de regulação foi observado em Diptera (Fechtel *et al.*, 1988), em Lepidoptera (Suzuki *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2006) e Hymenoptera (Soares *et al.*, 2007). No entanto, existem exceções. Por exemplo, a expressão do gene ACP20 foi induzida quando discos imaginais de asas de *Tenebrio molitor* foram incubados *in vitro* com diferentes concentrações de 20E, mas os experimentos que mimetizaram o pulso de ecdisteróides não provocaram o aumento de expressão esperado (Braquart *et al.*, 1996). Existem ainda casos de genes cuticulares que se expressam independentemente do pico de ecdisteróides, por exemplo, os genes *LCP1-4* de *Drosophila* (Kimbrell *et al.*, 1988) e *LCP16/17* de *Manduca sexta* (Horodyski e Riddiford, 1989; Wolfgang e Riddiford, 1986).

Para entender como a ecdisona regula o gene cuticular *BMWCP10*, Wang *et al.* (2010) realizaram experimentos de cultivo *in vitro* de discos imaginais de asas de *Bombyx* e, também, buscaram por prováveis sítios de regulação na região promotora deste gene. Os autores concluíram que *BMWCP10* é regulado diretamente por 20E via receptor de ecdisona EcRE1. Além disso, sugeriram que a ativação completa da transcrição envolve outros fatores, como por exemplo, um elemento de resposta ao *early gene* BR-Z2.

Foi também verificado que a proteína β FTZ-F1 reconhece uma sequência de 9pb, 5'-PyCAAGGPyCPu-3', onde Py corresponde a uma pirimidina (C ou T) e Pu a uma purina (A ou G) (Ueda *et al.*, 1990). Alguns genes codificadores de proteínas cuticulares têm essa sequência consenso na região *upstream* ao local de início da transcrição (Kawasaki *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 1996). Em moscas transgênicas, esta região é essencial para a expressão do gene *EDG84A*, codificador de uma proteína cuticular (Kawasaki *et al.*, 2002).

Estas descobertas têm contribuído para entender como os genes codificadores de proteínas cuticulares são regulados e quais os fatores de transcrição envolvidos nesta regulação. Estes dados são importantes para ampliar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na cascata de regulação por ecdisteróides que leva à muda e metamorfose dos insetos.

1.4. PROTEÍNAS CUTICULARES

As proteínas constituem cerca de metade do peso seco da cutícula dos insetos, sendo que podem ser separadas em duas classes: proteínas não-estruturais e estruturais. O primeiro grupo refere-se aos pigmentos, enzimas, proteínas de defesa e arilforinas (proteínas de estocagem). O segundo grupo é caracterizado por proteínas que participam da estrutura da cutícula, as proteínas cuticulares estruturais, que juntamente com o sistema de filamentos de quitina, proporcionam ao exoesqueleto vários graus de flexibilidade, dureza, estabilidade, capacidade de ligação com água e resistência contra degradação (Willis *et al.*, 2005).

Ainda não entendemos exatamente como a grande variedade de proteínas cuticulares contribui para a complexa estrutura, propriedades físicas e funções da cutícula. Uma descoberta marcante que facilitou a identificação destas proteínas foi o reconhecimento de um domínio comum às poucas sequências então conhecidas (Rebers e Riddiford, 1988). Este domínio de 28 resíduos de aminoácidos foi denominado Consenso R&R. A partir de então, o número de sequências reconhecidas como proteínas cuticulares continuou aumentando.

Os avanços nas tecnologias de sequenciamento, acompanhados pela redução de custos, têm permitido sequenciar o genoma de várias espécies e isto tem contribuído muito para o aumento da quantidade de proteínas cuticulares identificadas em vários insetos. A primeira revisão sobre proteínas cuticulares de insetos apresentava apenas 38 sequências completas derivadas principalmente de sequenciamento direto (Andersen *et al.*, 1995). Posteriormente, 139 proteínas cuticulares estruturais foram compiladas (Willis *et al.*, 2005), das quais 74 correspondiam a proteínas cuticulares autênticas, ou seja, extraídas da cutícula, enquanto as sequências remanescentes foram deduzidas de cDNAs, ESTs ou pequenas regiões de DNA genômico. A mais recente revisão sobre proteínas cuticulares evidencia que a disponibilização de sequências genômicas inteiras, aliada à anotação manual de proteínas cuticulares de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *A. mellifera*, *Bombyx mori* e *Nasonia*, identificou centenas de proteínas cuticulares preditas, ou seja, reconhecidas através da similaridade com as autênticas (Willis, 2010).

Um banco de dados de sequências de proteínas cuticulares de artrópodes, denominado cuticleDB (<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/index.jsp>) foi criado em 2004 (Magkrioti *et al.*, 2004). As sequências que compõem o CuticleDB foram identificadas em *Protein databases of Entrez* e *Uniprot* (Apweiler *et al.*, 2004) utilizando-se as palavras chaves *cuticle*, *exoskeletal* e *carapace*, e também incluem as proteínas cuticulares obtidas dos

genomas de *A. gambiae*, *D. melanogaster*, *B. mori*, *A. mellifera* e *Nasonia*. O banco de dados CuticleDB ainda inclui proteínas cuticulares de alguns Crustacea e Chelicerata, que foram preditas com base na presença do motivo Pfam PF00379 (Bateman *et al.*, 2002). Em sua última atualização (20-Out-2009), este banco apresentava 774 entradas, das quais 699 correspondem à Classe Insecta, 60 a Crustacea e 15 a Chelicerata.

A disponibilidade de sequências de genomas inteiros tem permitido novas descobertas sobre as proteínas cuticulares, inclusive com relação à distribuição entre diferentes famílias e à identificação de características que possam auxiliar na anotação de genomas futuros.

Willis (2010) descreveu as características de 12 famílias de proteínas cuticulares em sua mais recente revisão e, além disso, discutiu a nomenclatura das proteínas cuticulares e as dificuldades em se adotar uma classificação baseada apenas na presença de um domínio, já que muitas vezes, uma proteína cuticular apresenta mais de um domínio conservado.

Das 12 famílias descritas, a família CPR, caracterizada pela presença do Consenso R&R (Rebers e Riddiford, 1988), é a família de proteínas cuticulares que possui o maior número de representantes entre as espécies de artrópodes. Inicialmente, o Consenso R&R foi descrito como uma sequência conservada de 35 aminoácidos: G-x(8)-G-x(6)-Y-x(2)-A-x-E-x-G-F-x(7)-P-x-P. Atualmente, uma versão estendida deste Consenso está disponível no Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>), identificada pelo número de acesso: pf00379, chitin_bind_4. Três formas distintas deste Consenso foram encontradas e denominadas RR-1, RR-2 e RR-3 (Andersen, 1998, 2000). As proteínas pertencentes ao grupo RR-1 estão, principalmente, presentes em cutículas flexíveis e hidratadas, como por exemplo, cutículas de larvas de Diptera e Lepidoptera, e na membrana intersegmental e endocutícula de gafanhotos. Essas proteínas são geralmente hidrofílicas (Andersen, 1998). As do grupo RR-2 foram, principalmente, identificadas em cutículas mais duras e esclerotizadas, sugerindo que existe correlação entre tipos de proteínas e propriedades mecânicas da cutícula (Andersen, 1998). Estas proteínas possuem uma região Consenso mais longa, primeiramente reconhecida por Bouhin *et al.* (1992) e Charles *et al.* (1992). O Consenso RR-3 foi reconhecido em apenas cinco proteínas da cutícula pós-ecdisial de insetos e em algumas proteínas cuticulares de outras classes de artrópodes (Andersen, 2000). A ligação da quitina a esses domínios foi investigada e confirmada experimentalmente (Hamodrakas *et al.*, 2002; Iconomidou *et al.*, 2005; Rebers e Willis, 2001; Togawa *et al.*, 2004).

A família CPF (Andersen *et al.*, 1997) foi inicialmente definida pela presença de um domínio de 51 aminoácidos: (AY)-(AP)-x(2)-(PA)-(PA)-A-(LIV)-x-(SA)-(QS)-x-(SQ)-x-(IV)-(LV)-R-S-x-G-(NG)-x(3)-V-S-x-Y-(ST)-K-(TA)-(VI)-D-(TS)-(PA)-(YF)-S-SV-x-K-x-

D-x-R-(VI)-(TS)-N-x-(GA)-(IVL). Mais tarde, Togawa *et al.* (2007) verificaram que este domínio conservado era representado por apenas 42-44 aminoácidos e, além disso, identificaram uma nova família de proteínas cuticulares, à qual denominaram CPFL (CPF-like), cuja característica marcante é uma grande similaridade com proteínas da família CPF na região carboxi-terminal da molécula.

Outra família, denominada Tweedle, foi descrita por Guan *et al.* (2006) ao estudar um mutante de *D. melanogaster* com alteração do padrão corporal. A característica marcante das sequências da família de proteínas Tweedle é a presença da região YVLX₂₀₋₂₃KPEVYFiKY(R/K)t, onde as letras minúsculas representam aminoácidos não estritamente conservados. Estudos indicam que as proteínas Tweedle interagem diretamente com a quitina devido à presença de conformações β em suas estruturas (Guan *et al.*, 2006).

A família de proteínas apidermina, cujos genes foram caracterizados em *A. mellifera* por Kucharski *et al.* (2007), é formada por proteínas altamente hidrofóbicas, com pelo menos 30% de alanina. Além dos três genes encontrados nas abelhas (*apd-1*, *apd-2* e *apd-3*), três genes similares foram identificados em *Nasonia* (Willis, 2010). Até o presente momento não foram encontrados homólogos em outros grupos.

Além das famílias descritas anteriormente, Willis (2010) descreveu características estruturais particulares para diagnosticar as famílias CPLCA, CPLCG, PLCW, CPLCP, CPAP e CPG.

A família CPLCA é uma pequena família de proteínas cuticulares rica em resíduos de alanina (13 a 26%) presente exclusivamente na ordem Diptera. A principal característica desta família é a presença do domínio retinina (pfam04527/IPR007614) (Willis, 2010).

Os membros da família CPLCG compartilham um domínio próximo à região carboxi-terminal, caracterizado pela sequência G-x(2)-H-x-A-P-x(2)-G-H (Willis, 2010). Cornman e Willis (2009) observaram que os genes codificadores das proteínas pertencentes a esta família estão organizados em tandem nos cromossomos de *A. gambiae*, *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*.

Os membros da família PLCW foram originalmente identificados na cutícula de *A. gambiae* por He *et al.* (2007). As sequências codificadoras das 9 proteínas PLCW identificadas em *A. gambiae* apresentam em média 98,9% de identidade (Cornman e Willis, 2009). Aparentemente a família PLCW está restrita aos mosquitos (Willis, 2010).

A família CPLCP (*Cuticular Proteins of Low Complexity Proline-rich*) foi inicialmente identificada em *A. gambiae* (He *et al.*, 2007) e posteriormente reconhecida como uma família de proteínas cuticulares por Cornman e Willis (2009). A característica marcante

desta família consiste na alta densidade de prolina, que se dispõe em resíduos PV ou PY (Willis, 2010).

A família CPAP (*Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins*) compartilha o domínio ChtBD2 com as peritrofinas. As proteínas pertencentes a esta família podem ser classificadas em CPAP1 e CPAP3, indicando que possuem 1 ou 3 domínios ChtBD2, respectivamente (Willis, 2010). Os genes codificadores destas proteínas foram primeiramente incluídos na família do multigene *obstructor* (Behr e Hoch, 2005). Uma análise mais acurada e com suporte filogenético das proteínas que possuem o domínio ChtBD2 foi conduzida por Jasrapuria *et al.* (2010) em *Tribolium castaneum*, e resultou na proposta de separação em 3 famílias: CPAP1, CPAP3 e PMP (*Peritrophic Matrix Proteins*).

A família CPG, *Cuticular Proteins Glycine-rich*, inclui as proteínas com alto conteúdo de glicina, que se dispõe em repetições GGYGG ou GGxGG (Futahashi *et al.*, 2008). No entanto, a presença de GGY não é uma característica exclusiva deste grupo de proteínas (Willis, 2010).

Entre os insetos cujo genoma foi sequenciado, as abelhas *A. mellifera* possuem o menor número de genes potencialmente codificadores de proteínas CPR. Assim, enquanto 32 genes codificadores de proteínas CPR foram encontrados nesta abelha, 62 genes foram localizados em espécies da vespa parasita *Nasonia*, e este número aumenta para 101, 148 e 156 em *D. melanogaster*, *B. mori* e *A. gambiae*, respectivamente (Willis, 2010). Uma tentativa para explicar o menor número de proteínas CPR encontrado em *A. mellifera* é que estes insetos sociais vivem dentro de um ambiente protetor, a colméia, durante a maior parte de seu ciclo de vida e isto poderia influenciar o desenvolvimento de uma cutícula menos complexa, composta por um menor número de proteínas cuticulares (Consortium, 2006). Note-se que além da família CPR, membros de outras famílias de proteínas cuticulares já foram identificados em *A. mellifera*, como CPF, Tweedle, CPLCP, Apidermina e CPAP3 (Willis, 2010).

Até onde sabemos, a maioria destas proteínas foi predita do genoma de *A. mellifera*. Mas alguns genes codificadores de proteínas cuticulares já foram validados em *A. mellifera*. Dados experimentais validaram a região codificadora do gene *AmelCPR14* (Soares *et al.*, 2007). A expressão dos genes codificadores dos três membros da família apidermina, *apd-1*, *apd-2* e *apd-3*, foi caracterizada por Kucharski *et al.* (2007). Mais recentemente, Soares *et al.* (2011) descreveram a estrutura primária, a expressão ao longo do desenvolvimento e a regulação hormonal dos dois genes codificadores das proteínas da família Tweedle, *AmelTwdl1* e *AmelTwdl2*. Todos estes dados têm contribuído para aprofundar nosso conhecimento sobre as moléculas com função na estruturação do exoesqueleto.

2. **O**BJETIVOS

2.1. GERAIS

O presente trabalho visou caracterizar a expressão diferencial de genes do tegumento de *A. mellifera* durante eventos marcantes da muda pupal-adulta, regulados por ecdisteróides, como estratégia para aprofundar o conhecimento da metamorfose de *A. mellifera* em nível molecular.

2.2. ESPECÍFICOS

- I.** Identificar genes diferencialmente expressos no tegumento em três etapas sequenciais da muda pupal-adulta marcadas por variação do título de ecdisteróides. Para isto, foram realizados *microarrays* de cDNA e análises por bioinformática;
- II.** Validar a expressão diferencial destes genes por RT-PCR em Tempo Real;
- III.** Utilizar Hibridação *in situ* com sonda fluorescente para verificação da localização de genes cuticulares putativos no tegumento;
- IV.** Com base na expressão diferencial, propor função em eventos da metamorfose do tegumento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas abelhas operárias *A. mellifera* (Africanizada). As fases do desenvolvimento utilizadas, ou seja, pupas imediatamente após a ecdise (Pw), pupas em apólise (Pp) e adultas faratas (Pbl) foram categorizadas segundo a classificação proposta por Michelette e Soares (1993) e Thompson (1978) (Tabela I). Todo o material biológico foi coletado de colméias do apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Tabela I - Aspecto externo e idade cronológica das fases de desenvolvimento de abelhas operárias *A. mellifera* utilizadas no presente trabalho

Fases		Aspecto externo	Cor do olho	Pigmentação cuticular	Idade aproximada (dias após a ecdise pupal)
Pupa	Pw		Branco	Ausente	0,8
Pupa em apólise	Pp		Rosa	Ausente	2,1
Adultas-faratas	Pbl		Marrom	Clara	6,6

3.2. DISSECÇÃO DO TEGUMENTO

Os tegumentos torácicos (somente o dorso) de pupas (Pw) , pupas em apólise (Pp) e adultas faratas (Pbl) foram dissecados com auxílio de tesoura e pinças apropriadas e submetidos a uma rápida lavagem em Ringer para insetos. Conjuntos de 10 tegumentos de abelhas de mesma fase foram colocados em 1mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies) e estocados em microtubos Safe-Lock de 2,0mL a -80°C até sua utilização.

3.3. EXPERIMENTOS DE *MICROARRAY*

3.3.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi extraído de tegumentos de operárias conforme protocolo recomendado pelo fabricante do Trizol (Invitrogen), descrito a seguir. Após descongelamento, as amostras de tegumentos foram homogeneizadas com auxílio de ponteira esterilizada e em seguida foram incubadas por 5 min entre 15–30°C para permitir a dissociação completa dos complexos nucleoprotéicos. Adicionou-se 0,2mL de clorofórmio por mL de Reagente Trizol. Os tubos foram fechados, agitados vigorosamente por 15 s e incubados por 3 min entre 15–30°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12000 x g a 4°C. Após a centrifugação, a mistura se separou em três fases: uma fase fenol-clorofórmio, mais pesada e vermelha, uma interfase e uma fase superficial aquosa, incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos de 1,5mL, à qual foi misturado 0,5mL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas por 10 min entre 15–30°C e centrifugadas por 10 min a 12000 x g a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado com 1mL de etanol 75%. As amostras foram misturadas por vortex e centrifugadas por 5 min a 7500 x g a 4°C. Ao final deste procedimento, o sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* foi deixado por 10 min em banho-seco a 58°C para eliminar o excesso de etanol.

3.3.2 PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA obtido foi purificado seguindo protocolo do RNA *Cleanup* (*RNeasy Mini Kit*, QIAGEN, Cat. 74104). Seguindo este protocolo, foram adicionados 100µL de água livre de RNase ao *pellet* seco e depois, 350µL de *Buffer* RLT, misturando bem. Em seguida, foi adicionado 250µL de etanol (96–100%) ao RNA diluído, misturando bem com a pipeta. Toda a amostra (700µL) foi transferida para a coluna do kit (*RNeasy Mini spin column*), alojada em um tubo coletor de 2,0mL, para centrifugação por 15 s a 10.000 rpm em temperatura ambiente (15–25°C). O filtrado foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo coletor. Adicionou-se 500µL do *Buffer* RPE à coluna, centrifugando-se por 15 s a 10.000 rpm em temperatura ambiente para lavar a membrana da coluna. O filtrado foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo coletor. Novamente foi adicionado 500µL do *Buffer* RPE à coluna, centrifugando-se

por 2 min a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Para garantir a eliminação do etanol, a coluna foi transferida para novo tubo coletor de 2,0mL e centrifugada por 1 min adicional. A coluna foi realojada em um novo tubo coletor de 1,5mL, onde foram adicionados 50µL de água livre de RNase diretamente sobre a membrana da coluna, procedendo-se à centrifugação por 1 min a 10.000 rpm em temperatura ambiente para eluir o RNA. Em seguida, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo ou armazenadas a -80°C.

3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total isolado foi quantificado em Nanodrop (ND 1000). A razão entre as leituras de 260 e 280nm foi utilizada como um indicador da pureza do RNA, sendo ideal entre os valores de 1,9 e 2,0 (Ausubel *et al.*, 1995). Uma unidade de absorbância corresponde a 40µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.4 PREPARAÇÃO DE SONDAS DE RNA

Para preparar as amostras de RNA para análises de *array*, a amplificação do RNA foi realizada utilizando-se *Amino Alkyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit* (Ambion, Cat. AM1753). Todo o procedimento segue descrito abaixo.

3.3.4.1. TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1µg RNA total, 1µL de T7 Oligo(dT) em volume final ajustado para 12µL com água livre de RNase. A mistura foi incubada por 10 min a 70°C em termociclador. As amostras foram centrifugadas brevemente por 5 s e mantidas em gelo.

Em temperatura ambiente foi preparado o *Reverse Transcription Master Mix*. Os reagentes foram adicionados na ordem a seguir: 2µL de 10X *First Strand Buffer*, 4µL de *dNTP Mix*, 1µL *RNase Inhibitor* e 1µL de *ArrayScript*. Os reagentes foram misturados gentilmente por vortex, centrifugados brevemente e a mistura foi colocada em gelo. Um volume de 8µL da mistura foi adicionado a cada amostra de RNA, misturando com a pipeta de 2 a 3 vezes e centrifugando brevemente. As amostras foram incubadas por 2 h a 42°C.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas brevemente e imediatamente colocadas no gelo.

3.3.4.2. SÍNTESE DA SEGUNDA FITA DE cDNA

No gelo foi preparado o *Second Strand Master Mix*, de maneira que os reagentes foram adicionados na ordem a seguir: 63µL *Nuclease-free Water*, 10µL 10X *Second Strand Buffer*, 4µL *dNTP Mix*, 2µL DNA polimerase e 1µL RNase H. Os reagentes foram misturados gentilmente por vortex, a mistura foi centrifugada brevemente e colocada no gelo. Um volume de 80µL da mistura foi adicionado a cada amostra de RNA, misturando com a pipeta de 2 a 3 vezes e centrifugando brevemente. As amostras foram incubadas por 2 h a 16°C no termociclador. Após incubação, as amostras foram colocadas em gelo ou armazenadas a -20°C.

3.3.4.3. PURIFICAÇÃO DO cDNA

Antes de iniciar o procedimento de purificação do cDNA, a água livre de RNase foi aquecida entre 50–55°C por pelo menos 10 min.

Adicionou-se 250µL de *cDNA Binding Buffer* a cada amostra, misturando-se com a pipeta de 2 a 3 vezes, e centrifugando rapidamente. Logo em seguida, as amostras foram transferidas para o centro da coluna *cDNA Filter Cartridge* e centrifugadas por 1 min a 10.000 x g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor. 500µL de *Wash Buffer* foram adicionados em cada coluna, as quais foram centrifugadas por 1 min a 10000 x g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor vazio e centrifugada por 1 min adicional para remover qualquer resquício de *Wash Buffer*. A coluna foi transferida para o *cDNA Elution Tube*. Para melhorar a eficiência de eluição do cDNA, foram aplicados 9µL de água livre de RNase, pré-aquecida entre 50–55°C, no centro da coluna, que permaneceu em temperatura ambiente por 2 min e, em seguida, foi submetida à centrifugação por 1,5 min a 10.000 x g. Novamente, foram acrescentados mais 9µL de água livre de RNase, pré-aquecida, no centro da coluna, a qual permaneceu em temperatura ambiente por 2 min e, em seguida, foi centrifugada por 1,5 min a 10000 x g. O cDNA purificado foi armazenado a -20°C.

3.3.4.4. TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* PARA SINTETIZAR O *AMINO ALLYL-MODIFIED* aRNA

Em temperatura ambiente foi preparado o *IVT Master Mix*, adicionando-se os reagentes a seguir: 3µL de aaUTP (50 mM), 12µL ATP, CTP, GTP *Mix* (25 mM), 3µL UTP *Solution* (50 mM), 4µL T7 10X *Reaction Buffer* e 4µL T7 *Enzyme Mix*. Os reagentes foram misturados gentilmente por vortex e a mistura foi brevemente centrifugada e colocada em gelo. Um volume de 26µL foi adicionado a cada amostra, misturando-se com a pipeta de 2 a 3 vezes. Após breve centrifugação as amostras foram incubadas por 14 h a 37°C em banho-maria. Para finalizar a reação foram adicionados 60µL de água livre de RNase a cada amostra de aRNA, elevando a um volume final de 100µL. As amostras foram misturadas gentilmente por vortex. O aRNA foi armazenado a -20°C.

3.3.4.5. PURIFICAÇÃO DO aRNA

Este procedimento remove os aaUTP não incorporados na reação e que poderiam competir com o aRNA na reação de ligação ao corante, além de inativar enzimas, remover sais e outros nucleotídeos livres. Antes de iniciar o procedimento de purificação do aRNA, a água livre de RNase foi aquecida entre 50–60°C por pelo menos 10 min.

Foram adicionados 350µL de *aRNA Binding Buffer* a cada amostra de aRNA. Em seguida, 250µL de etanol 100% foram adicionados a cada amostra, misturando-se com a pipeta de 2 a 3 vezes. A mistura foi imediatamente transferida para o centro da coluna *aRNA Filter Cartridge* e centrifugada por 1 min a 10.000 x g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor vazio. Um volume de 650µL de *Wash Buffer* foi aplicado a cada coluna, a qual foi centrifugada novamente por 1 min a 10.000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor e centrifugada por 1 min adicional para remover qualquer resquício de *Wash Buffer*. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores. Foram adicionados 100µL de água livre de RNase, pré-aquecida, no centro da coluna. Após 2 min em temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 1,5 min a 10.000 x g. A concentração do aRNA foi quantificada em Nanodrop (ND 1000). O aRNA foi armazenado a -20°C.

3.3.4.6. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO aRNA AO CORANTE

Antes de iniciar o procedimento, os tubos contendo os corantes Cy3 e Cy5 foram centrifugados por 1 min a 10.000 rpm. O corante foi preparado imediatamente antes da etapa de ligação ao aRNA. Para isso, 11µL de DMSO foram adicionados a um tubo de corante reativo, Cy3 ou Cy5, misturando gentilmente por vortex. Os corantes ressuspensos foram mantidos no escuro em temperatura ambiente por até 1 h.

Uma quantidade equivalente a 20µg de aRNA foi transferida para um microtubo de 1,5mL, levado ao SpeedVac por cerca de 15 min para secar. Foram adicionados 9µL de *Coupling Buffer* ao tubo contendo o aRNA seco, misturando gentilmente por vortex para ressuspender o aRNA. Subseqüentemente, 11µL dos corantes já preparados foram acrescentados à mistura aRNA:*Coupling Buffer*, misturando gentilmente por vortex. Para proceder à reação de ligação ao corante, os tubos foram incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente.

Para extinguir a reação, foram adicionados 4,5µL de 4M *Hydroxylamine*, misturando gentilmente por vortex, e incubando a mistura por 15 min em temperatura ambiente, no escuro. Finalmente, foi adicionado 5,5µL de água livre de RNase, para elevar o volume de cada amostra a 30µL.

3.3.4.7. PURIFICAÇÃO DO aRNA CORADO

Antes de iniciar a purificação que remove o excesso de corante do aRNA marcado, água livre de RNase foi pré-aquecida entre 50-60°C.

Foram adicionados 105µL de aRNA *Binding Buffer* a cada amostra de aRNA. Em seguida, foram adicionados 75µL de etanol, misturando-se bem com a pipeta de 2 a 3 vezes, sem utilizar o vórtex ou centrifugar. Imediatamente, a mistura foi transferida para o centro da coluna *Labeled aRNA Filter Cartridge* e centrifugada por 1 min a 10.000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo coletor.

Um volume de 500µL de *Wash Buffer* foi aplicado a cada coluna, a qual foi centrifugada por 1 min a 10.000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo coletor. Para eliminar qualquer resquício de *Wash Buffer*, a coluna foi centrifugada por 1 min adicional. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e foram adicionados 10µL de água livre de RNase, pré-aquecida, no centro da coluna. Após 2 min em temperatura

ambiente a coluna foi centrifugada por 1,5 min a 10.000 x g. Este passo foi repetido utilizando-se mais 10µL de água livre de RNase pré-aquecida, totalizando um volume de 20µL.

3.3.5 HIBRIDIZAÇÃO DE *MICROARRAY* DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

As lâminas de *microarray* (BeeOligo121106) foram adquiridas do Keck Center for Comparative and Functional Genomics (Illinois University, Urbana, USA). Estas lâminas contêm 28.800 oligos dispostos em 48 quadrantes com 14.400 *spots* em réplicas duplas, que correspondem, aproximadamente, a todo o genoma de *A. mellifera* (versão 4.0). Cada um dos oligos é composto por 36 nucleotídeos. Maiores informações sobre como foram preparados os *arrays* podem ser obtidas em <http://www.ebi.ac.uk/aerep/result?queryFor=PhysicalArrayDesign&aAccession=A-MEXP-755>.

Antes da hibridização, cada lâmina foi incubada em solução de pré-hibridização (34,4mL água miliQ, 20mL formamida, 33,2mL SSC 20x, 10mL Denharts 50x, 0,5mL tRNA 10mg/mL, 1mL SDS 10%) por 60 min a 42°C. Depois os *slides* foram lavados duas vezes em água miliQ e uma vez em isopropanol e centrifugados a 2.000rpm por 3 min a 20°C.

As lâminas foram hibridadas com amostras de RNA do tegumento de operárias, seguindo o desenho experimental mostrado na Tabela II. Amostras de RNA foram marcadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5. Num experimento subsequente, as amostras de RNA foram marcadas com os fluoróforos invertidos (*dye swap*). Já foi observado que se a mesma amostra de RNA marcada independentemente com os corantes Cy3 e Cy5 e que são co-hibridadas em um *array*, intensidades de sinal diferentes serão medidas em cada canal devido às diferentes propriedades físicas de cada corante (Russel *et al.*, 2009).

Para a hibridização, os RNAs marcados (Cy3 e Cy5) foram combinados e um total de 40µL de solução de hibridação foi adicionado, completando um volume final de 80µL. Esta mistura foi pré-aquecida a 99°C por 3 min e mantida a 55°C, em banho-maria, até a aplicação sobre os *slides*. Quando os slides, juntamente com sua devida lamínula, estavam posicionados no cassete, sobre o termobloco, a 55°C, a amostra foi pipetada e colocada na extremidade da lamínula, deixando esta solução se mover por toda a lâmina por capilaridade. A hibridização ocorreu por 18-42 h, a 42°C.

Em seguida foi realizada uma série de lavagens (2x SSC 2X-SDS 0,1%; 2x SSC 0,5X-SDS 0,01%; 2x SSC 2X; 2x SSC 0,1X e 2x em água bidestilada) e procedeu-se à secagem das lâminas (centrifugadas a 2.000rpm por 2 min a 20°C) para serem escaneadas.

Tabela II - Desenho experimental dos *microarrays* utilizando amostras do tegumento de *A. mellifera*

Desenho experimental			
Experimento	Número do <i>slide</i>	Cy3	Cy5
Pupa x Pupa em apólise	13802207	Pw	Pp
	13802203	Pp	Pw
Pupa em apólise x Adulta-farata	13775439	Pp	Pbl
	13775444	Pbl	Pp
Pupa x Adulta-farata	13802201	Pw	Pbl
	13802205	Pbl	Pw

3.3.6 OBTENÇÃO DOS DADOS E ANÁLISES

As lâminas foram escaneadas em um Axon GenePix 4000B Scanner usando o software Feature Extraction (Agilent), 10 µm de resolução, e os filtros para Cy3 com Laser verde (532 nm), e filtro para Cy5 com Laser vermelho (635 nm).

Para quantificação dos *spots*, foi utilizado o programa GenePix Pro 6.0, com parâmetros *default*.

3.3.7 NORMALIZAÇÃO E ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software R (<http://www.r-project.org/>) associado ao projeto BioConductor - pacote Limma (Smyth, 2005). Algumas considerações essenciais para analisar os dados dos *microarrays* foram: qualidade dos dados, subtração do background e normalização dos dados.

Inicialmente foi realizada a normalização “*within arrays*” usando o método *print-tip loess* para o sinal (para correção dos efeitos dos corantes e efeitos espaciais dos *arrays*) e método *normexp* para o *background*, com *offset* de 50. Em seguida foi realizada a normalização “*between arrays*” utilizando o método “*Aquantile*”. Foram determinados os log2 para cada amostra em cada

array. O valor de *fold-change* de expressão e o erro padrão foram calculados utilizando-se regressão linear dos dados normalizados. Na análise dos genes diferencialmente expressos foi usado o programa eBayes, disponível no pacote Limma da plataforma R. Foram feitas 3 comparações: Pw *versus* Pp, Pbl *versus* Pw e Pbl *versus* Pp. Os *clustering* hierárquico e *heatmaps* foram feitos usando distância euclidiana e método de aglomeração “*complete linkage*”.

A análise funcional foi feita usando o programa DAVID (Huang *et al.*, 2008). Para isto foram considerados os genes diferencialmente expressos únicos que apresentaram similaridade com *D. melanogaster* nas comparações Pbl *versus* Pw e Pbl *versus* Pp, respectivamente (Figura 8). As categorias do *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000) analisadas foram “Processo Biológico” nível 3 e “Função Molecular” nível 2.

3.4. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR

3.4.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Para extração do RNA total, o material armazenado a -80°C foi descongelado. O protocolo de extração utilizado foi o recomendado pelo fabricante (Invitrogen). O RNA obtido foi ressuspensão em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para inibir a ação de RNases e quantificado em NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). A razão entre as leituras de 260 e 280 nm foi utilizada como um indicador da pureza do RNA, sendo ideal entre os valores de 1,9 e 2,0 (Ausubel *et al.*, 1995). Considerou-se que uma unidade de absorvância corresponde a 40µg/mL de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Em seguida, para eliminar a possível contaminação com DNA genômico, as amostras foram incubadas em presença de 0,1 unidade de DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega) por 30 min a 37°C e posteriormente a 70°C por 15 min para inativação da DNase.

3.4.2 SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, utilizando-se o sistema de síntese da SuperScript™ (Invitrogen™, Life Technologies). Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de transcrição reversa (RT). Nesta reação, as moléculas de cDNA foram sintetizadas utilizando-se 1µg de RNA total, 1µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/µL) e 1µL de dNTP (10 mM) em um volume total de 12µL. Em seguida a reação foi

aquecida por 5 min a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 4µL de *First-Strand Buffer* (Invitrogen), 2µL de DTT (0,1M) e 1µL de RNaseOut ou RNAsin (40 unidades/µL). A reação foi novamente incubada por 2 min a 42°C e resfriada em gelo. Finalmente, adicionou-se 1µL de *SuperScriptTM II RT 200U* (Invitrogen), totalizando 20µL. A reação foi incubada por 50 min a 42°C e, depois, aquecida por 15 min a 70°C para inativação da enzima. Como controle negativo da RT-PCR, misturas de reação foram preparadas sem SuperScript.

3.4.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Para as amplificações por PCR foram utilizadas amostras de cDNAs sintetizados a partir do RNA total de tegumentos e *primers* específicos para os genes codificadores de proteínas cuticulares em questão. Utilizou-se 10µL de *Promega Master Mix 2x* [contendo: *Taq DNA Polymerase* 50unidades/ml em tampão pH 8,5; 3 mM MgCl₂; 400µM de cada dNTP (dTTP; dATP; dGTP e dCTP)]; 0,8µL de cada *primer* (10µM), 1µL de cDNA, totalizando um volume final de 20µL com água milliQ bidestilada e autoclavada. As sequências dos *primers* utilizados e a temperatura de pareamento (Tp) para cada conjunto de *primers* estão descritas na Tabela III. Para cada par de *primers*, foi realizada uma curva de saturação para determinar o número de ciclos da PCR. Em geral, as condições de PCR foram:

94°C por 2 minutos	} 40 ciclos
94°C por 30 segundos	
Tp (ver tabela III) por 30 segundos	
72°C por 30 segundos	
72°C por 10 minutos	

O controle interno da amplificação foi realizado utilizando-se *primers* específicos para o gene codificador de uma proteína ribossomal de *A. mellifera*, *rp49*, de expressão constitutiva.

3.4.4 ANÁLISE POR ELETROFORESE EM AGAROSE

O DNA amplificado por PCR (20µL) foi misturado ao tampão de corrida para DNA (bromofenol azul 0,25%, xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30%) e analisado em gel de agarose 1-2% contendo brometo de etídio (0,5µL/mL de gel de agarose) em tampão 1x TBE (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada

sob corrente constante de 100V. Após a eletroforese, o gel foi analisado em digitalizador de imagem KODAK EDAS 290. O λ DNA/Hind III Fragments de 100pb (InvitrogenTM, Life Technologies) foi usado como marcador de peso molecular.

3.4.5 RT-PCR EM TEMPO REAL

Os níveis de transcritos nos diferentes momentos do desenvolvimento (Pw, Pp e Pbl) foram quantificados por RT-PCR em Tempo-Real com *Sybr Green* em equipamento da *Applied Biosystems* (7500 Real Time PCR System). Foi utilizado 1 μ l de cDNA para RT-PCR em Tempo Real em placas de 96 poços contendo 10 μ l de *Sybr Green* PCR Master Mix 2x (*Applied Biosystems*) e 0,8 μ l de *primers* específicos para cada gene estudado (vide Tabela III), em volume final de 20 μ l, completados com água.

Tabela III - Sequências e temperatura de pareamento dos *primers* utilizados nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa e quantitativa

Gene	Nº de acesso GenBank	intron	Primer	Sequência (5' → 3')	Tp	Amplifica
GB10683	-	sim	GB10683-F	TGACGGCAACTACCAATTCA	60°C	136pb
			GB10683-R	ACTTACCGCTTCCCCGTTAC		
GB10737	-	sim	GB10737-F	CCTCTTGACCCCACTATTGC	60°C	106pb
			GB10737-R	CTGGGGCGGCTACAACCTG		
GB11134	-	sim	GB11134-F	CAACAACACCCATTCCAATTT	60°C	134pb
			GB11134-R	CTCGCCTTCGCCTACTTTCT		
GB11550	-	sim	GB11550-F	GCCTGGAACTATGCACCTC	60°C	121pb
			GB11550-R	GGCGTTGTACAGGGAGAAGT		
GB12449	-	sim	GB12449-F	CTCTGCCGTTGTCACTGCT	60°C	120pb
			GB12449-R	TATCCCGCGTAACTGTAGGC		
GB12600	-	não	GB12600-F	AAGGCGGTAGTAGCCAAAGC	60°C	149pb
			GB12600-R	AGGGAATAACTGCCCTGGAC		
GB12705	-	sim	GB12705-F	ATATCAAGCTCGCCATCGTC	60°C	145pb
			GB12705-R	CCGTGCAATCCTCTCTTCTC		
GB12811	-	sim	GB12811-F	TGGTTATTCTTCGGTGGTG	60°C	104pb
			GB12811-R	CTCCCTCGCTGGTTTGATAG		
GB13208	-	sim	GB13208-F	TGGTGAAAGCGTGAAATCTG	60°C	136pb
			GB13208-R	AGCAGCCTCGTATCCGTAAC		
GB13601	-	não	GB13601-F	CTGCCAGAAACAACCTGGACA	60°C	107pb
			GB13601-R	GACTGAGTCGCAATTTGTGC		

Gene	Nº de acesso GenBank	intron	Primer	Sequência (5' → 3')	Tp	Amplifica
GB14225	-	sim	GB14225-F	CATCACGGCCACGATTACTA	60°C	139pb
			GB14225-R	GCTCGTTGACGCTGTAAGAA		
GB14537	-	sim	GB14537-F	TGAATCCCTCGATGTTACTGG	60°C	111pb
			GB14537-R	CAAGATTGATGGTGGGATGA		
GB15203	-	não	GB15203-F	GAAATCCCAGCAAGAAACCA	60°C	133pb
			GB15203-R	TTTATGGACAACCGCATTGA		
GB17384	-	não	GB17384-F	TTTGCGTATGACGTCCAAGA	60°C	120pb
			GB17384-R	TATGCGTCGAGTACCGTCTG		
GB18626	-	sim	GB18626-F	AGTTCATTGCTCTCGCTGCT	60°C	114pb
			GB18626-R	CTACTGGGGCAGCTGCTAAC		
GB18929	-	sim	GB18929-F	CCATCCGGAGCAAGACAATA	60°C	146pb
			GB18929-R	TTCCGGATTCTGTAACCCAC		
GB19110	-	sim	GB19110-F	TGGACAACGTGCAAAAAGAG	60°C	138pb
			GB19110-R	CATTTTCATCGGCCTCGTAT		
GB20015	-	sim	GB20015-F	CCAATGGTTATCCACCTCCT	60°C	145pb
			GB20015-R	TCTTCCTTCACCGCGTAGTT		
GB30203	-	sim	GB30203-F	GCTGGACCAACACTAGTTGC	60°C	125pb
			GB30203-R	TGGTGAGCGAGTACAGATGC		
GB30333	-	não	GB30333-F	ACCGATAGCGATTAGCTGGA	60°C	160pb
			GB30333-R	TGAGTCTTTGCCAACCTCCT		
GB30336	EF531707	não	GB30336-F	CAAGCAATGGGATCAGCCAC	60°C	146pb
			GB30336-R	GAAGCCATTCTCGTCGGCTA		
rp49	AF441189	sim	rp49-F	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	60°C	150pb
			rp49-R	TTGAGCACGTTCAACAATGG		

Os *primers* utilizados foram desenhados para amplificar uma região de cada gene que contém um íntron (Tabela III), de modo a servir como controle da contaminação por DNA genômico. A amplificação foi processada em termociclador 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C (2 min), 95° (10 min), seguido por 40 ciclos de 95° (15 s) e 60° (1 min).

Os dados foram analisados com auxílio do *software* qbase^{PLUS} (Biogazelle), empregando o modelo de quantificação relativa ΔC_t com a correção da eficiência da PCR e normalização múltipla com gene referência (*rp49*). As análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ considerando-se o valor de expressão de Pw como referência, e portanto, sempre igual a 1. Além disso, o *software* permitiu que os dados de diferentes corridas fossem

processados juntos, utilizando-se um calibrador entre corridas (Hellemans *et al.*, 2007). Para verificar a reprodutibilidade, foram realizadas triplicatas biológicas (amostras independentes) e duplicatas experimentais (réplicas técnicas).

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do *software* qbase^{PLUS} (Biogazelle), usando o método One Way ANOVA para testar as diferenças entre 3 grupos independentes (Pw, Pp e Pbl). Os gráficos foram gerados com o *software* Excel 2007 (Microsoft Office).

3.4.6 SEQUENCIAMENTO

3.4.6.1 PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

O fragmento de DNA amplificado por PCR convencional e visualizado em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio foi recortado do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sob luz UV. Subsequentemente, o DNA foi recuperado e purificado por meio do uso do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Inicialmente foram acrescentados 10µL de *Membrane Binding Solution* para cada 10mg de gel, sendo incubado a 50-65°C até que o gel estivesse totalmente dissolvido. Essa mistura foi transferida para a coluna, permanecendo 1 min a temperatura ambiente, e em seguida foi centrifugada a 16.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 700µL de *Membrane Wash Solution*, centrifugando-se novamente a 16.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi descartado. Este passo foi repetido, utilizando 500µL de *Membrane Wash Solution*. Após descarte do filtrado, a coluna foi reinserida no tubo, centrifugada por mais 1 min a 16.000 x g e transferida para um novo tubo. Finalmente foram acrescentados 50µL de *Nuclease-Free Water* e a coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 16.000 x g por 1 min. Ao final desta etapa, o DNA foi armazenado a -20°C.

3.4.6.2 LIGAÇÃO

A reação de ligação foi realizada seguindo as instruções do fabricante do vetor *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega). Foram misturados 3µL de DNA, 5µL de 2X *Rapid Ligation Buffer*, 1µL de T4 DNA *Ligase* e 1µL de pGEM. A reação foi incubada a 4°C por 16 h.

3.4.6.3 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Adicionou-se 10 μ L do produto da ligação com pGEM em um tubo contendo 250 μ L de bactérias *Escherichia coli* competentes da linhagem DH5 α , permanecendo incubado no gelo por 30 min. Então, procedeu-se ao choque térmico, colocando-se o tubo em banho-maria a 42°C por 1 min e, em seguida, incubando-o no gelo por mais 1 min. Meio LB sem antibiótico (500 μ L) foi adicionado ao tubo com as bactérias, permanecendo incubado a 37°C, sob agitação de 160 rpm por 1 hora. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (4 μ g/mL) e X-GAL (40 μ g/mL) e cultivadas a 37°C por aproximadamente 16 h. Uma colônia de bactérias (coloração branca) foi transferida para um tubo *Falcon* contendo meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL), e permaneceu incubada a 37°C, sob agitação de 160 rpm, por aproximadamente 16 h.

3.4.6.4 EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO

Após o período de crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 1 min. A seguir, o DNA plasmidial foi purificado através de mini preparações, utilizando-se o *FastPlasmid Mini kit* (Eppendorf), seguindo as instruções do fabricante.

Após a precipitação das bactérias e descarte do sobrenadante foram adicionados 400 μ L de Tampão de Lise gelado acrescido de RNase e mistura de lisozima (*Complete Lysis Solution*) para ressuspender o precipitado. A mistura foi agitada vigorosamente, incubada por 3 min em temperatura ambiente e transferida para uma coluna de purificação fornecida pelo kit (*Spin Column*). Em seguida à centrifugação por 2 min a 10.000 x g, o filtrado foi descartado e 40 μ L de Tampão de Lavagem diluído em isopropanol (*Diluted Wash Buffer*) foram adicionados à coluna para nova centrifugação por 2 min a 10.000 x g. O filtrado foi descartado e foi realizada uma nova centrifugação para remover totalmente o tampão de lavagem. A coluna foi, finalmente, transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 50 μ L de tampão de eluição (*Elution buffer*). Após incubação por 1 min em temperatura ambiente e centrifugação por 2 min a 10.000 x g, o material foi armazenado a -20°C.

