



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA ESTUDIOS
DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MARIPOSA TROPICAL**
HELICONIUS ERATO LATIVITTA
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JOSHUÉ GIOVANNI RUIZ MOREIRA

TUTOR: PhD. CAROLINE NICOLE BACQUET PÉREZ

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, JOSHUÉ GIOVANNI RUIZ MOREIRA, con documento de identidad N° 1726955584, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 19 de septiembre de 2023



Joshué Giovanni Ruiz Moreira
1726955584

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, JOSHUÉ GIOVANNI RUIZ MOREIRA, con documento de identidad N° 1726955584, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Evaluación de genes de referencia para estudios de expresión génica en la mariposa tropical *Heliconius erato lativitta* (Lepidoptera: Nymphalidae)" de conformidad con el Art. 144 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 19 de septiembre de 2023



Joshué Giovanni Ruiz Moreira

1726955584

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Evaluación de genes de referencia para estudios de expresión génica en la mariposa tropical *Heliconius erato lativitta* (Lepidoptera: Nymphalidae), en la modalidad: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Joshué Giovanni Ruiz Moreira, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 19 de septiembre de 2023

Firma



Caroline Nicole Bacquet Pérez

1756516041

DEDICATORIA

*A la memoria de mi abuela Lastenia,
por su apoyo incondicional en mis estudios y
la inspiración para alcanzar mis metas.*

*A mis padres y hermanos,
por su guianza, colaboración y cariño.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la oportunidad de haber podido estudiar en una universidad enfocada en la sostenibilidad, con un laboratorio vivo como patio trasero para aprender de la vida, sus particularidades y como la debemos respetar. Todo este trayecto no hubiera sido posible sin las personas que Ikiam me dio la oportunidad de conocer para transitar este camino que además de brindarme conocimientos para la vida, me brindó experiencias, alegrías y amistades.

Realizar este trabajo de investigación fue principalmente gracias al aporte de la Dra. Caroline Bacquet, quien de manera desinteresada me permitió ser parte de su grupo de investigación e indudablemente gestionó los recursos necesarios para su realización. Agradezco haberme convertido en pupilo de sus enseñanzas tanto académicas como experienciales. La alegría y confianza que depositaste en mi persona, impulsó que disfrute de las experiencias, aprendizajes y desafíos que presenté. Sin lugar a duda agradezco que la tutoría de este trabajo haya sido guiada por alguien que ama profundamente la enseñanza y se preocupa por los demás.

Igualmente, no puedo dejar de agradecer a quienes acompañaron de primera mano desde el LBMB con guianza y consejos. A las técnicas de laboratorio, compañeros e incluso Estelita, permitieron que mis actividades en el laboratorio se desarrollen de manera adecuada adquiriendo experiencia y fortaleciendo un espacio de trabajo colaborativo. Agradezco a mis amigos y colegas del equipo de mariposas *Heliconius*: Paola, Gabba, Andrei y Matthew con quienes compartía y validaba información relevante. Sobre todo, agradezco el apoyo de Ángel y Leo que con su vasta experiencia, fueron un apoyo increíble para sortear las dudas y desafíos que debía resolver, ambos me han inspirado con su entusiasmo por la ciencia y la enseñanza.

Toda esta experiencia no pudo haber sido más gratificante, sin el apoyo de amigos que acompañaron de distintos enfoques. Quiero agradecer profundamente a mis amigos más cercanos con quienes sortear las vivencias universitarias resultó una aventura muy agradable, sobre todo Dayana, Emilio, Mafer, Mishelle y Ricardo.

Finamente, agradezco a mi familia por sus palabras de aliento y apoyo incondicional para que esta aventura haya sido de mucho aprendizaje. Sin duda mi muestra de agradecimiento más sincera a todos ustedes se verá reflejado en que inspire a los demás a sorprenderse con la ciencia, la naturaleza y la enseñanza.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y

RESPONSABILIDAD ii

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL iii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.. iv