3.4.6.5 DIGESTÃO

Para checar a presença do inserto, uma alíquota do DNA plasmidial foi digerida com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen). A reação de digestão foi realizada utilizando-se 9µL de água bidestilada estéril, 2µL de tampão da enzima *EcoRI* (10x REAct® - Invitrogen), 1µL da enzima *EcoRI* (10U/µL) e 8µL de DNA plasmidial. Subsequentemente, a reação foi incubada a 37°C por 1 hora e submetida a eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0). Brometo de etídeo foi utilizado como corante para visualização dos produtos de digestão.

3.4.6.6 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Em um tudo de 200µL foram adicionados 2µL de DNA plasmidial (250ng/µL), 2µL de *BigDye terminator v3.0 cycle sequencing ready reaction with Amplitaq DNA polymerase* (Applied Biosystems), 2µL de *5X Sequencing buffer* (BigDye® Terminator v1.1, v3.1), 1µL de M13 *primer forward* (5' – CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3') ou M13 *reverse* (5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3') (3,2mol/µL), 3µL de água bidestilada estéril. Os tubos foram colocados no termociclador, nas seguintes condições:

96°C por 10 segundos	} 25 ciclos
50°C por 5 segundos	
60°C por 4 minutos	

3.4.6.7 PRECIPITAÇÃO DO DNA PARA O SEQUENCIAMENTO

Foram transferidos 10µL do produto da reação de sequenciamento para tubos de 1,5mL e acrescentados 4µL de isopropanol 75%. Essa mistura foi agitada, incubada por 15 min em temperatura ambiente e subsequentemente centrifugada por 20 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 250µL de isopropanol 75%. Novamente, o tubo foi agitado e centrifugado por 5 min a 10.000 x g. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi incubado a 57°C por 10 min, para evaporação do isopropanol restante. O DNA precipitado foi ressuspensão em 12µL de tampão TSR com EDTA (Applied Biosystems) e transferido para tubos de polipropileno de 600µL, próprios para sequenciador automático.

Finalmente, o DNA foi desnaturado por 2 min a 94°C, colocado imediatamente em gelo e em seguida no sequenciador. Para o sequenciamento, foi usado o equipamento ABI-PRISM 310 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems). Ambas as fitas de DNA foram sequenciadas, sendo que as sequências geradas foram diretamente enviadas na forma de cromatograma para um computador *PowerMac* (Macintosh), conectado ao sequenciador. Estes cromatogramas foram analisados pelo *software Sequencing Analysis v3 4.1* (Applied Biosystems). Os mesmos cromatogramas foram utilizados para alinhamento das sequências com auxílio do programa *SequencherTM version 4.7 for Windows* (Gene Codes Corporation).

3.4.7 ANOTAÇÃO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

As sequências gênicas diferencialmente expressas foram identificadas no Genoma de *A. mellifera*, versão *Amel_pre_release2* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>). Estas sequências foram comparadas com as sequências de proteínas e nucleotídicas existentes no banco de dados não redundante do GenBank (nr = GenBank + RefSeq Nucleotides + EMBL + DDBJ + PDB), através de buscas por BLASTP ou BLASTX (Altschul *et al.*, 1990).

A estrutura dos genes cuticulares foi verificada com o auxílio do *software Artemis Release 7, The Sanger Institute* (Rutherford *et al.*, 2000), utilizado para anotação dos genes estudados.

Para o alinhamento múltiplo das sequências e análises de similaridade foi utilizado o programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).

O *software* SignalP 3.0 Server foi utilizado para identificar o peptídeo sinal das proteínas codificadas pelos genes cuticulares (Bendtsen *et al.*, 2004).

A massa das proteínas deduzidas foi estimada com a ferramenta PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997) disponível no website <http://www.expasy.org/>.

3.5. LOCALIZAÇÃO ESPACIAL DOS TRANSCRITOS DE GENES CUTICULARES PUTATIVOS NO TEGUMENTO POR HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM SONDA FLUORESCENTE (FISH)

3.5.1 COLETA E FIXAÇÃO DO TEGUMENTO

Amostras de tegumento abdominal dissecado de pupas e adultas-faratas foram transferidas para uma mistura de fixação contendo tampão HEPES (0,1M de HEPES - pH 6,9; 2mM MgSO₄; 1mM EGTA), 10% dimetilsulfóxido (DMSO), 4% paraformaldeído e 1mL de Heptano, na qual foram incubadas por aproximadamente 30 minutos sob vigorosa agitação. Subseqüentemente, os tegumentos foram rapidamente enxaguados e incubados em metanol absoluto por 10 minutos, novamente sob agitação intensa, sendo então transferidos para etanol absoluto e congelados a -20°C até o momento do processamento para FISH.

3.5.2 PRODUÇÃO DA SONDA FLUORESCENTE

Para a localização espacial de transcritos foram selecionados genes cuticulares putativos (GB12449, GB11550 e GB12811) que se mostraram diferencialmente expressos nas análises de *microarrays*, levando-se em conta a identidade com genes cuticulares de outros organismos e a ausência de domínios “cuticulares” característicos. Para a produção das sondas fluorescentes foram confeccionados pares de *primers* específicos de forma a isolar fragmentos com tamanho aproximado entre 300-400 pb. As sequências destes fragmentos foram previamente analisadas *in silico* quanto à especificidade, para evitar que a sonda produzida não formasse híbridos com mRNAs diferentes dos alvos.

Tabela IV - Sequências e temperaturas de pareamento dos *primers* utilizados nos experimentos de hibridação *in situ*

Gene	Nº de acesso GenBank	intron	Primer	Seqüencia (5' → 3')	Tp (°C)	Amplifica
GB12449	-	sim	IS12449-F	CTACGGTGGTCACCTTGGAT	60°C	300pb
			IS12449-R	TATCCCGCGTAACTGTAGGC		
GB11550	-	sim	IS11550-F	TGGTATCCAGGAGCCTATGG	60°C	396pb
			IS11550-R	CGAGTTCCATGAGGGATTGT		
GB12811	-	não	IS12811-F	ACAGCTACAGCAGACCATCG	60°C	379pb
			IS12811-R	TGGCTCACTTGGTTGAACTG		

A sonda (mRNA modificado) foi produzida com o *FISH Tag RNA Green kit* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, utilizando o produto de amplificação por PCR dos genes alvo como molde. A transcrição *in vitro* das fitas *antisense* e *sense* do DNA molde produziu, respectivamente, a sonda para detecção do sinal fluorescente e seu controle de *background* (marcação de fundo). Em ambas as fitas ocorreu a incorporação (mediada por enzimas) de nucleotídeos contendo uma amina modificada (aminoalil-UTP em substituição a UTP) durante a transcrição *in vitro*. Às bases modificadas incorporadas, procedeu-se o acoplamento do corante fluorescente *Alexa Fluor® 555* (Invitrogen), através da ligação covalente do fluoróforo à base.

Na região 5' dos oligos foi adicionada uma sequência contendo o sítio de reconhecimento para a enzima RNA polimerase T7. O produto de PCR amplificado com estes primers foi purificado com *MinElute PCR purification kit* (Qiagen) e 1µg do DNA eluído foi utilizado para gerar 1-4µg de sonda. A solução de reação, constituída de 1-10µL de DNA molde, 4µL de tampão de transcrição (5x) para RNA polimerase T7, 2µL de mistura de nucleotídeos para RNA (10x), 1µL de inibidor de RNase (RNaseOUT™ *ribonuclease inhibitor*), 2µL de RNA polimerase T7, 1µL de DTT e 1-10µL de água *nuclease free* (também utilizada para completar o volume da reação para 20µL), foi incubada por 1 h a 37°C. Após este período, o produto de transcrição foi tratado com DNase I – RNase Free (Invitrogen) por 15 minutos a 37°C, para eliminação do DNA molde, sendo a reação bloqueada pela adição de 79µL de água *nuclease free* e vigorosa agitação em vórtex.

Em seguida, a sonda e seu controle negativo foram purificados com sistema de colunas do *kit* e precipitados com acetato de sódio 3M e etanol. O RNA, ressuspenso em água *nuclease free*, foi quantificado e sua concentração ajustada para 0,2µg/µL. Para acoplamento do corante fluorescente às bases modificadas, 5µL (1µg) de RNA foi desnaturado a 65°C por 5 minutos, seguido de imediata transferência e incubação em gelo por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm, seguida de adição de 3µL de bicarbonato de sódio e de 2µL do corante dissolvido em DMSO. A reação foi, então, incubada por 1 h no escuro à temperatura ambiente e, posteriormente, diluída com 90µL de água *nuclease free*. A sonda e seu respectivo controle negativo foram então purificados, precipitados e congelados em *freezer* -80°C até o momento do uso.

3.5.3 PROCEDIMENTOS DE HIBRIDAÇÃO E PÓS-HIBRIDAÇÃO

Os tegumentos fixados foram reidratados em bateria decrescente de metanol em tampão PTw (PBS 1x contendo 0,1% de Tween 20), seguida por três lavagens de 5 minutos cada neste tampão. Os tegumentos foram pós-fixados em mistura contendo 9 partes de PPTw (4% paraformaldeído em PTw e 0,1% Triton X-100) e 1 parte de DMSO por 30 minutos à temperatura ambiente e sob leve agitação. O material foi então lavado por 5 vezes de 1 minuto cada em PTw e incubado por 1-3 minutos com proteinase K (20µg/mL), seguido de enxágüe e incubação em solução de glicina (10mg/mL) por 5 minutos. Após duas lavagens rápidas com PTw o material foi novamente pós-fixado, com a mesma solução e condições acima descritas, e lavado por 5 vezes durante 1 minuto com PTw.

Os tegumentos foram incubados à temperatura ambiente por 2 vezes de 10 minutos cada, primeiramente em mistura 1:1 de PTw e solução de hibridação (50% formamida, 4x SSC, 1x solução de *Denhardt*, 250µg/mL de RNA total de levedura, 250µg/mL de espermatozoides de salmão fervido, 50µg/mL heparina, 0,1% Tween, 5% de sulfato de Dextran) e, em seguida, somente em solução de hibridação.

A solução de hibridação foi renovada e os tegumentos foram pré-hibridados por 1h à 45°C, e em seguida hibridados com a sonda diluída (200ng/mL) por 16h a 45°C sob leve agitação. Após este período, a sonda foi recuperada e congelada à -20°C, para posterior reutilização, ao passo que os tegumentos foram banhados por mistura de solução de hibridação e PTw (subsequentemente 3v:1v, 1v:1v e 1v:3v) com 30 minutos de duração cada.

Para co-localização dos núcleos das células do tegumento com a sonda fluorescente, foi realizada marcação com diamidino-2-fenilindole (DAPI) diluído 1:4.000 em PTw por 5 minutos, seguida de 4 lavagens de 10 min cada em PTw. Ao final, os tegumentos foram transferidos para solução de glicerol 70% em PTw e montados em lâminas histológicas com *SlowFade® Gold* (Invitrogen) para observação em microscópio confocal *Leica TCS-SP5 AOBS*.

4. **RESULTADOS**

4.1. PANORAMA GERAL DA INFORMAÇÃO GENÔMICA DINAMICAMENTE ORGANIZADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO EXOESQUELETO ADULTO

Para caracterizar a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento do exoesqueleto adulto de abelhas, investigamos as mudanças no perfil de expressão em três pontos específicos da ontogênese: antes, durante e após a apólise pupal, isto é, nas fases de pupa (Pw), pupa em apólise (Pp) e adulta farata (Pbl). A abordagem escolhida para medir os níveis dos transcritos em larga escala foi a técnica do *microarray*. O delineamento experimental abaixo (Figura 5) evidencia como foram realizadas as comparações entre as amostras biológicas selecionadas.

Figura 5 - Desenho dos experimentos de *microarrays*. Comparações diretas entre duas amostras, Pw *versus* Pp (A), Pbl *versus* Pw (B) e Pbl *versus* Pp (C), com *dye swap*, perfazendo um total de dois *arrays* para cada comparação. As flechas ligam as duas amostras que foram co-hibridadas no mesmo *array*, de maneira que, a ponta da flecha representa a marcação com corante Cy3 e a extremidade oposta da flecha indica marcação com o corante Cy5.

Desta forma, o experimento A (Figura 5), por exemplo, representa dois *microarrays*, sendo que no primeiro a amostra Pw foi marcada com Cy3 (verde) e a amostra Pp foi marcada com Cy5 (vermelho), enquanto que no segundo *array*, as amostras foram marcadas com os corantes invertidos. A inversão de corantes (*dye swap*) tem como objetivo eliminar diferenças sistemáticas que podem ocorrer devido às diferentes propriedades físicas de cada corante (Russel *et al.*, 2009) e, além disso, neste caso, a inversão de corantes funciona como uma réplica técnica.

Usando como critério estatístico um valor de $p \leq 0,05$ foi possível identificar 995 e 1497 *spots* diferencialmente expressos nos experimentos B e C (Figura 5), respectivamente. No experimento A (Figura 5) não foi encontrada diferença estatística significativa entre os dados de expressão dos genes das amostras de tegumento de Pw e Pp. Constatamos que o número de genes diferencialmente expressos em cada uma das quatro faixas de valores de *Fold* (>1 ou <-1 ; >2 ou <-2 ; $>2,5$ ou $<-2,5$; >4 ou <-4), na comparação Pw *versus* Pp (Tabela V, EXP A) é sempre muito menor quando comparado ao número de genes diferencialmente expressos na mesma faixa de *Fold* nas comparações entre Pbl *versus* Pw (Tabela V, EXP B) e Pbl *versus* Pp (Tabela V, EXP C). Esta menor proporção de genes com expressão diferencial (em valores de *Fold*) entre Pw e Pp resultou em valores de p insignificantes na análise global com o software *eBayes*. Biologicamente, essa diferença pode ser explicada, pois as cutículas de Pw e Pp são muito semelhantes, ou seja, na fase Pp a cutícula que recobre a abelha ainda é a cutícula pupal. Em Pp ocorre a apólise da cutícula pupal e, a partir deste momento, ocorrerá a formação da cutícula do adulto.

Dentre os genes (*spots*) diferencialmente expressos nos *arrays*, estão representadas sequências do *Official Gene Set* (OGS), *variable exons from the antimicrobial peptide apidaecin*, *variable exons from the IG-family gene Dscam*, *representative genes from viral, fungal, bacterial, and microsporidian pathogens of honey bees* e *non-OGS EST's from a subtractive library biased toward larval genes upregulated with exposure to the bacterial pathogen Paenibacillus larvae*. Focamos nossos resultados nos *spots* que correspondem às sequências do OGS, os quais representam aproximadamente 87% do número total de genes diferencialmente expressos identificados (Figura 6). O OGS corresponde a um conjunto de predições gênicas feitas por pesquisadores de diversos países durante o consórcio para o sequenciamento do genoma de abelhas *A. mellifera*. Os outros 13% restantes correspondem àquelas outras sequências disponíveis nas lâminas de *microarrays*, como especificado acima. Portanto, do total de 995 *spots* identificados no experimento B e dos 1497 *spots* do experimento C, 862 e 1304, respectivamente, correspondem a genes do OGS (Figura 6).

Dentre estes, alguns genes foram espotados em mais de um local nas lâminas de *microarrays*, sendo assim, 761 e 1173, respectivamente, correspondem a sequências únicas. A lista dos genes que correspondem ao OGS em cada uma destas comparações pode ser observada no apêndice 1 (8.1 e 8.2).

Tabela V - Número de genes do tegumento diferencialmente expressos nas comparações entre Pw/Pp, Pbl/Pw e Pbl/Pp utilizando-se o valor de *Fold* como critério.

<i>Fold</i>	Pw/Pp EXP A	Pw/Pp EXP A <i>dye swap</i>	Pbl/Pw EXP B	Pbl/Pw EXP B <i>dye swap</i>	Pbl/Pp EXP C	Pbl/Pp EXP C <i>dye swap</i>
>1 ou <-1	1224	1995	4257	2611	4291	5998
>2 ou <-2	142	350	598	561	724	1112
>2.5 ou <-2.5	66	158	288	275	363	467
>4 ou <-4	12	9	44	20	57	47

Para melhor explorar esta vasta lista de genes diferencialmente expressos utilizamos uma ferramenta de bioinformática (DAVID) que permite classificar os genes segundo critérios do *Gene Ontology* (GO) (Ashburner *et al.*, 2000), o qual fornece um vocabulário de categorização dos genes baseado em funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. Para isso, consideramos apenas os genes do OGS que apresentaram similaridade e, portanto, poderiam ser ortólogos, aos de *D. melanogaster*.

A Figura 7 mostra as porcentagens de genes (sequências únicas) com expressão diferencial significativa no tegumento de *A. mellifera*, que apresentaram ou não, ortólogos putativos em *D. melanogaster*. Em consequência, uma porcentagem de 8% e 7% nas respectivas comparações, adultas faratas *versus* pupas e adultas faratas *versus* pupas em apólise, não foram consideradas nas análises do GO.

As análises do GO baseadas nos processos biológicos, nas funções moleculares e nos componentes celulares revelaram que os genes diferencialmente expressos nas fases do desenvolvimento analisadas se enquadram em classificações bem distintas (Figura 8). As Figuras 8A, 8B e 8C evidenciam em quais categorias de processos biológicos, funções moleculares e de componentes celulares os genes diferencialmente expressos nas comparações Pbl *versus* Pw se encaixam, ao passo que as Figuras 8D, 8E e 8F trazem as informações da comparação entre Pbl *versus* Pp.

De maneira geral, os processos biológicos que caracterizam a fase de pupa (Pw) (Figura 8A) estão relacionados ao ciclo celular, como por exemplo: *cell cycle process*, *mitotic cell cycle*, *cytoskeleton organization* e *cellular biosynthetic process*. As funções moleculares

(Figura 8B) refletem a atividade de interação entre proteínas e ácidos nucleicos, como: *nucleic acid binding*, *protein binding* e *nucleotide binding*, também evidenciando a complexidade do sistema de controle que conduz e coordena o desenvolvimento do ciclo celular. A análise dos componentes celulares (Figura 8C) revelou maior sobreposição entre as categorias analisadas, embora a fase pupal (Pw) tenha se distinguido por algumas categorias específicas, tais como, *non-membrane-bounded organelle*, *larval serum protein complex* e *protein-DNA complex*.

O tegumento de pupas em apólise (Pp) é caracterizado por maior diversidade de categorias de processos biológicos (Figura 8D), a grande maioria destas relacionadas ao ciclo celular e sua regulação, tais como: *cell cycle process*, *cellular macromolecule metabolic process*, *cytoskeleton organization*, *regulation of cell cycle* e *gene expression*. As funções moleculares (Figura 8E) evidenciam interação entre proteínas, ácidos nucleicos e nucleotídeos: *protein binding*, *nucleotide binding* e *nucleic acid binding*. A análise dos componentes celulares (Figura 8F) em pupas em apólise (Pp) também revelou maior sobreposição entre as categorias analisadas.

Durante a fase Pbl destacam-se as seguintes categorias de processos biológicos (Figura 8A e 8D): *generation of precursor metabolites and energy*, *electron transport chain* e *phosphorus metabolic process*, as quais estão relacionadas com a produção de energia e manutenção do funcionamento da célula. As funções moleculares (Figura 8B e 8E) estão relacionadas a atividades enzimáticas, tais como, *oxidoreductase activity*, *peroxidase activity* e *substrate-specific transporter activity*, refletindo uma maior atividade das células da epiderme para a maturação cuticular. Além destas, merece destaque a categoria *structural constituent of cuticle*, o que evidencia a atividade de genes envolvidos na formação da estrutura cuticular, onde encaixam-se as sequências codificadoras dos genes cuticulares que estão sendo focados neste trabalho. A maioria das categorias de componentes celulares (Figura 8C e 8F) observadas em adultas faratas são semelhantes às observadas em pupas ou pupas em apólise, embora nas primeiras o número de características exclusivas é maior, tais como: *organelle envelope*, *organelle membrane*, *membrane* e *membrane part*.

Figura 6 - Proporção de genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* que correspondem às sequências do *Official Gene Set* (OGS) de um total de 995 e 1497 nas respectivas comparações: Pbl versus Pw (EXPERIMENTO B) e Pbl versus Pp (EXPERIMENTO C). As demais sequências foram lançadas na categoria 'Outros'.

A. **Pbl** versus **Pw** B. **Pbl** versus **Pp**

Figura 7 - Proporção de genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* de um total de 761 e 1173 nas respectivas comparações entre etapas distintas do desenvolvimento: adulta farata (Pbl) versus pupa (Pw) e adulta farata (Pbl) versus pupas em apólise (Pp). A presença ou não de ortólogos em *D. melanogaster* está indicada nas respectivas legendas.

A. Processo Biológico - Pbl versus Pw

B. Função Molecular - Pbl versus Pw

C. Componente Celular - Pbl *versus* Pw

D. Processo Biológico - Pbl versus Pp

E. Função Molecular - Pbl versus Pp

Figura 8 - Classificação dos genes diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* segundo critérios do *Gene Ontology*. A análise foi realizada com os genes que apresentaram ortólogos putativos em *D. melanogaster* nas categorias Processos Biológicos, Funções Moleculares e Componentes Celulares, nas seguintes comparações: (A, B, C) Adultas faratas (Pbl) versus pupas (Pw) e (D, E, F) Adultas faratas (Pbl) versus pupas em apólise (Pp).

4.2. GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS CUTICULARES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO TEGUMENTO DURANTE A MUDA PUPAL-ADULTA

Para identificar os genes codificadores de proteínas cuticulares entre os genes diferencialmente expressos, utilizamos duas abordagens. Inicialmente buscamos identificar sequências similares às sequências cuticulares já descritas (revisão em Willis, 2010). Numa segunda abordagem tentamos identificar sequências cuticulares ainda não descritas e, para isto, procuramos dentre os resultados de BLAST de todas as sequências inicialmente identificadas por palavras-chave como “*cuticle*”, “*exoskeleton*” e “*cuticular*”. Desta maneira foi possível identificar 24 genes que apresentaram similaridade com algum gene cuticular. A Tabela VI lista todas as 24 sequências encontradas e relaciona algumas informações como: Gene ID, Símbolo, Domínio Proteico, Família, Descrição da proteína similar e E-value.

Todos os GBs foram confrontados no banco de dados do NCBI NR (*Non-redundant protein sequences*) para identificação das proteínas codificadoras correspondentes (BLASTP). Esta busca também retornou a presença de domínios conservados, identificados pelo banco de dados Pfam/InterPRO, os quais são indicativos da família a qual pertencem estas sequências. Assim, as sequências detectadas estão distribuídas em 6 famílias de proteínas cuticulares: CPF, CPR, Apidermina, CPLCP, Análoga a peritrofina e Tweedle. Apenas os genes codificadores de AmelCPR14, AmelTwdl1 e AmelTwdl2 (Soares *et al.*, 2007; 2010) e das Apiderminas Apd-1, Apd-2 e Apd-3 (Kucharski *et al.*, 2007) foram validados experimentalmente por sequenciamento e estudos de expressão. Os genes codificadores das outras 18 proteínas cuticulares de *A. mellifera* derivam do sequenciamento do genoma e, portanto, são preditos.

Doze entre as 24 sequências identificadas, potencialmente codificam proteínas que possuem o domínio *Chitin_bind_4*, característico da família de proteínas cuticulares denominada CPR, que se distingue pela presença do Consenso R&R. Duas destas, AmelCPR29 e AmelCPR30, não constam no banco cuticleDB. Este banco possui todas as sequências que foram identificadas como proteínas cuticulares na ampla busca automatizada pelo genoma de *A. mellifera*.

O gene de ID GB13601 codifica a proteína AmelCPF1 de uma outra família de proteínas cuticulares, denominada CPF (*Cuticle Protein with Forty-four amino acid residues*) por Togawa *et al.* (2007). Os genes de IDs GB30202, GB10737 e GB30203 codificam as

proteínas cuticulares Apd-1, Apd-2 e Apd-3, da família das Apiderminas, cujos genes foram identificados por Kucharski *et al.* (2007). A característica principal dessa família de proteínas cuticulares é a presença de pelo menos um tetrapeptídeo AAPV/A, sendo encontradas predominantemente em cutículas mais duras, ou seja, com alto grau de esclerotização.

O gene de ID GB12705 codifica uma proteína da família CPLCP (*Cuticular Proteins of Low Complexity Proline-rich*) inicialmente identificada em *A. gambiae* (He *et al.*, 2007) e posteriormente reconhecida como uma família de proteínas cuticulares por Cornman e Willis (2009). Os genes de IDs GB13298 e GB13470 codificam proteínas da família CPAP3 (*Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins*), sendo que o número 3 indica que estas proteínas possuem 3 domínios ChtBD2.

Os genes de IDs GB11550, GB12449 e GB12811 codificam proteínas que não apresentam domínios conservados, típicos de proteínas cuticulares, ou pelo menos descritos nos bancos de dados atualmente disponíveis. No entanto, detectamos similaridade com outras sequências cuticulares ao realizar a busca acima referida contra o banco de dados do NCBI. Assim, estes genes foram incluídos entre os genes cuticulares de *A. mellifera*.

Tabela VI - Genes codificadores de proteínas cuticulares diferencialmente expressos no tegumento de abelhas *A. mellifera* durante a muda pupal-adulta, e similaridade com sequências de proteínas de insetos depositadas no NCBI

Gene ID (GB)	Símbolo	Domínio proteico (Pfam/InterPRO)	Família	Descrição	E-value
GB13601	AmelCPF1	Pupal cuticle protein C1	CPF	<i>Pupal cuticle protein C1B [Acromyrmex echinator]</i>	7.00E-38
GB17384	AmelCPR3	Chitin_bind_4	CPR	<i>cuticular protein RR-2 family member 9 [Nasonia vitripennis]</i>	1.00E-51
GB15203	AmelCPR4	Chitin_bind_4		<i>Larval cuticle protein A2B [Acromyrmex echinator]</i>	5.00E-47
GB14225	AmelCPR6	Chitin_bind_4		<i>Cuticle protein 8 [Harpegnathos saltator]</i>	1.00E-89
GB30336	AmelCPR14	Chitin_bind_4		<i>Structural cuticle protein [Apis mellifera]</i>	5.00E-97
GB17642	AmelCPR15	Chitin_bind_4		<i>Pro-resilin [Camponotus floridanus]</i>	3.00E-50
GB30333	AmelCPR17	Chitin_bind_4		<i>Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1 [Harpegnathos saltator]</i>	9.00E-61
GB20015	AmelCPR23	Chitin_bind_4		<i>Pro-resilin [Harpegnathos saltator]</i>	2.00E-82
GB10424	AmelCPR24	Chitin_bind_4		<i>Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2 [Acromyrmex echinator]</i>	1.00E-66
GB10683	AmelCPR25	Chitin_bind_4		<i>Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-8 [Camponotus floridanus]</i>	4.00E-48
GB14537	AmelCPR28	Chitin_bind_4		<i>Flexible cuticle protein 12 [Harpegnathos saltator]</i>	2.00E-54
GB11134	AmelCPR29	Chitin_bind_4		<i>cuticular protein RR-1 family member 53 [Nasonia vitripennis]</i>	4.00E-69
GB19110	AmelCPR30	Chitin_bind_4		<i>cuticular protein [Nasonia vitripennis]</i>	4.00E-18
GB30202	apd-1	-	Apidermina	<i>apidermin 1 [Apis mellifera]</i>	3.00E-65
GB10737	apd-2	-		<i>apidermin 2 [Apis mellifera]</i>	5.00E-40
GB30203	apd-3	-		<i>apidermin 3 [Apis mellifera]</i>	6.00E-65
GB12705	CPLCP1	-	CPLCP	<i>cuticular protein CPG24 [Papilio xuthus]</i>	2.00E-103
GB11550	-	-	-	<i>cuticular protein 92F [Drosophila melanogaster]</i>	0.001
GB12449	-	-	-	<i>apidermin-like [Apis mellifera]</i>	4.00E-53
GB12811	-	-	-	<i>cuticular protein glycine-rich 20 [Bombyx mori]</i>	2.00E-23
GB13298	Am-C	ChtBD2	Análoga a Peritrofinas	<i>cuticular protein analogous to peritrophins 3-C [Apis mellifera]</i>	0
GB13470	Am-D	ChtBD2		<i>cuticular protein analogous to peritrophins 3-D [Apis mellifera]</i>	1.00E-170
GB19234	AmelTwld1	DUF243	Tweedle	<i>tweedle motif cuticular protein 1 [Apis mellifera]</i>	0
GB14193	AmelTwld2	DUF243		<i>tweedle motif cuticular protein 2 [Apis mellifera]</i>	2.00E-123

4.3. ANOTAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CUTICULARES

As informações referentes aos 24 genes cuticulares diferencialmente expressos nos *microarrays*, tais como, localização no cromossomo, número de éxons e de íntrons, tamanho dos íntrons e tamanho do RNAm estão resumidas na Tabela VII, ao passo que as informações relativas às sequências das respectivas proteínas deduzidas estão dispostas na Tabela VIII, onde constam número de acesso no NCBI, e características das proteínas deduzidas, tais como, presença do peptídeo sinal, sítio de clivagem, tamanho das proteínas preditas e maduras, e massa molecular das proteínas maduras.

Os dados evidenciam que o tamanho do RNAm variou entre 234 e 1434 nucleotídeos, sendo que aproximadamente 75% deles possuem entre 300 e 600 nucleotídeos (Tabela VII). As proteínas deduzidas, por sua vez, variam entre 77 e 477 aminoácidos, de maneira que 71% delas têm até 200 aminoácidos (Tabela VIII).

Reconhecemos três *clusters* gênicos (destacados pela cor cinza na Tabela VII), sendo representados por GroupUn41, Group2.7 e Group4.7. Estes agrupam, respectivamente, dois (*AmelCPR3* e *AmelCPR4*), dois (*AmelCPR17* e *AmelCPR14*) e quatro (*GB12449*, *apd-3*, *apd-1* e *apd-2*) genes cuticulares. A representação esquemática dos genes pertencentes a estes grupos, incluindo o sentido de transcrição dos mesmos, está evidenciada na Figura 9.

Com relação à arquitetura dos genes, observamos que, dos 24 genes cuticulares, 8 possuem dois éxons, 12 possuem três éxons, 3 apresentaram quatro éxons e apenas 1 deles apresentou cinco éxons. Além disso, a grande maioria dos genes possui éxons iniciais pequenos, com cerca de 9 a 33 nucleotídeos. Estas informações podem ser conferidas na Tabela VII e nas Figuras 9 e 10.

Uma característica marcante das proteínas cuticulares é a presença do peptídeo sinal, direcionando o transporte destas proteínas. Assim, por serem proteínas secretadas possuem um peptídeo que é clivado no momento do transporte para a cutícula (Willis *et al.*, 2005). O peptídeo sinal está presente nas 24 proteínas cuticulares deduzidas, sendo que o sítio de clivagem varia da 16^a à 54^a posição (Tabela VIII). A grande maioria dos genes possui um íntron que interrompe o peptídeo sinal, resultando em éxons iniciais pequenos, como pode ser visto nas Figuras 9 e 10.

Tabela VII - Características dos 24 genes cuticulares de *A. mellifera* diferencialmente expressos nos *microarrays*, tamanho dos respectivos RNAs mensageiros e identificação das famílias de proteínas que codificam

Gene ID (GB)	Símbolo	Famílias de proteínas cuticulares	Grupo Gênico (versão 4.0)	Nº éxons	Nº introns	Tamanho dos introns (nt)	Gene (nt)	RNA _m (nt)
GB13601	<i>AmelCPF1</i>	CPF	Group15.34	2	1	211	616	405
GB17384	<i>AmelCPR3</i>	CPR	GroupUn.41	2	1	755	1709	954
GB15203	<i>AmelCPR4</i>		GroupUn.41	2	1	1456	1831	375
GB14225	<i>AmelCPR6</i>		Group8.18	2	1	1625	2216	591
GB30336	<i>AmelCPR14</i>		Group2.7	3	2	635; 1612	2685	438
GB30333	<i>AmelCPR17</i>		Group2.7	2	1	127	607	480
GB17642	<i>AmelCPR15</i>		GroupUn16.21	4	3	3002; 182; 368	4986	1434
GB20015	<i>AmelCPR23</i>		Group8.32	3	2	2817; 216	3611	578
GB10424	<i>AmelCPR24</i>		GroupUn.8750	3	2	552; 554	1604	498
GB10683	<i>AmelCPR25</i>		Group9.22	4	3	51424; 1751; 453	54399	771
GB14537	<i>AmelCPR28</i>		Group6.19	3	2	841; 168	1327	318
GB11134	<i>AmelCPR29</i>		GroupUn.217	2	1	1121	1628	507
GB19110	<i>AmelCPR30</i>		Group11.13	3	2	527; 71	1099	501
GB30202	<i>apd-1</i>	Apidermina	Group4.7	3	2	342; 317	1028	369
GB10737	<i>apd-2</i>		Group4.7	3	2	300; 392	926	234
GB30203	<i>apd-3</i>		Group4.7	3	2	248; 98	700	354
GB12449	-	-	Group4.7	3	2	540; 342	1515	633
GB11550	-	-	Group8.39	3	2	916; 231	1633	486
GB12811	-	-	Group13.9	2	1	563	1016	453
GB12705	<i>CPLCP1</i>	CPLCP	Group5.2	2	1	562	1645	1083
GB13298	<i>Am-C</i>	CPAP	GroupUn3.35	4	3	1839; 871; 1113	4092	807
GB13470	<i>Am-D</i>		Group5.28	5	4	1715; 1860; 1053; 81	4941	699
GB19234	<i>AmelTwld1</i>	Tweedle	GroupUn.1241	3	2	1872; 829	3700	999
GB14193	<i>AmelTwld2</i>		GroupUn.592	3	2	168; 192	951	591

(-) sem motivos ou domínios cuticulares canônicos

Tabela VIII - Características das proteínas cuticulares deduzidas dos 24 genes diferencialmente expressos nos *microarrays*.

Símbolo	Número de acesso (NCBI)	Domínio conservado	Peptídeo sinal	Sítio de Clivagem	Proteína deduzida (aa)	Proteína madura (aa)	Proteína Madura (kDa)
AmelCPF1	XP_001122355.1	Pupal cuticle protein C1	Sim	18	134	116	11,8
AmelCPR3	XP_392861.3	RR-2	Sim	18	317	299	32,6
AmelCPR4	XP_001122914.1	RR-2	Sim	22	124	102	11,1
AmelCPR6	XP_003249528.1	RR-2	Sim	29	196	167	18,4
AmelCPR14	ABP57431.1	RR-1	Sim	23	145	122	13,1
AmelCPR17	XP_001120445.2	RR-1	Sim	17	159	142	15,8
AmelCPR15	XP_392701.3	RR-2	Sim	54	477	423	40,4
AmelCPR23	XP_001122447.2	RR-2	Sim	19	191	172	19,3
AmelCPR24	XP_001123101.2	RR-1	Sim	18	165	147	16,6
AmelCPR25	XP_001122667.2	RR-1	Sim	24	256	232	22,4
AmelCPR28	XP_395664.2	RR-1	Sim	17	105	88	9,9
AmelCPR29	XP_001122709.2	RR-1	Sim	16	183	167	19,1
AmelCPR30	XP_003249415.1	Tipo de RR indefinido	Sim	26	166	140	15,3
apd-1	NP_001078814.1	-	Sim	17	122	105	9,2
apd-2	NP_001078815.1	-	Sim	17	77	60	6,1
apd-3	NP_001078813.1	-	Sim	17	117	100	8,9
GB12449	XP_001122844	-	Sim	17	209	192	17,9
GB11550	XP_625294.1	-	Sim	19	161	142	14,5
GB12811	XP_393452.3	-	Sim	19	177	158	15,6
CPLCP1	XP_624317.2	-	Sim	19	360	341	37,3
Am-C	NP_001165860.1	ChtBD2	Sim	18	807	789	27,7
Am-D	NP_001165850.1	ChtBD2	Sim	23	699	676	22,9
AmelTwld1	ACJ38118.1	DUF243	Sim	48	168	120	25,8
AmelTwld2	ADK73965.2	DUF243	Sim	26	196	170	18,5

(-) sem motivos ou domínios cuticulares canônicos

Figura 9 - Representação esquemática dos grupos 2.7 (de 39.000 a 123.500 nucleotídeos), 4.7 (de 1.650.000 a 1.674.000 nucleotídeos) e Un41 (de 36.800 a 48.000 nucleotídeos), perfazendo 8 genes cuticulares na versão 4.0 do genoma de *A. mellifera*: as grandes setas indicam a direção da transcrição. A estrutura dos genes detectados em cada grupo segue anotada. Logo abaixo da anotação gênica, a estrutura dos transcritos segue representada, sendo que os éxons e íntrons estão identificados como caixas e linhas, respectivamente, e o número de nucleotídeos está indicado acima ou abaixo destas representações. A posição dos *primers* usados para quantificar (por RT-PCR em tempo real) ou localizar (por meio de hibridação *in situ*) os transcritos no tegumento está identificada por pequenas flechas de cor preta ou cinza, respectivamente.

Figura 10 - Representação esquemática dos 16 genes cuticulares que não se organizam em *clusters* (versão 4.0 do genoma de *A. mellifera*). A estrutura dos genes detectados segue anotada, de maneira que os éxons e íntrons estão identificados como caixas e linhas, respectivamente, e o número de nucleotídeos está indicado acima ou abaixo destas representações. A flecha abaixo da figura indica a direção da transcrição. A posição dos *primers* usados para quantificar (por RT-PCR em tempo real) ou localizar (por meio de hibridação *in situ*) os transcritos no tegumento está identificada por pequenas flechas de cor preta ou cinza, respectivamente.

As massas moleculares das proteínas deduzidas, de maneira geral é pequena, variando entre 6,1 a 40,4 kDa (Tabela VIII). Para o cálculo das massas moleculares, consideramos apenas as proteínas maduras.

Como descrito anteriormente, o tipo de domínio presente nas sequências cuticulares é indicativo da família à qual pertencem, de maneira que cada família de proteínas cuticulares é caracterizada pela presença de algumas regiões conservadas. Até o presente momento foram descritos os domínios para as famílias CPF, CPR, CPAP e Tweedle. No caso da família CPR estão descritas três formas distintas deste domínio: os Consensos RR-1, RR-2 e RR-3 (Andersen, 1998, 2000). Dentre as 12 proteínas CPR codificadas pelos genes diferencialmente expressos nos *microarrays*, 6 possuem o Consenso RR-1, 5 possuem o RR-2 e em uma delas não foi possível distinguir o tipo de Consenso RR com a ferramenta de predição disponível atualmente no site cuticleDB.

Todas as 24 sequências de proteínas cuticulares que constam no OGS_preRelease2 de *A. mellifera* foram confrontadas com o banco de dados do NCBI (BLASTX). O número de acesso de cada uma destas sequências está disposto na Tabela VIII. As únicas incoerências observadas entre estes dois bancos de dados estão relacionadas às sequências GB12449, GB12811, AmelCPR6, AmelCPR24 e AmelCPR9 (Figuras 11, 12 e 13).

A sequência de aminoácidos predita do GB12449 e que consta do banco OGS_preRelease2 apresentou alta similaridade com duas outras sequências do NCBI, XP_001122844.1 e NP_001167615.1. O alinhamento entre as três sequências pode ser observado na Figura 11A. Após o sequenciamento do GB12449 foi possível detectar o erro na predição do mesmo e constatar que a sequência correspondente do NCBI é a de número de acesso XP_001122844.1. A sequência nucleotídica do GB12449 validada por sequenciamento e seu produto de tradução predito estão dispostos na Figura 11B.

A outra sequência que apresentou incoerência entre os bancos de dados utilizados foi o GB12811. Observamos que a região inicial da proteína predita do GB12811 está incompleta no banco OGS_preRelease2 (Figura 12A). O sequenciamento parcial confirmou a similaridade com a sequência XP_393452.3 do NCBI. O GB12811 validado por sequenciamento e seu respectivo produto de tradução são mostrados na Figura 12B.

O sequenciamento também se estendeu para as regiões 5'UTR de ambos os GBs, GB12449 e GB12811, validando-as (Figuras 11B e 12B). Outras inconsistências em relação a região 5'UTR entre os dois bancos de dados também foram verificadas para as sequências correspondentes a AmelCPR6, AmelCPR24 e AmelCPR29, como constatado na Figura 13.

A.

```

GB12449      1 MARKVILLAFVLVAAAPRQRDAIWSGYHGGYGGHLGYAHGVAVAGPALGPASVAGPHIGSTMVAAPSIGPAKLSGSVA 80
NP_001167615.1 1 -----
XP_001122844.1 1 MKALVILLAFVLVAAAPRQRDAIWSGYHGGYGGHLGYAHGVAVAGPALGPASVAGPHIGSTMVAAPSIGPAKLSGSVA 80

GB12449      81 GPVHVSGAVAGSAVVTASVAGPAHVEGYDAGPYDGGVGVGYAGPAYSYAGYPTFAGVGSFGAVIAGPASHGAILAGPASH 160
NP_001167615.1 81 -----
XP_001122844.1 81 GPVHVSGAVAGSAVVTASVAGPAHVEGYDAGPYDGGVGVGYAGPAYSYAGYPTFAGVGSFGAVIAGPASHGAILAGPASH 160

GB12449      161 GAVLSGPHSGTAAVSGPHAGSVVIAGPSGKITAHGTGYGAIHSGHSGHCQVTAHPPEPPSQTVPPAWKSEQALRANMRTF 240
NP_001167615.1 1 -----MRTF 4
XP_001122844.1 161 GAVLSGPHSGTAAVSGPHAGSVVIAGPSGKITAHGTGYGAIHSGHSGHW----- 209

GB12449      241 AAVLLVAVLSMAEAAPSGLLAPGAALAGPILGPAALSGPVAGPAALAGPAVGPARLSGAVDGGAVVTGAVAGPSLVSGSV 320
NP_001167615.1 5 AAVLLVAVLSMAEAAPSGLLAPGAALAGPILGPAALSGPVAGPAALAGPAVGPARLSGAVDGGAVVTGAVAGPSLVSGSV 84
XP_001122844.1 -----

GB12449      321 AGHAAPWPAAHWPAHALPWGAVLAGPAAPPAALAGPITAPALIAGPSGSIAGPAGVGSILRADGHW 388
NP_001167615.1 85 AGHAAPWPAAHWPAHALPWGAVLAGPAAPPAALAGPITAPALIAGPSGSIAGPAGVGSILRADGHW 152
XP_001122844.1 -----

```

B.

```

1 - CGGGCATCCTAGAACGGTATATAAAGTCGGATCAAATGGTTCGTGGGCACACTCAGCAAT - 60
61 - CGGTCGATGGGGAAGATGAAGGCCCTCGTGATCCTGCTAGCTTTCCTCGCCTTGGTCGCA - 120
1 - M K A L V I L L A F L A L V A - 16

121 - GCTGCGCCCGTCAGCGTCGCGATGCTATTTGGGGCGGATATCACGGTGGCTACGGTGGT - 180
17 - A A P R Q R R D A I W G G Y H G G Y G G - 36

181 - CATCTTGGATACGCTCACGGTGTGGCGATCGCTGGTCCAGCCTTGGGACCGGCCAGCGTA - 240
37 - H L G Y A H G V A I A G P A L G P A S V - 56

241 - GCCGGTCCTCACATCGGATCCACCATGGTGGCAGCGCCGTCCATAGGACCGGCTAAGCTG - 300
57 - A G P H I G S T M V A A P S I G P A K L - 76

301 - TCCGGATCAGTTGCTGGGCCGGTGACGTTTCCGGTGCTGTGGCCGGCTCTGCCGTTGTC - 360
77 - S G S V A G P V H V S G A V A G S A V V - 96

361 - ACTGCTTCCGTTGCCGGACCCGCTCACGTTGAGGGCTACGATGCTGGTCCCTACGATGGA - 420
97 - T A S V A G P A H V E G Y D A G P Y D G - 116

421 - GGAGTCGGTGTCGGATACGCGGGCCCGGCTACAGTTACGCGGGATACCGGCATTTCGCG - 480
117 - G V G V G Y A G P A Y S Y A G Y P A F A - 136

481 - GGAGTTGGCAGCCACGAGCGGTGATAGCGGTCCAGCGTCTCACGGTGCGATCCTCGCG - 540
137 - G V G S H G A V I A G P A S H G A I L A - 156

541 - GGGCCAGCATCCCATGGCGCCGTGCTCTCCGACCTCATTCGGAACCGCGGCGGTATCC - 600
157 - G P A S H G A V L S G P H S G T A A V S - 176

601 - GGTCCCCACGCTGGATCGGTGGTGATCGCCGGCCCCCTCCGGCAAATCACTGCCCACGGG - 660
177 - G P H A G S V V I A G P S G K I T A H G - 196

661 - ACAGGTTACGGCGCGATCCACTCTGGCCACTCTGGCCATTGGTAACGA - 708
197 - T G Y G A I H S G H S G H W * - 210

```

Figura 11 - Sequenciamento do GB12449 para resolução das inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2. **A.** Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do GB12449, do banco de dados OGS_preRelease2, com as sequências NP_001167615.1 e XP_001122844.1 do NCBI. **B.** Sequência nucleotídica do GB12449 validada por sequenciamento e o produto de tradução predito. A região 5'UTR está sublinhada. Em cinza estão localizados os *primers* utilizados para o sequenciamento deste gene.

A.

```

GB12811-PA      -----CIIIVGLAGFALAEPPSGYSYSRPSGGGGYSFGGGGGGGGFSGGGGGGYTSVST  54
XP_393452.3     MNPLIACIIIVGLAGFALAEPPSGYSYSRPSGGGGYSFGGGGGGGGFSGGGGGGYTSVST  60
                  *****

GB12811-PA      GYQTSEGASIDGALLEQIRQILLREEQNSGFGGGIGGGYAPSSSYGAPSSQYGVPSSSYG 114
XP_393452.3     GYQTSEGASIDGALLEQIRQILLREEQNSGFGGGIGGGYAPSSSYGAPSSQYGVPSSSYG 120
                  *****

GB12811-PA      VPSYQTRVVGIDLDGIRQAIQVAQFNQVSHA----- 145
XP_393452.3     VPSYQTRVVGIDLDGIRQAIQVAQFNQVSHAPGGYPSGPGSGSYGVPSRPSGSYGAPY 177
                  *****

```

B.

```

1 - AGTATCCCCCTGCTTCTCGTGGAGTATAAAGGACCTGGTCTACCTTGCACAGAGTCACA - 60
-
61 - GAACAGAGCGGCATCGCAGAAGCCGACATGAATCCTCTGATCGCGTGTATAATAGTCGGT - 120
1 -                               M N P L I A C I I V G - 11

121 - CTAGCAGGGTTCGCCCTCGCGGAACCACCGTCCGGCTACAGCTACAGCAGACCATCGGGG - 180
12 - L A G F A L A E P P S G Y S Y S R P S G - 31

181 - GGTGGTGGTTATTCTCTCGGTGGTGGCGGCGGCGGTGGCGGTGGTTTCTCGCACGGCGGG - 240
32 - G G G Y S F G G G G G G G G G F S H G G - 51

241 - GGTGGTGGATACCTCGGTGTGACCGGCTATCAAACCAGCGAGGGAGCATCGATCGAC - 300
52 - G G G Y T S V S T G Y Q T S E G A S I D - 71

301 - GGCGCGTTGCTCGAGCAGATCCGTGAGATACTGCTGAGGGAAGAGCAGAACAGCGGATTC - 360
72 - G A L L E Q I R Q I L L R E E Q N S G F - 91

361 - GGAGGTGGAATCGGCGGTGGTTACGCCCCTAGCTCGAGCTACGGCGCCCCATCTCCCAA - 420
92 - G G G I G G G Y A P S S S Y G A P S S Q - 111

421 - TACGGTGTGCCAAGCTCGTCCTACGGTGTACCGAGTTACCAGACCCGCGTGGTAGGAATA - 480
112 - Y G V P S S S Y G V P S Y Q T R V V G I - 131

481 - GATCTCGATGGGATCAGGCAGGCCATCCAGGTGGCCCAGTTCAACCAAGTGAGCCA - 536
132 - D L D G I R Q A I Q V A Q F N Q V S X - 151

```

Figura 12 - Sequenciamento do GB12811 para resolução das inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2. A. Alinhamento entre a sequência de aminoácidos deduzida do GB12811, constante do banco OGS_preRelease2, e a sequência XP_393452.3 do NCBI. B. Sequência nucleotídica do GB12811 validada por sequenciamento e respectivo produto de tradução predito. A sequência sublinhada corresponde à região 5'UTR. Em cinza estão localizados os *primers* utilizados para o sequenciamento deste gene.

AmelCPR6

```

GB14225-PA      MDPSELNDQLQFQSLCHLCATIAMSQAVVLSGYNGGHGISYTDYEGLEGYPSQYEGHAV
XP_003249528.1  -----MFQSLCHLCATIAMSQAVVLSGYNGGHGISYTDYEGLEGYPSQYEGHAV
                  *****

GB14225-PA      LPTVAVPVHAVSASPVHVAAALDHGSHGYDHHADHHGHHDYYAHPKYMFNYGVDHPHTGDI
XP_003249528.1  LPTVAVPVHAVSASPVHVAAALDHGSHGYDHHADHHGHHDYYAHPKYMFNYGVDHPHTGDI
                  *****

GB14225-PA      KTQHEVRDGDVVHGSYSVNEPDGSRIVEYTADDHNGFNAVVKVGPATHPKPIPVAKYI
XP_003249528.1  KTQHEVRDGDVVHGSYSVNEPDGSRIVEYTADDHNGFNAVVKVGPATHPKPIPVAKYI
                  *****

GB14225-PA      SPAYNSYEEYEKHHF
XP_003249528.1  SPAYNSYEEYEKHHF

```

AmelCPR24

```

GB10424-PA      -----MFSLFGCALGQYGAFRGFPIQNAYRSTPRPTYQQPTIQPQYTPQYNNPGRFIAI
XP_001123101.2  MQRILLMFSLFGCALGQYGAFRGFPIQNAYRSTPRPTYQQPTIQPQYTPQYNNPGRFIAI
                  *****

GB10424-PA      RNQQKDTYPDGTYYTFSYDTENGISVAESGRPQGAPPTQTEIVQGRYSYAPDGTPTITLEY
XP_001123101.2  RNQQKDTYPDGTYYTFSYDTENGISVAESGRPQGAPPTQTEIVQGRYSYAPDGTPTITLEY
                  *****

GB10424-PA      TADENGFHPQGAHLPTPPPIPEAIRRALAANPGPDDSDYRQYPNPNLYRRY
XP_001123101.2  TADENGFHPQGAHLPTPPPIPEAIRRALAANPGPDDSDYRQYPNPNLYRRY
                  *****

```

AmelCPR29

```

GB11134-PA      -----TTTPILHWNKQGEHDGT 19
XP_001122709.2  MKTIIIAIILGFAAQDSNYARNNYHEDRQNSPTDERGSLTTTPILHWNKQGEHDGT 60
                  *****

GB11134-PA      YKTSYETGNNIAEESGYIKKVGEQGEALVQQGSFSYTSPEGKLITIHYTEDETGFH 79
XP_001122709.2  YKTSYETGNNIAEESGYIKKVGEQGEALVQQGSFSYTSPEGKLITIHYTEDETGFH 120
                  *****

GB11134-PA      ATGDHIPTPPPVSEEIQKGLDLIFAGIRQQEVRPTTFPFLIFCFFLSLFLILSCVLFQFD 139
XP_001122709.2  ATGDHIPTPPPVSEEIQKGLDLIFAGIRQQEADAR-----EAAQKLQQQP 166
                  *****          :          :  *  *

GB11134-PA      LHFLFFSFSFYFILFYISKKYTYINYIR- 168
XP_001122709.2  LN-----QQIDRRDNYDRKFRK 183
                  *:          *: . * . : *

```

Figura 13 – Inconsistências observadas entre os bancos de dados NCBI e OGS_preRelease2 para as sequências correspondentes a AmelCPR6, AmelCPR24 e AmelCPR29. Alinhamento entre as sequências similares que constam nos dois bancos de dados. Os símbolos (*), (:) e (.) indicam, respectivamente, aminoácidos idênticos, substituições conservadas e semi-conservadas.

4.4. PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO EXOESQUELETO ADULTO DE *A. mellifera*

Além dos genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula, existem vários genes codificadores de enzimas que participam do processo de sua formação, melanização e esclerotização. Para verificar o perfil geral de expressão destes genes fizemos uma busca supervisionada nos resultados dos *microarrays* visando todos os genes descritos como participantes da formação estrutural da cutícula (pertencentes às famílias CPR, CPF, apiderminas, tweedle, CPLCP e CPAP), alguns genes codificadores de enzimas que participam da diferenciação da cutícula (laccase, peroxidase, dopa descarboxilase, tirosina hidroxilase, profenoloxidase), além dos prováveis genes cuticulares expressos em nossos *arrays* (GB12449, GB12811 e GB11550). A Tabela IX relaciona todos os genes utilizados para esta análise, incluindo seus valores de expressão (*Fold*) e respectivos valores de p ajustados nas comparações entre pupas (Pw) *versus* pupas em apólise (Pp), adultas faratas (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp), e adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw). A coluna *Fold* corresponde ao valor de contraste, de maneira que valores positivos indicam que tal gene está mais expresso e valores negativos indicam baixa expressão em relação à amostra referência. Por exemplo, o GB13601 possui um valor de *Fold* negativo, indicando que este gene é menos expresso em Pbl em comparação com Pp, que neste caso, é a referência. Portanto, com exceção do GB13601, todos os outros genes que apresentaram valor de p significativo estão ativados em Pbl, seja comparando-se com a amostra Pp ou com a Pw (ver Tabela IX).

Uma clusterização hierárquica supervisionada foi realizada para analisar os perfis de expressão destes 52 genes selecionados, apresentados nos *heatmaps* abaixo (Figuras 14 e 15). As cores nestes *heatmaps* indicam a variação na expressão dos genes, sendo que o vermelho indica baixa expressão, preto indica expressão intermediária e verde indica alto nível de expressão quando comparados aos valores referência. Por exemplo, no caso do *heatmap* da Figura 14, os valores referência são, respectivamente, pupas em apólise (Pp, coluna da esquerda), pupas (Pw, coluna do meio) e pupas em apólise (Pp, , coluna da direita).

Tabela IX - Dados de expressão dos genes codificadores de proteínas e enzimas cuticulares detectados nos experimentos de *microarrays* nas comparações entre pupas (Pw) *versus* pupas em apólise (Pp), adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw) e adultas faratas (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp)

Gene ID (GB)	Símbolo	Família das proteínas	Fold (Pw/Pp)	Valor de p ajustado	Fold (Pbl/Pw)	Valor de p ajustado	Fold (Pbl/Pp)	Valor de p ajustado
GB13601	<i>AmelCPF1</i>	CPF	3.14	0.9999	-2.88	0.5628	-0.82	0.0369
GB10628	<i>AmelCPF2</i>		-0.65	0.9999	0.74	0.6164	0.10	0.2827
GB16057	<i>AmelCPF3</i>		1.12	0.9999	-1.01	0.8878	-0.07	0.3079
GB18626	<i>AmelCPR1</i>	CPR	2.98	0.9999	-2.62	0.9870	1.71	0.7386
GB12600	<i>AmelCPR2</i>		3.21	0.9999	-0.59	0.5430	1.36	0.8569
GB17384	<i>AmelCPR3</i>		1.10	0.9999	3.26	0.0000	3.54	0.0000
GB15203	<i>AmelCPR4</i>		0.10	0.9999	2.92	0.0001	4.68	0.0000
GB20042	<i>AmelCPR5</i>		-0.22	0.9999	0.09	0.9729	-0.21	0.9748
GB14225	<i>AmelCPR6</i>		0.72	0.9999	2.09	0.0003	3.53	0.0002
GB16283	<i>AmelCPR7</i>		-0.35	0.9999	0.52	0.8963	0.87	0.4435
GB30318	<i>AmelCPR8</i>		-1.11	0.9999	-0.06	0.2231	-1.37	0.4681
GB16121	<i>AmelCPR9</i>		-0.09	0.9999	-0.63	0.9815	0.00	0.8646
GB12524	<i>AmelCPR10</i>		0.46	0.9999	-0.53	0.9845	0.43	0.9712
GB30419	<i>AmelCPR11</i>		-0.71	0.9999	0.38	0.9940	0.02	0.4461
GB30416	<i>AmelCPR12</i>		1.13	0.9999	-0.24	0.8273	0.97	0.9320
GB30417	<i>AmelCPR13</i>		2.64	0.9999	-0.91	0.9246	0.33	0.4464
GB30336	<i>AmelCPR14</i>		1.28	0.9999	3.84	0.0000	4.60	0.0000
GB17642	<i>AmelCPR15</i>		0.00	0.9999	0.88	0.0491	0.87	0.0369
GB15705	<i>AmelCPR16</i>		-0.75	0.9999	0.10	0.9875	0.57	0.0984
GB30333	<i>AmelCPR17</i>		0.01	0.9999	1.99	0.0009	2.24	0.0005
GB16416	<i>AmelCPR18</i>		0.50	0.9999	-0.32	0.9933	-0.01	0.4740
GB16692	<i>AmelCPR19</i>		0.97	0.9999	-0.17	0.4575	1.23	0.7027
GB18528	<i>AmelCPR20</i>		-0.32	0.9999	0.10	0.9921	0.05	0.7999
GB30334	<i>AmelCPR21</i>		2.53	0.9999	-1.43	0.9834	-0.05	0.1506
GB30335	<i>AmelCPR22</i>		0.26	0.9999	-0.01	0.9729	0.20	0.9853
GB20015	<i>AmelCPR23</i>		-0.35	0.9999	2.66	0.0089	1.34	0.0002
GB10424	<i>AmelCPR24</i>		-0.10	0.9999	1.97	0.0132	0.61	0.0696
GB10683	<i>AmelCPR25</i>		-0.16	0.9999	1.79	0.0000	2.02	0.0000
GB11715	<i>AmelCPR26</i>		0.77	0.9999	0.05	0.3890	1.42	0.3723
GB30200	<i>AmelCPR27</i>		2.05	0.9999	-0.79	0.6970	2.17	0.8278
GB14537	<i>AmelCPR28</i>		1.44	0.9999	2.65	0.0014	5.79	0.0020
GB11134	<i>AmelCPR29</i>		-1.03	0.9999	2.31	0.0002	2.62	0.0000
GB19110	<i>AmelCPR30</i>		-0.57	0.9999	2.18	0.0000	3.64	0.0000
GB30202	<i>apd-1</i>	Apidermina	0.04	0.9999	2.94	0.0018	1.38	0.0074
GB10737	<i>apd-2</i>		1.59	0.9999	0.69	0.0102	0.80	0.7899
GB30203	<i>apd-3</i>		0.07	0.9999	3.64	0.0000	5.79	0.0000
GB12705	<i>CPLCP1</i>	CPLCP	-0.93	0.9999	1.55	0.1427	0.56	0.0302
GB10653	<i>CPLCP2</i>		-1.26	0.9999	1.27	0.8354	0.00	0.3142
GB17664	<i>Am-B</i>	Análoga a Peritrofinas	0.60	0.9999	-1.13	0.3235	-0.24	0.1606
GB13298	<i>Am-C</i>		0.22	0.9999	0.78	0.0269	1.02	0.0288
GB13470	<i>Am-D</i>		0.23	0.9999	1.23	0.0005	1.72	0.0004
GB20072	<i>Am-E</i>		1.01	0.9999	0.12	0.7047	-0.23	0.4121
GB19234	<i>AmelTwld1</i>	Tweedle	-0.65	0.9999	2.08	0.0024	2.84	0.0002
GB14193	<i>AmelTwld2</i>		-0.70	0.9999	2.03	0.0143	2.15	0.0021
GB11321	<i>Amlac 2</i>	Enzimas	-0.62	0.9999	1.02	0.1014	1.18	0.0081
GB18313	<i>AmproPO</i>		-0.01	0.9999	0.00	0.8060	-0.58	0.2748
GB18453	<i>Ampxd</i>		0.11	0.9999	0.23	0.9718	-0.35	0.7439
GB13656	<i>ddc</i>		0.15	0.9999	-0.05	0.9724	0.20	0.9472
GB15303	<i>th</i>		0.87	0.9999	-0.02	0.9494	0.39	0.9912
GB12449	-	-	-0.24	0.9999	3.80	0.0000	2.82	0.0002
GB12811	-	-	0.22	0.9999	0.39	0.0846	2.97	0.0016
GB11550	-	-	1.22	0.9999	1.59	0.0060	3.69	0.0060

A Figura 15 mostra como os genes se comportam em cada um dos *arrays* realizados, incluindo os respectivos *dye-swaps*, perfazendo um total de 6 colunas. Assim, da esquerda para a direita, a primeira e segunda colunas evidenciam o perfil de expressão dos genes de proteínas e enzimas cuticulares de pupas (Pw) em relação aos genes homólogos de pupas em apólise (Pp); a terceira e quarta colunas evidenciam o perfil de expressão de genes cuticulares de adultas faratas (Pbl) em relação ao de pupas (Pw), e finalmente, a quinta e sexta colunas apresentam o perfil de expressão dos genes cuticulares de adultas faratas (Pbl) em relação ao de pupas em apólise (Pp). Enquanto a Figura 14 representa a média dos valores de expressão dos dois *arrays* (*dye swap*) realizados para cada uma destas comparações (ver Figura 5), a Figura 15 mostra a reprodutibilidade dos *dye swaps*.

O *heatmap* mostra que alguns genes se agrupam por apresentarem perfis de expressão semelhantes nas comparações realizadas, como é o caso dos genes *AmelCPF1*, *AmelCPR1*, *AmelCPR2*, *AmelCPR21*, *AmelCPR27*, *AmelCPR13* que estão *up-regulated* em pupas (Pw) em comparação com pupas em apólise (Pp) (primeira coluna da Figura 14). A Figura 15 (primeira e segunda colunas) mostra a expressão destes genes nos *dye swaps*. Como verificado na Tabela IX estes genes estão mais de duas vezes mais expressos em pupas (Pw) do que em pupas em apólise (Pp) (com valores de *Fold* iguais a 3,14, 2,98, 3,21, 2,53, 2,05 e 2,64, respectivamente), embora a análise global da variação da expressão gênica não tenha resultado em valores de *p* significantes. Na mesma comparação, os genes *AmelCPR28*, *AmelCPR12*, *apd-2* e *Am-E* também mostraram-se mais expressos em pupas (Pw), embora com valores de *Fold* um pouco maiores do que 1, respectivamente, 1,44, 1,13, 1,59 e 1,01. Outros genes, ressaltando-se *CPLCP2*, *AmelCPR29* e *AmelCPR8* mostraram-se menos expressos (*down-regulated*) em pupas (Pw) em comparação com pupas em apólise (Pp), com valores de *Fold* negativos, respectivamente, -1,26, -1,03 e -1,11 (Tabela IX, Figuras 14 e 15, primeira e segunda colunas). Na análise global, estas diferenças também não resultaram em valores de *p* estatisticamente significantes.

Entre os 52 genes cuticulares (Tabela IX, Figura 14) 19 mostram-se significantemente ativados nas adultas faratas (Pbl) em comparação com as pupas (Pw) e pupas em apólise (Pp), com valores de $p < 0,05$. São eles: *AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, *AmelCPR30*, *apd-1*, *apd-3*, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2*, *Am-C*, *Am-D*, *GB12449* e *GB11550*. Para 10 entre os 19 genes, esta diferença foi altamente significativa ($p < 0,001$) para ambas as comparações (Pbl/Pw e Pbl/Pp). Ressalte-se que na classe mais abundante de genes cuticulares, a família CPR, 11 dos 30 genes mostraram-se significativamente mais expressos em Pbl que em Pp e Pw.

Somente 5 genes cuticulares entre os 52 constantes da Tabela IX, mostraram-se induzidos somente em uma das comparações. Os genes *CPLCP1*, *Amlac2* e *GB12811* foram significativamente ativados em adultas faratas (Pbl) em comparação com pupas em apólise

(Pp), mas não em comparação com as pupas (Pw). Os genes *AmelCPR24* e *apd-2* foram significativamente ativados em adultas faratas (Pbl), mas somente na comparação com as pupas (Pw) (Tabela IX).

Para verificar a eficiência e a qualidade dos dados gerados nos experimentos de *microarrays*, procedemos à validação da expressão de 26 genes cuticulares por RT-PCR em tempo real, selecionados entre os 52 genes relacionados na Tabela IX. A Figura 16 mostra os níveis de transcritos de cada um destes 26 genes, nos três momentos: Pw, Pp e Pbl. Para estas análises foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, considerando os valores de Pw como referência e, portanto, sempre equivalentes a 1. Assim, para melhor visualizar as diferenças entre as amostras nos gráficos da Figura 16, o eixo X corta o eixo Y na posição 0,10.

As análises por RT-PCR em tempo real mostrou que a flutuação dos níveis de transcritos entre os três momentos do desenvolvimento é bem marcante e, algumas vezes, a diferença entre os níveis de RNAm mostrou-se mais de mil vezes maior em Pbl, como é o caso dos genes *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *apd-1*, *apd-2*, *apd-3*, *GB12449* e *GB12811*. Todos estes genes mostraram expressão significativamente maior ($p < 0,05$) em Pbl (adultas faratas) em relação a Pw (pupas) e/ou Pp (pupas em apólise) (Tabela IX). Todos os genes selecionados para a quantificação de transcritos por RT-PCR em tempo real, com exceção dos genes *AmelCPF1*, *AmelCPR1* e *AmelCPR2*, apresentaram níveis mais elevados de transcritos em Pbl, ou seja, após a apólise da cutícula pupal (Figura 16).

Em resumo, os dados dos experimentos de RT-PCR em tempo real (Figura 16) apresentaram diferença estatística significativa entre os três momentos do desenvolvimento analisados (Pw, Pp e Pbl) para os genes *apd-2*, *AmelCPR1*, *AmelCPR15*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, e *GB11550* (One Way ANOVA; $p < 0,00035$). Para os genes *apd-1*, *apd-3*, *AmelTwll1*, *AmelTwll2*, *AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR30*, *CPLCP1*, *GB12811* e *GB12449* foi detectada diferença estatística nos níveis dos respectivos transcritos nas comparações entre Pbl e Pw ou Pp (One Way ANOVA; $p < 0,00139$). Para o gene *AmelCPF1* foi observada diferença estatística entre Pbl/Pw e Pw/Pp (One Way ANOVA; $p < 0,00111$), porém não para a comparação entre Pbl e Pp. Os outros três genes restantes, *Am-C*, *Am-D* e *AmelCPR2*, mostraram níveis de transcritos estatisticamente diferentes apenas para uma das comparações (One Way ANOVA; $p < 0,02703$).

As análises estatísticas dos dados de quantificação de transcritos por RT-PCR em tempo real confirmaram os resultados dos *microarrays*, nas comparações entre as fases do desenvolvimento, exceto para os genes *AmelCPF1*, *AmelCPR1*, *AmelCPR2*, *AmelCPR24*, *apd-2*, *GB12449* e *CPLCP1*, onde pelo menos uma das comparações (Pw/Pp; Pp/Pbl ou Pw/Pbl) não corroborou estatisticamente os valores de p dos *microarrays* (Tabela IX).

Figura 14 - Perfis de expressão (*heatmap*) dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais de *A. mellifera*, de outros possíveis genes codificadores de proteínas cuticulares identificados nos experimentos de *microarrays* e de enzimas envolvidas na diferenciação da cutícula adulta. O *heatmap* foi obtido utilizando a distância euclidiana e método de aglomeração “*complete linkage*”. As cores no mapa indicam a variação na expressão, sendo que o vermelho indica baixa expressão, preto indica expressão intermediária e verde indica alto nível de expressão. A escala das cores está na parte superior esquerda da figura.

Figura 15 - Perfis de expressão (*heatmap*) dos genes envolvidos na formação e diferenciação da cutícula adulta. O *heatmap* acima apresenta os dados das réplicas técnicas, representadas pela inversão dos corantes Cy3 e Cy5, em cada uma das comparações: Pupas (Pw) *versus* pupas em apólise (Pp), adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw), e adultas faratas (Pbl) *versus* pupas em apólise (Pp). Este *heatmap* foi obtido utilizando a distância euclidiana e método de aglomeração “*complete linkage*”. As cores no mapa indicam a variação na expressão, sendo que o vermelho indica baixa expressão, preto indica expressão intermediária e verde indica alto nível de expressão. A escala das cores está na parte superior esquerda da figura.

Figura 16 - Quantificação dos níveis de RNAm de 26 genes cuticulares expressos nos experimentos de *microarrays*. Os níveis de transcritos foram quantificados por RT-PCR em Tempo Real usando três amostras independentes do tegumento de cada fase do desenvolvimento: pupas (Pw), pupas em apólise (Pp) e adultas faratas (Pbl). As análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ considerando como referência 1, o valor de expressão de Pw. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* qbasePLUS (Biogazelle).

4.5. LOCALIZAÇÃO ESPACIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES GB12449 E GB12811

Das 24 seqüências listadas na Tabela VI, 21 delas foram consideradas codificadoras de proteínas cuticulares, pois além da detecção dos transcritos no tegumento, suas respectivas seqüências de aminoácidos evidenciaram a presença de domínios característicos de algumas famílias de proteínas cuticulares estruturais. Como não existem domínios característicos nas seqüências traduzidas dos genes GB12449, GB11550 e GB12811, que as identificassem como proteínas cuticulares, optamos por investigar a localização dos respectivos transcritos utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH).

Inicialmente foi utilizado um protocolo para marcação dos núcleos (com DAPI) e da proteína actina (com faloidina) das células epidérmicas do tegumento para estabelecer o tempo de fixação do material. Estabelecido o protocolo, foi possível localizar os transcritos para o GB12449 e GB12811 no tegumento de adultas-faratas (Pbl) (Figuras 17 e 18). Observa-se na imagem sobreposta (DAPI + transcritos do gene) que os transcritos dos genes GB12449 e GB12811 (em verde) estão ao redor do núcleo, ou seja, no citoplasma das células epidérmicas. As Figuras 17B e 17C evidenciam ainda melhor a camada de células epidérmicas adjacente à cutícula e a marcação em verde no citoplasma. A cutícula e os pêlos são auto-fluorescentes e aparecem marcados tanto com DAPI, quanto com a sonda para o gene GB12449.

A determinação dos locais de expressão dos genes GB12449 e GB12811 suportam os dados obtidos nos experimentos de *microarrays*. Assim, estes genes estão sendo expressos na epiderme e provavelmente seus produtos irão contribuir para a formação e desenvolvimento do exoesqueleto adulto.

Infelizmente, não obtivemos sucesso no preparo da sonda para o gene GB11550. Os *primers* construídos amplificaram várias bandas, impossibilitando isolar apenas a banda de interesse.

Figura 17 - Imunofluorescência evidenciando a presença de transcritos do gene GB12449 na epiderme de adultas faratas Pbl (A, B e C) e em adultas faratas mais jovens, em fase Pb (D) Híbridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) em verde e marcação com diamidino-2-fenilindole (DAPI) em azul. À esquerda vê-se marcação com sonda para o gene GB12449 + DAPI, no centro, apenas marcação com a sonda para o gene GB12449 e à direita, apenas DAPI.

Figura 18 - Imunofluorescência evidenciando a presença de transcritos do gene GB12811 na epiderme de adultas faratas Pbl (A, B e C) e em adultas faratas mais jovens, Pb (D) Hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) em verde e marcação com diamidino-2-fenilindole (DAPI) em azul. À esquerda vê-se marcação com sonda para o gene GB12811 + DAPI, no centro, apenas marcação com a sonda para o gene GB12811 e à direita, apenas DAPI.

5. **Discussão**

5.1. ARQUITETURA DOS GENES CUTICULARES

Os potenciais genes cuticulares de *A. mellifera* identificados neste trabalho codificam proteínas pequenas, variando entre 77 a 477 aminoácidos, incluindo a região peptídeo-sinal, com exceção dos genes *Am-C* e *Am-D*, que codificam proteínas de 807 e 699 aminoácidos, respectivamente. A maioria destes genes não apresentaram mais que 2 íntrons, de maneira que 8 possuem um íntron, 12 possuem dois íntrons, 3 apresentaram três íntrons e apenas 1 apresentou quatro íntrons. Para todos estes genes, com exceção de *AmelCPR6*, *AmelCPR24* e *AmelCPR29*, o primeiro íntron interrompe o peptídeo sinal. Estas características estruturais foram também identificadas em 45 genes codificadores de proteínas cuticulares de *Apriona germari*, *T. molitor*, *Blaberus craniifer*, *A. gambiae*, *Drosophila*, *Lucilia cuprina*, *Myzus persicae*, *Aphis*, *Brevicoryne brassicae*, *Lipaphis erysimi*, *Rhopalosiphum maidis*, *B. mori*, *Galleria melonella*, *Helicoverpa armigera*, *Hyalophora cecropia*, *M. sexta*, *Locusta migratória* e *Schistocerca gregaria* (Willis *et al.*, 2005), que também não apresentam mais que 2 íntrons, sendo que geralmente, o primeiro íntron interrompe o peptídeo sinal culminando em éxons iniciais pequenos, que variam entre 18 e 33 nucleotídeos. Excepcionalmente, a presença de 3 ou 4 íntrons também foi observado em Lepidoptera (Nakato *et al.*, 1997; Rebers e Riddiford, 1988) e *Drosophila* (Cornman e Willis, 2009) e verificou-se até mesmo ausência de íntrons (Charles *et al.*, 1997). Binger e Willis (1994) sugeriram que a localização conservada do primeiro íntron, interrompendo a região codificadora, seria um indicativo de função na regulação gênica. Lemoine *et al.* (2004) confirmaram que a presença do primeiro íntron é essencial para a alta expressão do gene cuticular *ACP-20* de *T. molitor*.

A presença de um éxon inicial pequeno torna-se um obstáculo para a anotação gênica, pois diversos primeiros éxons plausíveis podem se encaixar no modelo da estrutura gênica. Para resolver alguns primeiros éxons problemáticos na anotação da família CPR de *A. gambiae*, Cornman *et al.* (2008) recorreram à técnica de sequenciamento por RACE. Em nosso trabalho, observamos durante a anotação dos genes cuticulares de *A. mellifera* aqui identificados, algumas incoerências entre as informações disponíveis nos bancos de dados PreRelease2_OGS e NCBI. Estas incoerências, de maneira geral, estavam restritas às extremidades dos genes, principalmente na região 5'UTR, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13 para as sequências GB12811, *AmelCPR6*, *AmelCPR24* e *AmelCPR29*. Provavelmente, isto deve ser resultado do uso de diferentes preditores de genes nestas duas

bases de dados. As inconsistências de anotação das sequências GB12811 e GB12449 foram aqui resolvidas por meio do sequenciamento total de suas regiões codificadoras.

Outra informação interessante sobre a organização genômica dos genes cuticulares é sua distribuição ao longo dos cromossomos. Existem vários exemplos de genes cuticulares de insetos localizados em *clusters*, tais como relatado para *A. gambiae* (Cornman *et al.*, 2008; Dotson *et al.*, 1998); *D. melanogaster* (Charles *et al.*, 1998; 1997) e *T. molitor* (Rondot *et al.*, 1998). Em *Drosophila*, 12 genes cuticulares estão dispostos em um *cluster* de 22kb, o qual inclui múltiplas cópias de genes, um pseudogene e cinco genes sem íntrons. Nesta análise, os autores sugerem que os genes cuticulares ancestrais possuíam dois íntrons. Durante a evolução, alguns genes perderam um dos íntrons, outros genes perderam o outro e outros ainda perderam ambos os íntrons (Charles *et al.*, 1997). As análises de nossos dados revelaram a distribuição de alguns genes cuticulares de *A. mellifera* em 3 *clusters*. No Group2.7 há dois genes dispostos em uma região de 84kb, no Group4.7 outros quatro genes se dispõem em *cluster* em uma região de 24kb e no GroupUn41, há dois genes ocupando uma distância de 11,2kb.

5.2. PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS CUTICULARES

Exceto as proteínas preditas dos genes GB12449, GB11550 e GB12811, todas as outras 21 proteínas deduzidas dos genes diferencialmente expressos nos *arrays* e por nós denominados ‘cuticulares’, revelaram características típicas de proteínas da cutícula. Doze entre estas 21 proteínas (57%) apresentaram um domínio muito conservado entre as proteínas cuticulares de insetos, denominado Consenso R&R. A presença deste domínio caracteriza a maior família de proteínas cuticulares entre os artrópodes, a família CPR (Togawa *et al.*, 2008). Foi demonstrado que o Consenso R&R corresponde ao sítio de ligação com a quitina, o principal polissacarídeo da cutícula (Rebers e Willis, 2001; Togawa *et al.*, 2004). As sequências das proteínas da família CPR podem ser graficamente representadas por quatro regiões: um peptídeo sinal, uma região N-terminal, uma região central contendo o Consenso R&R e uma região C-terminal (Figura 19).

Figura 19 - Representação esquemática da estrutura primária das proteínas cuticulares da família CPR. PS corresponde ao peptídeo sinal.

Todas as 24 sequências de proteínas cuticulares deduzidas dos genes diferencialmente expressos em nossos *arrays* apresentaram um peptídeo sinal, indicando que estas proteínas são secretadas, o que condiz com seu papel de proteína estrutural da cutícula.

Após o sequenciamento do genoma de *A. mellifera* (Consortium, 2006), foi realizada uma busca automatizada por possíveis genes cuticulares, com base na busca do Consenso R&R das sequências de aminoácidos deduzidas destes genes. Esta estratégia resultou na identificação de 28 proteínas da família CPR, que foram denominadas AmelCPR1 até AmelCPR28, e estas sequências foram depositadas no banco cuticleDB que inclui sequências de proteínas cuticulares de várias espécies de artrópodes (Magkrioti *et al.*, 2004). Em nossos resultados observamos que das 12 sequências contendo o Consenso R&R, 10 estavam depositadas no banco cuticleDB. Outras duas sequências, identificadas como GB11134 e GB19110, embora apresentem o Consenso R&R, não tinham sido identificadas como membros família CPR de *A. mellifera* e nem constavam do cuticleDB.. Assim, classificamos estas duas sequências como AmelCPR29 e AmelCPR30, respectivamente. Estes dois novos membros da família R&R não tinham sido detectados pelos programas de busca automatizada no genoma de *A. mellifera*.

Em sua recente revisão sobre as proteínas cuticulares estruturais de artrópodes, Willis (2010) mencionou a presença de 32 membros da família CPR em *A. mellifera*, 28 destes já anotados no banco de dados CuticleDB e 4 membros que ainda não foram submetidos. Não foi possível determinar se os 2 novos membros da família CPR por nós identificados corresponderiam a duas destas 4 sequências ainda não submetidas por Willis. Isto nos faz especular sobre a total validade da hipótese levantada na publicação do genoma de *A. mellifera* (Consortium, 2006) que considerou que a cutícula desta espécie seria estruturalmente menos complexa que a de outros insetos, tais como *Drosophila* e *Anopheles*, os quais possuem uma quantidade muito maior de genes (101 e 156, respectivamente) para esta família de proteínas cuticulares. Foi considerada a hipótese de que este baixo número de proteínas cuticulares da família CPR seria uma condição típica dos himenópteros. Esta hipótese foi reforçada com o sequenciamento do genoma de outro himenóptero, a vespa parasita *Nasonia*, que possui 62 proteínas preditas para esta família, ou seja, um número também menor que o identificado em dípteros. A aguardada publicação dos genomas dos himenópteros *Bombus terrestris* e *B. impatiens* poderá contribuir para resolver esta questão (Willis, 2010). Além disso, é possível que este conceito mude em futuro próximo, quando novos genes codificadores de proteínas cuticulares forem identificados no genoma de *A. mellifera*.

Nossas análises localizaram três genes codificadores de proteínas cuticulares da família das Apiderminas no tegumento. Estes genes foram inicialmente identificados por Kucharski *et al.* (2007) e dentre as características principais das respectivas proteínas deduzidas está a presença predominante do aminoácido alanina, tornando-as altamente hidrofóbicas. Estas proteínas possuem um domínio altamente conservado, AAPA/V. Conforme mencionado por Willis (2010) não foram encontrados homólogos da família Apidermina em outros grupos de insetos, no entanto foram identificados 3 genes similares em *Nasonia*, mas estas sequências são consideravelmente maiores que as de *A. mellifera*, e potencialmente codificam proteínas de 21,6 a 37kDa. Em nossos *arrays*, um dos genes diferencialmente expressos no tegumento de adultas-faratas, o gene GB12449, apresenta identidade com uma sequência similar a Apidermina 1 de *Nasonia*. A estrutura e localização do gene GB12449 no cromossomo, no mesmo *cluster* das Apiderminas (Figura 9), além da detecção dos respectivos transcritos no citoplasma das células epidérmicas (Figura 17), caracterizam este gene como um potencial membro da família das Apiderminas.

Outra família de proteínas cuticulares identificada em nossos resultados é a família CPF. As CPFs foram inicialmente descritas em *T. molitor* e *L. migratoria* por Andersen *et al.* (1997) que distinguiram um domínio conservado de 51 aminoácidos nestas proteínas. No entanto, o alinhamento de um número maior de sequências desta família utilizando-se diversas espécies de insetos revelou que esta região conservada está restrita a apenas 42-44 resíduos de aminoácidos (Togawa *et al.*, 2007). Papandreou *et al.* (2010), no intuito de investigar a função das proteínas desta família, propuseram modelos estruturais que indicam possíveis ligações com outros componentes, tais como, feromônios sexuais femininos e lipídeos, além da quitina.

De todas as sequências identificadas em nossos experimentos de *microarrays*, três delas não possuem qualquer dos domínios típicos de proteínas cuticulares. Fritz e Behm (2009) caracterizaram recentemente uma proteína envolvida na formação da cutícula e que é importante para a integridade do epitélio de *Caenorhabditis elegans*. Seus dados revelaram que esta proteína cuticular é na realidade uma proteína transmembrana de 202 aminoácidos, sem peptídeo sinal e que não apresenta similaridade com as outras famílias de proteínas cuticulares descritas, ou com domínios e sítios funcionais preditos até hoje. Assim, é possível que muitas outras proteínas cuticulares desprovidas de domínios típicos sejam ainda identificadas em *A. mellifera* e em insetos em geral.

5.3. EXPRESSÃO ESTÁGIO-ESPECÍFICA DOS GENES CUTICULARES E REGULAÇÃO POR HORMÔNIOS

Para entender aspectos da metamorfose em um nível molecular, utilizamos a tecnologia dos *microarrays* de cDNAs para monitorar as mudanças no perfil de expressão de genes do tegumento durante a transição da pupa em abelha adulta em três momentos específicos, isto é, em pupas, pupas em apólise e adultas faratas.

Nossos resultados mostraram que um total de 761 e 1173 genes envolvidos em várias funções e processos fisiológicos foram ativados na transição de pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp) para adultas faratas (Pbl), respectivamente. Os genes regulados positivamente no tegumento adulto em formação (fase Pbl) apresentam funções moleculares relacionadas às categorias de “constituintes estruturais da cutícula” (por exemplo, os genes codificadores de proteínas cuticulares) e “atividade de enzimas na diferenciação do exoesqueleto” (por exemplo, peroxidases e oxidoredutases). Ao passo que as atividades detectadas em destaque em pupas ou pupas em apólise estão mais relacionadas com o ciclo celular e interações entre proteínas, ácidos nucleicos e nucleotídeos.

Este padrão verificado nas análises do *Gene Ontology* corrobora os estudos de Elias-Neto *et al.* (2009), que descreveram as mudanças graduais no tegumento de abelhas durante um ciclo de muda completo por histologia convencional e microscopia de luz. Estas análises iniciaram-se imediatamente após a muda larval-pupal, e se estenderam até à deposição e diferenciação do tegumento adulto, revelando as características morfológicas da cutícula e da epiderme subjacente. A Figura 20 mostra a relação entre as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* eleitas para os experimentos de *microarray* e a anatomia microscópica dos respectivos tegumentos torácicos.

Elias-Neto *et al.* (2009) mostraram que o tegumento de pupas Pw é caracterizado por uma cutícula pupal fina sobreposta a uma única camada espessa de células epidérmicas colunares. Os núcleos das células epidérmicas estão localizados na região apical, enquanto na região basal aparecem amplas regiões de coloração clara, supostamente estes espaços armazenam secreções que serão usadas para a síntese do fluido de muda ou compostos cuticulares. Na fase subsequente, em Pp, a cutícula pupal está separada da epiderme, caracterizando neste momento a apólise pupal. O espaço entre a cutícula e a epiderme é preenchido pelo fluido de muda. Além disso, observa-se que a camada epidérmica está disposta como um epitélio pseudo-estratificado. Canhos (2010) conseguiu esclarecer melhor

algumas características das células epidérmicas de pupas em apólise utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. É possível observar que neste momento da muda as vesículas de secreção passam a se concentrar nos ápices das células epiteliais e, também, nos limites entre as membranas laterais de uma célula e outra. O fluido de muda encontra-se presente no espaço extracelular e parece ser constituído por material exocitado das vesículas das células epidérmicas. Também é possível notar a presença de grandes quantidades de ribossomos e retículo endoplasmático rugoso nas células, indicando intensa atividade de síntese proteica e secreção. Conforme o desenvolvimento vai progredindo, a cutícula torácica vai sendo depositada e torna-se cada vez mais espessa, enquanto a epiderme torna-se mais fina. O início da pigmentação do tórax aparentemente marca a transição entre a deposição da cutícula e sua diferenciação, caracterizando assim, o tegumento das adultas faratas iniciais, em fase Pbl (Elias-Neto *et al.*, 2009). Canhos (2010) retrata a diminuição da espessura da camada epidérmica por microscopia eletrônica de transmissão em adultas faratas um pouco mais avançadas. Estas transformações da epiderme são consistentes com a variação da expressão gênica detectada em nossos *microarrays* e nas RT-PCR em tempo real. Além disto, as mudanças morfológicas que ocorrem na epiderme durante a transição da pupa em adulta farata, aparentemente, refletem as diferenças nos processos biológicos e funções moleculares verificadas nas análises do *Gene Ontology*.

Goodsman *et al.* (2005), também utilizando *microarrays*, detectaram padrões de expressão distintos entre os estágios larval e adulto de formigas *Camponotus festinatus*. De modo geral, a maioria dos genes regulados positivamente em larvas estava relacionada com a biossíntese de proteínas e atividade estrutural. Em contraste, os genes regulados positivamente nos adultos possuíam maior diversidade de funções e atividades.

A análise supervisionada de todos os genes cuticulares descritos para *A. mellifera* e de algumas enzimas envolvidas nos processos de formação e diferenciação do exoesqueleto revelou que vários destes genes exibem níveis de expressão significativamente mais altos após a apólise, ou seja, na fase Pbl (Figura 14). Este momento do desenvolvimento é caracterizado pela síntese e diferenciação da cutícula adulta, sugerindo, portanto, que estes genes estão envolvidos na formação do exoesqueleto definitivo. Em contraste, o gene *AmelCPF1* foi o único a apresentar níveis de transcritos significativamente menores (em valores de p), tanto nos *microarrays* quanto nas RT-PCRs em tempo real, em adultas faratas (Pbl) nas comparações com pupas (Pw) e/ou pupas em apólise (Pp). Isto sugere que o produto deste gene é importante para a cutícula pupal. De modo similar, o gene *AmelCPRI* também mostrou níveis de transcritos significantemente menores em Pbl, mas somente nas análises

por RT-PCR em tempo real. É possível que o produto deste gene também seja importante para a cutícula pupal.

Um padrão de expressão que pode ser comparado ao encontrado em nossos estudos foi observado por Kuballa *et al.* (2007) quando investigavam o perfil de expressão de genes cuticulares durante o ciclo de muda do crustáceo *Portunus pelagicus*. Baseados na técnica de *microarray*, seus estudos revelaram que transcritos que codificavam proteínas contendo o domínio *cuticle_1* (domínio típico de cutículas calcificadas) podiam ser classificados em dois grupos: aqueles regulados positivamente ou regulados negativamente no momento “pós-muda”, quando comparados ao estado de intermuda.

Figura 20 - Fases do desenvolvimento de *A. mellifera* eleitas para os experimentos de *microarray* e cortes histológicos dos respectivos tegumentos torácicos. Imagens de Elias-Neto *et al.*, 2009. cut – cutícula; ep – epiderme; n – núcleo; mf – fluido de muda.

Um estudo conduzido na mariposa *B. mori* utilizou larvas inteiras e extratos de epiderme na investigação do perfil de expressão gênica em dezesseis estágios do desenvolvimento incluindo larvas e pupas. Os autores observaram que das 244 sequências cuticulares disponíveis nas lâminas de *arrays*, 93% apresentaram sinais de expressão em algum dos estágios selecionados. Não foi possível estabelecer uma correlação entre os padrões de expressão verificados e os domínios conservados das famílias de proteínas cuticulares. Os dados deste trabalho ainda revelaram que embora as cutículas das larvas, pupas e adultos sejam distintas, alguns genes cuticulares apresentaram expressão comum entre todos estes estágios, levando os autores a sugerir que as propriedades das cutículas

dependem da quantidade de proteínas cuticulares e sua distribuição espacial, além do grau de esclerotização e melanização, e não simplesmente, do tipo de proteína cuticular ali presente (Liang *et al.*, 2010).