DEDICATORIA v

AGRADECIMIENTOS vi

TABLA DE CONTENIDO vii

ÍNDICE DE TABLAS x

ÍNDICE DE FIGURAS xi

ÍNDICE DE ANEXOS xii

RESUMEN... xiii

ABSTRACT xiv

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes..... 1

1.1.1. Adaptación evolutiva de las especies..... 1

1.1.2. Estudios de expresión génica..... 1

1.1.3. Artrópodos, especímenes de estudio 2

1.1.4. Mariposas *Heliconius* como modelo de estudio..... 3

1.1.5. Expresión génica en *Heliconius erato lativitta* 4

1.1.6. Genes de referencia para la normalización de RT-qPCR 4

1.2. Planteamiento del problema a investigar..... 5

1.3. Justificación de la investigación..... 6

1.4. Preguntas de investigación 7

1.5. Hipótesis 7

1.6. Objetivos de la investigación 7

1.6.1. General..... 7

1.6.2.	Específicos	8
2.	CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	9
2.1.	Obtención y crianza de mariposas	9
2.2.	Tratamientos de temperatura	9
2.3.	Extracción de ARN total y construcción de la librería de ARN	10
2.4.	Estandarización e integridad de ARN.....	11
2.5.	Síntesis del ADN complementario (ADNc).....	11
2.6.	Selección de los genes de constitutivos	12
2.7.	Diseño de primers.....	12
2.8.	Extracción de ADN.....	13
2.9.	Estandarización de primers por perfil térmico.....	14
2.10.	Validación de primers por curvas de calibración.....	16
2.10.1.	Cálculo de la eficiencia de primers.....	17
2.11.	PCR en tiempo real de los genes de referencia	17
2.12.	Análisis de expresión génica.....	18
2.12.1.	Cuantificación de expresión génica absoluta	18
2.12.2.	Análisis de varianza en los genes de referencia.....	19
2.13.	Análisis de la estabilidad en los genes de referencia	20
2.13.1.	Normfinder	20
2.13.2.	GeNorm	20
2.14.	Expresión génica relativa con <i>Hsp90</i>	21
3.	CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	22
3.1.	Selección de primers y obtención del perfil térmico.....	22
3.2.	Evaluación de eficiencias de los genes de referencia	23
3.3.	Cuantificación génica absoluta (EGA)	23
3.4.	Varianza de los genes de referencia.....	25
3.5.	Análisis de la estabilidad en los genes de referencia	29
3.5.1.	Normfinder.....	29
3.5.2.	GeNorm	32

3.6.	Expresión génica relativa de <i>Hsp90</i>	34
4.	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	37
4.1.	Diseño experimental	37
4.1.1.	Ácidos nucleicos usados en el estudio	37
4.1.2.	Elección de genes de referencia y construcción de primers.....	38
4.2.	Expresión génica absoluta	39
4.3.	Análisis estadísticos de varianza.....	40
4.4.	Estabilidad de los genes de referencia	42
4.5.	Expresión génica relativa de <i>Hsp90</i>	43
4.6.	Actividades biológicas en los genes ribosomales	45
4.7.	Análisis futuros	46
5.	CONCLUSIONES	48
6.	RECOMENDACIONES	50
7.	REFERENCIAS	
8.	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros del diseño de primers para qPCR	12
Tabla 2.	Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR.....	15
Tabla 3.	Cantidades y concentraciones de los reactivos para Rt-qPCR.....	18
Tabla 4.	Lista de primers de genes de referencia.....	22
Tabla 5.	Eficiencia de los genes de referencia.....	23
Tabla 6.	Resultados del análisis de varianza GLM	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Expresión génica absoluta de los genes de referencia.	24
Figura 2.	Análisis NormFinder de los genes de referencia en relación al sexo.....	30
Figura 3.	Análisis NormFinder de los genes de referencia en tagmas.	31
Figura 4.	Análisis GeNorm de los genes de referencia en relación al sexo.	32
Figura 5.	Análisis GeNorm de los genes de referencia en relación a las tagmas. .	33
Figura 6.	EGR de <i>Hsp90</i> en ambos sexos con los genes <i>RPL3+RPS3A</i>	34
Figura 7.	EGR de <i>Hsp90</i> en ambos sexos con los genes <i>GAPDH+Tubulina 2</i>	35
Figura 8.	Expresión génica relativa de <i>Hsp90</i> comparado con <i>GAPDH</i>	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo Tabla 1.	Concentraciones de ARN extraído	6
Anexo Fig. 1.	Estandarización de la temperatura de <i>annealing</i>	8
Anexo Fig. 2.	Ejemplo de curva de calibración sobre un gen de referencia	9
Anexo Fig. 3.	Curvas de calibración y eficiencia de los genes referencia.....	9
Anexo Fig. 4.	Valor de Ct de los genes de referencia.....	10
Anexo Fig. 5.	Gráfica Q-Q de valores residuales de los genes de referencia	10
Anexo Fig. 6.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>GAPDH</i>	11
Anexo Fig. 7.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>pAbp</i>	12
Anexo Fig. 8.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>RPL3</i>	13
Anexo Fig. 9.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>REPS3A</i>	14
Anexo Fig. 10.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>Tubulina 2</i>	15
Anexo Fig. 11.	Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia <i>UCCR</i>	16

RESUMEN

Dentro de la biología evolutiva, la respuesta genética de las especies a los cambios ambientales es un tópico de creciente interés. La mariposa *Heliconius erato lativitta* se destaca en este ámbito; sin embargo, la ausencia de genes de referencia estables ha limitado los avances en los estudios de expresión génica. En este trabajo, se abordó este desafío directamente mediante la exposición de *H. e. lativitta* a tratamientos de calor y frío. Se evaluaron seis genes candidatos, y mediante análisis de varianza, expresión génica absoluta y métodos de evaluación de estabilidad, se identificó los genes más estables. Los resultados señalaron a *RPL3* y *RPS3A* como los genes más estables. Estos genes ribosomales desempeñan funciones esenciales en la síntesis de proteínas y mantuvieron una expresión constante en diferentes tejidos y tratamientos. En contraste, *GAPDH* y *Tubulina 2* mostraron menor estabilidad, posiblemente debido a su papel en procesos celulares sensibles a variaciones. La elección de genes de referencia confiables es crucial para comprender respuestas adaptativas y evolutivas frente a estreses ambientales. La aplicación de *RPL3* y *RPS3A* como genes de referencia estandarizados permitirá futuros estudios más precisos y comparables sobre expresión génica bajo condiciones de estrés térmico y análisis de diferentes tejidos y sexo. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para investigaciones evolutivas y adaptativas en *Heliconius erato lativitta* y pueden extenderse a otras especies, avanzando en la comprensión de cómo las respuestas génicas influyen en la adaptación al entorno cambiante.

Palabras clave: *Heliconius erato lativitta*, genes de referencia, expresión génica, estabilidad.

ABSTRACT

Within evolutionary biology, species' genetic responses to environmental changes are of growing interest. The butterfly *Heliconius erato lativitta* stands out in this realm; however, the absence of stable reference genes has hindered advances in gene expression studies. Addressing this challenge, we directly exposed *H. e. lativitta* to heat and cold treatments. Six candidate genes were evaluated, and through variance analysis, absolute gene expression, and stability evaluation methods, the most stable genes were identified. The results identified *RPL3* and *RPS3A* as the most stable genes. These ribosomal genes play essential roles in protein synthesis and maintained consistent expression across tissues and treatments. In contrast, *GAPDH* and *Tubulin 2* showed lower stability, possibly due to their involvement in sensitivity-sensitive cellular processes. Selecting reliable reference genes is crucial for understanding adaptive responses to environmental stresses. Applying *RPL3* and *RPS3A* as standardized reference genes will enable more precise and comparable studies on gene expression under thermal stress and across different tissues and sexes. These findings provide a robust foundation for evolutionary and adaptive investigations in *Heliconius erato lativitta*, with potential extensions to other species, advancing our understanding of how gene responses influence adaptation to changing environments.

Keywords: *Heliconius erato lativitta*, reference genes, gene expression, stability.

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Adaptación evolutiva de las especies

Los organismos vivos en la Tierra forman parte de un conjunto altamente diverso y de una historia evolutiva de miles de años que ha moldeado a cada individuo para que logren adaptarse a diferentes condiciones ambientales y que de esta manera pueda asegurarse la perpetuidad de las especies mejor adaptadas [1]. Estas especies por lo tanto han adquirido capacidades que permiten aumentar su rango de distribución e incluso generar resistencia a condiciones que para muchos organismos pueden resultar extremas. Estas capacidades adquiridas también se reflejan en las bases moleculares que determinan el funcionamiento de los organismos vivos.

Cuando nos referimos a las bases moleculares, se revela que los genes desempeñan un papel fundamental en la manera en que las especies logran adaptarse. Esto puede ser evidenciado por cambios en la expresión génica ante factores del ambiente. Experimentos como las 2,000 generaciones de *Escherichia coli* sometidas a un ambiente limitado de glucosa [2] o los llevados en organismos modelo como *Drosophila melanogaster* para analizar la expresión génica durante su ciclo de vida [3]. Indican que los organismos tienen la capacidad de regular la expresión génica por señales ambientales como la adaptación a diferentes temperaturas o disponibilidad de alimentos, además de cambios en la expresión en etapas específicas del desarrollo. Esto implica que podrían producirse modificaciones en el ADN y en las proteínas asociadas al ADN, generando así cambios en la expresión génica [4].

1.1.2. Estudios de expresión génica

La variación de la expresión génica se relaciona con la capacidad del ADN de producir ARN codificante y no codificante. El primero codifica proteínas, mientras que el segundo tiene la capacidad de controlar y regular la expresión génica [4]. Además, existen otros mecanismos regulatorios de la expresión génica que son explicados a través de la epigenética. Estos son la metilación del ADN, modificaciones de las histonas y los ARN

de interferencia, los cuales bajo diferentes condiciones pueden promover la traducción a proteínas o inactivar genes [5]. La regulación de la expresión génica involucra elementos regulatorios que permiten que los organismos respondan a diferentes condiciones según sus necesidades.

Así pues, la expresión génica representa cómo los organismos controlan y regulan el material genético a través de cascadas de procesos que codifican moléculas necesarias para procesos celulares. Los cuales permiten entender y estudiar factores en las especies como la producción de proteínas de interés, la heredabilidad de factores genéticos e incluso la respuesta a estímulos externos [6,7]. La manera de estudiar la expresión génica, puede enfocarse en el ARN por su naturaleza de codificar a proteínas, siendo una de las técnicas más empleadas para analizar genes individuales, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) [8].

La RT-qPCR permite partir de ARN mensajero transcribir a ADN complementario (ADNc) mediante una transcriptasa inversa, luego el ADNc es usado como molde para una PCR cuantitativa [9]. En el campo investigativo, esta técnica es usada en análisis de expresión génica, validación de ARN de interferencia, validación de micromatrices, pruebas genéticas, detección de patógenos e investigación de enfermedades [10]. Respecto a la expresión génica, se puede analizar cómo se expresan los genes en diferentes tejidos y ante diferentes tratamientos que pueden ser generados por factores de estrés como estrés térmico, químico, lumínico o alimenticio [11]. Estas aproximaciones permiten estudiar organismos vivos y su manera de respuesta al ambiente que los rodea, abriendo un campo investigativo amplio para estudiar especies de interés científico.

1.1.3. Artrópodos, especímenes de estudio

Los estudios de expresión génica pueden aplicarse a una variedad de organismos vivos. Estos estudios son especialmente útiles en animales con valor investigativo, ya sea debido a productos de interés, valor comercial o características evolutivas que les han permitido adaptarse a diversos ecosistemas. En consecuencia, la expresión génica puede servir como una herramienta para analizar especies ampliamente distribuidas por el planeta y conocer sus particularidades biológicas como es el caso de los artrópodos.