Os genes cuticulares positivamente regulados após a apólise da cutícula pupal em *A. mellifera*, isto é, nas adultas faratas em fase Pbl coincide com o momento do desenvolvimento em que os níveis de ecdisteróides diminuem após terem atingido valores máximos (o pico que induz a apólise). Os dados de *microarrays* mostraram que entre os 52 genes envolvidos na formação e diferenciação da cutícula, 24 (46,1%) mostraram aumento de expressão estatisticamente significativo em adultas faratas (Pbl), em comparação com pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp). São eles: *AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, *AmelCPR30*, *apd-1*, *apd-2*, *apd-3*, *CPLCP1*, *Am-C*, *Am-D*, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2*, *Amlac2*, *GB12449*, *GB12811* e *GB11550* (ver Tabela IX). O aumento de expressão de 23 destes genes foi aqui confirmado por RT-PCR em tempo real (Figura 16), e de um deles, *Amlac2*, foi confirmado por RT-PCR semiquantitativa em nosso laboratório (Elias-Neto *et al.*, 2010).

Além disto, 5 genes na comparação Pbl *versus* Pp (*AmelCPR1*, *AmelCPR2*, *AmelCPR19*, *AmelCPR26* e *AmelCPR27*) e 1 gene na comparação Pbl *versus* Pw (*CPLCP2*) mostraram aumento de expressão de mais de uma vez (entre 1,23 e 2,17 vezes) nos *microarrays* de adultas faratas, embora sem significado estatístico. No entanto, as análises por RT-PCR em tempo real confirmaram estatisticamente a maior expressão de 2 destes genes, *AmelCPR1* e *AmelCPR2*, nas adultas faratas (Pbl) ($p < 0,0004$). A expressão dos outros 3 genes (*AmelCPR19*, *AmelCPR26* e *AmelCPR27*) não foi quantificada por RT-PCR em tempo real. É possível que a utilização de fases mais tardias do período adulto farato nos *arrays* resultasse em valores significativamente aumentados da expressão destes genes. Ao contrário, um gene (*AmelCPR8*) na comparação Pbl *versus* Pp e 5 genes na comparação Pbl *versus* Pp (*AmelCPF1*, *AmelCPF3*, *AmelCPR1*, *AmelCPR21* e *Am-B*) mostraram diminuição de expressão em adultos faratos, no intervalo de -1,01 e -2,88 vezes, embora sem significado estatístico nas análises por *microarrays*. Contudo os níveis de transcritos de 2 destes genes (*AmelCPF1* e *AmelCPR1*), quantificados por RT-PCR em tempo real, confirmaram que ambos são negativamente regulados em adultas faratas (Pbl) em comparação com as pupas (Pw) ($p < 0,001$), sugerindo que são específicos de cutícula pupal. De maneira interessante, estes genes foram inibidos pelo aumento dos níveis de ecdisteróides, que induz a apólise.

Sabe-se que os ecdisteróides coordenam a expressão de genes cuticulares em preparação para a síntese da nova cutícula do próximo estágio do desenvolvimento, culminando com a ecdise da cutícula velha, do estágio anterior (Zitnan e Adams, 2005). Neste processo, o título de ecdisteróides é determinante: níveis elevados destes hormônios inibem a ecdise, que só ocorre quando o título decai. Isto foi primeiramente demonstrado em *T. molitor* (Slama, 1980) e em *M. sexta* (Truman, 1981; Truman *et al.*, 1983) onde a manutenção experimental de altos níveis de ecdisteróides atrasou a ecdise. A injeção de 20E em pupas jovens de abelhas permitiu, mas retardou, a pigmentação da cutícula, além de resultar em significativa diminuição das taxas de eclosão (Zufelato *et al.*, 2000), indicando que tal intervenção afetou a ecdise e a diferenciação da cutícula adulta. Sabe-se que o aumento dos níveis de ecdisteróides regula positivamente a produção do hormônio ETH (*ecdysis-triggering hormone*) nas células Inka das traquéias, mas a liberação deste hormônio e o início da ecdise estão associados com o subsequente declínio de ecdisteróides (Zitnan e Adams, 2005). A síntese da nova cutícula pelas células epidérmicas também tem início enquanto o título de ecdisteróides decai, após o pico indutor da apólise.

Um estudo do perfil de expressão gênica nos discos imaginais das asas de *B. mori* durante a ecdise pupal revelou dois grupos de genes com padrões de expressão distintos em relação aos níveis de ecdisteróides: genes induzidos antes do pico de ecdisteróides e genes induzidos após o pico (Ote *et al.*, 2004). Para determinar se os genes eram realmente regulados por este hormônio, os autores cultivaram os discos das asas em meio de cultivo contendo ecdisteróides. Entre os 69 genes testados, 54 foram induzidos por 20E.

Estudos de eventos do desenvolvimento regulados por ecdisteróides têm demonstrado que a expressão de muitos genes cuticulares necessita de um pulso de ecdisteróides, ou seja, da exposição ao hormônio seguida de sua remoção, para que a transcrição tenha início (Apple e Fristrom, 1991; Hiruma *et al.*, 1991; Noji *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2002). Em abelhas, esta hipótese foi testada para um gene cuticular, *AmelCPR14*, com o auxílio de experimentos de cultivo *in vitro* que revelaram um aumento dos níveis de transcritos nos tegumentos incubados primeiramente com 1 µg de 20E e, subsequente, em meio de cultivo sem este hormônio (Soares *et al.*, 2007). Estes experimentos *in vitro* foram utilizados para simular o pulso e decaimento de ecdisteróides que ocorre *in vivo*, permitindo assim demonstrar que o gene *AmelCPR14* requer a exposição a alto título de ecdisteróide, mas sua atividade só aumenta quando o nível destes hormônios decai. Também em abelhas, a expressão dependente de ecdisteróides foi verificada para dois genes cuticulares da família Tweedle, *AmelTwdl1* e *AmelTwdl2*, e para um gene codificador de uma peroxidase cuticular, *Ampxd* (Soares *et al.*,

2011). O efeito hormonal foi confirmado *in vivo* por meio de uma ligadura aplicada entre o tórax e o abdomen de pupas jovens para prevenir que o tegumento abdominal tivesse contato com os ecdisteróides liberados pela glândula protorácica.

Em sua revisão sobre a regulação da expressão dos genes cuticulares em insetos, Charles (2010) considerou que a identificação de vários fatores de transcrição pode contribuir para entender melhor como os genes cuticulares são regulados pelos hormônios. Togawa *et al.* (2008) encontraram regiões consenso de ligação de E74A e alguns outros sítios de ligação de fatores de transcrição relacionados à sinalização por ecdisona, tais como, EcR, Ftz-F1 e uma ou mais isoformas do complexo *Broad*, na maioria dos genes codificadores da família CPR de *Anopheles*, indicando que estes genes cuticulares são regulados direta ou indiretamente por ecdisteróides. O E74A é conhecido como um transdutor de sinal da ecdisona (Fletcher e Thummel, 1995).

Wang *et al.* (2010) demonstraram que a presença do receptor de ecdisona, EcRE1, na região *upstream* do gene *BMWCP10* é necessária para a ativação da expressão deste gene, no disco das asas de *B. mori*, mediada pelo hormônio 20E. No entanto, para que a expressão de *BMWCP10* seja máxima, é necessária a presença de outros fatores, incluindo outro gene de resposta a ecdisona, o *BR-Z2*.

A busca por elementos comuns na região *upstream* de genes com perfil de expressão semelhante pode contribuir para explicar os mecanismos de co-regulação da transcrição. Liang *et al.* (2010) analisaram a região promotora localizada 2 kb acima do provável códon de iniciação de 26 genes cuticulares da família CPR, co-expressos em larvas e pupas faratas de *B. mori* e identificaram 3 possíveis elementos de regulação comuns. Além disso, verificaram a presença de muitos sítios de ligação para fatores de transcrição conhecidos, tais como: EcR, E74A, Nkx2-5, Foxhead, C/EBP, bZIP e bHLH. Todos estes fatores de transcrição, exceto EcR e E74A, foram encontrados nas 26 sequências cuticulares. Os dados desta recente publicação indicam que estes genes são concomitantemente regulados, pelos mesmos fatores.

Nosso estudo aqui apresentado consiste na primeira análise global de expressão de genes na epiderme de uma espécie de himenóptero social. Os padrões de expressão de 26 dos genes cuticulares de *A. mellifera* foram confirmados por RT-PCR em tempo real e validaram os dados de nossos *microarrays*. Os resultados apresentados nesta tese apontam para diferenças significativas no padrão de expressão de genes codificadores de proteínas cuticulares em momentos específicos da muda, indicando que grupos de genes cuticulares exercem papéis específicos na cutícula pupal e adulta. Além disso, foi possível identificar

genes regulados positiva ou negativamente pelos títulos de ecdisteróides nas etapas do ciclo de muda. A busca por fatores de transcrição entre os genes diferencialmente expressos poderá contribuir para melhor entender como estes genes são regulados em *A. mellifera*. Este trabalho contribui com novos dados moleculares para o aprofundamento do conhecimento sobre muda e metamorfose das abelhas e de insetos holometábolos em geral.

6. CONCLUSÃO

- As análises dos *microarrays* dos tegumentos de adultas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp) mostraram, respectivamente, 761 e 1173 genes diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$). A maioria destes genes, incluindo genes envolvidos na formação da cutícula e muitos outros com funções em processos biológicos diversos, mostrou aumento de expressão em adultas faratas, quando o título de ecdisteróides decai após o pico indutor da apólise da cutícula pupal, indicando que têm função na construção do exoesqueleto adulto;
- Não foi detectada expressão gênica diferencial, estatisticamente significativa, na comparação entre pupas (Pw) e pupas em apólise (Pp), indicando que o processo de apólise da cutícula pupal não implica em expressão gênica diferencial significativa no tegumento;
- Os *microarrays* mostraram aumento estatisticamente significativo da expressão de 24 genes cuticulares no tegumento de adultas faratas, quando o título de ecdisteróides decai. Este resultado foi validado por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para 23 destes genes (*AmelCPR3*, *AmelCPR4*, *AmelCPR6*, *AmelCPR14*, *AmelCPR15*, *AmelCPR17*, *AmelCPR23*, *AmelCPR24*, *AmelCPR25*, *AmelCPR28*, *AmelCPR29*, *AmelCPR30*, *apd-1*, *apd-2*, *apd-3*, *CPLCP1*, *Am-C*, *Am-D*, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2*, *GB12449*, *GB12811* e *GB11550*). Além disto, a maior expressão de outros 2 genes cuticulares (*AmelCPR1* e *AmelCPR2*) no tegumento de adultas faratas foi demonstrada por qRT-PCR. A estes genes cuticulares positivamente regulados atribuímos função na formação e diferenciação do exoesqueleto adulto, definitivo. Ao contrário, as análises por qRT-PCR mostraram que 2 outros genes cuticulares (*AmelCPF1* e *AmelCPR1*) são negativamente regulados no tegumento de adultas faratas em comparação com pupas, sugerindo que são específicos de cutícula pupal e que são inibidos pelo aumento dos níveis de ecdisteróides que induz a apólise.
- Entre todos os genes diferencialmente expressos no tegumento nas comparações entre pupas faratas (Pbl) *versus* pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp), 8% e 7% respectivamente, não têm ortólogos em *D. melanogaster*, portanto, podem ser exclusivos de *A. mellifera* ou de insetos da ordem Hymenoptera;

- A categorização dos 761 e 1173 genes diferencialmente expressos no tegumento, segundo os critérios do *Gene Ontology*, distinguiu totalmente o tegumento de pupas (Pw) ou pupas em apólise (Pp) do tegumento de adultas faratas (Pbl) tanto em relação ao critério “Processo Biológico” quanto em relação à “Função molecular”. Este resultado evidenciou a grande mudança na expressão gênica do tegumento após a apólise da cutícula pupal, durante a construção da cutícula adulta, quando o título de ecdisteróides decresce;
- Três novos genes cuticulares putativos foram descobertos e dois deles se expressaram nas células da epiderme, conforme verificado por FISH, sugerindo fortemente sua natureza cuticular;
- Em conjunto, estes resultados levaram à identificação de genes com expressão associada ao processo de muda do tegumento pupal em adulto e à formação do exoesqueleto definitivo, assim contribuindo para o conhecimento de aspectos moleculares da metamorfose de *A. mellifera*.

7. **BIBLIOGRAFIA**

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215, 403-410.
- 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., Cuticular sclerotization and tanning. In: L. I. Gilbert, Iatrou, K., Gill, S., (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4. Elsevier Press, Oxford, 2005, pp. 145-170.
- Andersen, S. O., 2010. Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 166-178.
- Andersen, S. O., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25, 153-176.
- Andersen, S. O., Rafn, K., Roepstorff, P., 1997. Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27, 121-131.
- Apple, R. T., Fristrom, J. W., 1991. 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. *Developmental Biology*. 146, 569-582.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N., Yeh, L.-S. L., 2004. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 32, D115-D119.
- Ashburner, M., 1990. Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell*. 61, 1-3.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 25, 25-29.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., 1995. *Short protocols in Molecular Biology*. Wiley, U.S.A.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M., Sonnhammer, E. L. L., 2002. The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research*. 30, 276-280.

- Behr, M., Hoch, M., 2005. Identification of the novel evolutionary conserved obstructor multigene family in invertebrates. *Febs Letters*. 579, 6827-6833.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*. 340, 783-795.
- Binger, L. C., Willis, J. H., 1994. Identification of the cDNA, gene and promoter for a major protein from flexible cuticles of the giant silkmoth *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 24, 989-1000.
- Bouhin, H., Charles, J.-P., Quennedey, B., Delachambre, J., 1992. Developmental profiles of epidermal mRNAs during the pupal-adult molt of *Tenebrio molitor* and isolation of a cDNA clone encoding an adult cuticular protein: Effects of a juvenile hormone analogue. *Developmental Biology*. 149, 112-122.
- Braquart, C., Bouhin, H., Quennedey, A., Delachambre, J., 1996. Up-regulation of an adult cuticular gene by 20-hydroxyecdysone in insect metamorphosing epidermis cultured *in vitro*. *European Journal of Biochemistry*. 240, 336-341.
- Canhos, L. L., Caracterização de mudanças subcelulares e da expressão dos genes codificadores das enzimas tirosina hidroxilase e dopa descarboxilase no tegumento em diferenciação da abelha *Apis mellifera*. Departamento de Biologia, Vol. Monografia. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010, pp. 61.
- Charles, J.-P., Bouhin, H., Quennedey, B., Courrent, A., Delachambre, J., 1992. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of a major, glycine-rich cuticular protein from the coleopteran *Tenebrio molitor*. *European Journal of Biochemistry*. 206, 813-819.
- Charles, J.-P., Chihara, C., Nejad, S., Riddiford, L. M., 1998. Identification of proteins and developmental expression of RNAs encoded by the 65A cuticle protein gene cluster in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 131-138.
- Charles, J. P., 2010. The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochem Mol Biol*. 40, 205-13.
- Charles, J. P., Chihara, C., Nejad, S., Riddiford, L. M., 1997. A cluster of cuticle protein genes of *Drosophila melanogaster* at 65A: sequence, structure and evolution. *Genetics*. 147, 1213-1224.
- Consortium, H. B. G. S., 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 443, 931-949.
- Cornman, R. S., Togawa, T., Dunn, W. A., He, N., Emmons, A., Willis, J., 2008. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. 9, 22.

- 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, 607-22.
- Dotson, E. M., Cornel, A. J., Willis, J. H., Collins, F. H., 1998. A family of pupal-specific cuticular protein genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 459-472.
- 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., Hartfelder, K., Bitondi, M. M., 2010. Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 241-51.
- Fechtel, K. F., Natzle, J. E., Brown, E. E., Fristrom, J. W., 1988. Prepupal differentiation of *Drosophila* imaginal discs: identification of four genes whose transcripts accumulate in response to a pulse of 20-hydroxyecdysone. *Genetics*. 120, 465-474.
- Fletcher, J. C., Thummel, C. S., 1995. The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development*. 121, 1411-1421.
- Fritz, J.-A., Behm, C. A., 2009. CUTI-1: a novel tetraspan protein involved in *C. elegans* CUTicle formation and epithelial integrity. *PLoS One*. 4, e5117.
- Futahashi, R., Okamoto, S., Kawasaki, H., Zhong, Y. S., Iwanaga, M., Mita, K., Fujiwara, H., 2008. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38, 1138-46.
- 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.
- Gilbert, S. F., 2010. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA.
- Goodisman, M., Isoe, J., Wheeler, D., Wells, M., 2005. Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. *Evolution*. 59, 858.
- Grimaldi, D., Engel, M. S., 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- 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 Sciences of the United States of America*. 103, 16794-16799.

- Hamodrakas, S. J., Willis, J. H., Iconomidou, V. A., 2002. A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32, 1577-1583.
- He, N., Botelho, J. M. C., McNall, R. J., Belozarov, V., Augustine Dunn, W., Mize, T., Orlando, R., Willis, J. H., 2007. Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 135-146.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8, R19.
- Hepburn, H. R., Structure of the integument. In: G. A. Kerkut, Gilbert, L. I., (Ed.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 3. Pergamon Press, Oxford, 1985, pp. 1-58.
- Hiruma, K., Hardie, J., Riddiford, L. M., 1991. Hormonal regulation of epidermal metamorphosis *in vitro*: Control of expression of a larval-specific cuticle gene. *Developmental Biology*. 144, 369-378.
- Hopkins, T. L., John Krchma, L., Ahmad, S. A., Kramer, K. J., 2000. Pupal cuticle proteins of *Manduca sexta*: characterization and profiles during sclerotization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30, 19-27.
- Horodyski, F. M., Riddiford, L. M., 1989. Expression and hormonal control of a new larval cuticular multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. *Developmental Biology*. 132, 292-303.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A., 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 4, 44-57.
- Iconomidou, V. A., Willis, J. H., Hamodrakas, S. J., 2005. Unique features of the structural model of 'hard' cuticle proteins: implications for chitin-protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35, 553-560.
- Jasrapuria, S., Arakane, Y., Osman, G., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Muthukrishnan, S., 2010. Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 214-227.
- 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 & Differentiation*. 44, 419-425.

- Kimbrell, D. A., Berger, E., King, D. S., Wolfgang, W. J., Fristrom, J. W., 1988. Cuticle protein gene expression during the third instar of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry*. 18, 229-235.
- 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.
- Klowden, M., 2007. *Physiological Systems in Insects*. Academic Press.
- Kuballa, A., Merritt, D., Elizur, A., 2007. Gene expression profiling of cuticular proteins across the moult cycle of the crab *Portunus pelagicus*. *BMC Biology*. 5, 45.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Maleszka, R., 2007. Novel cuticular proteins revealed by the honey bee genome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 128-134.
- Lampe, D. F., Willis, J. H., 1994. Characterization of a cDNA and gene encoding a cuticular protein from rigid cuticles of the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*.
- Lemoine, A., Mathelin, J., Braquart-Varnier, C., Everaerts, C., Delachambre, J., 2004. A functional analysis of ACP-20, an adult-specific cuticular protein gene from the beetle *Tenebrio*: role of an intronic sequence in transcriptional activation during the late metamorphic period. *Insect Molecular Biology*. 13, 481-493.
- Liang, J., Zhang, L., Xiang, Z., He, N., 2010. Expression profile of cuticular genes of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*. 11, 173.
- Locke, M., 2001. The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *Journal of Insect Physiology*. 47, 495-507.
- Magkrioti, C. K., Spyropoulos, I. C., Iconomidou, V. A., Willis, J. H., Hamodrakas, S. J., 2004. cuticleDB: a relational database of Arthropod cuticular proteins.
- Michelette, E. R. F., Soares, A. E. E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 24, 431-440.
- Moussian, B., 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 363-375.
- Murata, T., Kageyama, Y., Hirose, S., Ueda, H., 1996. Regulation of the *EDG84A* gene by *FTZ-F1* during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*.
- Nakato, H., Takekoshi, M., Togawa, T., Izumi, S., Tomino, S., 1997. Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27, 701-709.

- Nation, J. L., 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Nijhout, H. F., 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- Noji, T., Ote, M., Takeda, M., Mita, K., Shimada, T., Kawasaki, H., 2003. Isolation and comparison of different ecdysone-responsive cuticle protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33, 671-679.
- Ote, M., Mita, K., Kawasaki, H., Seki, M., Nohata, J., Kobayashi, M., Shimada, T., 2004. Microarray analysis of gene expression profiles in wing discs of *Bombyx mori* during pupal ecdysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34, 775-784.
- Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A., Willis, J. H., Hamodrakas, S. J., 2010. A possible structural model of members of the CPF family of cuticular proteins implicating binding to components other than chitin. *Journal of Insect Physiology*. 56, 1420-1426.
- Rebers, J. E., Riddiford, L. M., 1988. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J Mol Biol*. 203, 411-23.
- Rebers, J. E., Willis, J. H., 2001. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem Mol Biol*. 31, 1083-93.
- Riddiford, L. M., Hormone action at the cellular level. In: G. A. kerkut, Gilbert, L.I., (Ed.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 8. Pergamon, Oxford, 1985, pp. 2-84.
- Rondot, I., Quennedey, B., Delachambre, J., 1998. Structure, organization and expression of two clustered cuticle protein genes during the metamorphosis of an insect, *Tenebrio molitor*. *European Journal of Biochemistry*. 254, 304-312.
- Russel, S., Meadows, L. A., Russel, R. R., 2009. *Microarray Technology in Practice*. Academic Press, Oxford, UK.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A. l., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 16, 944-945.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Slama, K., 1980. Homeostatic function of ecdysteroids in ecdysis and oviposition. *Acta Entomol. Bohemoslov*. 77, 145-168.
- Smyth, G. K., Limma: linear models for microarray data. In: R. Gentleman, Vincent, J.C., Wolfgang, H., Irizarry, R.A., Dudoit, S., (Ed.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer Science+Business Media, Inc., New York, NY, 2005, pp. 397-420.

- Snodgrass, R. E., 1956. Anatomy of the honey bee. Cornell University, Ithaca.
- Soares, M. P. M., Elias-Neto, M., Simões, Z. L., Bitondi, M. M., 2007. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 1272-82.
- 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.
- Suderman, R. J., Dittmer, N. T., Kanost, M. R., Kramer, K. J., 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36, 353-365.
- Sugumaran, M., 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*. 15, 2-9.
- Sugumaran, M., 2009. Complexities of cuticular pigmentation in insects. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 22, 523-525.
- Suzuki, Y., Matsuoka, T., Iimura, Y., Fujiwara, H., 2002. Ecdysteroid-dependent expression of a novel cuticle protein gene *BMCPG1* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32, 599-607.
- Takeda, M., Mita, K., Quan, G.-X., Shimada, T., Okano, K., Kanke, E., Kawasaki, H., 2001. Mass isolation of cuticle protein cDNAs from wing discs of *Bombyx mori* and their characterizations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31, 1019-1028.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673-4680.
- Thompson, P. R., 1978. Histological development of cuticle in the worker honeybee, *Apis mellifera adansonii*. *Journal of apicultural research*. 17, 32-40.
- Togawa, T., Augustine Dunn, W., Emmons, A. C., Willis, J. H., 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, 508-19.
- Togawa, T., Nakato, H., Izumi, S., 2004. Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34, 1059-1067.

- Truman, J. W., 1981. Interaction between ecdysteroid, eclosion hormone and bursicon titers in *Manduca sexta*. *American Zoologist*. 21, 655-661.
- Truman, J. W., Riddiford, L. M., 1999. The origins of insect metamorphosis. *Nature*. 401, 447-452.
- Truman, J. W., Rountree, D. B., Reiss, S. E., Schwartz, L. M., 1983. Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Journal of Insect Physiology*. 29, 895-900.
- Ueda, H., Sonoda, S., Brown, J. I., Scott, M. P., Wu, C., 1990. A sequence-specific DNA-binding protein that activates *fushi tarazu* segmentation gene expression.
- Vincent, J. F. V., Wegst, U. G. K., 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development*. 33, 187-199.
- Wang, H.-B., Moriyama, M., Iwanaga, M., Kawasaki, H., 2010. Ecdysone directly and indirectly regulates a cuticle protein gene, *BMWCP10*, in the wing disc of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 453-459.
- Wilkins, M. R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., Appel, R. D., 1997. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS – a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis*. 18, 403-408.
- Willis, J. H., 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol*. 40, 189-204.
- Willis, J. H., Iconomidou, V., Smith, R. F., Hamodrakas, S. J., Cuticular proteins. In: L. Gilbert, Iatrou, K., Gill, S., (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4. Elsevier, Oxford, 2005.
- Wolfgang, W. J., Riddiford, L. M., 1986. Larval cuticular morphogenesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal regulation. *Developmental Biology*. 113, 305-316.
- Zhong, Y. S., Mita, K., Shimada, T., Kawasaki, H., 2006. Glycine-rich protein genes, which encode a major component of the cuticle, have different developmental profiles from other cuticle protein genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36, 99-110.
- Zitnan, D., Adams, M. E., Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: L. I. Gilbert, Iatrou, K., Gill, S., (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3. Elsevier Press, Oxford, 2005, pp. 1-60.
- Zufelato, M. S., Bitondi, M. M., Simões, Z. L., 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 & Development*. 29, 111-9.

8. **APÊNDICE**

8.1. Genes diferencialmente expressos na comparação Pbl versus Pw com valor de p ajustado $\leq 0,05$

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB12164-RA		Gene	2.84861	0.000	FBgn0050354
GB16494-RA		Gene	2.52979	0.000	FBgn0016119
GB10344-RA		Gene	2.59978	0.000	FBgn0011227
GB15816-RA		Gene	2.42245	0.000	FBgn0019624
GB17944-RA		Gene	3.76891	0.000	FBgn0003721
GB12510-RA		Gene	2.33062	0.000	FBgn0035600
GB14417-RA		Gene	2.51114	0.000	FBgn0034245
GB30405-RA		Gene	2.60123	0.000	FBgn0031912
GB13508-RA		Gene	2.50626	0.000	FBgn0021906
GB14455-RA		Gene	2.18109	0.000	
GB20012-RA		Gene	1.98376	0.000	FBgn0032833
GB15038-RA		Gene	3.16832	0.000	FBgn0036481
GB17278-RA		Gene	3.16442	0.000	
GB10683-RA	AmelCPR25	Gene	1.81379	0.000	FBgn0033603
GB13489-RA		Gene	1.76042	0.000	FBgn0050371
GB17693-RA		Gene	2.18802	0.000	FBgn0003514
GB30336-RA	AmelCPR14	Gene	4.52121	0.000	FBgn0037069
GB15214-RA		Gene	2.70679	0.000	FBgn0040601
GB19004-RA		Gene	1.80617	0.000	FBgn0036642
GB11028-RA		Gene	2.71441	0.000	FBgn0000667
GB12980-RA		Gene	1.76742	0.000	FBgn0021848
GB17614-RA		Gene	2.02128	0.000	FBgn0040773
GB30412-RA		Gene	-2.06047	0.000	FBgn0010355
GB10474-RA		Gene	1.72887	0.000	FBgn0031505
GB17384-RA	AmelCPR3	Gene	3.72142	0.000	FBgn0004777
GB18838-RA		Gene	2.49028	0.000	FBgn0003514
GB10192-RA		Gene	2.46789	0.000	FBgn0027586
GB30203-RA	apd-3	Gene	4.38157	0.000	FBgn0052654
GB14832-RA		Gene	1.73765	0.000	FBgn0014028
GB16568-RA		Gene	2.03474	0.000	FBgn0031830
GB11615-RA		Gene	2.82619	0.000	FBgn0034688
GB15018-RA		Gene	1.81445	0.000	FBgn0029167
GB19040-RA		Gene	3.54412	0.000	FBgn0031698
GB17255-RA		Gene	2.32777	0.000	FBgn0028342
GB30104-RA		Gene	3.84711	0.000	FBgn0035917
GB19110-RA	AmelCPR30	Gene	2.47886	0.000	FBgn0033602
GB14758-RA		Gene	-1.75721	0.000	FBgn0001233
GB13595-RA		Gene	1.37523	0.000	FBgn0039252
GB14091-RA		Gene	-1.56574	0.000	FBgn0036958
GB19666-RA		Gene	3.04429	0.000	FBgn0039897
GB14906-RA		Gene	-1.51029	0.000	FBgn0038916
GB14791-RA		Gene	1.43672	0.000	FBgn0011211
GB12863-RA		Gene	1.53234	0.000	FBgn0036173
GB15657-RA		Gene	1.63503	0.000	FBgn0027495
GB18920-RA		Gene	1.84650	0.000	FBgn0021967
GB17455-RA		Gene	2.77567	0.000	FBgn0031700
GB17868-RA		Gene	1.47442	0.000	FBgn0039909
GB18242-RA		Gene	1.92111	0.000	FBgn0001205
GB11987-RA		Gene	1.38459	0.000	FBgn0039257
GB12181-RA		Gene	1.29847	0.000	FBgn0031845
GB10455-RA		Gene	1.57278	0.000	FBgn0030136
GB18146-RA		Gene	1.61417	0.000	FBgn0052736
GB14490-RA		Gene	-2.36003	0.000	FBgn0026084
GB17038-RA		Gene	1.60836	0.000	FBgn0030853
GB12402-RA		Gene	1.43189	0.000	FBgn0033162
GB30104-RA		Gene	3.28646	0.000	FBgn0035917
GB12875-RA		Gene	1.64746	0.000	FBgn0037873
GB12449-RA	similar cuticular_found array	Gene	3.54863	0.000	FBgn0028490
GB12526-RA		Gene	1.78777	0.000	FBgn0022160
GB19606-RA		Gene	3.06822	0.000	FBgn0011643
GB15203-RA	AmelCPR4	Gene	3.18784	0.000	FBgn0035510
GB16215-RA		Gene	2.12686	0.000	FBgn0002772
GB18986-RA		Gene	1.31678	0.000	FBgn0031683
GB11489-RA		Gene	1.55915	0.000	FBgn0019957
GB13073-RA		Gene	1.84077	0.000	FBgn0037891
GB15540-RA		Gene	3.32117	0.000	FBgn0033427
GB16917-RA		Gene	1.91054	0.000	FBgn0031021
GB10926-RA		Gene	1.73044	0.000	FBgn0038662
GB15102-RA		Gene	1.70384	0.000	FBgn0011361
GB19246-RA		Gene	1.54697	0.000	FBgn0028436

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10576-RA		Gene	2.80274	0.000	FBgn0053519
GB10444-RA		Gene	1.84905	0.000	
GB10916-RA		Gene	1.61219	0.000	FBgn0032511
GB13279-RA		Gene	2.60463	0.000	FBgn0004117
GB15438-RA		Gene	1.56655	0.000	FBgn0040705
GB17476-RA		Gene	1.50203	0.000	FBgn0017567
GB17767-RA		Gene	1.45299	0.000	FBgn0050185
GB17838-RA		Gene	4.08826	0.000	FBgn0038156
GB30104-RA		Gene	3.53925	0.000	FBgn0035917
GB30512-RA		Gene	2.49738	0.000	FBgn0003721
GB10188-RA		Gene	2.64021	0.000	FBgn0028920
GB19845-RA		Gene	-1.31048	0.000	FBgn0051460
GB11132		Pos	-1.35476	0.000	
GB16466-RA		Gene	2.00227	0.000	
GB12356-RA		Gene	-1.29173	0.000	FBgn0028925
GB11025-RA		Gene	-1.35254	0.000	FBgn0035754
GB11759-RA		Gene	1.18548	0.000	FBgn0044030
GB10658-RA		Gene	1.85669	0.000	FBgn0011455
GB15475-RA		Gene	1.61304	0.000	FBgn0030552
GB18363-RA		Gene	-1.78063	0.000	FBgn0034474
GB15203-RA	AmelCPR4	Gene	3.30711	0.000	FBgn0035510
GB16129-RA		Gene	1.76286	0.000	FBgn0039112
GB17473-RA		Gene	1.24324	0.000	FBgn0003738
GB12209-RA		Gene	-1.26352	0.000	FBgn0005655
GB12636-RA		Gene	3.26347	0.000	FBgn0032285
GB19422-RA		Gene	1.63923	0.000	FBgn0027291
GB12454-RA		Gene	2.35582	0.000	FBgn0039484
GB13970-RA		Gene	1.65128	0.000	FBgn0029942
GB12412-RA		Gene	-1.37120	0.000	FBgn0038100
GB16704-RA		Gene	1.79020	0.000	FBgn0011836
GB11132		Pos	-1.16233	0.000	
GB16651-RA		Gene	1.18807	0.000	FBgn0039965
GB17057-RA		Gene	-1.44307	0.000	FBgn0037973
GB12637-RA		Gene	-1.59689	0.000	FBgn0010408
GB18651-RA		Gene	2.75846	0.000	FBgn0005634
GB16900-RA		Gene	3.55044	0.000	FBgn0037428
GB17626-RA		Gene	1.78241	0.000	FBgn0036762
GB10859-RA		Gene	1.61950	0.000	FBgn0039669
GB16362-RA		Gene	-1.16607	0.000	FBgn0035630
GB10009-RA		Gene	1.61565	0.000	FBgn0003884
GB30222-RA		Gene	2.62701	0.000	FBgn0003149
GB16248-RA		Gene	-1.51342	0.000	FBgn0032020
GB11134-RA	AmelCPR29	Gene	2.07414	0.000	FBgn0033728
GB17755-RA		Gene	2.72457	0.000	FBgn00113674
GB11132		Pos	-1.17326	0.000	
GB14589-RA		Gene	2.23363	0.000	FBgn0039648
GB12274-RA		Gene	-1.34171	0.000	FBgn0004087
GB12747-RA		Pos	-1.11527	0.000	
GB16493-RA		Gene	1.68140	0.000	FBgn0038426
GB13909-RA		Gene	2.82393	0.000	FBgn0035429
GB10255-RA		Gene	1.17762	0.000	
GB17120-RA		Gene	1.96250	0.000	FBgn0036279
GB19626-RA		Gene	1.89848	0.000	FBgn0037416
GB12603-RA		Gene	1.14425	0.000	FBgn0050373
GB12841-RA		Gene	1.62729	0.000	FBgn0036728
GB19293-RA		Gene	1.68132	0.000	FBgn0000409
GB13526-RA		Gene	1.59573	0.000	FBgn0025839
GB15119-RA		Gene	1.38356	0.000	FBgn0051961
GB14012-RA		Gene	1.41857	0.000	FBgn0034497
GB12973-RA		Gene	1.79013	0.000	FBgn0050038
GB15916-RA		Gene	1.49308	0.000	FBgn0020907
GB13349-RA		Gene	3.02395	0.000	FBgn0036391
GB13399-RA		Gene	3.26747	0.000	FBgn0002773
GB14225-RA	AmelCPR6	Gene	2.80975	0.000	FBgn0035281
GB12779-RA		Gene	-1.09827	0.000	FBgn0027936
GB14305-RA		Gene	-1.39328	0.000	
GB15055-RA		Gene	-1.76921	0.000	FBgn0051150
GB19224-RA		Gene	1.34997	0.000	FBgn0050415
GB13101-RA		Gene	1.32005	0.000	FBgn0033608
GB14484-RA		Gene	1.11364	0.000	FBgn0040871
GB17637-RA		Gene	1.00105	0.000	FBgn0036557
GB19328-RA		Gene	-1.90481	0.000	FBgn0051363

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17885-RA		Gene	2.44843	0.000	FBgn0053257
GB19481-RA		Gene	2.27491	0.000	FBgn0017566
GB19379-RA		Gene	-1.11428	0.000	FBgn0026170
GB14489-RA		Gene	-1.37863	0.000	FBgn0033156
GB10514-RA		Gene	-1.20942	0.000	FBgn0003884
GB30204-RA		Gene	2.17270	0.000	FBgn0003177
GB14892-RA		Gene	1.31767	0.000	FBgn0034649
GB17384-RA	AmelCPR3	Gene	3.27628	0.000	FBgn0004777
GB13323-RA		Gene	-1.08236	0.000	FBgn0031227
GB15885-RA		Gene	1.59149	0.000	
GB16465-RA		Gene	1.41155	0.000	FBgn0033679
GB16952-RA		Gene	-1.02968	0.000	
GB10406-RA		Gene	1.14587	0.000	FBgn0037001
GB14225-RA	AmelCPR6	Gene	2.67108	0.000	FBgn0035281
GB14664-RA		Gene	1.80108	0.001	FBgn0026323
GB11150-RA		Gene	1.83044	0.001	FBgn0039576
GB12889-RA		Gene	-1.38030	0.001	FBgn0031549
GB13470-RA	Am-D	Gene	1.46635	0.001	FBgn0022770
GB17681		Pos	-1.32205	0.001	
GB16445-RA		Gene	1.42698	0.001	FBgn0033961
GB12280-RA		Gene	1.14881	0.001	FBgn0039141
GB12532-RA		Gene	2.01571	0.001	FBgn0033244
GB16884-RA		Gene	2.25652	0.001	FBgn0037288
GB16405-RA		Gene	-1.53639	0.001	FBgn0020615
GB12205-RA		Gene	-1.16084	0.001	FBgn0025682
GB20152-RA		Gene	-1.17349	0.001	FBgn0034277
GB10234-RA		Gene	-1.36430	0.001	FBgn0030863
GB14302-RA		Gene	1.14722	0.001	
GB12419-RA		Gene	-1.04765	0.001	FBgn0024332
GB16485-RA		Gene	1.94734	0.001	FBgn0016120
GB18960-RA		Gene	1.68398	0.001	FBgn0038922
GB18574-RA		Gene	0.98465	0.001	FBgn0030460
GB12633-RA		Gene	-1.04170	0.001	FBgn0010078
GB16124-RA		Gene	1.57587	0.001	FBgn0034940
GB30512-RA		Gene	2.13593	0.001	FBgn0003721
GB13320-RA		Gene	2.58110	0.001	
GB17238-RA		Gene	0.98198	0.001	FBgn0039635
GB16463-RA		Gene	-1.08753	0.001	FBgn0035539
GB15341-RA		Gene	-1.10894	0.001	FBgn0030554
GB12712-RA		Gene	-0.87329	0.001	FBgn0030720
GB13317-RA		Gene	-1.02786	0.001	FBgn0036811
GB30512-RA		Gene	2.49385	0.001	FBgn0003721
GB14476-RA		Gene	1.22348	0.001	FBgn0038923
GB16295-RA		Gene	-1.12873	0.001	FBgn0051184
GB30333-RA	AmelCPR17	Gene	2.07328	0.001	FBgn0050045
GB15584-RA		Gene	1.88515	0.001	
GB10284-RA		Gene	1.48628	0.001	FBgn0047038
GB16804-RA		Gene	2.29787	0.001	FBgn0037429
GB19787-RA		Gene	2.42155	0.001	FBgn0053003
GB13953-RA		Gene	-0.93759	0.001	FBgn0030851
GB19756-RA		Gene	-1.04470	0.001	FBgn0037241
GB15245-RA		Gene	-1.71086	0.001	FBgn0034914
GB16371-RA		Gene	1.37784	0.001	FBgn0033570
GB13420-RA		Gene	1.36402	0.001	FBgn0035980
GB15288-RA		Gene	1.25016	0.001	FBgn0052694
GB13954-RA		Gene	2.26065	0.001	FBgn0020370
GB11686-RA		Gene	-1.02187	0.001	FBgn0030474
GB11597-RA		Gene	0.98454	0.001	FBgn0037566
GB10054-RA		Gene	0.99923	0.001	FBgn0035122
GB14778-RA		Gene	1.31398	0.001	FBgn0030572
GB15408-RA		Gene	0.84466	0.001	FBgn0036892
GB17044-RA		Gene	-1.11031	0.001	FBgn0026196
GB15447-RA		Gene	1.25846	0.001	FBgn0014380
GB15757-RA		Gene	-1.05582	0.001	FBgn0031670
GB20076-RA		Gene	1.64513	0.001	FBgn0033109
GB11228-RA		Gene	-1.24207	0.001	FBgn0014857
GB17668-RA		Gene	-1.46870	0.001	FBgn0010413
GB12239-RA		Gene	3.89878	0.001	FBgn0038294
GB10560		Pos	1.33529	0.001	
GB18017-RA		Gene	1.24870	0.001	FBgn0030309
GB18669-RA		Gene	1.25256	0.001	FBgn0033919
GB17503-RA		Gene	1.23558	0.001	FBgn0035334

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10909-RA		Gene	-0.90659	0.001	FBgn0028554
GB13110-RA		Gene	1.97145	0.001	FBgn0035046
GB14627-RA		Gene	1.51748	0.001	FBgn0020766
GB14642-RA		Gene	1.83710	0.001	FBgn0003432
GB17395-RA		Gene	-1.64234	0.001	
GB17587-RA		Gene	1.75637	0.001	FBgn0033710
GB20083-RA		Gene	1.08148	0.001	FBgn0029594
GB17659-RA		Gene	-1.11072	0.001	FBgn0037700
GB14537-RA	AmelCPR28	Gene	4.40309	0.001	FBgn0052405
GB11132		Pos	-0.90875	0.001	
GB17681		Pos	-1.65895	0.001	
GB15450-RA		Gene	1.33400	0.001	FBgn0082582
GB14539-RA		Gene	-0.98629	0.001	FBgn0037749
GB17652-RA		Gene	1.27402	0.001	FBgn0033769
GB18347-RA		Gene	-1.25685	0.001	FBgn0029738
GB12646-RA		Gene	0.97792	0.001	FBgn0037102
GB17653-RA		Gene	-1.00597	0.002	FBgn0037137
GB16879-RA		Gene	1.27814	0.002	FBgn0039159
GB18984-RA		Gene	-1.18151	0.002	FBgn0032035
GB12614-RA		Gene	1.65894	0.002	FBgn0000046
GB17195-RA		Gene	-0.87551	0.002	FBgn0017457
GB12691-RA		Gene	-0.95804	0.002	FBgn0004413
GB18600-RA		Gene	-0.92869	0.002	FBgn0039673
GB14289-RA		Gene	-0.91835	0.002	FBgn0082598
GB17681		Pos	-1.65219	0.002	
GB10745-RA		Gene	1.13913	0.002	FBgn0052103
GB19166-RA		Gene	-1.24325	0.002	FBgn0016700
GB19950-RA		Gene	-0.87082	0.002	FBgn0034084
GB30202-RA	apd-1	Gene	2.43251	0.002	FBgn0051496
GB13870-RA		Gene	1.17997	0.002	FBgn0031357
GB11669-RA		Gene	1.69685	0.002	FBgn0034248
GB15784-RA		Gene	2.19588	0.002	FBgn0038420
GB19237-RA		Gene	1.91039	0.002	FBgn0054036
GB12185-RA		Gene	1.32057	0.002	FBgn0010482
GB11683-RA		Gene	1.36584	0.002	FBgn0029868
GB15252-RA		Gene	1.50243	0.002	FBgn0030605
GB18497-RA		Gene	1.03725	0.002	FBgn0024556
GB10174-RA		Gene	-1.73112	0.002	FBgn0044051
GB16844-RA		Gene	-0.90369	0.002	FBgn0000556
GB10889-RA		Gene	-1.07130	0.002	FBgn0031313
GB11132		Pos	-1.50744	0.002	
GB19705-RA		Gene	-1.09598	0.002	FBgn0033272
GB16049-RA		Gene	-1.08631	0.002	FBgn0025700
GB12364-RA		Gene	1.23133	0.002	FBgn0038924
GB17830-RA		Gene	-1.30667	0.002	FBgn0033210
GB11156-RA		Gene	-1.07714	0.002	FBgn0052344
GB14034-RA		Gene	0.81420	0.002	FBgn0035082
GB15496-RA		Gene	-0.96077	0.002	FBgn0037551
GB16168-RA		Gene	-1.18319	0.002	FBgn0039257
GB16757-RA		Gene	-1.55480	0.002	FBgn0032620
GB13473-RA		Gene	-1.52610	0.002	FBgn0035544
GB14961-RA		Gene	-1.25113	0.002	FBgn0039172
GB11146-RA		Gene	0.95388	0.002	FBgn0001995
GB19639-RA		Gene	1.11198	0.002	FBgn0024978
GB19671-RA		Gene	-0.89510	0.002	FBgn0031876
GB11666-RA		Gene	-0.84217	0.002	FBgn0032050
GB19234-RA	AmelTwld1	Gene	2.11489	0.002	FBgn0029170
GB13069-RA		Gene	1.59061	0.002	
GB15238-RA		Gene	1.15996	0.002	FBgn0030610
GB18004-RA		Gene	-1.01745	0.002	FBgn0051075
GB13993-RA		Gene	-1.51550	0.002	FBgn0036277
GB15189-RA		Gene	-1.24508	0.003	FBgn0025366
GB11847-RA		Gene	-1.13054	0.003	FBgn0037087
GB15172-RA		Gene	1.44081	0.003	FBgn0028336
GB15487-RA		Gene	1.38226	0.003	
GB13473-RB		Gene	-1.33830	0.003	FBgn0035544
GB13613-RA		Gene	-1.17547	0.003	FBgn0002562
GB13994-RA		Gene	1.11966	0.003	FBgn0035591
GB11358-RA		Gene	2.12903	0.003	FBgn0005666
GB12342-RA		Gene	1.26051	0.003	FBgn0032607
GB16219-RA		Gene	1.00959	0.003	FBgn0039635
GB19274-RA		Gene	-1.12846	0.003	FBgn0038746