Los artrópodos representan el 81,5% de todas las especies animales descritas y por lo tanto son el componente más numeroso de los ecosistemas [12]. Estos animales poseen la característica de ser ectotermos, por lo que dependen de fuentes de calor externa para regular su temperatura corporal. Aunque esto parezca una desventaja para la adaptabilidad, se ha evidenciado que ciertas especies han logrado tener una amplia distribución en diferentes condiciones de temperatura y altitudes como es el caso de los Lepidópteros. Aunque esta capacidad adaptativa en ciertos artrópodos sigue siendo desconocida, se ha relacionado con factores genéticos adquiridos con el tiempo que brindan resistencia a los factores de estrés ambientales [13]. En esta perspectiva, se puede analizar a las especies en regiones de interés, donde las condiciones ambientales y geográficas han permitido una gran diversidad de especies.

Una de estas posibles zonas de interés, son las regiones tropicales de América Latina y el Caribe, donde se existe la mayor biodiversidad del planeta con especies de artrópodos que han logrado adaptarse a diferentes condiciones climáticas y aumentar su rango de distribución [14]. Realizar estudios de expresión génica sobre especies de interés en estas zonas, puede proporcionar más información de cómo los artrópodos a pesar de su sensibilidad al ambiente logran adaptarse y sobrevivir. Además, el enfoque puede ser realizado para comprender como las especies vulnerables pueden responder a desafíos ambientales como las variaciones de temperatura producto del cambio climático [13].

1.1.4. Mariposas *Heliconius* como modelo de estudio

Dentro del grupo de los artrópodos, algunas especies de lepidópteros han encontrado mecanismos para habitar diversos ecosistemas que varían en temperatura y en altitudes como el género de mariposas *Heliconius*. Estas mariposas, habitan en las regiones neotropicales de Latinoamérica y el Caribe. Varias especies del género han sido usadas como modelo de estudio para pigmentación, morfología del ala, distribución y plasticidad en la tolerancia para aliviar efectos del estrés térmico [14,15].

Más a profundidad se pueden elegir modelos animales específicos para realizar estudios de expresión génica. *Heliconius erato lativitta* es una de las especies del género con amplia distribución en el neotrópico y que ha sido estudiada en relación a su tolerancia al estrés térmico [16]. Sin embargo, aunque esta especie ha sido considerada como un

modelo en crecimiento para el estudio de sus genes y adaptación, aún hay espacio para continuar la investigación. Se requiere la estandarización de los análisis de expresión génica en la especie mediante la técnica de RT-qPCR. Esto permitiría obtener análisis confiables y reproducibles, lo que a su vez impulsaría la comprensión de los mecanismos evolutivos de esta especie y del género *Heliconius* a través del estudio de genes que estén involucrados en respuestas adaptativas. Ya que estas especies han adquirido la habilidad de adaptarse y habitar diversos ecosistemas en las regiones tropicales.

1.1.5. Expresión génica en *Heliconius erato lativitta*

El estudio de la expresión génica se vuelve fundamental para comprender las particularidades adaptativas de la especie, ya que se pueden analizar genes individuales que sean candidatos para mostrar variaciones de genes ante factores de estrés ambiental [17]. Estos genes de interés suelen ser seleccionados con base en evidencia de informes sobre especies emparentadas por familia o género, en las cuales ya se haya demostrado que ciertos genes varían en respuesta a condiciones específicas. Sin embargo, para llevar a cabo un análisis de expresión génica, se requieren genes de referencia que permitan estandarizar y medir los resultados.

1.1.6. Genes de referencia para la normalización de RT-qPCR

Los genes de referencia o genes constitutivos, están involucrados en funciones celulares basales esenciales para la existencia de una célula. Su expresión constante sirve como punto de comparación y normalización de ensayos en RT-qPCR [18]. Por lo tanto, si se requiere analizar la expresión génica en *H. e. lativitta*, se vuelve imprescindible contar con genes constitutivos con los que se pueda comparar la expresión de genes de interés [8,11].

Los genes de referencia deben también contar con parámetros específicos para la normalización de la RT-qPCR. Los genes más idóneos son los que muestran una expresión estable en todas las condiciones experimentales y las muestras analizadas. Estos sirven de estándar para ajustar los niveles de expresión de un gen de interés teniendo en cuenta las diferencias en la eficiencia de amplificación y la cantidad de ARN utilizado en la reacción de RT-qPCR [8].

A pesar de que los genes pueden tener diferentes perfiles de expresión en los tejidos de un organismo y dependiendo de la condición a la que sean expuestos, no es suficiente utilizar un solo gen de referencia. Estudios de expresión génica con un menor sesgo experimental y una mayor precisión de los resultados toman en cuenta el uso de varios genes de referencia, esto permite aumentar la precisión de la normalización verificando la estabilidad de los mismos [19].

Llevando estas particularidades de estudio sobre una especie de interés como la mariposa *H. e. lativitta*, se demuestra que al usar más genes estandarizados, se podría seleccionar los genes más idóneos para servir de referencia en ciertos tejidos, o condiciones a analizar. Esto permitiría lograr resultados precisos y confiables en estudios de expresión génica.

1.2. Planteamiento del problema a investigar

Las mariposas del género *Heliconius*, han emergido como un organismo modelo en investigaciones de expresión génica, dada su relevancia en el estudio de la biología de lepidópteros tropicales. Su capacidad para ilustrar características evolutivas y adaptativas a diversas condiciones ambientales ha impulsado su popularidad en la investigación. Sin embargo, a pesar de esta prominencia como modelo, se enfrenta a un desafío fundamental: la ausencia de genes de referencia validados representa un desafío en estos estudios. Este problema se intensifica debido a la falta de secuenciación y anotación genómica en múltiples especies de *Heliconius*, lo que dificulta la identificación de genes de interés.

La confiabilidad de los estudios de expresión génica, se basa en la estandarización de las técnicas utilizadas. En este sentido, la técnica RT-qPCR empleada para evaluar la expresión de genes de interés, requiere de la selección de genes de referencia estables que estén particularmente adaptados en las condiciones experimentales. Estos estudios son fundamentales para descifrar la regulación génica y entender su influencia en procesos como la especiación y adaptación evolutiva. [20].

En el caso particular de la especie *H. e. lativitta*, que carece de genes de referencia para estudios de expresión génica, se propone identificar genes relacionados a genes de

referencia ya reportados en otras especies. Herramientas como BLAST pueden ser útiles para localizar genes con el potencial de actuar como referencias fiables para esta especie.

Así, para profundizar en los estudios de expresión génica de *H. e. lativitta* y entender su respuesta a estreses ambientales y su diversidad genética, es imperativo examinar y validar genes de referencia previamente reportados, garantizando una eficiente normalización de la RT-qPCR.

1.3. Justificación de la investigación

H. e. lativitta desempeña un papel crucial en la comprensión de los mecanismos evolutivos que permiten a la especie adaptarse a diversas altitudes, su diversidad fenotípica e incluso la diversificación del género *Heliconius* [21–23]. Su amplia distribución en las regiones tropicales amazónicas, la coloca como un candidato ideal para analizar respuestas a desafíos ambientales. Particularmente, es relevante en áreas amenazadas por las variaciones de temperatura a causa del cambio climático, como los bosques tropicales de la Amazonía ecuatoriana [24].

Para asegurar mediciones precisas de expresión génica, es fundamental estandarizar y normalizar los métodos de RT-qPCR en *H. e. lativitta*. La estrategia de selección de genes basada en especies relacionadas como *H. numata*, *Spodoptera litura* y *Bombyx mori*, que ya han reportado genes constitutivos, resulta prometedora. Genes como la proteína de unión a poliA (*pAbp*), proteínas ribosomales L3 (*RPL3*) y S3A (*RPS3A*), *Tubulina*, Ubiquinol-citocromo c reductasa (*UCCR*), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), podrían ser candidatos clave para la normalización en *H. e. lativitta* [8].

Validar y estandarizar genes de referencia en *H. e. lativitta*, basados en investigaciones previas de especies emparentadas, mediciones confiables de los niveles de expresión génica en genes candidatos [8,11]. La adaptabilidad de estos genes a estreses específicos como los químicos, térmicos o alimenticios, o en tejidos específicos, amplía su relevancia [17]. En consecuencia, la identificación de genes de referencia adecuados, impulsará significativamente la investigación de la expresión génica para esta especie.

1.4. Preguntas de investigación

Para la presente propuesta de trabajo de investigación se han postulado las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Los genes constitutivos *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* mantendrán una expresión génica absoluta constante entre individuos machos y hembras de *H. e. lativitta*?
2. ¿Los genes constitutivos *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* mantendrán una expresión génica absoluta constante bajo las diferentes tagmas (cabeza, tórax y abdomen) de *H. e. lativitta*?
3. ¿Los genes constitutivos *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* mantendrán una expresión génica absoluta constante durante tratamientos de estrés térmico (frío y calor)?

1.5. Hipótesis

Los genes de mayor estabilidad en *H. e. lativitta* en los ensayos aplicados de tratamientos de calor y frío, tanto en ambos sexos y las diferentes tagmas analizadas: cabeza, tórax y abdomen, serán el gen ribosomal L3 y la proteína de unión a la poliA como han sido reportadas en ensayos de expresión génica realizados sobre especies de lepidópteros relacionadas al género.

1.6. Objetivos de la investigación

1.6.1. General

- Identificar la estabilidad de la expresión génica absoluta de los genes *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* para la normalización de estudios de expresión génica en *Heliconius erato lativitta*.

1.6.2. Específicos

- Evaluar a *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* como posibles genes de referencia en *H. e. lativitta* para análisis de expresión génica en PCR en tiempo real.
- Comparar la expresión génica absoluta de los genes *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* en los tratamientos de macho y hembra de *H. e. lativitta*.
- Comparar la expresión génica absoluta de los genes *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* en las tagmas cabeza, tórax y abdomen en individuos de *H. e. lativitta*.
- Comparar la expresión génica absoluta de los genes *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* sometidos a tratamientos de frío y calor en *H. e. lativitta*.
- Analizar la expresión génica relativa del gen inducible *Hsp90* con los genes que presenten mayor y menor estabilidad en *H. e. lativitta*.

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Obtención y crianza de mariposas

La recolección de las mariposas *H. e. lativitta* se realizó bajo el contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAATE-DBI-CM—2021-0176 emitido por el Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica. El área de recolección fue en el cantón Tena tomando como puntos de referencia las inmediaciones de la Universidad Ikiam (Latitud: -0.9524192758743053, Longitud: -77.8642702686959) y los sectores de Alto Tena (Latitud: -0.9378297920743162, Longitud: -77.87995720451063) y Granja Shitig (Latitud: -0.930020236936231, Longitud: -77.8768887573447).