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB12011-RA		Gene	0.91751	0.003	FBgn0040666
GB16215-RB		Gene	2.22544	0.003	FBgn0002772
GB16162-RA		Gene	-0.87423	0.003	FBgn0031992
GB11386-RA		Gene	-0.99213	0.003	FBgn0038829
GB14910-RA		Gene	1.07525	0.003	FBgn0000228
GB18086-RA		Gene	1.76345	0.003	FBgn0031228
GB16048-RA		Gene	-1.03427	0.003	FBgn0032101
GB13000-RA		Gene	1.13803	0.003	FBgn0029718
GB15299-RA		Gene	-0.81879	0.003	FBgn0037913
GB17088-RA		Gene	1.01136	0.003	FBgn0030692
GB12747-RA		Pos	-0.95260	0.003	
GB15582-RA		Gene	-1.21721	0.003	FBgn0020238
GB15865-RA		Gene	2.75792	0.003	FBgn0037430
GB16525-RA		Gene	-0.74646	0.003	FBgn0017645
GB12747-RA		Pos	-0.99577	0.003	
GB14607-RA		Gene	-1.17482	0.003	FBgn0030332
GB19561-RA		Gene	1.84259	0.003	FBgn0036780
GB17861-RA		Gene	0.98796	0.003	FBgn0035960
GB14593-RA		Gene	-1.06882	0.003	
GB17082-RA		Gene	1.19467	0.003	FBgn0053155
GB17681		Pos	-1.52423	0.003	
GB17820-RA		Gene	-1.13798	0.004	FBgn0022772
GB16194-RA		Gene	0.90418	0.004	FBgn0036365
GB18953-RA		Gene	1.32777	0.004	FBgn0031912
GB10560		Pos	1.32189	0.004	
GB18784-RA		Gene	1.76652	0.004	FBgn0032538
GB19200-RA		Gene	-0.79473	0.004	FBgn0029134
GB11588-RA		Gene	2.43984	0.004	FBgn0050031
GB30510-RA_2		Gene	0.88731	0.004	FBgn0031995
GB13583-RA		Gene	-0.82590	0.004	FBgn0033902
GB10545-RA		Gene	1.01443	0.004	FBgn0010424
GB19746-RA		Gene	-0.93097	0.004	FBgn0032726
GB17566-RA		Gene	-0.96851	0.004	FBgn0032487
GB14176-RA		Gene	0.77044	0.004	FBgn0039565
GB12721-RA		Gene	-0.78609	0.004	FBgn0024841
GB12948-RA		Gene	-0.88624	0.004	FBgn0014857
GB18694-RA		Gene	-1.05079	0.004	
GB11786-RA		Gene	-0.78488	0.004	FBgn0029676
GB16412-RA		Gene	-0.74134	0.004	FBgn0037874
GB13680-RA		Gene	-1.92060	0.004	FBgn0021765
GB15628-RA		Gene	-0.78026	0.004	FBgn0033385
GB18501-RA		Gene	-1.57412	0.004	FBgn0025678
GB17398-RA		Gene	-0.94530	0.004	FBgn0032196
GB17573-RA		Gene	-0.85480	0.004	FBgn0033948
GB15567-RA		Gene	-0.87809	0.004	
GB10560		Pos	1.06573	0.004	
GB17715-RA		Gene	1.35112	0.004	FBgn0039765
GB11132		Pos	-0.86300	0.004	
GB14599-RA		Gene	1.11240	0.004	FBgn0030976
GB16303-RA		Gene	0.88262	0.004	FBgn0051450
GB10297-RA		Gene	-0.83820	0.004	FBgn0036356
GB12270-RA		Gene	-0.99490	0.004	FBgn0027086
GB14298-RA		Gene	-0.83009	0.004	FBgn0028968
GB13868-RA		Gene	0.90921	0.005	FBgn0038307
GB30119-RA		Gene	1.32767	0.005	FBgn0030204
GB10560		Pos	1.02609	0.005	
GB11132		Pos	-0.81060	0.005	
GB14788-RA		Gene	-1.13307	0.005	FBgn0033603
GB16597-RA		Gene	-0.90156	0.005	FBgn0034051
GB10526-RA		Gene	-1.10858	0.005	FBgn0038830
GB10560		Pos	1.22185	0.005	
GB15440-RA		Gene	0.84291	0.005	FBgn0037890
GB16520-RA		Gene	-0.93436	0.005	FBgn0013269
GB12303-RA		Gene	1.57925	0.005	FBgn0026059
GB12506-RA		Gene	-1.03337	0.005	FBgn0030719
GB11012-RA		Gene	-1.15890	0.005	
GB14537-RA	AmelCPR28	Gene	3.83620	0.005	FBgn0052405
GB11374-RA		Gene	-0.74146	0.005	FBgn0031499
GB19485-RA		Gene	-0.91479	0.005	FBgn0052486
GB20015-RA	AmelCPR23	Gene	0.89406	0.005	FBgn0033869
GB17401-RA		Gene	-0.92988	0.005	FBgn0031677
GB10083-RA		Gene	-0.89295	0.005	FBgn0030435

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10343-RA		Gene	0.94228	0.005	FBgn0034986
GB13992-RA		Gene	-1.07027	0.005	FBgn0038373
GB20132-RA		Gene	1.92452	0.005	FBgn0030940
GB19666-RB		Gene	1.75632	0.005	FBgn0039897
GB11655-RA		Gene	0.81827	0.005	FBgn0004888
GB17681		Pos	-1.51549	0.005	
GB17699-RA		Gene	1.10848	0.005	FBgn0031684
GB17681		Pos	-1.14120	0.005	
GB10216-RA		Gene	0.88773	0.005	FBgn0036488
GB15186-RA		Gene	-0.88312	0.005	FBgn0052177
GB17498-RA		Gene	-0.79476	0.005	FBgn0022893
GB19618-RA		Gene	1.69971	0.006	FBgn0034157
GB30420-RA		Gene	1.14956	0.006	FBgn0040369
GB20087-RA		Gene	1.64891	0.006	FBgn0032421
GB15326-RA		Gene	1.33404	0.006	FBgn0027785
GB16549-RA		Gene	1.12060	0.006	FBgn0005558
GB13473-RA		Gene	-1.26074	0.006	FBgn0035544
GB16909-RA		Gene	1.39402	0.006	FBgn0013988
GB14029-RA		Gene	0.67086	0.006	FBgn0032153
GB12865-RA		Gene	1.24245	0.006	
GB11263-RA		Gene	0.92976	0.006	FBgn0032614
GB16633-RA		Gene	-0.99352	0.006	FBgn0002989
GB13495-RA		Gene	-0.75564	0.006	FBgn0011763
GB11550-RA	similar cuticular_found array	Gene	2.70112	0.006	FBgn0038819
GB13936-RA		Gene	1.97915	0.006	FBgn0038161
GB14937-RA		Gene	1.05619	0.006	FBgn0027360
GB16603-RA		Gene	-0.88248	0.006	FBgn0051548
GB11696-RA		Gene	0.76967	0.006	FBgn0040751
GB17522-RA		Gene	-0.76687	0.006	FBgn0040283
GB17592-RA		Gene	-0.99677	0.006	FBgn0011016
GB10560		Pos	1.23837	0.006	
GB11703-RA		Gene	1.26357	0.006	FBgn0039864
GB14037-RA		Gene	0.99500	0.006	FBgn0052209
GB12827-RA		Gene	-1.02125	0.007	FBgn0000486
GB12747-RA		Pos	-0.85322	0.007	
GB14870-RA		Gene	-0.88971	0.007	FBgn0051472
GB14114-RA		Gene	-0.98122	0.007	FBgn0039406
GB30104-RA		Gene	2.30674	0.007	FBgn0035917
GB13111-RA		Gene	1.09627	0.007	FBgn0036697
GB17681		Pos	-1.43005	0.007	
GB17883-RA		Gene	1.57188	0.007	FBgn0031436
GB14587-RA		Gene	0.74969	0.007	
GB16464-RA		Gene	0.94553	0.007	FBgn0038587
GB13214-RA		Gene	-0.89610	0.007	FBgn0014189
GB15320-RA		Gene	-0.97875	0.007	FBgn0038183
GB17095-RA		Gene	1.10874	0.007	FBgn0031771
GB10769-RA		Gene	0.91568	0.007	FBgn0036197
GB16276-RA		Gene	-0.90325	0.007	FBgn0010083
GB12747-RA		Pos	-0.85528	0.007	
GB10775-RA		Gene	-1.37989	0.007	
GB14694-RA		Gene	-0.78699	0.007	FBgn0004002
GB18365-RA		Gene	1.68021	0.007	FBgn0000046
GB11124-RA		Gene	1.04712	0.007	FBgn0022344
GB12747-RA		Pos	-0.87682	0.007	
GB10560		Pos	1.19184	0.008	
GB11492-RA		Gene	-0.87267	0.008	FBgn0051076
GB16552-RA		Gene	1.10626	0.008	FBgn0038149
GB10669-RA		Gene	-0.79547	0.008	FBgn0034743
GB11889-RA		Gene	-0.90360	0.008	FBgn0061209
GB17696-RA		Gene	-0.99965	0.008	FBgn0050100
GB18277-RA		Gene	-1.22591	0.008	FBgn0034918
GB18381-RA		Gene	-0.67932	0.008	FBgn0035601
GB30413-RA		Gene	0.77230	0.008	FBgn0019960
GB18406-RA		Gene	0.79873	0.008	FBgn0028919
GB12747-RA		Pos	-0.75812	0.008	
GB15355-RA		Gene	1.34380	0.008	FBgn0035404
GB16751-RA		Gene	1.47967	0.008	FBgn0010612
GB13846-RA		Gene	0.84317	0.008	
GB14511-RA		Gene	2.04276	0.008	FBgn0037424
GB10871-RA		Gene	-1.00701	0.008	FBgn0001086
GB11132		Pos	-0.79159	0.008	
GB17114-RA		Gene	-1.25633	0.008	FBgn0003292

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17681		Pos	-1.68407	0.008	
GB15948-RA		Gene	1.12415	0.008	FBgn0034645
GB17681		Pos	-1.36002	0.008	
GB12749-RA		Gene	1.19769	0.008	FBgn0062447
GB10560		Pos	1.29889	0.009	
GB15145-RA		Gene	-0.69187	0.009	FBgn0067622
GB17641-RA		Gene	-1.28485	0.009	FBgn0030478
GB19903-RA		Gene	0.78551	0.009	FBgn0038474
GB18183-RA		Gene	1.64319	0.009	
GB15502-RA		Gene	1.19547	0.009	
GB20019-RA		Gene	-0.79158	0.009	FBgn0035951
GB14223-RA		Gene	-1.09897	0.009	FBgn0029148
GB10896-RA		Gene	1.68124	0.009	FBgn0051997
GB11973-RA		Gene	0.85703	0.009	FBgn0030304
GB12747-RA		Pos	-0.87959	0.009	
GB15727-RA		Gene	-1.00484	0.009	FBgn0005776
GB12547-RA		Gene	-0.85238	0.009	FBgn0002542
GB20015-RA	AmelCPR23	Gene	1.78545	0.009	FBgn0033869
GB19189-RA		Gene	0.98563	0.009	FBgn0040793
GB16243-RA		Gene	1.62082	0.009	FBgn0004360
GB13473-RA		Gene	-1.36649	0.009	FBgn0035544
GB16420-RA		Gene	-0.90570	0.009	FBgn0032214
GB30195-RA		Gene	1.63297	0.009	FBgn0029876
GB18801-RA		Gene	-0.77139	0.009	FBgn0035252
GB14128-RA		Gene	0.92848	0.009	FBgn0052264
GB13487-RA		Gene	1.01964	0.009	FBgn0035865
GB12853-RA		Gene	1.89853	0.009	FBgn0015609
GB15690-RA		Gene	0.88634	0.009	FBgn0038323
GB17564-RA		Gene	-0.71318	0.009	FBgn0029897
GB12739-RA		Gene	-1.10542	0.009	FBgn0039110
GB30393-RA		Gene	-1.07453	0.009	FBgn0013325
GB16065-RA		Gene	0.92185	0.010	FBgn0004656
GB10560		Pos	1.08284	0.010	
GB11160-RA		Gene	-0.89148	0.010	FBgn0001491
GB10176-RA		Gene	0.80987	0.010	
GB14167-RA		Gene	0.96528	0.010	FBgn0029711
GB11296-RA		Gene	-0.66053	0.010	FBgn0026566
GB12296-RA		Gene	1.08985	0.010	FBgn0030743
GB13689-RA		Gene	-1.09040	0.010	FBgn0028327
GB19218-RA		Gene	0.71555	0.010	FBgn0053553
GB10737-RA	apd-2	Gene	1.25848	0.010	FBgn0036870
GB10942-RA		Gene	0.95839	0.010	FBgn0004598
GB11144-RA		Gene	0.75403	0.010	FBgn0032053
GB12089-RA		Gene	-1.03733	0.010	FBgn0034753
GB12850-RA		Gene	1.07272	0.010	FBgn0036353
GB14989-RA		Gene	-1.09418	0.010	FBgn0030114
GB12747-RA		Pos	-0.91771	0.010	
GB10869-RA		Gene	-1.15151	0.010	FBgn0002565
GB15436-RA		Gene	-1.17256	0.010	FBgn0035592
GB10560		Pos	1.08994	0.010	
GB12747-RA		Pos	-0.64589	0.010	
GB16215-RB		Gene	1.52771	0.010	FBgn0002772
GB17558-RA		Gene	1.00132	0.011	FBgn0037093
GB10560		Pos	1.09312	0.011	
GB17891-RA		Gene	0.96802	0.011	
GB13684-RA		Gene	-1.15579	0.011	FBgn0037739
GB10315-RA		Gene	-0.62184	0.011	FBgn0031633
GB16972-RA		Gene	-0.75314	0.011	FBgn0030724
GB17317-RA		Gene	-0.80219	0.011	FBgn0015615
GB11766-RA		Gene	-0.75528	0.011	FBgn0034794
GB20117-RA		Gene	-1.37201	0.011	
GB12261-RA		Gene	-0.76045	0.011	FBgn0022936
GB17681		Pos	-1.74891	0.011	
GB15448-RA		Gene	-0.70762	0.011	FBgn0034315
GB17770-RA		Gene	-0.87662	0.012	FBgn0026143
GB15304-RA		Gene	-0.85606	0.012	FBgn0033886
GB18764-RA		Gene	-0.80367	0.012	FBgn0029176
GB19850-RA		Gene	1.68887	0.012	FBgn0010218
GB17561-RA		Gene	1.41503	0.012	FBgn0042112
GB18843-RA		Gene	0.67304	0.012	FBgn0037822
GB17277-RA		Gene	-0.90057	0.012	FBgn0051915
GB12569-RA		Gene	-0.76791	0.012	FBgn0032409

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17751-RA		Gene	1.14620	0.012	FBgn0037018
GB10560		Pos	1.36991	0.012	
GB11132		Pos	-1.24428	0.012	
GB13284-RA		Gene	-0.81957	0.012	FBgn0003062
GB12567-RA		Gene	1.15484	0.012	FBgn0027348
GB14786-RA		Gene	1.14353	0.012	FBgn0037447
GB12869-RA		Gene	1.01003	0.013	
GB15548-RA		Gene	0.75723	0.013	FBgn0050437
GB14361-RA		Gene	-1.06155	0.013	FBgn0002564
GB17782-RA		Gene	-1.15479	0.013	FBgn0035544
GB18238-RA		Gene	-0.77410	0.013	FBgn0034988
GB19406-RA		Gene	-0.61042	0.013	FBgn0028688
GB10560		Pos	1.03218	0.013	
GB13940-RA		Gene	-0.78785	0.013	FBgn0029639
GB10787-RA		Gene	1.17630	0.013	FBgn0067102
GB15929-RA		Gene	-0.89852	0.013	FBgn0026751
GB17148-RA		Gene	1.26896	0.013	FBgn0001258
GB17609-RA		Gene	1.02182	0.013	FBgn0032222
GB19920-RA		Gene	0.92136	0.013	FBgn0050290
GB18192-RA		Gene	-1.51020	0.013	FBgn0032643
GB13798-RA		Gene	-0.75210	0.013	FBgn0058045
GB19834-RA		Gene	0.98276	0.013	FBgn0083984
GB17782-RA		Gene	-1.43914	0.013	FBgn0035544
GB10424-RA	AmelCPR24	Gene	1.52753	0.013	FBgn0050045
GB16175-RA		Gene	-0.72005	0.013	FBgn0032050
GB11132		Pos	-1.01020	0.013	
GB19739-RA		Gene	0.79810	0.013	FBgn0035983
GB19212-RA		Gene	-0.82193	0.013	FBgn0050108
GB14729-RA		Gene	-1.21266	0.013	
GB11284-RA		Gene	-0.64350	0.014	FBgn0003151
GB17603-RA		Gene	-0.69609	0.014	FBgn0000173
GB13049-RA		Gene	-1.08064	0.014	FBgn0003887
GB16284-RA		Gene	-0.90017	0.014	FBgn0040512
GB18042-RA		Gene	-1.16310	0.014	FBgn0014868
GB19777-RA		Gene	-0.67629	0.014	FBgn0037314
GB11034-RA		Gene	1.02435	0.014	FBgn0035244
GB20149-RA		Gene	0.67778	0.014	FBgn0037653
GB13631-RA		Gene	1.12995	0.014	FBgn0032849
GB14193-RA	AmelTwld2	Gene	1.83550	0.014	FBgn0031957
GB18912-RA		Gene	-0.82696	0.014	FBgn0028967
GB19743-RA		Gene	1.06371	0.014	FBgn0033633
GB10560		Pos	1.00862	0.014	
GB15291-RA		Gene	0.71107	0.015	FBgn0020235
GB18454-RA		Gene	-1.55791	0.015	FBgn0037239
GB10560		Pos	0.96682	0.015	
GB16770-RA		Gene	-0.72078	0.015	
GB12747-RA		Pos	-0.75723	0.015	
GB19895-RA		Gene	-0.87653	0.015	FBgn0003117
GB12507-RA		Gene	1.81985	0.015	
GB14975-RA		Gene	2.21894	0.015	FBgn0031629
GB17681		Pos	-1.37966	0.015	
GB19907-RA		Gene	-0.78943	0.015	FBgn0031979
GB12747-RA		Pos	-0.83815	0.015	
GB30329-RA		Gene	1.36268	0.016	FBgn0002741
GB10560		Pos	1.01711	0.016	
GB13845-RA		Gene	2.34604	0.016	FBgn0029922
GB18908-RA		Gene	-1.49870	0.016	
GB11022-RA		Gene	0.75013	0.016	FBgn0039896
GB17347-RA		Gene	2.49610	0.016	FBgn0031629
GB10850-RA		Gene	0.85283	0.016	FBgn0002174
GB18376-RA		Gene	-0.87445	0.016	FBgn0053126
GB14986-RA		Gene	-0.88106	0.016	FBgn0052672
GB15296-RA		Gene	0.85896	0.016	FBgn0017429
GB14059-RA		Gene	-1.03313	0.016	FBgn0015268
GB19989-RA		Gene	-0.68726	0.016	FBgn0030801
GB10155-RA		Gene	-0.65446	0.016	FBgn0004926
GB14321-RA		Gene	2.07000	0.016	FBgn0019644
GB12753-RA		Gene	-0.62609	0.016	FBgn0030611
GB14811-RA		Gene	1.03191	0.017	FBgn0033158
GB17523-RA		Gene	-1.55668	0.017	FBgn0032157
GB17749-RA		Gene	0.68843	0.017	FBgn0004465
GB17681		Pos	-1.16042	0.017	

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB16834-RA		Gene	-0.60919	0.017	FBgn0035020
GB10560		Pos	0.99068	0.017	
GB13099-RA		Gene	0.91082	0.018	FBgn0032646
GB15141-RA		Gene	-0.86309	0.018	
GB16881-RA		Gene	1.08983	0.018	FBgn0004169
GB17681		Pos	-1.49574	0.018	
GB16604-RA		Gene	0.94925	0.018	FBgn0023170
GB18002-RA		Gene	-0.97572	0.019	
GB17681		Pos	-1.17804	0.019	
GB16189-RA		Gene	-0.71865	0.019	FBgn0015283
GB18848-RA		Gene	-0.54343	0.019	
GB12140-RA		Gene	-0.71787	0.019	FBgn0010411
GB14939-RA		Gene	-0.80517	0.019	FBgn0004132
GB13338-RA		Gene	-0.63425	0.019	
GB17494-RA		Gene	1.09082	0.019	FBgn0039025
GB15095-RA		Gene	-0.97332	0.019	FBgn0034496
GB18362-RA		Gene	-0.89438	0.019	FBgn0003612
GB12145-RA		Gene	-0.67473	0.019	FBgn0027053
GB14947-RA		Gene	-1.12753	0.020	FBgn0053303
GB16200-RA		Gene	1.03698	0.020	
GB30362-RA		Gene	-2.18451	0.020	FBgn0002565
GB12925-RA		Gene	-0.72520	0.020	FBgn0021814
GB12061-RA		Gene	-1.19061	0.020	FBgn0038360
GB15066-RA		Gene	-0.89499	0.020	FBgn0038489
GB16132-RA		Gene	-0.70420	0.020	FBgn0039697
GB18567-RA		Gene	-0.80788	0.020	FBgn0004915
GB19169-RA		Gene	1.40291	0.020	FBgn0034412
GB10901-RA		Gene	0.90978	0.020	
GB10395-RA		Gene	-1.66326	0.021	FBgn0024244
GB10920-RA		Gene	0.78072	0.021	FBgn0029843
GB12829-RA		Gene	-0.56858	0.021	FBgn0032051
GB14769-RA		Gene	-0.69269	0.021	FBgn0036489
GB18703-RA		Gene	-0.72296	0.021	FBgn0035169
GB12920-RA		Gene	-0.75709	0.021	FBgn0017577
GB12747-RA		Pos	-1.11970	0.021	
GB11005-RA		Gene	1.10629	0.021	FBgn0032200
GB11132		Pos	-0.89389	0.021	
GB17681		Pos	-1.45285	0.021	
GB11132		Pos	-0.65458	0.021	
GB30227-RA		Gene	-0.94205	0.021	FBgn0000261
GB10560		Pos	0.90481	0.021	
GB12046-RA		Gene	-0.66517	0.021	FBgn0023177
GB11486-RA		Gene	0.81663	0.021	FBgn0034267
GB11914-RA		Gene	0.68244	0.021	FBgn0033235
GB14800-RA		Gene	1.44415	0.021	FBgn0030940
GB11132		Pos	-0.97881	0.021	
GB13418-RA		Gene	1.14311	0.021	FBgn0033205
GB16340-RA		Gene	1.05749	0.021	FBgn0001263
GB12264-RA		Gene	-0.59324	0.022	FBgn0035134
GB11432-RA		Gene	1.42433	0.022	FBgn0026562
GB11007-RA		Gene	-1.08815	0.022	FBgn0014879
GB11680-RA		Gene	1.04164	0.022	
GB16812-RA		Gene	-0.68687	0.022	FBgn0026170
GB17327-RA		Gene	-0.58506	0.022	FBgn0036272
GB13827-RA		Gene	-0.75758	0.022	FBgn0051715
GB11063-RA		Gene	1.60494	0.022	FBgn0032538
GB11601-RA		Gene	-0.81694	0.022	FBgn0030275
GB17681		Pos	-1.32721	0.022	
GB12700-RA		Gene	1.06741	0.022	FBgn0061209
GB18654-RA		Gene	0.91018	0.022	FBgn0039896
GB13457-RA		Gene	2.30116	0.022	FBgn0034159
GB12384-RA		Gene	0.80441	0.022	FBgn0035679
GB19973-RA		Gene	-0.65352	0.023	FBgn0039402
GB15693-RA		Gene	-1.19877	0.023	FBgn0036514
GB15994-RA		Gene	0.80374	0.023	FBgn0028491
GB19992-RA		Gene	-0.88178	0.023	FBgn0052662
GB17681		Pos	-1.13955	0.023	
GB17681		Pos	-1.04112	0.024	
GB13692-RA		Gene	-1.08793	0.024	FBgn0030136
GB16242-RA		Gene	-0.96483	0.024	FBgn0031040
GB10560		Pos	0.96765	0.024	
GB10732-RA		Gene	-1.06554	0.024	FBgn0023529

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB12521-RA		Gene	-0.94738	0.024	FBgn0037609
GB18108-RA		Gene	-0.94816	0.024	FBgn0003941
GB15236-RA		Gene	0.70245	0.025	FBgn0031971
GB19431-RA		Gene	0.79523	0.025	FBgn0021856
GB17056-RA		Gene	-0.83118	0.025	FBgn0036415
GB16699-RA		Gene	-0.72714	0.025	FBgn0029715
GB15059-RA		Gene	-1.11274	0.025	FBgn0028997
GB16215-RA		Gene	1.34756	0.025	FBgn0002772
GB13545-RA		Gene	-0.69592	0.025	FBgn0032001
GB18314-RA		Gene	0.67614	0.025	FBgn0039219
GB16307-RA		Gene	-0.96675	0.026	FBgn0032763
GB11273-RA		Gene	0.72770	0.026	FBgn0035154
GB16812-RA		Gene	-0.75561	0.026	FBgn0026170
GB17681		Pos	-1.34431	0.026	
GB17681		Pos	-1.04314	0.026	
GB12898-RA		Gene	0.94709	0.026	FBgn0053977
GB12174-RA		Gene	0.82232	0.026	FBgn0038737
GB16647-RA		Gene	-0.96351	0.026	FBgn0001084
GB14431-RA		Gene	-0.63766	0.026	FBgn0030940
GB18270-RA		Gene	0.86992	0.026	FBgn0037814
GB15220-RA		Gene	-1.43526	0.026	FBgn0010218
GB15141-RA		Gene	0.93624	0.026	
GB17681		Pos	-1.42299	0.026	
GB18432-RA		Gene	1.02109	0.027	FBgn0039205
GB13298-RA	Am-C	Gene	0.93255	0.027	FBgn0026077
GB17787-RA		Gene	1.20533	0.027	FBgn0052230
GB12747-RA		Pos	-0.58768	0.028	
GB14908-RA		Gene	-0.94257	0.028	FBgn0065032
GB18637-RA		Gene	-0.73042	0.028	FBgn0011570
GB18450-RA		Gene	1.09316	0.028	FBgn0033365
GB10872-RA		Gene	-0.97958	0.028	FBgn0039690
GB15641-RA		Gene	1.69110	0.028	FBgn0037288
GB11132		Pos	-0.97252	0.029	
GB12747-RA		Pos	-0.98554	0.029	
GB16281-RA		Gene	-0.57529	0.029	FBgn0010602
GB18020-RA		Gene	-0.62518	0.029	FBgn0034368
GB15547-RA		Gene	-0.63264	0.029	FBgn0035590
GB17963-RA		Gene	-0.78590	0.029	FBgn0036897
GB15114-RA		Gene	-0.70004	0.029	FBgn0043010
GB18959-RA		Gene	-0.57901	0.029	FBgn0038578
GB10560		Pos	1.08748	0.029	
GB12470-RA		Gene	-0.78076	0.029	FBgn0039849
GB14980-RA		Gene	-0.91904	0.029	FBgn0011584
GB19530-RA		Gene	-1.02156	0.029	FBgn0028902
GB18246-RA		Gene	-0.66727	0.029	FBgn0036187
GB17681		Pos	-1.31293	0.029	
GB16241-RA		Gene	0.66479	0.030	FBgn0028582
GB12747-RA		Pos	-1.76671	0.030	
GB12887-RA		Gene	-0.66878	0.030	FBgn0027084
GB17681		Pos	-1.28598	0.030	
GB18993-RA		Gene	-0.95040	0.031	FBgn0016926
GB13730-RA		Gene	-0.81156	0.031	FBgn0004868
GB18811-RA		Gene	0.80743	0.031	FBgn0013684
GB11312-RA		Gene	-0.84636	0.031	FBgn0032059
GB11132		Pos	-0.59475	0.031	
GB18124-RA		Gene	-1.17498	0.031	FBgn0029709
GB10560		Pos	0.93980	0.031	
GB19284-RA		Gene	-0.62233	0.031	FBgn0005639
GB16986-RA		Gene	-0.79946	0.031	FBgn0038180
GB14538-RA		Gene	-0.98359	0.032	FBgn0040394
GB19146-RA		Gene	-0.73646	0.032	
GB17164-RA		Gene	-0.80356	0.032	FBgn0037439
GB30142-RB		Gene	-0.78140	0.032	FBgn0053520
GB14658-RA		Gene	-0.89754	0.032	FBgn0040384
GB19429-RA		Gene	-0.81704	0.032	FBgn0038826
GB12090-RA		Gene	1.23220	0.032	FBgn0038224
GB11039-RA		Gene	-0.56264	0.032	
GB16871-RA		Gene	-0.71519	0.032	FBgn0033081
GB11362-RA		Gene	0.58731	0.032	FBgn0038400
GB14473-RA		Gene	0.77275	0.032	FBgn0016756
GB17552-RA		Gene	-0.58356	0.032	FBgn0028434
GB18555-RA		Gene	-0.82469	0.032	FBgn0064126

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB19868-RA		Gene	-0.90097	0.032	FBgn0013349
GB18938-RA		Gene	0.72882	0.032	FBgn0030672
GB20028-RA		Gene	-0.95525	0.032	
GB13469-RA		Gene	-0.62684	0.033	FBgn0037573
GB15488-RA		Gene	-1.12151	0.033	FBgn0039859
GB17681		Pos	-1.12269	0.033	
GB19424-RA		Gene	-0.69657	0.033	FBgn0034528
GB12038-RA		Gene	-0.82419	0.033	FBgn0038359
GB18969-RA		Gene	-0.70803	0.033	FBgn0015245
GB10238-RA		Gene	-1.20887	0.033	FBgn0033663
GB18917-RA		Gene	-0.79840	0.033	FBgn0011726
GB10275-RA		Gene	-0.75242	0.033	FBgn0003887
GB11765-RA		Gene	0.70164	0.033	FBgn0026088
GB13668-RA		Gene	-0.69272	0.033	FBgn0022349
GB16151-RA		Gene	-0.68027	0.033	FBgn0034821
GB10502-RA		Gene	0.63326	0.033	FBgn0052937
GB12118-RA		Gene	-0.92401	0.033	FBgn0038950
GB12113-RA		Gene	0.63261	0.034	FBgn0004363
GB17681		Pos	-1.51895	0.034	
GB17681		Pos	-1.26470	0.034	
GB17725-RA		Gene	0.66699	0.034	FBgn0036570
GB17789-RA		Gene	1.11847	0.034	FBgn0013981
GB19902-RA		Gene	-0.87865	0.034	FBgn0032052
GB30506-RA		Gene	-0.80499	0.034	FBgn0039562
GB17961-RA		Gene	-0.91196	0.034	
GB17803-RA		Gene	0.56509	0.034	FBgn0033038
GB12400-RA		Gene	1.16042	0.035	FBgn0034166
GB12946-RA		Gene	-0.84850	0.035	FBgn0002022
GB30512-RC		Gene	1.70822	0.035	FBgn0003721
GB18834-RA		Gene	0.88543	0.035	
GB14777-RA		Gene	-1.10383	0.035	FBgn0033687
GB15617-RA		Gene	1.12672	0.035	FBgn0051057
GB17377-RA		Gene	-0.61640	0.035	FBgn0037298
GB19720-RA		Gene	-0.77433	0.035	FBgn0025808
GB10974-RA		Gene	1.12418	0.035	FBgn0020300
GB10252-RA		Gene	-0.72977	0.035	FBgn0036967
GB13529-RA		Gene	-0.59546	0.035	FBgn0013954
GB13982-RA		Gene	-0.54561	0.035	FBgn0016013
GB15637-RA		Gene	-0.84600	0.035	FBgn0002622
GB30388-RA		Gene	1.09133	0.036	FBgn0015031
GB12022-RA		Gene	-0.70403	0.036	
GB18028-RA		Gene	1.13429	0.036	FBgn0031066
GB10472-RA		Gene	-0.58896	0.036	FBgn0039020
GB15500-RA		Gene	-0.63454	0.036	FBgn0000053
GB30244-RA		Gene	0.55828	0.036	FBgn0031247
GB14288-RA		Gene	-1.42512	0.036	FBgn0032104
GB30162-RA		Gene	-0.70682	0.036	FBgn0003660
GB10560		Pos	1.00250	0.036	
GB16154-RA		Gene	-0.60358	0.036	FBgn0030878
GB13809-RA		Gene	-0.69156	0.036	FBgn0036574
GB19725-RA		Gene	-0.69388	0.036	FBgn0030061
GB11336-RA		Gene	-0.73677	0.037	FBgn0033669
GB16186-RA		Gene	0.70180	0.037	FBgn0036702
GB18605-RA		Gene	0.71644	0.037	FBgn0058127
GB14256-RA		Gene	-0.61257	0.037	FBgn0033556
GB17681		Pos	-1.17755	0.037	
GB17681		Pos	-1.01256	0.037	
GB18667-RA		Gene	0.73947	0.037	FBgn0030038
GB15864-RA		Gene	0.79321	0.037	
GB16086-RA		Gene	-0.96870	0.037	FBgn0011598
GB11815-RA		Gene	-0.72980	0.038	FBgn0035147
GB13459-RA		Gene	0.97387	0.038	FBgn0031464
GB17553-RA		Gene	-1.08785	0.038	FBgn0037011
GB11344-RA		Gene	-0.76658	0.038	FBgn0015949
GB13135-RA		Gene	-0.56571	0.038	FBgn0014020
GB17739-RA		Gene	-0.78831	0.039	FBgn0032702
GB14698-RA		Gene	1.33784	0.039	FBgn0032889
GB17470-RA		Gene	-0.56090	0.039	FBgn0026582
GB30189-RA		Gene	-0.90417	0.039	FBgn0035993
GB12747-RA		Pos	-0.66680	0.039	
GB14723-RA		Gene	0.59052	0.039	FBgn0011787
GB16641-RA		Gene	-0.55883	0.040	FBgn0019637

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17382-RA		Gene	-0.92052	0.040	FBgn0036229
GB19996-RA		Gene	-1.11589	0.040	FBgn0035772
GB11495-RA		Gene	-1.18052	0.040	FBgn0044871
GB17681		Pos	-1.10599	0.040	
GB12399-RA		Gene	-0.80700	0.040	FBgn0038293
GB12673-RA		Gene	-0.67480	0.040	FBgn0033901
GB14901-RA		Gene	0.56230	0.040	FBgn0032595
GB10560		Pos	0.93300	0.040	
GB15345-RA		Gene	1.36682	0.040	FBgn0030171
GB17438-RA		Gene	0.88601	0.041	FBgn0051126
GB16539-RA		Gene	0.62096	0.041	FBgn0035388
GB17251-RA		Gene	-1.24086	0.041	FBgn0000150
GB17681		Pos	-1.15376	0.041	
GB19048-RA		Gene	0.65130	0.041	FBgn0033883
GB10253-RA		Gene	1.43490	0.041	FBgn0034877
GB12127-RA		Gene	0.73802	0.041	FBgn0034110
GB17540-RA		Gene	0.73401	0.042	FBgn0015582
GB16965-RA		Gene	0.69533	0.042	FBgn0038570
GB12143-RA		Gene	-0.84065	0.042	FBgn0030940
GB16104-RA		Gene	0.62952	0.043	FBgn0035483
GB10560		Pos	0.78447	0.043	
GB13751-RA		Gene	-0.66651	0.043	FBgn0038869
GB16047-RA		Gene	-0.90651	0.043	FBgn0061492
GB13712-RA		Gene	1.32109	0.043	FBgn0033936
GB12590-RA		Gene	-0.65701	0.043	FBgn0033528
GB12655-RA		Gene	0.89672	0.044	FBgn0039617
GB10144-RA		Gene	-0.60321	0.044	FBgn0015610
GB12956-RA		Gene	-0.81149	0.044	FBgn0040064
GB11462-RA		Gene	-0.64870	0.044	FBgn0022268
GB15689-RA		Gene	-0.84484	0.044	FBgn0029992
GB13297-RA		Gene	0.69329	0.044	
GB13574-RA		Gene	-0.69029	0.044	FBgn0042092
GB10169-RA		Gene	-0.94172	0.045	FBgn0036855
GB11132		Pos	-1.28616	0.045	
GB13269-RA		Gene	0.92908	0.045	FBgn0032762
GB11560-RA		Gene	0.50607	0.045	FBgn0037506
GB12462-RA		Gene	-0.69236	0.045	FBgn0042135
GB18682-RA		Gene	-0.74272	0.045	FBgn0032761
GB12226-RA		Gene	-0.66261	0.045	FBgn0010406
GB12741-RA		Gene	0.85770	0.045	FBgn0012036
GB19460-RA		Gene	-0.64212	0.045	FBgn0000064
GB18250-RA		Gene	-0.69468	0.045	FBgn0002641
GB19670-RA		Gene	1.02029	0.046	FBgn0038516
GB17710-RA		Gene	-0.83197	0.046	FBgn0021825
GB18156-RA		Gene	-0.57864	0.046	FBgn0040534
GB19167-RA		Gene	0.63045	0.046	FBgn0030573
GB15834-RA		Gene	0.90933	0.046	FBgn0037955
GB15604-RA		Gene	0.60793	0.046	FBgn0033028
GB11366-RA		Gene	-0.55511	0.046	FBgn0051938
GB17848-RA		Gene	0.59925	0.046	FBgn0037901
GB12717-RA		Gene	-0.73168	0.046	FBgn0033209
GB18770-RA		Gene	-0.51487	0.046	FBgn0034967
GB13850-RA		Gene	-0.61843	0.046	FBgn0027873
GB14253-RA		Gene	-0.75942	0.046	FBgn0036500
GB15001-RA		Gene	-1.01652	0.047	FBgn0032455
GB30582-RA_2		Gene	0.74486	0.047	FBgn0031893
GB30056-RA		Gene	-0.91999	0.047	
GB30331-RA		Gene	-0.54231	0.047	FBgn0020381
GB11018-RA		Gene	-0.89276	0.048	FBgn0031090
GB16714-RA		Gene	0.68098	0.048	FBgn0034851
GB16961-RA		Gene	0.65894	0.048	FBgn0032261
GB30108-RA		Gene	0.67953	0.048	
GB16622-RA		Gene	-0.64084	0.048	FBgn0028382
GB11985-RA		Gene	0.70755	0.049	FBgn0025704
GB17642-RA	AmelCPR15	Gene	0.88494	0.049	FBgn0034499
GB10209-RA		Gene	0.57593	0.049	FBgn0038405
GB18234-RA		Gene	-0.73988	0.049	FBgn0062411
GB11010-RA		Gene	-0.74735	0.050	
GB13426-RA		Gene	-0.79239	0.050	
GB12568-RA		Gene	-0.88915	0.050	FBgn0052708
GB17681		Pos	-0.81581	0.050	
GB13210-RA		Gene	-0.60503	0.050	FBgn0028737

8.2. Genes diferencialmente expressos na comparação Pbl versus Pp com valor de p ajustado $\leq 0,05$

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17944-RA		Gene	4.88945	0.000	FBgn0003721
GB15816-RA		Gene	2.74983	0.000	FBgn0019624
GB16494-RA		Gene	2.69016	0.000	FBgn0016119
GB17278-RA		Gene	4.07537	0.000	
GB30412-RA		Gene	-2.96260	0.000	FBgn0010355
GB12510-RA		Gene	2.59852	0.000	FBgn0035600
GB15214-RA		Gene	3.58744	0.000	FBgn0040601
GB10344-RA		Gene	2.68956	0.000	FBgn0011227
GB13489-RA		Gene	2.15992	0.000	FBgn0050371
GB30405-RA		Gene	2.86006	0.000	FBgn0031912
GB15657-RA		Gene	2.38234	0.000	FBgn0027495
GB14417-RA		Gene	2.59187	0.000	FBgn0034245
GB12164-RA		Gene	2.38034	0.000	FBgn0050354
GB20012-RA		Gene	2.07198	0.000	FBgn0032833
GB14455-RA		Gene	2.26268	0.000	
GB19110-RA	AmelCPR30	Gene	3.34199	0.000	FBgn0033602
GB10683-RA	AmelCPR25	Gene	1.99906	0.000	FBgn0033603
GB13508-RA		Gene	2.50895	0.000	FBgn0021906
GB11028-RA		Gene	3.12617	0.000	FBgn0000667
GB19040-RA		Gene	4.37426	0.000	FBgn0031698
GB14091-RA		Gene	-1.98183	0.000	FBgn0036958
GB15038-RA		Gene	3.14950	0.000	FBgn0036481
GB14758-RA		Gene	-2.17118	0.000	FBgn0001233
GB19004-RA		Gene	1.89895	0.000	FBgn0036642
GB30203-RA	apd-3	Gene	5.04749	0.000	FBgn0052654
GB10474-RA		Gene	1.90329	0.000	FBgn0031505
GB16568-RA		Gene	2.34462	0.000	FBgn0031830
GB17693-RA		Gene	2.14203	0.000	FBgn0003514
GB17614-RA		Gene	2.12188	0.000	FBgn0040773
GB18363-RA		Gene	-2.59134	0.000	FBgn0034474
GB12402-RA		Gene	1.85001	0.000	FBgn0033162
GB10192-RA		Gene	2.59849	0.000	FBgn0027586
GB18838-RA		Gene	2.58861	0.000	FBgn0003514
GB19666-RA		Gene	3.52916	0.000	FBgn0039897
GB12875-RA		Gene	2.09172	0.000	FBgn0037873
GB10009-RA		Gene	2.32936	0.000	FBgn0003884
GB15540-RA		Gene	4.18302	0.000	FBgn0033427
GB14791-RA		Gene	1.61651	0.000	FBgn0011211
GB19379-RA		Gene	-1.69877	0.000	FBgn0026170
GB12526-RA		Gene	2.17150	0.000	FBgn0022160
GB14832-RA		Gene	1.80013	0.000	FBgn0014028
GB11134-RA	AmelCPR29	Gene	2.86310	0.000	FBgn0033728
GB10455-RA		Gene	1.79021	0.000	FBgn0030136
GB17838-RA		Gene	5.11588	0.000	FBgn0038156
GB17868-RA		Gene	1.65032	0.000	FBgn0039909
GB10514-RA		Gene	-1.79563	0.000	FBgn0003884
GB12181-RA		Gene	1.47074	0.000	FBgn0031845
GB12209-RA		Gene	-1.65382	0.000	FBgn0005655
GB17455-RA		Gene	3.06972	0.000	FBgn0031700
GB30336-RA	AmelCPR14	Gene	3.92436	0.000	FBgn0037069
GB15288-RA		Gene	2.06190	0.000	FBgn0052694
GB14489-RA		Gene	-1.99926	0.000	FBgn0033156
GB12863-RA		Gene	1.62206	0.000	FBgn0036173
GB19626-RA		Gene	2.57935	0.000	FBgn0037416
GB12980-RA		Gene	1.56791	0.000	FBgn0021848
GB12274-RA		Gene	-1.76110	0.000	FBgn0004087
GB19606-RA		Gene	3.47511	0.000	FBgn0011643
GB13279-RA		Gene	3.09653	0.000	FBgn0004117
GB13909-RA		Gene	3.69695	0.000	FBgn0035429
GB13073-RA		Gene	2.11049	0.000	FBgn0037891
GB12889-RA		Gene	-2.01112	0.000	FBgn0031549
GB18986-RA		Gene	1.48722	0.000	FBgn0031683
GB12636-RA		Gene	4.05163	0.000	FBgn0032285
GB18242-RA		Gene	2.02184	0.000	FBgn0001205
GB13595-RA		Gene	1.37337	0.000	FBgn0039252
GB18651-RA		Gene	3.47188	0.000	FBgn0005634
GB12356-RA		Gene	-1.52668	0.000	FBgn0028925
GB17626-RA		Gene	2.23089	0.000	FBgn0036762
GB30104-RA		Gene	3.74347	0.000	FBgn0035917
GB17885-RA		Gene	3.30254	0.000	FBgn0053257

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10916-RA		Gene	1.84442	0.000	FBgn0032511
GB11025-RA		Gene	-1.58186	0.000	FBgn0035754
GB11987-RA		Gene	1.43021	0.000	FBgn0039257
GB15916-RA		Gene	1.94968	0.000	FBgn0020907
GB16362-RA		Gene	-1.44593	0.000	FBgn0035630
GB16757-RA		Gene	-2.62306	0.000	FBgn0032620
GB16248-RA		Gene	-1.87828	0.000	FBgn0032020
GB15018-RA		Gene	1.65308	0.000	FBgn0029167
GB16463-RA		Gene	-1.56767	0.000	FBgn0035539
GB10188-RA		Gene	2.94858	0.000	FBgn0028920
GB19422-RA		Gene	1.91936	0.000	FBgn0027291
GB15203-RA	AmelCPR4	Gene	3.79024	0.000	FBgn0035510
GB15203-RA	AmelCPR4	Gene	3.35766	0.000	FBgn0035510
GB19246-RA		Gene	1.69014	0.000	FBgn0028436
GB11489-RA		Gene	1.64116	0.000	FBgn0019957
GB18146-RA		Gene	1.62739	0.000	FBgn0052736
GB15438-RA		Gene	1.69022	0.000	FBgn0040705
GB15440-RA		Gene	1.49804	0.000	FBgn0037890
GB17384-RA	AmelCPR3	Gene	3.08294	0.000	FBgn0004777
GB18920-RA		Gene	1.72707	0.000	FBgn0021967
GB14906-RA		Gene	-1.38642	0.000	FBgn0038916
GB17255-RA		Gene	2.08621	0.000	FBgn0028342
GB14490-RA		Gene	-2.29647	0.000	FBgn0026084
GB17476-RA		Gene	1.57361	0.000	FBgn0017567
GB10926-RA		Gene	1.76156	0.000	FBgn0038662
GB15475-RA		Gene	1.73660	0.000	FBgn0030552
GB12747-RA		Pos	-1.27186	0.000	
GB10859-RA		Gene	1.80869	0.000	FBgn0039669
GB12532-RA		Gene	2.60774	0.000	FBgn0033244
GB12841-RA		Gene	1.87446	0.000	FBgn0036728
GB16917-RA		Gene	1.89695	0.000	FBgn0031021
GB16215-RA		Gene	2.07917	0.000	FBgn0002772
GB14012-RA		Gene	1.64542	0.000	FBgn0034497
GB17767-RA		Gene	1.47217	0.000	FBgn0050185
GB10444-RA		Gene	1.86260	0.000	
GB16900-RA		Gene	3.88946	0.000	FBgn0037428
GB14305-RA		Gene	-1.61075	0.000	
GB16129-RA		Gene	1.84120	0.000	FBgn0039112
GB30512-RA		Gene	2.52154	0.000	FBgn0003721
GB16295-RA		Gene	-1.47527	0.000	FBgn0051184
GB12454-RA		Gene	2.46383	0.000	FBgn0039484
GB14302-RA		Gene	1.45045	0.000	
GB11132		Pos	-1.26884	0.000	
GB17038-RA		Gene	1.47575	0.000	FBgn0030853
GB11228-RA		Gene	-1.67248	0.000	FBgn0014857
GB12779-RA		Gene	-1.23619	0.000	FBgn0027936
GB11759-RA		Gene	1.19261	0.000	FBgn0044030
GB10909-RA		Gene	-1.22647	0.000	FBgn0028554
GB30204-RA		Gene	2.52691	0.000	FBgn0003177
GB15757-RA		Gene	-1.38636	0.000	FBgn0031670
GB30104-RA		Gene	2.95862	0.000	FBgn0035917
GB16952-RA		Gene	-1.19455	0.000	
GB10576-RA		Gene	2.67180	0.000	FBgn0053519
GB16520-RA		Gene	-1.46569	0.000	FBgn0013269
GB11615-RA		Gene	2.18814	0.000	FBgn0034688
GB13953-RA		Gene	-1.18182	0.000	FBgn0030851
GB14484-RA		Gene	1.23217	0.000	FBgn0040871
GB20076-RA		Gene	2.12689	0.000	FBgn0033109
GB17057-RA		Gene	-1.46203	0.000	FBgn0037973
GB30222-RA		Gene	2.70433	0.000	FBgn0003149
GB12419-RA		Gene	-1.25714	0.000	FBgn0024332
GB16048-RA		Gene	-1.50674	0.000	FBgn0032101
GB11847-RA		Gene	-1.60109	0.000	FBgn0037087
GB11132		Pos	-1.15709	0.000	
GB17473-RA		Gene	1.21169	0.000	FBgn0003738
GB15245-RA		Gene	-2.11781	0.000	FBgn0034914
GB14892-RA		Gene	1.45334	0.000	FBgn0034649
GB16704-RA		Gene	1.75587	0.000	FBgn0011836
GB10255-RA		Gene	1.21200	0.000	
GB19201-RA		Gene	-1.56164	0.000	
GB11132		Pos	-1.26449	0.000	
GB12449-RA	similar cuticular_found array	Gene	3.07097	0.000	FBgn0028490

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB16405-RA		Gene	-1.76720	0.000	FBgn0020615
GB17088-RA		Gene	1.44109	0.000	FBgn0030692
GB19756-RA		Gene	-1.27046	0.000	FBgn0037241
GB13323-RA		Gene	-1.18033	0.000	FBgn0031227
GB13970-RA		Gene	1.58136	0.000	FBgn0029942
GB15056-RA		Gene	-1.98069	0.000	
GB16909-RA		Gene	2.12953	0.000	FBgn0013988
GB30104-RA		Gene	3.18591	0.000	FBgn0035917
GB19166-RA		Gene	-1.60480	0.000	FBgn0016700
GB16879-RA		Gene	1.61554	0.000	FBgn0039159
GB17637-RA		Gene	1.04898	0.000	FBgn0036557
GB17652-RA		Gene	1.60249	0.000	FBgn0033769
GB13487-RA		Gene	1.66156	0.000	FBgn0035865
GB18497-RA		Gene	1.35134	0.000	FBgn0024556
GB15145-RA		Gene	-1.11033	0.000	FBgn0067622
GB12603-RA		Gene	1.14086	0.000	FBgn0050373
GB12280-RA		Gene	1.26755	0.000	FBgn0039141
GB19234-RA	AmelTwid1	Gene	2.80301	0.000	FBgn0029170
GB13954-RA		Gene	2.67354	0.000	FBgn0020370
GB18960-RA		Gene	1.90734	0.000	FBgn0038922
GB16651-RA		Gene	1.12434	0.000	FBgn0039965
GB16844-RA		Gene	-1.16286	0.000	FBgn0000556
GB13613-RA		Gene	-1.57239	0.000	FBgn0002562
GB17238-RA		Gene	1.11392	0.000	FBgn0039635
GB13526-RA		Gene	1.57660	0.000	FBgn0025839
GB14225-RA	AmelCPR6	Gene	2.80788	0.000	FBgn0035281
GB15055-RA		Gene	-1.77736	0.000	FBgn0051150
GB15450-RA		Gene	1.63717	0.000	FBgn0082582
GB17498-RA		Gene	-1.16712	0.000	FBgn0022893
GB30420-RA		Gene	1.68977	0.000	FBgn0040369
GB30512-RA		Gene	2.39919	0.000	FBgn0003721
GB16466-RA		Gene	1.77516	0.000	
GB20015-RA	AmelCPR23	Gene	1.29219	0.000	FBgn0033869
GB15102-RA		Gene	1.46018	0.000	FBgn0011361
GB19671-RA		Gene	-1.15059	0.000	FBgn0031876
GB17659-RA		Gene	-1.32762	0.000	FBgn0037700
GB12412-RA		Gene	-1.24826	0.000	FBgn0038100
GB15582-RA		Gene	-1.63266	0.000	FBgn0020238
GB18574-RA		Gene	1.08364	0.000	FBgn0030460
GB14225-RA	AmelCPR6	Gene	2.78367	0.000	FBgn0035281
GB19481-RA		Gene	2.28995	0.000	FBgn0017566
GB18507-RA		Gene	-1.65958	0.000	FBgn0051641
GB13473-RA		Gene	-1.91656	0.000	FBgn0035544
GB12547-RA		Gene	-1.30816	0.000	FBgn0002542
GB13992-RA		Gene	-1.50624	0.000	FBgn0038373
GB14642-RA		Gene	2.13840	0.000	FBgn0003432
GB17587-RA		Gene	2.04138	0.000	FBgn0033710
GB11039-RA		Gene	-1.05894	0.000	
GB10174-RA		Gene	-2.11760	0.000	FBgn0044051
GB14788-RA		Gene	-1.55007	0.000	FBgn0033603
GB16168-RA		Gene	-1.46033	0.000	FBgn0039257
GB11156-RA		Gene	-1.32734	0.000	FBgn0052344
GB12592-RA		Gene	-1.26986	0.000	FBgn0039680
GB14361-RA		Gene	-1.69921	0.000	FBgn0002564
GB10387-RA		Gene	1.46945	0.000	FBgn0004577
GB12637-RA		Gene	-1.41789	0.000	FBgn0010408
GB14223-RA		Gene	-1.64299	0.000	FBgn0029148
GB18784-RA		Gene	2.31009	0.000	FBgn0032538
GB12646-RA		Gene	1.13420	0.000	FBgn0037102
GB10745-RA		Gene	1.34794	0.000	FBgn0052103
GB10658-RA		Gene	1.57597	0.000	FBgn0011455
GB19845-RA		Gene	-1.09030	0.000	FBgn0051460
GB15119-RA		Gene	1.28370	0.000	FBgn0051961
GB13470-RA	Am-D	Gene	1.47837	0.000	FBgn0022770
GB13473-RA		Gene	-1.74606	0.000	FBgn0035544
GB12364-RA		Gene	1.48185	0.000	FBgn0038924
GB11666-RA		Gene	-1.02559	0.000	FBgn0032050
GB19666-RB		Gene	2.39975	0.000	FBgn0039897
GB10284-RA		Gene	1.59075	0.000	FBgn0047038
GB13317-RA		Gene	-1.09285	0.000	FBgn0036811
GB17395-RA		Gene	-1.84909	0.000	
GB17653-RA		Gene	-1.14985	0.000	FBgn0037137

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB19618-RA		Gene	2.31831	0.000	FBgn0034157
GB14593-RA		Gene	-1.36061	0.000	
GB10942-RA		Gene	1.43744	0.000	FBgn0004598
GB14607-RA		Gene	-1.48720	0.000	FBgn0030332
GB20028-RA		Gene	-1.73894	0.000	
GB12973-RA		Gene	1.63945	0.000	FBgn0050038
GB14627-RA		Gene	1.68691	0.000	FBgn0020766
GB17120-RA		Gene	1.76291	0.000	FBgn0036279
GB13993-RA		Gene	-1.82751	0.000	FBgn0036277
GB14664-RA		Gene	1.77114	0.000	FBgn0026323
GB17699-RA		Gene	1.49067	0.000	FBgn0031684
GB14289-RA		Gene	-1.04947	0.000	FBgn0082598
GB13473-RA		Gene	-1.98345	0.000	FBgn0035544
GB17820-RA		Gene	-1.43184	0.000	FBgn0022772
GB13473-RB		Gene	-1.61430	0.000	FBgn0035544
GB16493-RA		Gene	1.46706	0.000	FBgn0038426
GB17044-RA		Gene	-1.19569	0.000	FBgn0026196
GB30333-RA	AmelCPR17	Gene	2.15471	0.000	FBgn0050045
GB30512-RA		Gene	2.57911	0.000	FBgn0003721
GB10871-RA		Gene	-1.41748	0.000	FBgn0001086
GB15487-RA		Gene	1.64799	0.001	
GB17603-RA		Gene	-1.06562	0.001	FBgn0000173
GB12869-RA		Gene	1.52152	0.001	
GB13976-RA		Gene	-1.36584	0.001	FBgn0032906
GB10560		Pos	1.42818	0.001	
GB14034-RA		Gene	0.93858	0.001	FBgn0035082
GB19237-RA		Gene	2.15441	0.001	FBgn0054036
GB19561-RA		Gene	2.25247	0.001	FBgn0036780
GB20019-RA		Gene	-1.11198	0.001	FBgn0035951
GB17195-RA		Gene	-0.96474	0.001	FBgn0017457
GB16215-RB		Gene	2.20708	0.001	FBgn0002772
GB12747-RA		Pos	-1.28781	0.001	
GB14176-RA		Gene	0.95171	0.001	FBgn0039565
GB19189-RA		Gene	1.38111	0.001	FBgn0040793
GB14511-RA		Gene	2.79637	0.001	FBgn0037424
GB10054-RA		Gene	1.03279	0.001	FBgn0035122
GB13380-RA		Gene	-1.64204	0.001	FBgn0000308
GB15341-RA		Gene	-1.09946	0.001	FBgn0030554
GB10406-RA		Gene	1.05846	0.001	FBgn0037001
GB15066-RA		Gene	-1.41237	0.001	FBgn0038489
GB19293-RA		Gene	1.43600	0.001	FBgn0000409
GB12747-RA		Pos	-1.17512	0.001	
GB12185-RA		Gene	1.45652	0.001	FBgn0010482
GB16525-RA		Gene	-0.88927	0.001	FBgn0017645
GB17782-RA		Gene	-2.11489	0.001	FBgn0035544
GB12747-RA		Pos	-1.18563	0.001	
GB15865-RA		Gene	3.26553	0.001	FBgn0037430
GB14128-RA		Gene	1.28139	0.001	FBgn0052264
GB11150-RA		Gene	1.70223	0.001	FBgn0039576
GB10869-RA		Gene	-1.61591	0.001	FBgn0002565
GB13583-RA		Gene	-0.98460	0.001	FBgn0033902
GB19871-RA		Gene	-1.36349	0.001	FBgn0025815
GB20132-RA		Gene	2.41520	0.001	FBgn0030940
GB13049-RA		Gene	-1.58073	0.001	FBgn0003887
GB11296-RA		Gene	-0.91129	0.001	FBgn0026566
GB13214-RA		Gene	-1.16050	0.001	FBgn0014189
GB14936-RA		Gene	-1.32084	0.001	FBgn0035918
GB10297-RA		Gene	-1.01316	0.001	FBgn0036356
GB12303-RA		Gene	1.92743	0.001	FBgn0026059
GB12712-RA		Gene	-0.84117	0.001	FBgn0030720
GB13680-RA		Gene	-2.27883	0.001	FBgn0021765
GB12633-RA		Gene	-0.98511	0.001	FBgn0010078
GB17522-RA		Gene	-0.96620	0.001	FBgn0040283
GB11358-RA		Gene	2.37665	0.001	FBgn0005666
GB11686-RA		Gene	-1.00450	0.001	FBgn0030474
GB11864-RA		Gene	-1.17006	0.001	FBgn0003607
GB12614-RA		Gene	1.72596	0.001	FBgn0000046
GB14599-RA		Gene	1.32244	0.001	FBgn0030976
GB16464-RA		Gene	1.20260	0.001	FBgn0038587
GB19200-RA		Gene	-0.92166	0.001	FBgn0029134
GB19743-RA		Gene	1.53176	0.001	FBgn0033633
GB12567-RA		Gene	1.61555	0.001	FBgn0027348

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB18004-RA		Gene	-1.11726	0.001	FBgn0051075
GB18406-RA		Gene	1.03505	0.001	FBgn0028919
GB30413-RA		Gene	0.99952	0.001	FBgn0019960
GB12205-RA		Gene	-1.07047	0.001	FBgn0025682
GB16751-RA		Gene	1.90755	0.001	FBgn0010612
GB17503-RA		Gene	1.23498	0.001	FBgn0035334
GB19328-RA		Gene	-1.61647	0.001	FBgn0051363
GB19406-RA		Gene	-0.85003	0.001	FBgn0028688
GB30119-RA		Gene	1.56931	0.001	FBgn0030204
GB14778-RA		Gene	1.27482	0.001	FBgn0030572
GB14729-RA		Gene	-1.69188	0.001	
GB17681		Pos	-1.66414	0.001	
GB13420-RA		Gene	1.30511	0.001	FBgn0035980
GB18002-RA		Gene	-1.42894	0.001	
GB18694-RA		Gene	-1.20269	0.001	
GB30331-RA		Gene	-0.94407	0.001	FBgn0020381
GB15584-RA		Gene	1.77216	0.001	
GB12253-RA		Gene	1.76735	0.001	FBgn0003319
GB18917-RA		Gene	-1.28851	0.001	FBgn0011726
GB15628-RA		Gene	-0.89324	0.001	FBgn0033385
GB14989-RA		Gene	-1.44105	0.001	FBgn0030114
GB18737-RA		Gene	-2.35276	0.001	FBgn0011693
GB17830-RA		Gene	-1.36790	0.001	FBgn0033210
GB15496-RA		Gene	-1.00606	0.001	FBgn0037551
GB17755-RA		Gene	2.11018	0.001	FBgn0013674
GB15046-RA		Gene	-3.11731	0.001	FBgn0038819
GB19705-RA		Gene	-1.13944	0.001	FBgn0033272
GB13320-RA		Gene	2.34855	0.001	
GB12046-RA		Gene	-0.97961	0.001	FBgn0023177
GB13936-RA		Gene	2.37771	0.001	FBgn0038161
GB14937-RA		Gene	1.26580	0.001	FBgn0027360
GB14138-RA		Gene	0.93364	0.001	FBgn0035438
GB17681		Pos	-1.65903	0.001	
GB13399-RA		Gene	2.60700	0.001	FBgn0002773
GB17573-RA		Gene	-0.96532	0.001	FBgn0033948
GB14539-RA		Gene	-0.96790	0.001	FBgn0037749
GB12747-RA		Pos	-1.03008	0.001	
GB15320-RA		Gene	-1.19152	0.001	FBgn0038183
GB17641-RA		Gene	-1.61544	0.001	FBgn0030478
GB18567-RA		Gene	-1.16629	0.001	FBgn0004915
GB15299-RA		Gene	-0.88336	0.001	FBgn0037913
GB15432-RA		Gene	-1.17019	0.001	FBgn0037376
GB14298-RA		Gene	-0.93549	0.001	FBgn0028968
GB14589-RA		Gene	1.69002	0.001	FBgn0039648
GB16175-RA		Gene	-0.96314	0.001	FBgn0032050
GB17384-RA	AmelCPR3	Gene	2.70721	0.001	FBgn0004777
GB15189-RA		Gene	-1.29481	0.001	FBgn0025366
GB10315-RA		Gene	-0.80367	0.001	FBgn0031633
GB10560		Pos	1.43715	0.001	
GB20015-RA	AmelCPR23	Gene	2.22811	0.001	FBgn0033869
GB15784-RA		Gene	2.18393	0.001	FBgn0038420
GB18450-RA		Gene	1.64488	0.001	FBgn0033365
GB11263-RA		Gene	1.08495	0.001	FBgn0032614
GB15252-RA		Gene	1.49773	0.002	FBgn0030605
GB17668-RA		Gene	-1.36823	0.002	FBgn0010413
GB16641-RA		Gene	-0.89240	0.002	FBgn0019637
GB17566-RA		Gene	-1.04986	0.002	FBgn0032487
GB19224-RA		Gene	1.05279	0.002	FBgn0050415
GB17782-RA		Gene	-1.52851	0.002	FBgn0035544
GB12811-RA	similar cuticular_found array	Gene	2.18971	0.002	FBgn0003065
GB14870-RA		Gene	-1.04275	0.002	FBgn0051472
GB16124-RA		Gene	1.37470	0.002	FBgn0034940
GB12747-RA		Pos	-1.46827	0.002	
GB30329-RA		Gene	1.83175	0.002	FBgn0002741
GB11374-RA		Gene	-0.83162	0.002	FBgn0031499
GB17401-RA		Gene	-1.04331	0.002	FBgn0031677
GB19989-RA		Gene	-0.93006	0.002	FBgn0030801
GB30195-RA		Gene	2.00871	0.002	FBgn0029876
GB12739-RA		Gene	-1.36753	0.002	FBgn0039110
GB16276-RA		Gene	-1.06588	0.002	FBgn0010083
GB17277-RA		Gene	-1.15001	0.002	FBgn0051915
GB17696-RA		Gene	-1.18968	0.002	FBgn0050100

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB12721-RA		Gene	-0.84413	0.002	FBgn0024841
GB15567-RA		Gene	-0.95221	0.002	
GB11597-RA		Gene	0.88613	0.002	FBgn0037566
GB18703-RA		Gene	-1.00660	0.002	FBgn0035169
GB12749-RA		Gene	1.43933	0.002	FBgn0062447
GB19777-RA		Gene	-0.88235	0.002	FBgn0037314
GB16371-RA		Gene	1.22263	0.002	FBgn0033570
GB18501-RA		Gene	-1.68454	0.002	FBgn0025678
GB17861-RA		Gene	1.03233	0.002	FBgn0035960
GB17382-RA		Gene	-1.43770	0.002	FBgn0036229
GB11973-RA		Gene	1.03012	0.002	FBgn0030304
GB16549-RA		Gene	1.25828	0.002	FBgn0005558
GB18953-RA		Gene	1.39266	0.002	FBgn0031912
GB19639-RA		Gene	1.09752	0.002	FBgn0024978
GB13101-RA		Gene	1.01359	0.002	FBgn0033608
GB19907-RA		Gene	-1.03697	0.002	FBgn0031979
GB19992-RA		Gene	-1.24116	0.002	FBgn0052662
GB11362-RA		Gene	0.87540	0.002	FBgn0038400
GB16622-RA		Gene	-1.03508	0.002	FBgn0028382
GB11889-RA		Gene	-1.05943	0.002	FBgn0061209
GB15172-RA		Gene	1.44429	0.002	FBgn0028336
GB12747-RA		Pos	-0.99172	0.002	
GB14910-RA		Gene	1.10154	0.002	FBgn0000228
GB17681		Pos	-1.67529	0.002	
GB11146-RA		Gene	0.93586	0.002	FBgn0001995
GB16485-RA		Gene	1.64273	0.002	FBgn0016120
GB14537-RA	AmelCPR28	Gene	4.03747	0.002	FBgn0052405
GB15408-RA		Gene	0.75225	0.002	FBgn0036892
GB12850-RA		Gene	1.30585	0.002	FBgn0036353
GB15238-RA		Gene	1.14266	0.002	FBgn0030610
GB12747-RA		Pos	-1.04368	0.002	
GB15641-RA		Gene	2.43577	0.002	FBgn0037288
GB15236-RA		Gene	0.98683	0.002	FBgn0031971
GB10121-RA		Gene	-1.55932	0.002	FBgn0037834
GB18959-RA		Gene	-0.83488	0.002	FBgn0038578
GB11920-RA		Gene	-1.38428	0.002	FBgn0003888
GB12261-RA		Gene	-0.93298	0.002	FBgn0022936
GB14537-RA	AmelCPR28	Gene	4.14099	0.002	FBgn0052405
GB11284-RA		Gene	-0.81472	0.002	FBgn0003151
GB10176-RA		Gene	0.96817	0.002	
GB14193-RA	AmelTwld2	Gene	2.33918	0.002	FBgn0031957
GB13982-RA		Gene	-0.81410	0.002	FBgn0016013
GB19429-RA		Gene	-1.18981	0.002	FBgn0038826
GB12747-RA		Pos	-0.96337	0.002	
GB12747-RA		Pos	-0.77839	0.002	
GB13798-RA		Gene	-0.93762	0.002	FBgn0058045
GB15095-RA		Gene	-1.29286	0.002	FBgn0034496
GB11825-RA		Gene	-1.01471	0.002	
GB10144-RA		Gene	-0.92794	0.002	FBgn0015610
GB12634-RA		Gene	-1.62302	0.002	FBgn0030629
GB14167-RA		Gene	1.14199	0.002	FBgn0029711
GB17751-RA		Gene	1.40038	0.002	FBgn0037018
GB19013-RA		Gene	3.22042	0.002	FBgn0038017
GB17095-RA		Gene	1.23888	0.002	FBgn0031771
GB13110-RA		Gene	1.74880	0.002	FBgn0035046
GB10666-RA		Gene	1.70957	0.002	
GB11034-RA		Gene	1.28280	0.002	FBgn0035244
GB13284-RA		Gene	-1.00263	0.002	FBgn0003062
GB14053-RA		Gene	-1.42168	0.002	FBgn0011425
GB13426-RA		Gene	-1.24225	0.002	
GB14958-RA		Gene	-1.43185	0.002	FBgn0020615
GB13000-RA		Gene	1.12843	0.002	FBgn0029718
GB16094-RA		Gene	-0.92475	0.003	FBgn0053139
GB19850-RA		Gene	2.03336	0.003	FBgn0010218
GB12747-RA		Pos	-1.28583	0.003	
GB18669-RA		Gene	1.09046	0.003	FBgn0033919
GB19821-RA		Gene	-1.11148	0.003	FBgn0027950
GB16194-RA		Gene	0.90404	0.003	FBgn0036365
GB17470-RA		Gene	-0.82967	0.003	FBgn0026582
GB19746-RA		Gene	-0.93546	0.003	FBgn0032726
GB19879-RA		Gene	-1.15950	0.003	FBgn0032979
GB12296-RA		Gene	1.26733	0.003	FBgn0030743

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB15186-RA		Gene	-0.93427	0.003	FBgn0052177
GB19868-RA		Gene	-1.27559	0.003	FBgn0013349
GB12239-RA		Gene	3.35012	0.003	FBgn0038294
GB13418-RA		Gene	1.50602	0.003	FBgn0033205
GB15502-RA		Gene	1.35477	0.003	
GB18114-RA		Gene	-1.07023	0.003	FBgn0001941
GB14476-RA		Gene	1.00639	0.003	FBgn0038923
GB17849-RA		Gene	2.02344	0.003	FBgn0045862
GB18764-RA		Gene	-0.95542	0.003	FBgn0029176
GB12399-RA		Gene	-1.18908	0.003	FBgn0038293
GB19895-RA		Gene	-1.08109	0.003	FBgn0003117
GB10775-RA		Gene	-1.51107	0.003	
GB17681		Pos	-1.54416	0.003	
GB13574-RA		Gene	-1.02987	0.003	FBgn0042092
GB17488-RA		Gene	-0.80525	0.003	FBgn0019936
GB11786-RA		Gene	-0.78090	0.003	FBgn0029676
GB11130-RA		Gene	-1.49972	0.003	FBgn0003742
GB12948-RA		Gene	-0.87751	0.003	FBgn0014857
GB18993-RA		Gene	-1.31533	0.003	FBgn0016926
GB16242-RA		Gene	-1.27551	0.003	FBgn0031040
GB16420-RA		Gene	-1.01905	0.003	FBgn0032214
GB15994-RA		Gene	1.05397	0.003	FBgn0028491
GB16065-RA		Gene	1.04602	0.003	FBgn0004656
GB18323-RA		Gene	-1.59866	0.003	
GB11683-RA		Gene	1.22826	0.003	FBgn0029868
GB18432-RA		Gene	1.37280	0.003	FBgn0039205
GB15304-RA		Gene	-0.99772	0.003	FBgn0033886
GB12113-RA		Gene	0.88438	0.003	FBgn0004363
GB16219-RA		Gene	0.94863	0.003	FBgn0039635
GB13845-RA		Gene	2.86185	0.003	FBgn0029922
GB13457-RA		Gene	2.98701	0.003	FBgn0034159
GB10005-RA		Gene	-1.50049	0.003	FBgn0036372
GB18984-RA		Gene	-1.02440	0.003	FBgn0032035
GB15326-RA		Gene	1.37957	0.003	FBgn0027785
GB16303-RA		Gene	0.87632	0.003	FBgn0051450
GB11703-RA		Gene	1.32889	0.003	FBgn0039864
GB15447-RA		Gene	1.04316	0.003	FBgn0014380
GB18912-RA		Gene	-0.98821	0.003	FBgn0028967
GB16215-RB		Gene	2.07678	0.003	FBgn0002772
GB17681		Pos	-0.99272	0.003	
GB20117-RA		Gene	-1.57093	0.003	
GB14029-RA		Gene	0.69186	0.003	FBgn0032153
GB14473-RA		Gene	1.05894	0.003	FBgn0016756
GB17891-RA		Gene	1.10103	0.003	
GB13668-RA		Gene	-0.95379	0.003	FBgn0022349
GB18969-RA		Gene	-0.97187	0.003	FBgn0015245
GB13545-RA		Gene	-0.91004	0.004	FBgn0032001
GB14037-RA		Gene	1.03725	0.004	FBgn0052209
GB17782-RA		Gene	-1.65773	0.004	FBgn0035544
GB12569-RA		Gene	-0.88271	0.004	FBgn0032409
GB11815-RA		Gene	-1.02518	0.004	FBgn0035147
GB12747-RA		Pos	-1.11204	0.004	
GB16393-RA		Gene	-1.50167	0.004	FBgn0002638
GB17749-RA		Gene	0.83346	0.004	FBgn0004465
GB17681		Pos	-1.44537	0.004	
GB15929-RA		Gene	-1.04171	0.004	FBgn0026751
GB11492-RA		Gene	-0.92636	0.004	FBgn0051076
GB18347-RA		Gene	-1.06002	0.004	FBgn0029738
GB16340-RA		Gene	1.33312	0.004	FBgn0001263
GB16965-RA		Gene	0.99249	0.004	FBgn0038570
GB18749-RA		Gene	-1.06038	0.004	FBgn0029915
GB18843-RA		Gene	0.76727	0.004	FBgn0037822
GB19169-RA		Gene	1.74724	0.004	FBgn0034412
GB13813-RA		Gene	1.10053	0.004	FBgn0027562
GB16884-RA		Gene	1.70394	0.004	FBgn0037288
GB14538-RA		Gene	-1.32284	0.004	FBgn0040394
GB19902-RA		Gene	-1.19807	0.004	FBgn0032052
GB11273-RA		Gene	0.94240	0.004	FBgn0035154
GB14811-RA		Gene	1.24055	0.004	FBgn0033158
GB17148-RA		Gene	1.46025	0.004	FBgn0001258
GB16633-RA		Gene	-1.00757	0.004	FBgn0002989
GB30189-RA		Gene	-1.26095	0.004	FBgn0035993

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10560		Pos	1.19315	0.004	
GB10769-RA		Gene	0.94980	0.004	FBgn0036197
GB17558-RA		Gene	1.11411	0.004	FBgn0037093
GB17782-RA		Gene	-1.32202	0.004	FBgn0035544
GB10560		Pos	1.18139	0.004	
GB11012-RA		Gene	-1.13901	0.004	
GB11480-RA		Gene	-1.20980	0.004	FBgn0013969
GB15296-RA		Gene	1.02052	0.004	FBgn0017429
GB12747-RA		Pos	-0.79751	0.004	
GB17725-RA		Gene	0.89878	0.004	FBgn0036570
GB30104-RA		Gene	2.36088	0.004	FBgn0035917
GB19475-RA		Gene	-0.84613	0.004	FBgn0002733
GB19485-RA		Gene	-0.89636	0.004	FBgn0052486
GB19274-RA		Gene	-1.01797	0.004	FBgn0038746
GB12022-RA		Gene	-0.95539	0.004	
GB16243-RA		Gene	1.73390	0.004	FBgn0004360
GB11019-RA		Gene	-1.07140	0.004	FBgn0042177
GB19218-RA		Gene	0.77828	0.004	FBgn0053553
GB17032-RA		Gene	1.67856	0.004	FBgn0052036
GB12799-RA		Gene	0.79296	0.004	FBgn0039055
GB16647-RA		Gene	-1.22127	0.004	FBgn0001084
GB19212-RA		Gene	-0.93274	0.004	FBgn0050108
GB10889-RA		Gene	-0.92057	0.004	FBgn0031313
GB12747-RA		Pos	-1.36260	0.004	
GB18621-RA		Gene	1.06588	0.004	FBgn0019985
GB18365-RA		Gene	1.71709	0.005	FBgn0000046
GB15114-RA		Gene	-0.89743	0.005	FBgn0043010
GB15494-RA		Gene	-1.05699	0.005	
GB10395-RA		Gene	-2.00580	0.005	FBgn0024244
GB11892-RA		Gene	-1.19043	0.005	FBgn0004507
GB13135-RA		Gene	-0.76407	0.005	FBgn0014020
GB11132		Pos	-0.73501	0.005	
GB18287-RA		Gene	-0.98701	0.005	FBgn0002787
GB10155-RA		Gene	-0.75772	0.005	FBgn0004926
GB17005-RA		Gene	-1.07358	0.005	FBgn0028980
GB12057-RA		Gene	1.58468	0.005	
GB11407-RA		Gene	0.80674	0.005	FBgn0003471
GB14059-RA		Gene	-1.19069	0.005	FBgn0015268
GB16552-RA		Gene	1.12676	0.005	FBgn0038149
GB16606-RA		Gene	-0.85972	0.005	FBgn0034729
GB19739-RA		Gene	0.88991	0.005	FBgn0035983
GB12747-RA		Pos	-1.18284	0.005	
GB15617-RA		Gene	1.48191	0.005	FBgn0051057
GB10560		Pos	1.15904	0.005	
GB18600-RA		Gene	-0.75710	0.005	FBgn0039673
GB19735-RA		Gene	1.85122	0.005	FBgn0031381
GB13297-RA		Gene	0.95031	0.005	
GB11124-RA		Gene	1.05411	0.005	FBgn0022344
GB17055-RA		Gene	-1.85954	0.005	FBgn0013988
GB12747-RA		Pos	-0.88990	0.005	
GB18385-RA		Gene	0.94234	0.005	FBgn0034022
GB18277-RA		Gene	-1.23550	0.005	FBgn0034918
GB14288-RA		Gene	-1.86742	0.005	FBgn0032104
GB19787-RA		Gene	1.81462	0.006	FBgn0053003
GB11007-RA		Gene	-1.29604	0.006	FBgn0014879
GB10343-RA		Gene	0.88757	0.006	FBgn0034986
GB18020-RA		Gene	-0.77835	0.006	FBgn0034368
GB10560		Pos	1.47281	0.006	
GB17883-RA		Gene	1.53377	0.006	FBgn0031436
GB15090-RA		Gene	-1.02076	0.006	FBgn0036314
GB14429-RA		Gene	-0.79903	0.006	FBgn0038872
GB20087-RA		Gene	1.56313	0.006	FBgn0032421
GB30028-RA		Gene	-0.90655	0.006	
GB11550-RA	similar cuticular_found array	Gene	2.58536	0.006	FBgn0038819
GB17317-RA		Gene	-0.84564	0.006	FBgn0015615
GB12089-RA		Gene	-1.07922	0.006	FBgn0034753
GB16812-RA		Gene	-0.80914	0.006	FBgn0026170
GB18381-RA		Gene	-0.67309	0.006	FBgn0035601
GB17359-RA		Gene	-1.11747	0.006	FBgn0020503
GB13868-RA		Gene	0.82910	0.006	FBgn0038307
GB16603-RA		Gene	-0.84148	0.006	FBgn0051548
GB15500-RA		Gene	-0.81587	0.006	FBgn0000053

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB15448-RA		Gene	-0.74572	0.006	FBgn0034315
GB19636-RA		Gene	-1.12919	0.006	FBgn0038666
GB10896-RA		Gene	1.69434	0.006	FBgn0051997
GB12384-RA		Gene	0.94680	0.006	FBgn0035679
GB16284-RA		Gene	-0.97598	0.006	FBgn0040512
GB10920-RA		Gene	0.90241	0.006	FBgn0029843
GB11132		Pos	-0.73722	0.006	
GB14868-RA		Gene	-0.88698	0.006	FBgn0015796
GB17770-RA		Gene	-0.92097	0.006	FBgn0026143
GB20083-RA		Gene	0.83064	0.006	FBgn0029594
GB13705-RA		Gene	-1.02730	0.006	FBgn0032515
GB15338-RA		Gene	-0.93733	0.006	FBgn0003449
GB14363-RA		Gene	-1.03251	0.006	FBgn0033092
GB14940-RA		Gene	0.90963	0.006	FBgn0036381
GB16812-RA		Gene	-0.90593	0.006	FBgn0026170
GB20149-RA		Gene	0.73539	0.006	FBgn0037653
GB13291-RA		Gene	-0.76183	0.006	FBgn0050051
GB12887-RA		Gene	-0.82165	0.007	FBgn0027084
GB12342-RA		Gene	1.06265	0.007	FBgn0032607
GB13622-RA		Gene	-0.97590	0.007	
GB15019-RA		Gene	-1.13246	0.007	
GB18156-RA		Gene	-0.77045	0.007	FBgn0040534
GB16445-RA		Gene	0.97074	0.007	FBgn0033961
GB16791-RA		Gene	-0.90541	0.007	FBgn0034703
GB16597-RA		Gene	-0.81379	0.007	FBgn0034051
GB10560		Pos	1.16724	0.007	
GB13099-RA		Gene	1.01553	0.007	FBgn0032646
GB15059-RA		Gene	-1.32063	0.007	FBgn0028997
GB15355-RA		Gene	1.31307	0.007	FBgn0035404
GB10828-RA		Gene	-0.79816	0.007	FBgn0034722
GB19567-RA		Gene	0.97025	0.007	FBgn0038234
GB19877-RA		Gene	1.46539	0.007	FBgn0052105
GB11106-RA		Gene	-0.87382	0.007	FBgn0029133
GB15690-RA		Gene	0.88897	0.007	FBgn0038323
GB11132		Pos	-0.72936	0.007	
GB20137-RA		Gene	1.09458	0.007	FBgn0033973
GB17681		Pos	-1.32945	0.007	
GB30510-RA_2		Gene	0.76992	0.007	FBgn0031995
GB12470-RA		Gene	-0.94672	0.007	FBgn0039849
GB11165-RA		Gene	-1.18970	0.007	FBgn0033210
GB16162-RA		Gene	-0.73523	0.007	FBgn0031992
GB10216-RA		Gene	0.81493	0.007	FBgn0036488
GB10234-RA		Gene	-0.95100	0.007	FBgn0030863
GB12747-RA		Pos	-0.94247	0.007	
GB14694-RA		Gene	-0.75605	0.007	FBgn0004002
GB14319-RA		Gene	0.88402	0.007	FBgn0052121
GB12038-RA		Gene	-1.01689	0.007	FBgn0038359
GB12747-RA		Pos	-1.33923	0.007	
GB14431-RA		Gene	-0.75186	0.007	FBgn0030940
GB18605-RA		Gene	0.90198	0.007	FBgn0058127
GB10209-RA		Gene	0.76564	0.007	FBgn0038405
GB15291-RA		Gene	0.75968	0.007	FBgn0020235
GB17398-RA		Gene	-0.82561	0.007	FBgn0032196
GB12858-RA		Gene	-1.09202	0.007	FBgn0015618
GB12747-RA		Pos	-0.69752	0.007	
GB16899-RA		Gene	1.32675	0.007	FBgn0033304
GB11023-RA		Gene	-1.39152	0.007	FBgn0027571
GB12753-RA		Gene	-0.68001	0.007	FBgn0030611
GB19920-RA		Gene	0.96102	0.007	FBgn0050290
GB19857-RA		Gene	-1.02814	0.007	FBgn0003884
GB30202-RA	apd-1	Gene	1.89053	0.007	FBgn0051496
GB17681		Pos	-1.62421	0.008	
GB15220-RA		Gene	-1.68053	0.008	FBgn0010218
GB17681		Pos	-1.77636	0.008	
GB11018-RA		Gene	-1.16946	0.008	FBgn0031090
GB12747-RA		Pos	-0.88531	0.008	
GB10109-RA		Gene	1.22211	0.008	FBgn0027615
GB20152-RA		Gene	-0.80032	0.008	FBgn0034277
GB12270-RA		Gene	-0.87205	0.008	FBgn0027086
GB13665-RA		Gene	-1.00702	0.008	FBgn0038046
GB11132		Pos	-0.75977	0.008	
GB17494-RA		Gene	1.20365	0.008	FBgn0039025

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB13597-RA		Gene	1.13056	0.008	FBgn0034583
GB12140-RA		Gene	-0.78844	0.008	FBgn0010411
GB19533-RA		Gene	-0.84282	0.008	FBgn0031519
GB17681		Pos	-1.55865	0.008	
GB12300-RA		Gene	0.85419	0.008	FBgn0042098
GB14723-RA		Gene	0.74057	0.008	FBgn0011787
GB18362-RA		Gene	-0.98483	0.008	FBgn0003612
GB19834-RA		Gene	1.01647	0.008	FBgn0083984
GB10560		Pos	1.17510	0.008	
GB13314-RA		Gene	-1.07059	0.008	FBgn0027889
GB16526-RA		Gene	-1.02072	0.008	FBgn0016697
GB16710-RA		Gene	0.77010	0.008	FBgn0035490
GB12747-RA		Pos	-1.14976	0.008	
GB12865-RA		Gene	1.12667	0.008	
GB17514-RA		Gene	-0.69926	0.008	FBgn0034068
GB14698-RA		Gene	1.66793	0.008	FBgn0032889
GB11388-RA		Gene	-0.95303	0.008	FBgn0011741
GB17681		Pos	-1.62154	0.008	
GB11321-RA	Laccase	Gene	1.33552	0.008	FBgn0050437
GB18916-RA		Gene	-0.73422	0.008	FBgn0030571
GB14056-RA		Gene	-0.62703	0.008	FBgn0039160
GB17082-RA		Gene	1.00055	0.008	FBgn0053155
GB17564-RA		Gene	-0.69493	0.008	FBgn0029897
GB17681		Pos	-1.01813	0.008	
GB13630-RA		Gene	-0.85366	0.008	FBgn0041186
GB10252-RA		Gene	-0.88993	0.008	FBgn0036967
GB13459-RA		Gene	1.20266	0.008	FBgn0031464
GB10872-RA		Gene	-1.14040	0.008	FBgn0039690
GB13349-RA		Gene	1.82568	0.008	FBgn0036391
GB16215-RA		Gene	1.53987	0.008	FBgn0002772
GB13339-RA		Gene	-0.79617	0.008	FBgn0002283
GB18042-RA		Gene	-1.19987	0.008	FBgn0014868
GB12747-RA		Pos	-0.79164	0.008	
GB11779-RA		Gene	-1.10099	0.008	FBgn0029939
GB17226-RA		Gene	-1.19219	0.008	
GB18654-RA		Gene	1.01468	0.009	FBgn0039896
GB18637-RA		Gene	-0.84269	0.009	FBgn0011570
GB30244-RA		Gene	0.67771	0.009	FBgn0031247
GB11022-RA		Gene	0.78616	0.009	FBgn0039896
GB10048-RA		Gene	-0.96011	0.009	FBgn0002741
GB10438-RA		Gene	-0.97559	0.009	FBgn0022987
GB19498-RA		Gene	-0.82352	0.009	FBgn0000173
GB15359-RA		Gene	-0.92612	0.009	FBgn0005776
GB17164-RA		Gene	-0.94376	0.009	FBgn0037439
GB16368-RA		Gene	-0.86012	0.009	
GB19486-RA		Gene	-0.97987	0.009	
GB19167-RA		Gene	0.79373	0.009	FBgn0030573
GB14396-RA		Gene	-1.05599	0.009	FBgn0035575
GB12747-RA		Pos	-1.05216	0.009	
GB12618-RA		Gene	-1.22859	0.009	FBgn0037815
GB11985-RA		Gene	0.90050	0.009	FBgn0025704
GB13495-RA		Gene	-0.66997	0.009	FBgn0011763
GB11669-RA		Gene	1.27510	0.009	FBgn0034248
GB13069-RA		Gene	1.23670	0.009	
GB15693-RA		Gene	-1.32037	0.009	FBgn0036514
GB10587-RA		Gene	-0.70780	0.010	FBgn0010621
GB15637-RA		Gene	-1.00880	0.010	FBgn0002622
GB17523-RA		Gene	-1.62130	0.010	FBgn0032157
GB16673-RA		Gene	0.84431	0.010	FBgn0031818
GB14658-RA		Gene	-1.04379	0.010	FBgn0040384
GB16895-RA		Gene	-0.72352	0.010	FBgn0053198
GB14939-RA		Gene	-0.85465	0.010	FBgn0004132
GB19513-RA		Gene	-0.95986	0.010	FBgn0001255
GB17461-RA		Gene	1.10996	0.010	FBgn0024320
GB12747-RA		Pos	-0.88242	0.010	
GB10083-RA		Gene	-0.76814	0.010	FBgn0030435
GB11696-RA		Gene	0.68018	0.010	FBgn0040751
GB15141-RA		Gene	1.05180	0.010	
GB16307-RA		Gene	-1.07973	0.010	FBgn0032763
GB10294-RA		Gene	0.71815	0.010	FBgn0032192
GB12827-RA		Gene	-0.90947	0.010	FBgn0000486
GB18086-RA		Gene	1.41179	0.010	FBgn0031228