Se recolectaron individuos en estado salvaje mediante redes entomológicas aéreas, la especie de interés fue identificada y guardada en sobres entomológicos. Estos fueron sexados, registrados, etiquetados en la zona discal del ala derecha y se colocaron en una de las jaulas del insectario científico de la Universidad Regional Amazónica Ikiam [25]. Las mariposas se alimentaron en base a una solución que contiene sucrosa 50 μ M y aproximadamente 10 g de polen con 5 mg de sal. Se suplementó periódicamente flores cortadas mantenidas en agua para asemejar un ambiente natural y se colocó la planta hospedera *Passiflora puntacta* en la cual las mariposas desovaron los huevos [26].

Los huevos que se obtuvieron fueron recolectados en recipientes separados, tras eclosionar, las larvas se alimentaron con hojas de *P. puntacta* y se las observó hasta los 28 días, tiempo aproximado donde ocurrió la metamorfosis [27]. Se identificó el sexo de cada individuo y se colocó una codificación en la zona discal del ala derecha, finalmente fueron mantenidas y alimentadas con la solución de azúcar y polen durante 2 semanas previamente a la realización de los tratamientos de temperatura.

2.2. Tratamientos de temperatura

Se seleccionaron 18 mariposas, divididas en 9 hembras y 9 machos. Sobre estas se las dividió en 3 grupos de 6 individuos (3 machos y 3 hembras) para exponerlas a una temperatura baja de 5°C en refrigeración, una temperatura alta de 40°C mediante un baño maría, y una temperatura de control de 25°C o ambiente sobre cada grupo de

mariposas. Las condiciones en los tratamientos de temperatura baja y alta fueron controladas mediante termómetros y fueron realizadas durante 60 minutos [14]. Estas temperaturas permitirán analizar si la expresión de los genes constitutivos seleccionados es estable.

Inmediatamente luego del tratamiento las mariposas fueron sacrificadas, diseccionadas y almacenadas sin alas en RNA Later (Invitrogen®) para posteriormente extraer el ARN.

2.3. Extracción de ARN total y construcción de la librería de ARN

De los individuos tratados se extrajo el ARN total de los tejidos/tagmas cabeza, tórax y abdomen mediante el kit *SV Total RNA Isolation System* de Promega® siguiendo las recomendaciones del protocolo.

Se diseccionó las 3 tagmas seleccionadas por cada individuo con ayuda de un bisturí, se las separó y colocó en microtubos de 1.5 mL donde se les añadió aproximadamente 1 mL de buffer de lisis y se maceró cada uno de los tejidos. Se separó 175 µL del lisado a los cuales se agregaron 350 µL de buffer de dilución en cada microtubo. Se incubaron los microtubos a 70 °C durante 3 minutos, se procedió a centrifugar a 13,000 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Los sobrenadantes de cada muestra fueron separados a un nuevo microtubo al que se le añadió 200 µL de etanol al 95%. Se transfirieron las mezclas a columnas de purificación que se centrifugaron a 13,000 g por un minuto y se descartó el sobrante del tubo colector. Transcurrido estos pasos se procedió a realizar el primer lavado de las columnas con 600 µL de solución de lavado y se volvió a centrifugar a 13,000 g por un minuto, volviendo a descartar el sobrante del tubo colector. A continuación, se combinaron por pipeteo 40 µL de Yellow Core Buffer, 5µL de 0.09M MgCl₂ y 5 µL de enzima DNasa para realizar la digestión del ADN genómico. Se incubaron las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la digestión con 200 µL de DNase Stop Solution y se centrifugó a 13,000 g durante 1 minuto. Se realizó dos lavados extras: uno con 600 µL de solución de lavado y el siguiente con 250 µL de la misma solución, ambas fueron centrifugadas a 13 000 g durante dos minutos. El ARN obtenido de la muestra fue eluído en un nuevo microtubo con 100 µL de agua libre de nucleasas.

El ARN total obtenido de cada muestra, fue etiquetado bajo un código único para diferenciarlos por su tagna, tratamiento y sexo (**Anexo Tabla 1.**). De cada muestra se utilizó 1 μL para cuantificar su concentración a través del espectrómetro Nanodrop ND-ONEC-W (Thermo Scientific™) usando como blanco agua libre de nucleasas. Finalmente se almacenaron las muestras en ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para la síntesis de ADNc.

2.4. Estandarización e integridad de ARN

Previamente a la síntesis de ADNc se estandarizó la librería de ARN, diluyendo las muestras con agua libre de nucleasas para estandarizarlas a $60\text{ ng}/\mu\text{L}$ en $20\text{ }\mu\text{L}$, esto con el objetivo de conseguir una concentración igual de ADNc tras las síntesis [28].

2.5. Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Se utilizó el kit de transcripción reversa GoScript® de Promega™, siguiendo el protocolo del fabricante. Primero se descongeló suavemente las muestras de ARN trabajando en tandas de 9, para evitar que las muestras pasen mucho tiempo fuera del congelador. Para la primera etapa, se mezclaron $4,5\text{ }\mu\text{L}$ de ARN (ya diluido en agua libre de nucleasas) con $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de primers Oligo dT, se preparó por igual un control negativo remplazado el ARN total por agua libre de nucleasas. En el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler de Applied Biosystems™ se incubó a 70°C durante 5 minutos, seguido de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo indefinido.

En la segunda etapa, se preparó el *master mix* de la reacción de transcripción reversa mezclado por cada reacción $7.3\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas, $4\text{ }\mu\text{L}$ de del tampón de reacción GoScript 5x, $1.2\text{ }\mu\text{L}$ de MgCl_2 25 mM, $1\text{ }\mu\text{L}$ de mezcla de nucleótidos 10 mM, $1\text{ }\mu\text{L}$ de la enzima transcriptasa reversa y $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Inhibidor de ribonucleasas 20 U. Se preparó otro control negativo sin la enzima transcriptasa reversa, aumentando la cantidad de agua libre de nucleasas a $8.3\text{ }\mu\text{L}$. Se colocó el *master mix* en cada muestra de la tanda y los 2 controles negativos, se realizó una pequeña centrifugación y se los colocó en el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) incubando con un perfil térmico de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos y $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. La librería de ADNc obtenida se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6. Selección de los genes de constitutivos

Para la selección de los genes de referencia apropiados para normalizar la RT-qPCR en *H. e. lativitta*, se seleccionaron seis genes constitutivos ya reportados en 3 especies emparentadas. En *H. numata*: *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2*, en *B. mori*: el gen *GAPDH* y en *Spodoptera litura*: *UCCR* [8]. Para aplicarlos en la especie de interés *H. e. lativitta*, se realizó una búsqueda de las secuencias de los genes en *Nucleotide* del *National Center of Biotechnology information* (NCBI). Con las secuencias obtenidas se usó la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de *The Lepidopteran Genome database* (LepBase) en donde se alineó el genoma de regiones codificantes (CDS) de *H. e. lativitta* [29,30]. De esta forma se estableció la base de datos de los CDS de los genes de referencia.

2.7. Diseño de primers

Se diseñaron los primers para PCR en tiempo real mediante el software Geneious Primers (Dotmatics®) partiendo de los CDS obtenidos de los genes de referencia y tomando en cuenta los parámetros del diseño de primers para qPCR (**Tabla 1.**).

Tabla 1. Parámetros del diseño de primers para qPCR

Longitud	18 a 30 pares de bases (pb)
Tamaño del producto	80 a 130 pb
Temperatura de melting (Tm)	55 – 60 °C
Diferencia de Tm	2 °C entre cadenas
Especificidad	1 secuencia objetivo
Contenido CG	40 - 60 % (óptimo 50%)
Terminación	1 a 3 nucleótidos C o G en las cinco bases de la cola 3'

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023. En base a Green et al. (2012) y Bustin et al. (2017) [31,32].

Finalmente, para identificar y descartar amplificación de regiones intrónicas o de ADN genómico se usó la herramienta Primer-BLAST.

2.8. Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico (ADNg) de mariposas *H. e. lativitta* colectadas en estado salvaje, este material fue utilizado posteriormente para la estandarización de primers por perfil térmico y para obtener las curvas de calibración de cada gen. La extracción se realizó mediante las especificaciones del kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN™). Se diseccionó cabeza, tórax y abdomen de dos mariposas, y se maceró cada tejido en microtubos de 1.5 mL, se etiquetó cada microtubo y se les añadió 270 µL de tampón de lisis de tejidos además de 30 µL de proteinasa K, a continuación, fueron incubados durante 3 horas a 56 °C en baño maría (WB10 de PoliScience®) y durante la incubación, cada 15 minutos se agitaron mediante vórtex.

Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos, se retiró $\frac{3}{4}$ del sobrenadante y se lo colocó en un nuevo microtubo etiquetado; el $\frac{1}{4}$ restante se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos para obtener la mayor cantidad de sobrenadante. Se adicionaron 300 µL de tampón de lisis AL y se mezcló por agitación. Se pipeteó la mitad de la mezcla previa a una columna de microcentrífuga y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto, se descartó el fluido resultante, y se repitió el proceso con la otra mitad. Se colocó la columna de centrífuga en un nuevo tubo de recolección y se le agregaron 500 µL del tampón del lavado AW1, a continuación, se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto, se descartó el fluido y el tubo de recolección. Se realizó el segundo lavado de las muestras agregando un nuevo tubo de recolección y 500 µL de tampón de lavado AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, se descartó el fluido y el tubo de recolección. Para la elución del ADN, se realizó una doble recuperación primero transfiriendo la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga etiquetado, al que se le añadió 200 µL de tampón de elución y se centrifugaron las muestras a 8,000 rpm por un minuto. Para la segunda recuperación se tomó el fluido del tubo recolector y se lo volvió a pasar por la columna en las mismas condiciones de centrifugación.

De cada muestra se utilizó 1 µL para cuantificar su concentración a través del espectrómetro Nanodrop ND-ONEC-W (Thermo Scientific™) usando como blanco agua libre de nucleasas. Finalmente se almacenaron las muestras a -20 °C.

2.9. Estandarización de primers por perfil térmico

Para la estandarización del perfil térmico de los primers se realizó una PCR convencional con el Kit de Platinum® Taq DNA Polymerase de Invitrogen™. En este proceso se obtuvo la temperatura de *annealing* experimental mediante dos etapas, la primera realizada en un gradiente de 52 a 62 °C en saltos de temperatura de 2 °C de diferencia y la segunda etapa en un gradiente con diferencia de 0.5 °C en relación al rango de temperatura que mostró las mejores bandas de amplificación de la primera etapa.