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB12747-RA		Pos	-0.99425	0.010	
GB10928-RA		Gene	-0.77947	0.010	FBgn0035243
GB19425-RA		Gene	-0.86117	0.010	FBgn0024352
GB10560		Pos	1.04788	0.010	
GB13059-RA		Gene	1.70328	0.010	FBgn0037819
GB16838-RA		Gene	-1.00439	0.010	
GB14976-RA		Gene	-1.07103	0.010	FBgn0030791
GB13135-RA		Gene	-0.64444	0.010	FBgn0014020
GB19319-RA		Gene	-1.08270	0.010	FBgn0038903
GB18028-RA		Gene	1.33314	0.010	FBgn0031066
GB30282-RA		Gene	0.91893	0.010	FBgn0030715
GB12840-RA		Gene	-0.77057	0.010	FBgn0003498
GB17187-RA		Gene	-0.89965	0.010	FBgn0024909
GB18806-RA		Gene	-1.34117	0.010	FBgn0053817
GB11132		Pos	-0.71284	0.011	
GB11680-RA		Gene	1.11817	0.011	
GB16086-RA		Gene	-1.14777	0.011	FBgn0011598
GB13338-RA		Gene	-0.66279	0.011	
GB14423-RA		Gene	-2.36637	0.011	FBgn0030699
GB14632-RA		Gene	-0.75329	0.011	
GB19582-RA		Gene	1.47273	0.011	FBgn0028984
GB15831-RA		Gene	0.58071	0.011	FBgn0035232
GB15960-RA		Gene	-0.72647	0.011	FBgn0051957
GB10944-RA		Gene	1.06533	0.011	FBgn0030786
GB18326-RA		Gene	-0.76100	0.011	FBgn0032819
GB11132		Pos	-1.20130	0.011	
GB12183-RA		Gene	-0.82734	0.011	FBgn0035640
GB18553-RA		Gene	-0.86268	0.011	FBgn0052407
GB16961-RA		Gene	0.80878	0.012	FBgn0032261
GB17681		Pos	-1.73642	0.012	
GB15313-RA		Gene	-0.78268	0.012	FBgn0027358
GB13206-RA		Gene	-1.08914	0.012	FBgn0038146
GB13631-RA		Gene	1.10966	0.012	FBgn0032849
GB15792-RA		Gene	-0.99834	0.012	FBgn0004587
GB16269-RA		Gene	-1.59929	0.012	FBgn0035766
GB10615-RA		Gene	0.78592	0.012	FBgn0052039
GB15727-RA		Gene	-0.91097	0.012	FBgn0005776
GB12717-RA		Gene	-0.88630	0.012	FBgn0033209
GB17929-RA		Gene	-1.21820	0.012	FBgn0026585
GB10560		Pos	1.16847	0.012	
GB13469-RA		Gene	-0.70735	0.012	FBgn0037573
GB14947-RA		Gene	-1.16001	0.012	FBgn0053303
GB14908-RA		Gene	-1.02959	0.012	FBgn0065032
GB12435-RA		Gene	-0.83847	0.012	FBgn0031764
GB17552-RA		Gene	-0.65469	0.012	FBgn0028434
GB19893-RA		Gene	-0.61663	0.012	FBgn0037170
GB13433-RA		Gene	-0.60198	0.012	
GB12925-RA		Gene	-0.74438	0.013	FBgn0021814
GB14961-RA		Gene	-0.92287	0.013	FBgn0039172
GB12829-RA		Gene	-0.58736	0.013	FBgn0032051
GB17629-RA		Gene	-0.63273	0.013	FBgn0024939
GB11141-RA		Gene	-1.09632	0.013	FBgn0005654
GB13111-RA		Gene	0.94259	0.013	FBgn0036697
GB14800-RA		Gene	1.50169	0.013	FBgn0030940
GB11495-RA		Gene	-1.37330	0.013	FBgn0044871
GB16770-RA		Gene	-0.70504	0.013	
GB14172-RA		Gene	-0.62633	0.013	FBgn0024314
GB11344-RA		Gene	-0.88265	0.013	FBgn0015949
GB13994-RA		Gene	0.83968	0.013	FBgn0035591
GB18630-RA		Gene	-0.80777	0.013	FBgn0035987
GB11814-RA		Gene	1.10225	0.013	FBgn0051974
GB17681		Pos	-1.38032	0.013	
GB17240-RA		Gene	-1.03236	0.013	FBgn0013726
GB18270-RA		Gene	0.92819	0.013	FBgn0037814
GB12920-RA		Gene	-0.77516	0.013	FBgn0017577
GB19284-RA		Gene	-0.68455	0.013	FBgn0005639
GB10643-RA		Gene	-0.94489	0.013	FBgn0037958
GB12747-RA		Pos	-0.83533	0.014	
GB17937-RA		Gene	-0.78838	0.014	FBgn0030320
GB15700-RA		Gene	-0.77288	0.014	FBgn0053129
GB14710-RA		Gene	-0.81079	0.014	FBgn0038738
GB17963-RA		Gene	-0.84905	0.014	FBgn0036897

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB18817-RA		Gene	-1.34275	0.014	
GB10275-RA		Gene	-0.83550	0.014	FBgn0003887
GB14326-RA		Gene	-0.68406	0.014	FBgn0036578
GB17684-RA		Gene	1.12373	0.014	FBgn0033246
GB11132		Pos	-1.08317	0.014	
GB11655-RA		Gene	0.67087	0.014	FBgn0004888
GB19555-RA		Gene	0.79267	0.014	
GB10560		Pos	0.96820	0.014	
GB19973-RA		Gene	-0.67674	0.014	FBgn0039402
GB10974-RA		Gene	1.25959	0.014	FBgn0020300
GB12747-RA		Pos	-1.23238	0.014	
GB16406-RA		Gene	-0.62012	0.014	FBgn0030854
GB17787-RA		Gene	1.28381	0.014	FBgn0052230
GB18234-RA		Gene	-0.88400	0.014	FBgn0062411
GB18539-RA		Gene	0.98446	0.014	FBgn0037610
GB17059-RA		Gene	-1.05583	0.014	FBgn0039210
GB10686-RA		Gene	-1.07936	0.014	FBgn0016940
GB12866-RA		Gene	0.63226	0.014	FBgn0010348
GB17114-RA		Gene	-1.09440	0.014	FBgn0003292
GB17538-RA		Gene	-1.44483	0.014	
GB15015-RA		Gene	0.64653	0.014	FBgn0029800
GB18770-RA		Gene	-0.60652	0.014	FBgn0034967
GB17147-RA		Gene	-1.08748	0.014	FBgn0023514
GB17681		Pos	-1.18431	0.014	
GB18133-RA		Gene	-0.81802	0.014	FBgn0030434
GB12043-RA		Gene	-0.78722	0.014	FBgn0011285
GB18518-RA		Gene	0.74091	0.015	FBgn0000039
GB10973-RA		Gene	-0.91863	0.015	FBgn0000116
GB15937-RA		Gene	-1.11405	0.015	FBgn0033477
GB16154-RA		Gene	-0.67390	0.015	FBgn0030878
GB15548-RA		Gene	0.70140	0.015	FBgn0050437
GB12655-RA		Gene	1.03397	0.015	FBgn0039617
GB11766-RA		Gene	-0.68521	0.015	FBgn0034794
GB16133-RA		Gene	-1.05361	0.015	FBgn0035249
GB11336-RA		Gene	-0.82156	0.015	FBgn0033669
GB18761-RA		Gene	-0.95574	0.015	
GB10560		Pos	0.83104	0.015	
GB10112-RA		Gene	-0.80790	0.015	FBgn0033737
GB15339-RA		Gene	1.17330	0.015	FBgn0011642
GB13870-RA		Gene	0.81636	0.015	FBgn0031357
GB15988-RA		Gene	1.14560	0.015	FBgn0000299
GB15188-RA		Gene	0.76555	0.015	FBgn0039829
GB17487-RA		Gene	-0.81171	0.015	FBgn0029512
GB19530-RA		Gene	-1.08585	0.015	FBgn0028902
GB12317-RA		Gene	-0.55587	0.015	FBgn0027055
GB13986-RA		Gene	-0.68462	0.015	FBgn0036641
GB15771-RA		Gene	0.76199	0.015	FBgn0004581
GB16465-RA		Gene	0.81499	0.015	FBgn0033679
GB17264-RA		Gene	-0.86159	0.015	FBgn0034988
GB16281-RA		Gene	-0.60725	0.015	FBgn0010602
GB18648-RA		Gene	-1.00320	0.015	FBgn0038110
GB10560		Pos	1.00821	0.015	
GB10796-RA		Gene	-0.80016	0.015	FBgn0028693
GB17681		Pos	-1.37180	0.015	
GB18994-RA		Gene	-0.66101	0.015	FBgn0039303
GB18757-RA		Gene	-1.05588	0.015	FBgn0034176
GB15948-RA		Gene	0.96525	0.015	FBgn0034645
GB13955-RA		Gene	0.81264	0.015	FBgn0031043
GB17681		Pos	-1.12454	0.015	
GB10560		Pos	0.91151	0.016	
GB13995-RA		Gene	-0.80410	0.016	FBgn0037624
GB12483-RA		Gene	-0.93195	0.016	FBgn0035838
GB14847-RA		Gene	-1.63528	0.016	FBgn0000404
GB10560		Pos	0.95416	0.016	
GB15805-RA		Gene	-0.85892	0.016	FBgn0023167
GB19075-RA		Gene	-1.39794	0.016	FBgn0038198
GB30369-RA		Gene	1.30433	0.016	FBgn0029807
GB19950-RA		Gene	-0.59538	0.016	FBgn0034084
GB16380-RA		Gene	-0.71132	0.016	FBgn0052580
GB13731-RA		Gene	-0.60061	0.016	FBgn0036825
GB13850-RA		Gene	-0.71065	0.016	FBgn0027873
GB17681		Pos	-1.46926	0.016	

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB17691-RA		Gene	-0.62322	0.016	FBgn0012066
GB19182-RA		Gene	0.84517	0.016	FBgn0020503
GB30362-RA		Gene	-2.13754	0.016	FBgn0002565
GB17739-RA		Gene	-0.87249	0.016	FBgn0032702
GB10526-RA		Gene	-0.86066	0.016	FBgn0038830
GB30214-RA		Gene	-1.00394	0.016	FBgn0013531
GB15435-RA		Gene	-0.84935	0.017	
GB14253-RA		Gene	-0.86915	0.017	FBgn0036500
GB14722-RA		Gene	0.96337	0.017	FBgn0030940
GB15885-RA		Gene	0.90428	0.017	
GB16701-RA		Gene	0.94685	0.017	
GB18256-RA		Gene	-0.94760	0.017	FBgn0030808
GB17006-RA		Gene	-0.73721	0.017	FBgn0035323
GB16539-RA		Gene	0.69264	0.017	FBgn0035388
GB18555-RA		Gene	-0.87674	0.017	FBgn0064126
GB14786-RA		Gene	1.03229	0.017	FBgn0037447
GB19745-RA		Gene	-0.86136	0.017	FBgn0022355
GB13846-RA		Gene	0.70664	0.017	
GB16335-RA		Gene	-0.96986	0.017	FBgn0016685
GB20097-RA		Gene	0.66166	0.017	FBgn0036853
GB13800-RA		Gene	-1.07342	0.017	FBgn0053862
GB14205-RA		Gene	-1.44547	0.017	FBgn0036334
GB12747-RA		Pos	-1.30103	0.017	
GB18454-RA		Gene	-1.44038	0.017	FBgn0037239
GB15072-RA		Gene	-0.74531	0.017	FBgn0015393
GB15141-RA		Gene	-0.82091	0.017	
GB13833-RA		Gene	0.69912	0.017	FBgn0031850
GB15223-RA		Gene	-0.77900	0.017	
GB10850-RA		Gene	0.79540	0.018	FBgn0002174
GB18550-RA		Gene	-0.81848	0.018	
GB12011-RA		Gene	0.65608	0.018	FBgn0040666
GB12462-RA		Gene	-0.77630	0.018	FBgn0042135
GB17681		Pos	-1.41330	0.018	
GB30056-RA		Gene	-1.04092	0.018	
GB11132		Pos	-0.91134	0.018	
GB18491-RA		Gene	-0.83900	0.018	FBgn0035675
GB14277-RA		Gene	-1.36561	0.018	FBgn0011638
GB30388-RA		Gene	1.16763	0.018	FBgn0015031
GB12747-RA		Pos	-1.12155	0.018	
GB11160-RA		Gene	-0.76082	0.018	FBgn0001491
GB18249-RA		Gene	-0.57845	0.018	FBgn0011217
GB16943-RA		Gene	-0.61472	0.018	FBgn0052110
GB18490-RA		Gene	0.80664	0.019	FBgn0034936
GB10235-RA		Gene	1.16575	0.019	FBgn0036180
GB11640-RA		Gene	-0.79172	0.019	FBgn0051855
GB18675-RA		Gene	-0.87568	0.019	FBgn0013988
GB19881-RA		Gene	-0.58213	0.019	FBgn0027066
GB16737-RA		Gene	-0.74612	0.019	FBgn0030183
GB19678-RA		Gene	1.12656	0.019	FBgn0035907
GB18314-RA		Gene	0.67452	0.019	FBgn0039219
GB18376-RA		Gene	-0.80616	0.019	FBgn0053126
GB17681		Pos	-1.11312	0.019	
GB17774-RA		Gene	1.31422	0.019	FBgn0032289
GB19720-RA		Gene	-0.82034	0.019	FBgn0025808
GB10498-RA		Gene	1.94355	0.019	FBgn0033520
GB17528-RA		Gene	-0.77026	0.019	FBgn0011710
GB16953-RA		Gene	1.27096	0.019	
GB15689-RA		Gene	-0.93150	0.019	FBgn0029992
GB13037-RA		Gene	1.05590	0.019	FBgn0015766
GB13940-RA		Gene	-0.69795	0.019	FBgn0029639
GB16871-RA		Gene	-0.73907	0.019	FBgn0033081
GB16528-RA		Gene	-2.19434	0.019	
GB19358-RA		Gene	-0.76586	0.019	
GB15747-RA		Gene	-1.00599	0.019	FBgn0015925
GB18009-RA		Gene	0.82376	0.020	FBgn0028789
GB12839-RA		Gene	-0.78143	0.020	FBgn0000996
GB12747-RA		Pos	-0.76846	0.020	
GB14287-RA		Gene	0.58002	0.020	FBgn0038996
GB19410-RA		Gene	-0.84666	0.020	FBgn0033485
GB12142-RA		Gene	-0.69079	0.020	FBgn0004861
GB18183-RA		Gene	1.35737	0.020	
GB11601-RA		Gene	-0.79006	0.020	FBgn0030275

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB11157-RA		Gene	-0.80502	0.020	FBgn0039335
GB15212-RA		Gene	0.75006	0.020	FBgn0083953
GB15436-RA		Gene	-0.99956	0.020	FBgn0035592
GB16412-RA		Gene	-0.54324	0.020	FBgn0037874
GB19365-RA		Gene	1.15034	0.020	FBgn0029856
GB14727-RA		Gene	-0.57522	0.020	FBgn0021761
GB19983-RA		Gene	0.57752	0.020	FBgn0051950
GB17757-RA		Gene	0.87179	0.020	FBgn0038949
GB30382-RA		Gene	-0.72125	0.020	
GB12218-RA		Gene	-1.29670	0.020	FBgn0053864
GB12571-RA		Gene	1.35209	0.020	FBgn0003089
GB16826-RA		Gene	1.34966	0.020	FBgn0010403
GB14043-RA		Gene	-1.03709	0.020	FBgn0053556
GB16804-RA		Gene	1.37717	0.020	FBgn0037429
GB11221-RA		Gene	-0.81539	0.020	FBgn0032408
GB13684-RA		Gene	-0.98533	0.020	FBgn0037739
GB15565-RA		Gene	-0.65254	0.020	FBgn0038326
GB18250-RA		Gene	-0.76150	0.020	FBgn0002641
GB17681		Pos	-1.24134	0.020	
GB13698-RA		Gene	-0.83422	0.021	FBgn0031599
GB15819-RA		Gene	0.64140	0.021	FBgn0026261
GB16860-RA		Gene	-1.19316	0.021	FBgn0037344
GB11758-RA		Gene	-0.70246	0.021	FBgn0029833
GB17553-RA		Gene	-1.14769	0.021	FBgn0037011
GB16294-RA		Gene	-0.98597	0.021	FBgn0034603
GB11410-RA		Gene	-0.86948	0.021	FBgn0027932
GB16167-RA		Gene	0.79290	0.021	FBgn0014023
GB16502-RA		Gene	-1.12972	0.021	FBgn0036849
GB17681		Pos	-1.00439	0.021	
GB10472-RA		Gene	-0.61335	0.021	FBgn0039020
GB12491-RA		Gene	-0.90240	0.021	FBgn0011297
GB11427-RA		Gene	-0.66088	0.021	FBgn0032194
GB16714-RA		Gene	0.75025	0.021	FBgn0034851
GB17681		Pos	-1.40390	0.021	
GB14529-RA		Gene	-1.01059	0.021	FBgn0003138
GB10432-RA		Gene	-1.24861	0.021	FBgn0040732
GB10361-RA		Gene	-0.79960	0.021	FBgn0002736
GB12348-RA		Gene	-0.93291	0.021	FBgn0051952
GB18652-RA		Gene	0.70635	0.021	
GB18062-RA		Gene	-0.59462	0.021	FBgn0032247
GB30227-RA		Gene	-0.88558	0.022	FBgn0000261
GB14418-RA		Gene	-1.46674	0.022	FBgn0000147
GB19656-RA		Gene	-1.08954	0.022	FBgn0023528
GB17186-RA		Gene	-1.01605	0.022	FBgn0026149
GB19588-RA		Gene	-0.67666	0.022	FBgn0039867
GB10099-RA		Gene	-1.13595	0.022	FBgn0030056
GB15604-RA		Gene	0.65876	0.022	FBgn0033028
GB10560		Pos	0.91138	0.022	
GB17803-RA		Gene	0.57639	0.022	FBgn0033038
GB18445-RA		Gene	1.12865	0.022	FBgn0016047
GB14970-RA		Gene	1.24850	0.022	FBgn0053715
GB11132		Pos	-0.78139	0.022	
GB16241-RA		Gene	0.65873	0.023	FBgn0028582
GB12621-RA		Gene	0.55948	0.023	FBgn0027524
GB16693-RA		Gene	-0.71148	0.023	FBgn0032999
GB18217-RA		Gene	0.96138	0.023	FBgn0029888
GB18463-RA		Gene	0.70509	0.023	FBgn0052190
GB13375-RA		Gene	0.79656	0.023	FBgn0037637
GB12747-RA		Pos	-0.54536	0.023	
GB18238-RA		Gene	-0.66358	0.023	FBgn0034988
GB11132		Pos	-0.60932	0.023	
GB10560		Pos	1.07223	0.023	
GB10857-RA		Gene	0.84282	0.023	FBgn0037892
GB14256-RA		Gene	-0.63269	0.023	FBgn0033556
GB17325-RA		Gene	-0.56764	0.023	FBgn0038834
GB12919-RA		Gene	1.19139	0.023	FBgn0026090
GB14502-RA		Gene	0.71390	0.023	FBgn0040339
GB10304-RA		Gene	0.85447	0.023	FBgn0037833
GB11596-RA		Gene	1.85315	0.023	FBgn0043044
GB12151-RA		Gene	0.82539	0.023	FBgn0035500
GB30142-RB		Gene	-0.77882	0.023	FBgn0053520
GB15834-RA		Gene	0.97510	0.023	FBgn0037955

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB13090-RA		Gene	-0.64917	0.023	
GB19250-RA		Gene	3.50694	0.023	FBgn0029681
GB10732-RA		Gene	-1.01117	0.023	FBgn0023529
GB13896-RA		Gene	-0.79126	0.023	FBgn0036534
GB30371-RA		Gene	-0.75292	0.023	FBgn0039039
GB11333-RA		Gene	-1.69111	0.024	
GB10329-RA		Gene	-0.62746	0.024	FBgn0030765
GB30580-RA		Gene	-0.71937	0.024	FBgn0010747
GB10517-RA		Gene	1.68398	0.024	FBgn0028841
GB17681		Pos	-1.27079	0.024	
GB18569-RA		Gene	-0.80358	0.024	FBgn0027049
GB14669-RA		Gene	-0.89343	0.024	
GB19046-RA		Gene	0.52882	0.024	FBgn0039488
GB16685-RA		Gene	-0.98092	0.024	FBgn0039489
GB17327-RA		Gene	-0.54266	0.024	FBgn0036272
GB11122-RA		Gene	1.18887	0.024	FBgn0020389
GB18337-RA		Gene	-0.56285	0.024	FBgn0031534
GB11366-RA		Gene	-0.59027	0.024	FBgn0051938
GB12059-RA		Gene	-0.75820	0.024	FBgn0031781
GB17609-RA		Gene	0.86526	0.024	FBgn0032222
GB19452-RA		Gene	1.06071	0.024	FBgn0040323
GB11631-RA		Gene	-0.56294	0.025	FBgn0035164
GB17347-RA		Gene	2.18027	0.025	FBgn0031629
GB17681		Pos	-1.02203	0.025	
GB12328-RA		Gene	-0.52557	0.025	FBgn0043884
GB14003-RA		Gene	-1.00982	0.025	FBgn0031052
GB18851-RA		Gene	-0.66648	0.025	FBgn0037255
GB10390-RA		Gene	-0.65319	0.025	FBgn0010405
GB15922-RA		Gene	-0.60723	0.025	FBgn0038965
GB18700-RA		Gene	0.79945	0.025	FBgn0030584
GB10977-RA		Gene	-0.57337	0.025	FBgn0034118
GB10236-RA		Gene	-0.71203	0.026	FBgn0022786
GB12331-RA		Gene	0.89412	0.026	FBgn0032310
GB19747-RA		Gene	0.76024	0.026	FBgn0039836
GB12506-RA		Gene	-0.74196	0.026	FBgn0030719
GB14529-RA		Gene	-0.61885	0.026	FBgn0003138
GB17681		Pos	-1.18895	0.026	
GB16328-RA		Gene	1.21744	0.026	FBgn0036397
GB18801-RA		Gene	-0.61030	0.026	FBgn0035252
GB16186-RA		Gene	0.70596	0.026	FBgn0036702
GB20098-RA		Gene	-0.93214	0.026	FBgn0002121
GB10734-RA		Gene	2.87547	0.026	FBgn0032299
GB16151-RA		Gene	-0.66949	0.026	FBgn0034821
GB17073-RA		Gene	-0.62239	0.026	FBgn0039404
GB10254-RA		Gene	-0.52037	0.026	FBgn0039828
GB14829-RA		Gene	-0.98889	0.026	FBgn0035981
GB12700-RA		Gene	0.97720	0.026	FBgn0061209
GB11708-RA		Gene	-0.82552	0.027	FBgn0015075
GB12747-RA		Pos	-0.71225	0.027	
GB17056-RA		Gene	-0.77040	0.027	FBgn0036415
GB18121-RA		Gene	0.52178	0.027	FBgn0038925
GB10191-RA		Gene	-0.90386	0.027	FBgn0037121
GB15428-RA		Gene	0.84575	0.028	FBgn0027621
GB17681		Pos	-1.02545	0.028	
GB17681		Pos	-1.17715	0.028	
GB18908-RA		Gene	-1.28130	0.028	
GB15545-RA		Gene	-0.76336	0.028	FBgn0000449
GB17799-RA		Gene	-0.94973	0.028	
GB11059-RA		Gene	-1.34042	0.028	FBgn0016724
GB17623-RA		Gene	-0.70100	0.028	FBgn0037478
GB11144-RA		Gene	0.60040	0.028	FBgn0032053
GB11600-RA		Gene	-0.81562	0.028	FBgn0033083
GB10169-RA		Gene	-0.96803	0.028	FBgn0036855
GB18000-RA		Gene	-0.61588	0.028	FBgn0015321
GB14584-RA		Gene	-0.49855	0.028	FBgn0001565
GB11132		Pos	-0.68660	0.028	
GB17681		Pos	-0.96344	0.029	
GB17681		Pos	-1.28582	0.029	
GB13298-RA	Am-C	Gene	0.86826	0.029	FBgn0026077
GB30263-RA		Gene	0.90310	0.029	
GB13697-RA		Gene	-0.61605	0.029	FBgn0032686
GB16881-RA		Gene	0.94261	0.030	FBgn0004169

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB10259-RA		Gene	-0.91178	0.030	FBgn0044324
GB12264-RA		Gene	-0.52891	0.030	FBgn0035134
GB18774-RA		Gene	-1.22282	0.030	
GB17681		Pos	-1.10371	0.030	
GB11765-RA		Gene	0.67432	0.030	FBgn0026088
GB15086-RA		Gene	-0.83358	0.030	FBgn0040286
GB12705-RA	CPLCP1	Gene	1.20117	0.030	FBgn0050101
GB14421-RA		Gene	-0.63399	0.030	FBgn0032169
GB16831-RA		Gene	0.92133	0.030	FBgn0000057
GB14895-RA		Gene	-0.90085	0.031	FBgn0038964
GB14321-RA		Gene	1.75120	0.031	FBgn0019644
GB13322-RA		Gene	-0.67611	0.031	FBgn0034057
GB15290-RA		Gene	0.92139	0.031	FBgn0037537
GB15547-RA		Gene	-0.58798	0.031	FBgn0035590
GB12898-RA		Gene	0.86498	0.031	FBgn0053977
GB14817-RA		Gene	0.83127	0.031	FBgn0026179
GB12521-RA		Gene	-0.85434	0.031	FBgn0037609
GB15807-RA		Gene	-1.21294	0.031	FBgn0023537
GB10723-RA		Gene	-0.73755	0.031	FBgn0026878
GB12428-RA		Gene	0.69397	0.031	FBgn0033963
GB18439-RA		Gene	-0.71444	0.031	FBgn0042134
GB15998-RA		Gene	-0.65432	0.032	FBgn0032298
GB10560-RA		Gene	0.85869	0.032	FBgn0000557
GB12747-RA		Pos	-1.11968	0.032	
GB17911-RA		Gene	-1.05175	0.032	
GB16819-RA		Gene	0.88684	0.032	FBgn0036337
GB11120-RA		Gene	-0.61032	0.032	FBgn0037538
GB12149-RA		Gene	-0.93196	0.032	FBgn0036531
GB12568-RA		Gene	-0.91311	0.032	FBgn0052708
GB17045-RA		Gene	0.76701	0.032	FBgn0003308
GB11459-RA		Gene	-0.73625	0.032	FBgn0015546
GB10560		Pos	0.90970	0.033	
GB30337-RA		Gene	0.94986	0.033	FBgn0050045
GB14175-RA		Gene	-0.69109	0.033	FBgn0030545
GB12823-RA		Gene	0.57861	0.033	FBgn0051759
GB11482-RA		Gene	-0.61871	0.033	FBgn0003150
GB16615-RA		Gene	0.97576	0.033	FBgn0030745
GB15799-RA		Gene	1.07837	0.033	FBgn0025712
GB18246-RA		Gene	-0.61602	0.033	FBgn0036187
GB11386-RA		Gene	-0.64191	0.033	FBgn0038829
GB30294-RA		Gene	-0.92825	0.033	FBgn0010282
GB19933-RA		Gene	-0.75154	0.033	FBgn0027903
GB13535-RA		Gene	-0.56215	0.033	FBgn0034232
GB18440-RA		Gene	-0.80740	0.033	FBgn0028689
GB16972-RA		Gene	-0.58782	0.033	FBgn0030724
GB15193-RA		Gene	-0.79830	0.033	FBgn0039182
GB10253-RA		Gene	1.41046	0.033	FBgn0034877
GB11862-RA		Gene	-0.61653	0.033	FBgn0032400
GB10833-RA		Gene	-0.65572	0.034	FBgn0036921
GB17273-RA		Gene	-0.85992	0.034	FBgn0033378
GB17961-RA		Gene	-0.86275	0.034	
GB18682-RA		Gene	-0.74174	0.034	FBgn0032761
GB17312-RA		Gene	0.90057	0.034	FBgn0037937
GB30108-RA		Gene	0.68749	0.034	
GB10560		Pos	0.78401	0.034	
GB11675-RA		Gene	1.27249	0.034	FBgn0034797
GB20050-RA		Gene	-0.56752	0.034	FBgn0039163
GB13667-RA		Gene	-1.17133	0.034	FBgn0038039
GB16253-RA		Gene	-0.72388	0.034	FBgn0027338
GB13269-RA		Gene	0.91948	0.035	FBgn0032762
GB15792-RA		Gene	-0.81664	0.035	FBgn0004587
GB11979-RA		Gene	-0.64164	0.035	FBgn0038065
GB17639-RA		Gene	0.49347	0.035	FBgn0035532
GB14402-RA		Gene	1.21346	0.035	FBgn0032497
GB10571-RA		Gene	1.00231	0.035	FBgn0030627
GB12853-RA		Gene	1.42718	0.035	FBgn0015609
GB19364-RA		Gene	0.46986	0.036	FBgn0001276
GB19424-RA		Gene	-0.64569	0.036	FBgn0034528
GB13702-RA		Gene	0.68331	0.036	FBgn0034735
GB14513-RA		Gene	-0.77182	0.036	FBgn0033373
GB10560		Pos	0.68780	0.036	
GB17681		Pos	-1.19216	0.036	

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB11734-RA		Gene	-0.65552	0.036	FBgn0013799
GB12573-RA		Gene	0.75779	0.036	FBgn0026708
GB13510-RA		Gene	-0.64700	0.036	FBgn0036450
GB15665-RA		Gene	1.23162	0.036	FBgn0050438
GB17581-RA		Gene	0.83152	0.036	FBgn0035134
GB18617-RA		Gene	-0.84872	0.036	FBgn0036487
GB17271-RA		Gene	-1.28828	0.036	FBgn0053291
GB17438-RA		Gene	0.85429	0.036	FBgn0051126
GB12747-RA		Pos	-0.80785	0.037	
GB15863-RA		Gene	-0.64398	0.037	FBgn0000115
GB17404-RA		Gene	-1.10829	0.037	FBgn0010504
GB18874-RA		Gene	0.62858	0.037	FBgn0062442
GB10719-RA		Gene	-0.56719	0.037	FBgn0015359
GB13601-RA	AmelCPF1	Gene	-2.55442	0.037	FBgn0035787
GB17397-RA		Gene	1.79207	0.037	
GB12127-RA		Gene	0.71192	0.037	FBgn0034110
GB14117-RA		Gene	-0.70494	0.037	FBgn0039459
GB14903-RA		Gene	-1.04172	0.037	FBgn0038499
GB17642-RA	AmelCPR15	Gene	0.88249	0.037	FBgn0034499
GB17611-RA		Gene	-0.66541	0.037	FBgn0030241
GB12536-RA		Gene	0.81897	0.037	FBgn0038181
GB20148-RA		Gene	-0.75100	0.037	FBgn0037513
GB18811-RA		Gene	0.73413	0.037	FBgn0013684
GB16470-RA		Gene	-0.68621	0.037	FBgn0032701
GB17681		Pos	-1.34424	0.037	
GB15200-RA		Gene	-0.94880	0.037	FBgn0025592
GB11081-RA		Gene	0.82513	0.038	FBgn0039201
GB14783-RA		Gene	-1.03832	0.038	FBgn0033015
GB13886-RA		Gene	0.61392	0.038	FBgn0030311
GB11029-RA		Gene	-0.54288	0.038	FBgn0035753
GB10626-RA		Gene	0.68858	0.038	FBgn0031651
GB18744-RA		Gene	-1.96015	0.038	FBgn0036814
GB15372-RA		Gene	-0.64728	0.038	FBgn0038808
GB18794-RA		Gene	-0.56358	0.038	FBgn0038601
GB14823-RA		Gene	0.68464	0.038	FBgn0052600
GB19565-RA		Gene	-0.56985	0.038	FBgn0038571
GB15623-RA		Gene	0.75012	0.038	FBgn0033900
GB15083-RA		Gene	-0.78455	0.038	FBgn0003716
GB18165-RA		Gene	0.72028	0.038	FBgn0033337
GB10532-RA		Gene	-0.50958	0.038	FBgn0035357
GB11274-RA		Gene	-0.82948	0.039	FBgn0031115
GB12133-RA		Gene	-0.52452	0.039	FBgn0032719
GB14575-RA		Gene	-0.67477	0.039	FBgn0037382
GB10244-RA		Gene	0.59133	0.039	FBgn0028528
GB13645-RA		Gene	-0.90846	0.039	FBgn0020248
GB18474-RA		Gene	-1.28873	0.039	FBgn0003141
GB14777-RA		Gene	-1.01863	0.039	FBgn0033687
GB20068-RA		Gene	0.81378	0.039	FBgn0032846
GB13646-RA		Gene	-0.83932	0.039	FBgn0011785
GB18407-RA		Gene	-1.27954	0.039	FBgn0005596
GB10521-RA		Gene	0.96219	0.039	FBgn0040389
GB17681		Pos	-1.32226	0.040	
GB15932-RA		Gene	0.57027	0.040	FBgn0035064
GB16039-RA		Gene	-0.69455	0.040	FBgn0038609
GB11348-RA		Gene	-0.72873	0.040	FBgn0023184
GB10751-RA		Gene	0.67812	0.040	FBgn0003870
GB11484-RA		Gene	-0.94103	0.040	FBgn0037504
GB17600-RA		Gene	-0.51777	0.040	FBgn0004811
GB17848-RA		Gene	0.58021	0.041	FBgn0037901
GB11387-RA		Gene	-1.54310	0.041	
GB15323-RA		Gene	1.45556	0.041	FBgn0083951
GB11936-RA		Gene	-0.77644	0.041	FBgn0034879
GB14495-RA		Gene	-0.73360	0.041	FBgn0050122
GB11432-RA		Gene	1.19028	0.042	FBgn0026562
GB16116-RA		Gene	-0.66209	0.042	FBgn0030659
GB16482-RA		Gene	-0.58915	0.042	FBgn0035048
GB18834-RA		Gene	0.80557	0.042	
GB19248-RA		Gene	0.74547	0.042	FBgn0029704
GB19377-RA		Gene	-0.83623	0.042	FBgn0033094
GB13677-RA		Gene	-0.90588	0.042	FBgn0031114
GB16229-RA		Gene	-0.84377	0.042	FBgn0034500
GB14390-RA		Gene	0.89298	0.042	FBgn0050022

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB11462-RA		Gene	-0.61555	0.042	FBgn0022268
GB12145-RA		Gene	-0.55066	0.042	FBgn0027053
GB12935-RA		Gene	-1.05885	0.042	FBgn0035995
GB15343-RA		Gene	-0.47507	0.042	FBgn0038196
GB17681		Pos	-1.06360	0.043	
GB12761-RA		Gene	-0.72371	0.043	FBgn0037707
GB14946-RA		Gene	0.83624	0.043	FBgn0031851
GB18104-RA		Gene	-0.70792	0.043	FBgn0030406
GB14990-RA		Gene	-1.48369	0.043	FBgn0013988
GB15449-RA		Gene	-0.65576	0.043	FBgn0038501
GB19003-RA		Gene	-0.69226	0.043	FBgn0026380
GB12747-RA		Pos	-1.04931	0.043	
GB17870-RA		Gene	-0.83560	0.043	FBgn0011703
GB11914-RA		Gene	0.56480	0.043	FBgn0033235
GB10185-RA		Gene	-0.76216	0.043	FBgn0034878
GB12617-RA		Gene	-0.63084	0.043	FBgn0033686
GB18954-RA		Gene	-1.00103	0.043	FBgn0053862
GB12174-RA		Gene	0.70257	0.044	FBgn0038737
GB10560		Pos	0.82890	0.044	
GB12747-RA		Pos	-0.98795	0.044	
GB18387-RA		Gene	-0.72496	0.044	FBgn0030457
GB18680-RA		Gene	-0.68171	0.044	FBgn0034657
GB16713-RA		Gene	-0.57973	0.044	FBgn0036288
GB20121-RA		Gene	-1.33521	0.044	FBgn0030361
GB12118-RA		Gene	-0.82493	0.044	FBgn0038950
GB18024-RA		Gene	-1.00407	0.044	
GB13704-RA		Gene	0.76070	0.044	FBgn0030087
GB30162-RA		Gene	-0.64056	0.044	FBgn0003660
GB19023-RA		Gene	-0.92229	0.044	FBgn0039904
GB11132		Pos	-1.21121	0.044	
GB17480-RA		Gene	0.54080	0.044	FBgn0027779
GB18821-RA		Gene	-0.82379	0.044	FBgn0004493
GB19725-RA		Gene	-0.62933	0.044	FBgn0030061
GB16104-RA		Gene	0.58823	0.044	FBgn0035483
GB15185-RA		Gene	0.53447	0.044	FBgn0033236
GB11699-RA		Gene	0.80486	0.045	FBgn0029783
GB16132-RA		Gene	-0.57155	0.045	FBgn0039697
GB13892-RA		Gene	-0.81190	0.045	FBgn0010280
GB16317-RA		Gene	-0.62394	0.045	FBgn0031217
GB10560		Pos	0.90504	0.045	
GB10094-RA		Gene	-0.70759	0.045	FBgn0005593
GB17036-RA		Gene	-0.69837	0.045	FBgn0032921
GB17262-RA		Gene	-0.69876	0.045	FBgn0039557
GB13766-RA		Gene	0.60942	0.046	FBgn0010808
GB17676-RA		Gene	-0.58985	0.046	FBgn0036686
GB19988-RA		Gene	-0.87493	0.046	FBgn0034162
GB11063-RA		Gene	1.32053	0.046	FBgn0032538
GB18983-RA		Gene	-0.52446	0.046	
GB10971-RA		Gene	-0.99005	0.046	FBgn0000299
GB11132		Pos	-0.65593	0.046	
GB14901-RA		Gene	0.51510	0.046	FBgn0032595
GB16614-RA		Gene	-0.64555	0.046	FBgn0028691
GB10908-RA		Gene	-0.44891	0.046	FBgn0038581
GB11762-RA		Gene	-1.00330	0.046	
GB14144-RA		Gene	-0.49413	0.046	FBgn0024285
GB14907-RA		Gene	-0.60625	0.046	FBgn0024183
GB16429-RA		Gene	-0.72434	0.046	FBgn0003074
GB10800-RA		Gene	-0.48325	0.047	FBgn0015019
GB13771-RA		Gene	-0.59680	0.047	FBgn0050296
GB14023-RA		Gene	0.57190	0.047	FBgn0034727
GB17681		Pos	-1.18554	0.047	
GB12997-RA		Gene	-0.74819	0.047	FBgn0035950
GB16049-RA		Gene	-0.61962	0.047	FBgn0025700
GB15279-RA		Gene	-0.73392	0.047	FBgn0030940
GB18315-RA		Gene	0.79309	0.047	FBgn0039223
GB17247-RA		Gene	-0.58403	0.047	FBgn0032651
GB12691-RA		Gene	-0.52676	0.047	FBgn0004413
GB15219-RA		Gene	0.83457	0.047	FBgn0033929
GB19808-RA		Gene	-0.86010	0.047	FBgn0033529
GB18937-RA		Gene	0.71222	0.048	FBgn0031190
GB10972-RA		Gene	1.30319	0.048	FBgn0038519
GB19355-RA		Gene	-0.68853	0.048	FBgn0038364

ID	Anotação Sequências Cuticulares	Status	Fold	valor de p ajustado	Ortólogo <i>D. melanogaster</i>
GB16336-RA		Gene	-0.87491	0.048	FBgn0039890
GB14139-RA		Gene	-0.69342	0.049	FBgn0002774
GB30096-RA		Gene	-0.63319	0.049	FBgn0010762
GB17377-RA		Gene	-0.54354	0.049	FBgn0037298
GB12838-RA		Gene	-0.78687	0.049	FBgn0015286
GB15457-RA		Gene	-0.83913	0.049	FBgn0035631
GB17706-RA		Gene	-1.04346	0.049	FBgn0034000
GB13293-RA		Gene	1.67257	0.049	FBgn0036715
GB19901-RA		Gene	-0.54159	0.050	FBgn0004210
GB12097-RA		Gene	-0.92857	0.050	FBgn0032848

8.3. Artigo publicado

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(5): e20513.

OPEN ACCESS Freely available online

Ecdysteroid-Dependent Expression of the *Tweedle* and *Peroxidase* Genes during Adult Cuticle Formation in the Honey Bee, *Apis mellifera*

Michelle P. M. Soares, Fernanda A. Silva-Torres, Moysés Elias-Neto, Francis M. F. Nunes, Zilá L. P. Simões, Márcia M. G. Bitondi*

Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Cuticle renewal is a complex biological process that depends on the cross talk between hormone levels and gene expression. This study characterized the expression of two genes encoding cuticle proteins sharing the four conserved amino acid blocks of the *Tweedle* family, *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2*, and a gene encoding a cuticle peroxidase containing the Animal haem peroxidase domain, *Ampxd*, in the honey bee. Gene sequencing and annotation validated the formerly predicted *tweedle* genes, and revealed a novel gene, *Ampxd*, in the honey bee genome. Expression of these genes was studied in the context of the ecdysteroid-coordinated pupal-to-adult molt, and in different tissues. Higher transcript levels were detected in the integument after the ecdysteroid peak that induces apolysis, coinciding with the synthesis and deposition of the adult exoskeleton and its early differentiation. The effect of this hormone was confirmed *in vivo* by tying a ligature between the thorax and abdomen of early pupae to prevent the abdominal integument from coming in contact with ecdysteroids released from the prothoracic gland. This procedure impaired the natural increase in transcript levels in the abdominal integument. Both *tweedle* genes were expressed at higher levels in the empty gut than in the thoracic integument and trachea of pharate adults. In contrast, *Ampxd* transcripts were found in higher levels in the thoracic integument and trachea than in the gut. Together, the data strongly suggest that these three genes play roles in ecdysteroid-dependent exoskeleton construction and differentiation and also point to a possible role for the two *tweedle* genes in the formation of the cuticle (peritrophic membrane) that internally lines the gut.

Citation: Soares MPM, Silva-Torres FA, Elias-Neto M, Nunes FMF, Simões ZLP, et al. (2011) Ecdysteroid-Dependent Expression of the *Tweedle* and *Peroxidase* Genes during Adult Cuticle Formation in the Honey Bee, *Apis mellifera*. PLoS ONE 6(5): e20513. doi:10.1371/journal.pone.0020513

Editor: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay, Instituto Nacional de Câncer, Brazil

Received: February 25, 2011; **Accepted:** May 2, 2011; **Published:** May 31, 2011

Copyright: © 2011 Soares et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil - Grant 05/03926-5 and fellowships: MPMS (07/04314-9), FAST (03/10581-9), MEN (07/08300-2), FMFN (07/07594-2). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mmgbt@usp.br

Introduction

Insects grow and differentiate from the larval to the adult stage through periodic degradation of the exoskeleton (or cuticle) and replacement by a new one. Each episode of cuticle renewal, or molt, comprises a series of events mainly marked by the detachment of the cuticle from the subjacent epidermis (apolysis), the synthesis and secretion of the components of the new cuticle by the epidermal cells, and the ecdysis or shedding of the old cuticle [1]. This cyclic re-construction of the cuticle is a complex task involving the expression of genes for extensive synthesis of structural cuticle proteins (CPs) and enzymes with roles in cuticle pigmentation (darkening) and sclerotization (hardening). The pigmentation and sclerotization pathways involve the activity of enzymes including tyrosine hydroxylase [2] and dopa-decarboxylase [3,4,5], which participate in the biosynthesis of catecholic sclerotization precursors that are oxidized to quinones by the action of phenoloxidases [6,7,8], laccases [9,10,11,12] and peroxidases [13]. Quinones are the precursors of melanin in the process of cuticle pigmentation, and they also interact to form covalent bonds with amino acid residues of CPs in cross-linking reactions for sclerotization and stabilization of the cuticle [14,15,16].

The coordination of cuticle renewal is known to be controlled by the ecdysteroid hormone 20-hydroxyecdysone [17,18,19]; its precursor, ecdysone, and other structurally related compounds are only active as molting hormones in a few organisms [20]. The study of the molecular mechanism of ecdysteroid action in *Drosophila melanogaster* demonstrated that a pulse of ecdysteroids mediated by the heterodimeric complex formed by the ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (Usp) triggers expression of the so-called "early" genes for production of regulatory proteins, which in turn activate the "late" or effector genes in a secondary response [21,22]. Among other presumed effector genes or late-response genes are those encoding many CPs and cuticular enzymes [23]. Data from *Manduca sexta* have been used to construct a proposed neuroendocrine model for the regulation of molting events that may apply to insects in general. According to this model, the increase in ecdysteroid levels that induces apolysis and early gene expression concomitantly makes the insect central nervous system (CNS) sensitive to the pre-ecdysis hormone and ecdysis-triggering hormone produced by the tracheal Inka cells. The release of both hormones and the release of several CNS neuropeptides, including the eclosion hormone (involved in ecdysis), are induced by late gene expression, which occurs when ecdysteroid titers decrease to

baseline levels [24]. Another neuropeptide, bursicon, is critical for the late events of cuticle differentiation and causes cuticle expansion and tanning [25,26,27]. Therefore, molting initiation is ensured by the increase in ecdysteroid titer, but the synthesis of a new cuticle and ecdysis only take place when the titer of ecdysteroids decreases after the peak [28,29,30,31]. This sequence of events triggered and timed by ecdysteroids, which includes many other molecular components in addition to those mentioned above, underlies the process of cuticle renewal.

Whole genome sequencing of insect species has allowed prediction of genes potentially involved in cuticle structuring. Predicted CP sequences were included in the cuticle proteome database [32] (<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/index.jsp>), and a recent review by Willis [33] summarized the current state of knowledge about CPs in arthropods. Overall, CPs have mainly been predicted from assembled insect genomes and from the conceptual translation of cDNAs and ESTs. CPs were designated as cuticle components based on their similarity to the so-called authentic CPs, i.e., those identified by biochemical methods in cuticle extracts. The classification of CPs into twelve structurally distinct protein families demonstrates their diversity within and amongst species.

Among the insect species with sequenced genomes, the honey bee, *Apis mellifera*, has the lowest number of genes potentially encoding the major and best-known class of CPs, i.e., the CPR proteins carrying the R&R Consensus sequence [34]. Whereas 32 CPR genes were found in the honey bee genome, 62 of these genes were found in another hymenopteran, the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*, and this number rises to 101, 148 and 156 in *D. melanogaster*, *Bombyx mori* and *Anopheles gambiae*, respectively [33]. The lower diversity of structural CPR proteins in the honey bee has been tentatively explained by the fact that this social insect lives inside a protective hive during most of its life cycle [35].

Although many CP genes have been predicted from insect genomes, most of these genes have not yet been experimentally validated. To our knowledge, only one of the honey bee CPR predicted genes, *AmelCPR14*, has been validated by sequencing of its CDS (coding sequence) [36]. Another cluster of three genes containing sequence motifs characteristic of genes encoding CPs, in addition to other features, was also identified in the honey bee and included in the separate class of *apidermin* cuticle genes [37].

We are particularly interested in studying the molecular basis of formation and differentiation of the adult stage-cuticle. In comparison to the larval and pupal cuticles, the construction of the definitive cuticle in the honey bee (and other insects) is more complex, mainly due to the onset and progress of pigmentation that occurs in concert with an intense process of sclerotization, thus resulting in striking changes in chemical and structural properties [38,39]. Toward this main goal, we previously characterized the structure and expression of the above-mentioned CPR gene, *AmelCPR14* [36] and a laccase gene, *Amlac2* [11]. These studies established the relationship between the expression of both genes and the ecdysteroid titer that induces apolysis and triggers the biosynthesis and differentiation of the adult cuticle. The current study describes the primary structure, developmental expression and ecdysteroid-dependent regulation of three other genes, two of which belong to the Tweedle CP family, *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2*, and the other encoding a cuticular peroxidase, *Ampxd*. Expression of these genes was studied in the thoracic, abdominal and wing integument in the context of the sequential events occurring during the last molting cycle and leading to adult cuticle synthesis and differentiation. In addition, expression of these genes was investigated in the trachea and gut, which are internally lined by cuticle. Characterization of the expression of

these genes provided insights into the roles of the Tweedle protein family and a peroxidase in the cuticles making up the exoskeleton and lining internal organs, and it also expanded the list of validated cuticle genes in the honey bee.

Materials and Methods

Genes identification and bioinformatic analyses

BLAST searches using as query a CP sequence from *B. mori*, BAE06189.1 [40] allowed identification of the two *tweedle* genes in the honey bee genome. The *peroxidase* gene was identified by using peroxidase protein sequences from *Aedes aegypti* (EAT46477.1) and *Culex quinquefasciatus* (EDS26535.1). TBLASTN searches were performed against the honey bee genome version 4.0 [35] to check chromosomal region (linkage group). BLASTN and BLASTP searches were performed against the *A. mellifera* Official Gene Set database Pre_Release2 to identify predicted sequences. All these information were used to define each gene structure using Artemis 7.0 platform [41]. Primers were designed along the annotated sequences (File S1) and used for cDNA amplification in semiquantitative (sq) and quantitative (q) RT-PCRs, and also for cDNA sequencing. Sequenced fragments were assembled using Sequencher 3.1 software. Consensus cDNA sequence for each gene was used to refine and validate the annotation. Based on ExPASy softwares (<http://expasy.org/tools>), translation products were deduced from the annotated CDSs and used to compute theoretical molecular mass, isoelectric point, amino acid composition, and also served as input to check potential signal peptide using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The deduced proteins and insect orthologs for *tweedle* and *peroxidase* genes were used for further alignment analysis (ClustalW 2 - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and identification of conserved domains.

A. mellifera and tissue dissections

Africanized honey bee workers were collected from colonies maintained at the Experimental Apiary of the University of São Paulo in Ribeirão Preto, SP, Brazil. Pupae and pharate adults were staged according to the criteria established by Michelette and Soares [42], and dissected for separation of the thoracic and abdominal integument (only the dorsal portion), wings, trachea and gut. Total RNA was extracted from samples prepared with 6 thoracic or abdominal integuments, 15 fore wing pairs, and also from samples prepared with trachea or gut dissected from 10 abdomens. Some RNA samples were prepared by pooling three whole bodies of pupae and pharate adults during the successive phases of development.

Abdominal ligation

Newly ecdysed pupae (Pw phase) were submitted to a ligation between thorax and abdomen. After ligation, they were maintained in Petri dishes lined with filter paper, in an incubator, at 34°C and 80% relative humidity. Development in comparison with non-ligated controls, which were maintained at the same conditions of temperature and humidity, was followed during pupal and pharate adult stages. During this time, ligated and non-ligated bees were periodically taken for dissection of the abdominal integument for total RNA extraction.

Semiquantitative RT-PCR analysis (sqRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) following manufacturer instructions. The extract was subsequently incubated in the presence of 3 units of RNase-free DNase (Promega) for 40 min at 37°C to eliminate contaminant DNA, and for 15 min at

70°C to inactivate this enzyme. First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription using 2.5 µg of total RNA, SuperScript II reverse transcriptase and the oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen). Negative control reactions, without the reverse transcriptase, were also prepared and analyzed in parallel to check for DNA contamination. Aliquots of first-strand cDNAs were used in PCR reactions with PCR Master mix (Promega) and specific primers (File S1). All primer pairs were designed to span at least one intron. Thus, contamination by genomic DNA, if any, could be easily identified after electrophoresis of RT-PCR products by detection of an amplicon size heavier than expected. The thermal cycling program consisted of 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C and a final extension step at 72°C for 10 min. The number of PCR-cycles was previously tested to avoid saturation. The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized using KODAK EDAS 290.

A constitutively expressed *A. mellifera actin* gene, *Actin* [43] (see File S1 for accession number and primers), was used to control cDNA loading and to correct for differences in cDNA amounts. In this case, the thermal cycling program was as follows: 2 min at 94°C, 25 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 62°C, 1 min at 72°C and a final extension step at 72°C for 10 min.

Real-time RT-PCR analysis (qRT-PCR)

AmelTwdl1, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts were quantified in the thoracic integument and in other tissues (trachea and gut) by using a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and the $\Delta\Delta C_T$ method by which the relative amount of transcripts is given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Applied Biosystems User bulletin #2 [44]). The gene encoding a ribosomal protein, *Amp49*, (see File S1 for accession number and primers), which is expressed in similar levels during honey bee development, and was validated as being suitable for normalizing real time RT-PCR data [43] was used as the endogenous reference. The primers used for the reference and target genes (File S1), were designed to span at least one intron, thereby serving as control for genomic DNA contamination. Previously, validation experiments were performed to verify the efficiencies of amplification of the targets and endogenous reference. Using serial cDNA dilutions, the efficiency (E) of the reactions was calculated ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each gene and showed to be approximately equal. Amplification was carried out in a 20 µl reaction volume, containing 10 µl SYBR Green Master Mix 2x (Applied Biosystems), 1 µl cDNA (prepared from total RNA extracted as described for RT-PCR analysis), 7.4 µl water, and 8 pmol of each gene-specific primer. Reactions not including the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), or cDNA template, were prepared as negative controls. The PCR conditions were 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Each run was followed by a melting curve analysis to confirm the specificity of amplification and absence of primer dimers. To check reproducibility, each SYBR green assay was done in technical duplicate and repeated with three independent biological samples. The baseline and threshold were correctly set to obtain accurate C_T values, which were exported into a MS Excel spreadsheet (Microsoft Inc.) for $2^{-\Delta\Delta C_T}$ calculation.

Cloning and Sequencing

Using specific primers for *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* (File S1), cDNA regions were amplified and electrophorized. PCR products were then extracted from the agarose gels, purified with Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf), and cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega). Insert-containing plasmids were

sequenced using M13 forward and reverse universal primers. Dideoxy sequencing was performed in an ABI Prism 310 DNA Analyser using BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems).

SDS-PAGE and Western Blot

The presence of the *AmelTwdl1* protein was investigated in the thoracic and abdominal integuments during pupal and pharate adult development. Total protein was extracted by homogenizing integuments from staged bees in 100 µl extraction buffer (Tris-HCl 0.25 M and 2% SDS, pH 6.8). Following incubation on ice during 2 h, the extracts were centrifuged at 15,000 × g, at 4°C for 5 min and the respective supernatants were collected for total protein quantification using bicinchoninic acid [45]. Aliquots containing 10 µg of total protein were subjected to SDS-PAGE according to Laemmli [46], with some modifications: the 7.5–15% polyacrylamide gradient gels (100 × 120 × 0.9 mm) were prepared without SDS, which was added only to the running and sample buffers. Electrophoresis was carried out at a constant current of 15 mA at 7–10°C. Blotting was performed according to the protocol described by Towbin *et al.* [47]. Electrophoretically separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ImmunBlot™ PVDF Membrane, Bio-Rad), which were subsequently incubated in a 1:100 diluted primary antibody against the BmGRP2 protein from *B. mori* cuticle. Membrane-immobilized *AmelTwdl1* was detected with Horseradish Peroxidase (HRP) labeled secondary antibody diluted 1:12000 (ECL kit, Amersham Biosciences), and the corresponding fluorescent band was visualized by exposing membranes to a Kodak XR-Omat film.

Electrophoretic characterization of peroxidase activity in thoracic integument samples

Pools of ten thoracic integuments (only the dorsal portion) dissected from pupae and pharate adults were frozen in liquid nitrogen, pulverized with the aid of a glass pestle, and homogenized in 200 µl extraction buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% SDS and 4 M urea). After 20 min at room temperature, these samples were centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C. The supernatants were mixed with sample buffer (1.25 ml 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 500 ml saccharose 70%, 0.1 g SDS, 100 ml bromophenol blue, 3 ml water) and used for electrophoresis, performed as described in item 2.6, but using 7.5% polyacrylamide gels. Peroxidase activity was detected in these non-heated samples after incubation of the polyacrylamide gels in 5 mM diaminobenzidine dissolved in 0.2 M sodium acetate buffer pH 6.0 containing 3% H₂O₂ [48].

Results

Characteristics of two *tweedle* genes and a cuticular peroxidase gene in the honey bee

Using the *B. mori* BmGRP2 deduced protein (Accession number BAE06189.1, [40]) as a query in BLAST searches, we identified the GB19234 sequence in the genomic region GroupUn.1241. Specific primers were designed for this honey bee sequence, and total RNA was extracted from the thoracic integument. In a reverse transcription procedure, the corresponding cDNA was synthesized, amplified and sequenced. The sequenced cDNA was compared against the corresponding annotated gene *in silico* using the Artemis platform, revealing the exon/intron boundaries (Figure 1A). The CDS spans 999 nucleotides (stop codon included) distributed among 3 exons. Only the last four nucleotides at the 3' region and the stop codon were not validated by cDNA sequencing. The conceptual primary protein sequence consists of

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

Figure 1. Tweedle: gene structures and alignment of insect tweedle proteins. (A) Schematic representation of the *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* genes. Initiation and termination codons are indicated at the left and right of the figure, respectively. Exons and introns are indicated by boxes and lines, respectively, and the number of nucleotides is shown. The direction of transcription is indicated by an arrow. (B) Alignment (ClustalW 2) of *AmelTwdl1* (ACJ38118.1) and *AmelTwdl2* (ADK73965.2) amino acid sequences with other Tweedle protein sequences from *B. mori*, BmGRP2 (BAE06189.1), and *D. melanogaster*, TwdlT (AAF56656.1) and TwdlE (AAF52571.2). The four conserved blocks of amino acids are marked in dark gray. The signal peptide region is underlined in all sequences. In light gray is a region of BmGRP2 sequence that was used by Zhong *et al.* (see ref. [40]) to synthesize a peptide for antibody production. This antibody recognized the *AmelTwdl1* protein (see Fig. 3 and corresponding text in Results section). Asterisks, colons and dots represent identical amino acid residues, strong- and weak-conservative substitutions, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0020513.g001

332 amino acids. It has a molecular mass of 30.81 kDa and a *pI* value of 9.2. The N-terminal signal peptide spans 47 amino acids (see in File S2 the nucleotides validated by sequencing, the deduced amino acid sequence, and the signal peptide region). The deduced protein contains the four conserved blocks of amino acids (Blocks I, II, III and IV) that typically characterize the Tweedle CP family, as observed in the ClustalW alignment with Tweedle proteins from other species of insects shown in Figure 1B. This honey bee gene was then named *AmelTwdl1* (*Amel* was used to conserve the nomenclature given to the *A. mellifera* CPs in the CuticleDB; Twdl is the abbreviation given to *tweedle* genes first described in *Drosophila*), and the GB19234 sequence prediction was validated as a cuticle protein gene. The *AmelTwdl1* protein shares 58% similarity (ClustalW score) with BmGRP2 and 60% and 48% similarities with the TwdlT (AAF56656.1) and TwdlE (AAF52571.2) proteins from *D. melanogaster*, respectively [49].

The other honey bee *tweedle* gene, here named *AmelTwdl2*, corresponds to the GB14193 sequence in the genomic region GroupUn.592. This gene was identified by BLASTP analysis using the BmGRP2 and *AmelTwdl1* deduced CP sequences as queries. As performed for *AmelTwdl1*, the *AmelTwdl2* cDNA was synthesized using RNA from the thoracic integument, amplified with specific primers based on the GB14193 sequence and sequenced. Computational comparison of the sequenced cDNA against the corresponding annotated gene using the Artemis platform allowed the identification of the CDS formed by 3 exons encompassing 591 nucleotides (stop codon included) (Figure 1A). Only 33 nucleotides at the N-terminus were not validated by CDS sequencing. The conceptual translation product consists of 196 amino acid residues, has a molecular mass of 21.36 kDa and a *pI* value of 8.4, and contains a putative N-terminal signal peptide comprising 25 amino acids (see in File S3 the CDS region confirmed by sequencing, the translated protein sequence, and the signal peptide). *AmelTwdl2* contains the four amino acid blocks typical of Tweedle proteins and shares 50% similarity to *AmelTwdl1*; it also has 41, 42, and 52% similarities to the BmGRP2, TwdlT, and TwdlE proteins, respectively (Figure 1B).

BLASTP analysis using the predicted peroxidases of *Aedes aegypti* (EAT46477.1) and *Culex quinquefasciatus* (EDS26535.1) failed to identify a *peroxidase* gene prediction in the Official Gene Set pre_release2 database. However, we verified that in the honey bee genome version 4.0, both dipteran genes aligned to two regions, Group4.3 and GroupUn.1247. To annotate and determine the structure of the honey bee *peroxidase* gene, both linkage groups were reoriented and merged. These two orthologous sequences enabled us to manually predict a gene model. Gene sequencing using primers (primers *Amprxd* f2 and r2, see File S1) flanking regions mapped on both linkage groups, Group4.3 and GroupUn.1247, confirmed that these groups are indeed continuous. The identified *peroxidase* gene spans ~21 kb of genomic DNA. The annotated CDS has 1977 nucleotides (stop codon included) and is separated into 13 exons (Figure 2A) that potentially encode a protein of 658 amino acids. Expected canonical splice sites (conforming to the GT/AG rule) were found at all exon/intron boundaries. The CDS was partially sequenced,

with 1403 of the 1977 nucleotides identified, validating 7 entire and 2 partial annotated exons. These sequence data were submitted to GenBank under accession number GU785071.2 (ADE45321.2 for its conceptual translation product). The Animal haem peroxidase domain (pfam03098) spanning a region of 541 amino acids was identified in the deduced translation product. The predicted N-terminal signal peptide includes 26 residues (see in File S4 the CDS region confirmed by sequencing, the translated protein sequence, and the signal peptide). The molecular mass of the annotated protein is 75.08 kDa, and its *pI* value is 5.8. Leucine is the most abundant amino acid in the deduced peroxidase protein, comprising 10.3% of the amino acid residues. Other amino acids are present at a lower abundance, which ranges from 1.5 to 7.0%. The honey bee peroxidase protein shows 80% and 79% similarity with the peroxidases of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*, respectively (ClustalW score) (Figure 2B).

File S5 summarizes the main characteristics of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Amprxd* CDSs and their deduced amino acid sequences.

The *tweedle* and *peroxidase* genes are regulated during the molt cycle

The expression of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Amprxd* was studied in the thoracic, abdominal and wing integuments during the pupal-to-adult molt cycle coordinated by changes in ecdysteroid titer. Approximately one day after the pupal ecdysis, the ecdysteroid titer rises and reaches a peak, thus inducing apolysis of the pupal cuticle. The ecdysteroid titer then decreases gradually. The adult ecdysis occurs when the hormone reaches a basal level. Figure 3A shows ecdysteroid titer modulation and the sequential changes in the honey bee cuticle during pupal and pharate adult development.

AmelTwdl1 expression

The thoracic integument of pupae (Pw phase) and of the succeeding developmental phase where the pupal-to-adult apolysis takes place (Pp phase) exhibit very low levels of *AmelTwdl1* transcripts, but subsequently the abundance of this mRNA rapidly increases. High transcript levels are then maintained during almost all of the pharate adult stage, which comprises the time interval between the Pdp and Pbm phases, and this is followed by a decrease in transcript levels just before the ecdysis to the adult stage, at the Pbd phase (Figure 3B, upper panel). A similar pattern of expression occurs in the integument of the abdomen and wings (Figure 3B, middle and lower panels).

Western blots of honey bee proteins extracted from the thoracic integument and then probed with an antibody against the CP from *B. mori*, BmGRP2, revealed a band that matches the molecular mass of the deduced *AmelTwdl1* protein (30.81 kDa), indicating that the antibody reacted with the product of the *AmelTwdl1* gene (observe in Figure 1A that the light-gray marked amino acid region of the BmGRP2 sequence used for antibody production almost completely matches a region in the *AmelTwdl1* protein). In addition, and reinforcing this argument, we observed that the

A

B

[illegible]

Figure 2. Peroxidase: gene structure and alignment of insect peroxidase proteins. (A) Schematic representation of the *peroxidase* gene from *A. mellifera*. Initiation and termination codons are indicated, as well as exons (boxes) and introns (lines). The number of nucleotides is shown, and the direction of transcription is indicated by an arrow. (B) Alignment (ClustalW 2) of peroxidase sequences from *A. mellifera* (AmPXD, ADE45321.2), *Culex quinquefasciatus* (CqPXD, EDS26535.1) and *Aedes aegypti* (AaPXD, EAT46477.1). The signal peptide region was underlined in the *A. mellifera* and *C. quinquefasciatus* sequences. The region containing the Animal haem peroxidase domain (pfam03098) is marked in grey. Asterisks, colons and dots represent identical amino acid residues, strong- and weak-conservative substitutions, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0020513.g002

temporal pattern in the Western blots is similar to the *AmelTwdl1* transcriptional pattern. The *AmelTwdl1* protein appears in the thoracic integument soon after apolysis in the Pdp phase, where it is abundant, and it remains at a high level in the next Pb phase, but then decreases gradually in the subsequent pharate adult phases (Pbl, Pbm and Pbd) (Figure 3C). A similar *AmelTwdl1* expression profile was detected in the abdominal integument of the same developmental phases (data not shown).

AmelTwdl2 expression

The expression pattern of *AmelTwdl2* during the pupal-to-adult molt is similar to that observed for *AmelTwdl1*, although the differences in transcript levels among the developmental phases as detected by RT-PCR are not as striking. The level of *AmelTwdl2* transcripts in the thoracic integument is low during pupal development (Pw and Pp phases), increases in the earlier phase of the pharate adult development (Pdp) and remains high up to the penultimate pharate adult phase (Pbm) but then decreases in the last pharate adult phase (Pbd) (Figure 3D, upper panel). A similar pattern was observed in the abdominal and wing integuments (Figure 3D, middle and lower panels).

Ampxd expression

The expression of *Ampxd* increases in the whole body during the early pharate adult phase (Pdp) and is maintained at a high level during the subsequent Pb and Pbl pharate adult phases and then the expression decreases in the final pharate adult phases (Pbm and Pbd) (Figure 3E, upper panel). A similar temporal expression pattern was observed using the wings as the RNA source, but with a slight delay in the onset of high expression to the Pb phase (Figure 3E, intermediate panel). The activity profile of the potential AmPXD enzyme was also tested using a specific substrate. The peroxidase activity (Figure 3F) matched the pattern of the *Ampxd* transcript (Figure 3E, upper panel), suggesting that the enzyme is the product of *Ampxd*.

Ecdysteroid titers versus expression profiles of the tweedle and peroxidase genes

By contrasting the gene expression profiles (Figure 3B–F) with the changing hemolymph ecdysteroid titer that coordinates the pupal-to-adult molt (Figure 3A), we observed that the transition from low to high levels of transcripts and proteins occurred as the ecdysteroid titer was decreasing from the peak that triggers apolysis (in the Pp phase). This comparative analysis suggests that the expression of the genes *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* is activated by this pulse of ecdysteroids for the subsequent formation of the adult cuticle, which occurs as the hormone titer decreases during the pharate adult development. The decreased expression in late pharate adults (Pbd), which are ready to ecdyse to the adult stage, coincides with the advanced process of cuticle differentiation, as seen by its intense pigmentation and sclerotization.

The transcriptional profiles shown in Figure 3 were corroborated by the results obtained by real time RT-PCR analysis using RNA samples from thoracic integuments. Figure 4 shows very low levels of the three transcript types in the pupal (Pw) thoracic integument, but the expression is significantly higher in the middle of the pharate adult development (Pbl phase), and subsequently

decreases at the end of this period (Pbd phase). The levels of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts were 15-, 18.6- and 45.5-fold higher, respectively, in the thoracic integument from Pbl pharate adults than in the integument from Pw pupae.

Expression in different tissues

Real-time RT-PCR was used to quantify the levels of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts in the gut and trachea, and the expression in these tissues was compared to the expression in the thoracic integument. The levels of *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* transcripts were significantly higher in the gut than in the thoracic integument (6.6- and 7.2-fold, respectively) and trachea (27.3- and 12.1-fold, respectively). In contrast, *Ampxd* showed the higher expression in the thoracic integument, with 7.8- and 2.2-fold higher transcript levels than in the gut and trachea, respectively (Figure 5).

Down regulation of the tweedle and peroxidase genes in ligated abdomens

The amounts of the *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts did not increase in the integument of ligated abdomens as they did in intact abdomens, at least up to the fifth day after ligation (Figure 6). By impairing the flow of hemolymph, and consequently of ecdysteroids, to the abdomen, the ligation also temporarily impaired the increase in the abdominal levels of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts. This result suggests that abdominal exposure to the ecdysteroid peak that induces apolysis (see Figure 3) is critical for the increase in the levels of all of these transcripts in pharate adults. This result also reinforces the fact that *Ampxd* encodes a genuine cuticular peroxidase involved in cuticle sclerotization, which, like the CP genes studied here, depends on the ecdysteroid pulse for maximal activity.

However, the suppression of gene expression in the integument of ligated abdomens was transient, with a clear increase in transcript levels observed on the sixth day after ligation. This intriguing result could be explained by the hypothetical existence of a secondary source of ecdysteroids in the abdomen that would induce the expression of these genes on the sixth day (see the last item of the Discussion section).

Discussion

Structural features and expression patterns of *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* are consistent with roles in the formation of exoskeleton and other cuticles

The study of a mutation that affects *D. melanogaster* body shape led Guan *et al.* [49] to identify a new class of CPs, named Tweedle. Using one of these proteins (TweedleD) as a query, these authors identified Tweedle sequences in different insect genomes, including the honey bee genome. The alignment of these sequences has highlighted the four conserved blocks of amino acids that now define the Tweedle CP family (see Fig. 4 in [49]).

A consensus seems to exist among experts in CPs that the presence of the four conserved blocks of amino acids is sufficient for inclusion in the Tweedle class, despite richness in glycine residues. In fact, Cornman and Willis [50] included the 35% glycine-enriched *AmelTwdl1* (then identified under the GenBank accession number gi:217330652) in a neighbor-joining phylogene-

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

Figure 3. Expression of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* genes during the pupal-to-adult development coordinated by ecdysteroid titer. (A) Hemolymph ecdysteroid titer redrawn from Pinto *et al.* (see ref. [59]), and the successive developmental phases in the interval between the pupal and adult ecdyses: Pw and Pp are early and late pupae; Pdp, Pb, Pbl, Pbm and Pbd are the successive pharate adult phases. (B) Transcriptional profile of *AmelTwdl1* in the thoracic, abdominal and wing integument. (C) Developmental profile of thoracic integument proteins stained with Coomassie Brilliant Blue (at the left) and the *AmelTwdl1* protein (at the right) as detected using Western blot and an antibody against a cuticle protein from *B. mori* (BmGRP2). (D) Transcriptional profile of *AmelTwdl2* in the thoracic, abdominal and wing integument. (E) Transcriptional profile of *Ampxd* in whole body extracts and wings. (F) *Ampxd* enzyme activity detected in thoracic integument samples using electrophoresis in polyacrylamide gels stained with a specific substrate. Transcript abundance was investigated by semiquantitative RT-PCR followed by electrophoresis of the amplified cDNAs in ethidium bromide-stained agarose gels. An *A. mellifera actin* gene, *Amactin*, was used as endogenous control. doi:10.1371/journal.pone.0020513.g003

netic analysis based on predicted Tweedle proteins of eight insect species. Futahashi *et al.* [51] also gave preference to the Tweedle motifs over glycine-rich characteristics and renamed the 36% glycine-enriched BmGRP2 (*B. mori* Glycine Rich Protein 2) as BmorCPT3, i.e., *B. mori* Cuticle Protein Tweedle 3. Furthermore, six *D. melanogaster* CPs containing both glycine-rich domains and the four amino acid blocks were included in the Tweedle class together with other twenty-one glycine-poor Tweedle proteins [49].

The other honey bee sequence containing the conserved Tweedle blocks was here named *AmelTwdl2* (this sequence is also included in the above-mentioned phylogenetic analysis by Cornman and Willis [50] under the GenBank accession number gi:110766924). The only two *tweedle* genes in the honey bee genome differ considerably in structure and length. In contrast to *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* does not encode a glycine-rich protein, but a protein that has many occurrences of proline, with several PP repeats. Proline richness is a characteristic of CPs classified as CPLCP (Cuticular Protein of Low Complexity, Proline-rich) [50], where proline residues occur mainly as PY and PV. *AmelTwdl2* only has one PY motif and does not have any PV motif, and therefore, by these criteria it should not be included in the CPLCP class. It is known that the amino acid composition of CPs influences the mechanical properties of cuticle, thus implying that *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* may somehow differ in their roles, but this is far from being completely understood.

Consistent with secretion by the epidermis for integration in the cuticle, N-terminal signal peptides were identified in the deduced *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* protein sequences. For *AmelTwdl1* this was confirmed by sequencing of the gene.

AmelTwdl1 and *AmelTwdl2* are expressed in the superficial integument (epidermis) covering the thorax, abdomen and wings. Both genes are up-regulated during the pharate adult development, period when synthesis and deposition of the adult cuticle take place, suggesting roles in cuticle renewal during the pupal-to-adult molt. By showing a close correspondence between *AmelTwdl1* transcript and protein profiles our data reinforce the assumption of a role in cuticle renewal. The modulated expression of the honey bee *tweedle* genes in the integument, and the findings that *tweedle* genes from *Drosophila* [49], and *B. mori* [51] are expressed in epidermis are consistent with a function in exoskeleton structuring.

We also verified that the expression of both *tweedle* genes in the honey bee integument is not exclusively linked to the formation of the adult cuticle, as these genes are similarly induced after apolysis of the larval cuticle, during the synthesis of the pupal cuticle (data not shown). The periodic expression of *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* in integument strongly suggests that their products are essential for exoskeleton formation at each molt cycle. This observation agrees with Cornman and Willis [50] data on expression levels of various *tweedle* genes during larval and pupal development of *A. gambiae*. Cornman and Willis [50] data are, in our understanding, consistent with the regulation of *tweedle* genes by ecdysteroid titer fluctuation during the succession of the molting events.

Therefore, like the majority of the CPR genes [52], the *tweedle* genes are important for exoskeleton reconstruction in the different developmental stages.

In addition of being active in epidermis, the honey bee *tweedle* genes are also expressed in other cuticle producing tissues, such as the trachea, the inner surface of which is lined by cuticle, and unexpectedly, the highest expression was detected in the gut. At least two of the *tweedle* genes of *Drosophila* (*TwdlC* and *TwdlE*) are also expressed in the foregut of late-stage embryos [49], thus evidencing a role for the Tweedle family proteins in the formation of the chitinous peritrophic membrane that lines the inner surface of the gut epithelium.

Proteins of the Tweedle family lack the R&R Consensus sequence that confers chitin-binding and cross-linking properties to the most abundant class of CPs, the CPR proteins [53]. Based on the prediction that the four blocks of amino acids in the Tweedle proteins form β -strands containing conserved aromatic residues that bind chitin, Tweedle proteins had been proposed to interact with chitin [49]. Recently, Tang *et al.* [54] confirmed this prediction by demonstrating that a Tweedle protein from *B. mori* (BmorCPT1) effectively binds chitin. Therefore, *AmelTwdl1* and *AmelTwdl2* must be part of the proteinaceous matrix that interacts with chitin to form the cuticle lining epidermis and trachea, and the gut peritrophic membrane.

***Ampxd* encodes a peroxidase with a potential role in pharate-adult cuticle sclerotization**

The oxidation of catechols to quinones for cuticle sclerotization may occur via the action of peroxidases and other enzymes [16]. Peroxidases, which are heme-containing enzymes that catalyze oxidative reactions, have been suggested to play a role in sclerotization based on the detection of specific activity in the cuticle through histochemical methods [13,55,56].

Cuticular peroxidases are believed to be secreted into the cuticle by means of an amino-terminal hydrophobic region that is cleaved by a peptidase, thus allowing exportation through the secretory pathway. However, using computer-based programs we could only find weak evidence of a candidate signal peptide in *Ampxd*. Similarly, no signal peptide has been recognized in the peroxidase of *A. aegypti*, although a signal peptide is clearly present in the *C. quinquefasciatus* peroxidase. Exceptions to the well-known mode of protein secretion dependent on a cleavable signal peptide have been reported in the literature. Some eukaryotic proteins can be efficiently secreted even if they lack a typical signal peptide [57,58]. Further studies are needed to establish the mechanisms by which *Ampxd* and the peroxidase of *A. aegypti* reach the cuticle.

Transcripts of *Ampxd* were undetectable in the integument of larvae, pupae and ecdysed adult bees (data not shown). In contrast, *Ampxd* transcripts were found in significant amounts in the sclerotizing thoracic and wing integuments and in the trachea of pharate adult bees. These temporal and spatial patterns of *Ampxd* expression strongly suggest that it plays a role in sclerotization of the definitive exoskeleton and of the cuticle lining the lumen of the adult tracheal tree.

The temporal pattern of peroxidase activity during the pupal-to-adult development of the honey bee exactly matches the expression profile of the transcript. Thus, the detected enzyme activity was tentatively assigned to the *Ampxd* gene product, but this finding requires further confirmation.

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

Figure 4. Relative quantification of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts in the thoracic integument of pupae (Pw phase) and pharate adults (Pbl and Pbd phases). The *Amp49* gene was used as endogenous control in real-time RT-PCR assays, and the relative amount of transcripts is given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Each column represents the mean of two independent integument samples. doi:10.1371/journal.pone.0020513.g004

Ecdysteroid-dependent expression of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* genes

An elevation in ecdysteroid titer in hemolymph of the honey bee pupae (Pp phase) [59] induces the detachment of the pupal cuticle and this is followed by the gradual synthesis and differentiation of the adult cuticle, which occur as the hormone titer declines [60]. Gene regulation by ecdysteroids in the context of cuticle renewal during molting and metamorphosis has been mainly described for *D.*

Figure 5. Relative quantification of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts in different tissues of the Pbl pharate adult. The *Amp49* gene was used as endogenous control in real-time RT-PCR assays. The relative amount of transcripts is given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Columns and bars represent means $\pm$ SE of three independent samples prepared with each tissue. *AmelTwdl1* transcript levels were significantly different among the tested tissues, with a higher expression in the gut ($p=0.002$). Similarly, *AmelTwdl2* showed a significantly higher expression in the gut than in integument and trachea ($p=0.010$). In contrast, *Ampxd* showed a higher expression in integument than in the other tissues ($p=0.001$). Statistical analysis was carried out with Jandel SigmaStat 3.1 software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). One Way Anova; post-hoc comparisons using Holm Sidak test $p<0.05$. Different letters above columns indicate statistical difference. doi:10.1371/journal.pone.0020513.g005

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

Figure 6. Abundance of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts in the integument of ligated (L) abdomens compared to non-ligated controls (NL). Transcript levels were investigated at days (d) 1, 2, 3, 4, 5 and 6 after the abdominal ligation of newly ecdysed pupae. Transcript levels were assessed by semiquantitative RT-PCR assays followed by electrophoresis of the amplified cDNAs in ethidium bromide stained agarose gels. The *Amactin* gene was used as endogenous control.
doi:10.1371/journal.pone.0020513.g006

melanogaster and *M. sexta* [19,61]. The activity of several CP genes requires a pulse of ecdysteroids, i.e., a rapid increase followed by a decline to basal levels. Although this mode of gene regulation does not adapt to all CP genes, it has been clearly shown not only in *Drosophila* and *M. sexta*, but also in *B. mori*, *Tenebrio molitor* [62] and for the *AmelCPR14* gene in the honey bee [36]. Most likely, these genes are effectors, or late-response genes, that indirectly respond to ecdysteroids. The genes here studied follow the same mode of regulation by ecdysteroids, as suggested by the respective expression patterns and ligation experiments. The three genes showed increased expression after the ecdysteroid peak, when the hormone titer was declining. By preventing the increase in ecdysteroid concentration in abdomen, the ligation also inhibited the natural increase of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcript levels in the abdominal integument, thus indicating that the ecdysteroid peak is critical for induction of these genes. The complete and correct formation of the adult cuticle was also prevented in the ligated abdomens, which remained non-pigmented and much less sclerotized, whereas the cuticle covering the head and thorax developed normally (see Fig. 5A in [11]). However, on the sixth day after ligation, we observed a consistent increase in the levels of the three types of transcripts in the abdominal integument. This result may be explained by assuming the existence of a secondary ecdysteroid source in the abdomen in addition to the primary source, i.e., the ecdysteroid-producing prothoracic glands. A later increase in ecdysteroid titer in ligated abdomens of *A. mellifera* was demonstrated using a radioimmunoassay [11]. Abdominal cells, most likely epidermal cells and oenocytes, were inferred to be the secondary sources of ecdysteroids. Several authors have referred to active secondary ecdysteroid sources during the late steps of insect metamorphosis when the prothoracic glands have completely or nearly completely disappeared due to programmed cell death. The existence of secondary ecdysteroid sources was also hypothesized in experiments using isolated insect body parts or explanted tissues incubated *in vitro* [18,63] and references therein). Ecdysteroids were also detected in *in vitro* incubations of fat body-adhered to cuticle, and other tissues of the adult worker honey bee [64]. We suggest that in ligated abdomens of honey bees, a late and transient release of abdominal ecdysteroids caused the increase in the

levels of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* transcripts at the sixth day after ligation.

In conclusion, by validating the predicted *tweddle* sequences and by revealing a novel gene, *Ampxd*, we contributed to expand the set of honey bee genes (*AmelCPR14* [36], *Amlac2* [11] and the three apidermin genes, *apd-1*, *apd-2* and *apd-3* [37]) that are experimentally confirmed as having a role in cuticle formation. In addition, *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* were herein characterized in terms of structure, temporal- and tissue-specific expression, and regulation by ecdysteroids. Taken together, our data highlighted the roles of these genes in the context of the ecdysteroid-coordinated pupal-to-adult molt cycle.

Supporting Information

File S1 Specific primer sequences used for sqRT-PCR, qRT-PCR, and for sequencing the *AmelTwdl1* and *Ampxd* genes. The GenBank accession number of each gene is underlined.

(DOC)

File S2 *AmelTwdl1* nucleotide sequence and translated product. Only the last nucleotides (underlined) were not validated by sequencing the cDNA. Stop codon is in red. Part of the 5'UTR (blue letters) was also confirmed by sequencing the cDNA. Signal peptide is marked with a dashed line. The sequenced cDNA was deposited in the GenBank under the accession number FJ380949.1 (ACJ38118.1 for its conceptual translation product).

(DOC)

File S3 *AmelTwdl2* nucleotide sequence and translated product. Nucleotides encoding the N-terminal region (underlined) were not validated by sequencing the cDNA. Stop codon is in red. Part of the 3'UTR (blue letters) was also confirmed by sequencing the cDNA. The deduced signal peptide is marked with a dashed line. The sequenced cDNA was deposited in the GenBank under the accession number HM481255.2 (ADK73965.2 for its conceptual translation product).

(DOC)

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

File S4 *Ampxd* nucleotide sequence and translated product. The region not validated by sequencing the gene is underlined. Stop codon is in red. Signal peptide is marked with a dashed line. The partially sequenced CDS was deposited in the GenBank under the accession number [GU785071.2](#) ([ADE45321.2](#) for its conceptual translation product). (DOC)

File S5 Characteristics of *AmelTwdl1*, *AmelTwdl2* and *Ampxd* CDSs and their respective predicted proteins. (DOC)

References

1. Hepburn HR (1985) Structure of the integument. In: Kerkut GA, Gilbert LI, eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press, pp 1–58.
2. Gorman MJ, Arakane Y (2010) Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 267–273.
3. Hiruma K, Carter MS, Riddiford LM (1995) Characterization of the dopa decarboxylase gene of *Manduca sexta* and its suppression by 20-Hydroxyecdysone. *Developmental Biology* 169: 195–209.
4. Hiruma K, Riddiford LM (2009) The molecular mechanisms of cuticular melanization: The ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 245–253.
5. Arakane Y, Dixit R, Begum K, Park Y, Specht CA, et al. (2009) Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 355–365.
6. Ashida M, Brey PT (1995) Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10698–10702.
7. Andersen SO, Peter MG, Roepstorff P (1996) Cuticular sclerotization in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113: 689–703.
8. Sugumaran M (1998) Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Advances in Insect Physiology*, Vol 27 27: 229–334.
9. Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, et al. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 29–41.
10. Dittmer NT, Gorman MJ, Kanost MR (2009) Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 596–606.
11. Elias-Neto M, Soares MP, Simoes ZL, Hanfelder K, Bitondi MM (2010) Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Insect Biochem Mol Biol* 40: 241–251.
12. Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11337–11342.
13. Hasson C, Sugumaran M (1987) Protein cross-linking by peroxidase - possible mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 5: 13–28.
14. Hopkins TL, Kramer KJ (1992) Insect Cuticle Sclerotization. *Annual Review of Entomology* 37: 273–302.
15. Andersen SO (2005) Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert LI, Latrou K, Gill S, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier Press, pp 145–170.
16. Andersen SO (2010) Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 166–178.
17. Nijhout HF (1994) *Insect Hormones*. New Jersey: Princeton University Press.
18. Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* 47: 883–916.
19. Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA (2003) Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1327–1338.
20. Nakagawa Y, Henrich VC (2009) Arthropod nuclear receptors and their role in molting. *FEBS J* 276: 6128–6157.
21. Ashburner M (1990) Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell* 61: 1–3.
22. Yao T-P, Forman BM, Jiang Z, Chertbas L, Chen JD, et al. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366: 476–479.
23. Yao Q, Zhang D, Tang B, Chen J, Chen J, et al. Identification of 20-Hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS One* 5: e14058.
24. Zinnab D, Adams ME (2005) Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: Gilbert LI, Latrou K, Gill S, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier Press, pp 1–60.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Hideki Kawasaki from Utsunomiya University (Japan) that gently provided the antibody against the *B. mori* GRP2 cuticle protein. We also thank Luiz R. Aguiar for his valuable technical assistance in the Apiary.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MPMS FAST ZLPS MMGB. Performed the experiments: MPMS FAST MEN. Analyzed the data: MPMS FAST MEN FMFN ZLPS MMGB. Wrote the paper: MMGB.

25. Fraenkel G, Hsiao C (1962) Hormonal and nervous control of tanning in the fly. *Science* 138: 27–29.
26. Fraenkel G, Hsiao C (1963) Tanning in the adult fly: a new function of neurosecretion in the brain. *Science* 141: 1057–1058.
27. Liao CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, et al. (2005) Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2820–2825.
28. Truman JW, Rountree DB, Reiss SE, Schwartz LM (1983) Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Journal of Insect Physiology* 29: 895–900.
29. Schwartz LM, Truman JW (1983) Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Biol* 99: 103–114.
30. Curtis AT, Hori M, Green JM, Wolfgang WJ, Hiruma K, et al. (1984) Ecdysteroid regulation of the onset of cuticular melanization in allatectomized and black mutant *Manduca sexta* larvae. *Journal of Insect Physiology* 30: 597–606.
31. Zulfelato MS, Bitondi MM, Simoes ZL, Hanfelder 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 Struct Dev* 29: 111–119.
32. Magkrioti GK, Spyropoulos IC, Iconomidou YA, Willis JH, Hamodrakas SJ (2004) cuticleDB: a relational database of Arthropod cuticular proteins. *BMC Bioinformatics* 5: 138.
33. Willis JH (2010) Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 189–204.
34. Rebers JE, Riddiford LM (1988) Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J Mol Biol* 203: 411–423.
35. Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931–949.
36. Soares MP, Elias-Neto M, Simoes ZL, Bitondi MM (2007) A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1272–1282.
37. Kucharski R, Maleszka J, Maleszka R (2007) Novel cuticular proteins revealed by the honey bee genome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 128–134.
38. Thompson PR, Hepburn HR (1978) Changes in chemical and mechanical properties of honeybee (*Apis mellifera adansonii* L.) cuticle during development. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 126: 257–262.
39. Andersen SO, Thompson PR, Hepburn HR (1981) Cuticular sclerotization in the honeybee (*Apis mellifera adansonii*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 145: 17–20.
40. Zhong YS, Mita K, Shimada T, Kawasaki H (2006) Glycine-rich protein genes, which encode a major component of the cuticle, have different developmental profiles from other cuticle protein genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 99–110.
41. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, et al. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944–945.
42. Michelette ERF, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431–440.
43. Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simoes ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372–385.
44. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25: 402–408.
45. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Garment FH, et al. (1983) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76–85.
46. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680–682.
47. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350–4354.
48. Binnington KC, Barrett FM (1968) Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Tissue Cell* 20: 405–419.

Ecdysteroid-Dependent Expression of Cuticle Genes

49. Guan X, Middlebrooks BW, Alexander S, Wasserman SA (2006) Mutation of TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16794–16799.
50. Cornman RS, Willis JH (2009) Annotation and analysis of low-complexity protein families of *Anopheles gambiae* that are associated with cuticle. *Insect Mol Biol* 18: 607–622.
51. Futahashi R, Okamoto S, Kawasaki H, Zhong YS, Iwanaga M, et al. (2008) Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 1138–1146.
52. Togawa T, Dunn WA, Emmons AC, Nagao J, Willis JH (2008) Developmental expression patterns of cuticular protein genes with the R&R Consensus from *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 508–519.
53. Rebers JE, Willis JH (2001) A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1083–1093.
54. Tang L, Liang J, Zhan Z, Xiang Z, He N (2010) Identification of the chitin-binding proteins from the larval proteins of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 228–234.
55. Locke M (1969) The localization of a peroxidase associated with hard cuticle formation in an insect, *Calpodex ethius* Stoll, Lepidoptera, Hesperidae. *Tissue Cell* 1: 555–574.
56. Messner B, Janda V (1991) Der Peroxidase-Nachweis in der Kutikula von *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) und *Phaenocarpa terraeosae* (Insecta, Diptera): Ein Beitrag zur Sklerotisierung der Insektenkutikula. *Zoologie Und Physiologie Der Tiere* 95: 31–37.
57. Ye RD, Wun TC, Sadler JE (1988) Mammalian protein secretion without signal peptide removal. Biosynthesis of plasminogen activator inhibitor-2 in U-937 cells. *J Biol Chem* 263: 4869–4875.
58. Revest JM, DeMeo-Booze L, Dickson C (2000) Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem* 275: 8083–8090.
59. Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MM, Simoes ZL (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J Insect Physiol* 48: 783–790.
60. Elias-Neto M, Soares MPM, Bitondi MMG (2009) Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie* 40: 29–39.
61. Hiruma K, Riddiford LM (2010) Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 56: 1390–1395.
62. Charles JP (2010) The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 205–213.
63. Lafont R, Dauphin-Villemant C, Warren JT, Rees H (2005) Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier Press. pp 125–193.
64. Yamazaki Y, Kinchi M, Takeuchi H, Kubo T (2011) Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* In Press, doi:10.1016/j.ibmb.2011.01.005.