La PCR se realizó con un volumen final de 10 µL, se usó dos *pools* de ADN_g de *H. e. lativitta* por cada gradiente de temperatura, además de un control negativo para validar los resultados. El *master mix* de la PCR estuvo compuesto por los elementos descritos a continuación.

Tabla 2. Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR

Componente	Concentración inicial	Volumen 1 Rx [μL]	Concentración final
Agua libre de nucleasas	-	4.6	-
Buffer	10 X	1	1 X
dNTPs	2.5 μM/dNTP	1	0.25 μM/dNTP
Primer forward	10 μM	0.5	0.5 μM
Primer reverse	10 μM	0.5	0.5 μM
MgCl ₂	50 nM	0.3	1.5 nM
Albúmina de suero bovino (BSA)	5 μg/μL	1	0.5 μg/10μL
Platinum ® Taq enzyme	200 U	0.1	2 U
Templado de ADN	-	1	<500ng
Total	-	10	-

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

El programa para la primera etapa aplicado en el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) fue de 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de PCR, constituidos por: 95 °C por 30 segundos, el gradiente de temperaturas de annealing de 52, 54, 56, 58, 60 y 62 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos; tras los 35 ciclos se finalizó con una temperatura de 72 °C por 5 minutos. En la segunda etapa, el protocolo de la PCR se mantiene con las mismas temperaturas y tiempos de la primera, a excepción de la temperatura de *annealing* que como se mencionó previamente, toma en cuenta los 6 rangos de temperatura en saltos de 0.5 °C, en los cuales se observó las bandas con mayor consistencia en la amplificación.

Tras obtener los amplicones de las PCR, estos fueron visualizados en cámaras de electroforesis horizontal Owl™ EasyCast™ B1 de Thermo Scientific™. Se realizaron las corridas en geles de agarosa al 2%, teñidas con 5 μL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain de Invitrogen™. Para los geles se usó 4 μL de amplicón, mezclados con 3 μL de tampón de carga BlueJuice™ [2X] de Thermofisher™ por cada pocillo del gel. Se agregaron además 3 μL de estándar de peso molecular 50-1,500 pb DNA Ladder de Promega™,

mezclado con tampón de carga Orange Loading Dye 6X del mismo fabricante en proporción 1:4 respectivamente. Las condiciones de corrida de la cámara de electroforesis tras cargarla con TBE 1X, fueron de 400 mA y 70V durante 60 minutos, proporcionadas por la fuente de alimentación Owl™ EC300XL2 (Thermo Scientific™). Se procuró además cubrir con aluminio la cámara durante el proceso para asegurar la mejor actividad del SYBR™ Safe DNA Gel Stain.

Finalmente, los geles resultantes fueron retirados de las cámaras de electroforesis y revelados en el fotodocumentador Enduro™ GDS touch 1302 de Labnet™.

2.10. Validación de primers por curvas de calibración

Inicialmente se realizaron diluciones seriadas del ADN_g extraído previamente en razón 1:3, 1:9, 1:27 y 1:81, partiendo de un ADN_g de concentración inicial 30 ng/μL se obtuvo las diluciones en 10, 3.33, 1.11 y 0.37 ng/μL. La reacción se llevó a cabo en volumen de 10 μL, en triplicados para cada dilución seriada. El *master mix* de una reacción consistió en 5 μL de BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (abm®), 0.25 μL para ambos primers (*forward* y *reverse*) a una concentración de 10 μM, 1.5 μL agua libre de nucleasas, 1 μL de BSA a 5 μg/μL y finalmente el ADN_g añadido fue de 2 μL.

Las reacciones sucedieron en el termociclador en tiempo real CFX96 Touch de BIO-RAD™ bajo el siguiente protocolo: una temperatura inicial de 95 °C por 3 minutos, luego 40 ciclos compuestos de: 15 segundos a 95 °C, 15 segundos en la temperatura de *annealing* estandarizada para cada primer, 72 °C por 1 minuto y una lectura de placa por cada ciclo. Se aplicó una curva de *melting* en un rango de 55 a 95 °C con un aumento de 0.5 °C cada minuto junto con una lectura de placa. Tras obtener las lecturas de fluorescencia se usó el programa R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022) y se graficaron los valores de ciclo de umbral (Ct), en relación con el logaritmo de la concentración. Para cada primer se determinó una línea de tendencia, ecuación de la recta y valor de R².

2.10.1. Cálculo de la eficiencia de primers

De las gráficas obtenidas en R, se calculó el valor de la eficiencia en base a la pendiente de las ecuaciones de la recta de las curvas estándar de cada primer. La siguiente ecuación describe el cálculo de la eficiencia:

$$E = (10^{(\frac{-1}{m})} - 1) * 100 \text{ [33]}$$

En donde E es la eficiencia medida en porcentaje y m es la pendiente de la recta medida en $Ct/\log$ (concentración ng/ μ L).

2.11. PCR en tiempo real de los genes de referencia

A partir de la librería ADNc, se realizaron reacciones en duplicado de PCR en tiempo real con un volumen final de 10 μ L. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos MicroAmp™ (AppliedBiosystems™) con el termociclador en tiempo real CFX96 Touch (BIO-RAD™) bajo el perfil térmico aplicado en las curvas de calibración de cada gen. Las cantidades y concentraciones usadas en la PCR de tiempo real son descritas a continuación.

Tabla 3. Cantidades y concentraciones de los reactivos para Rt-qPCR

Componente	Concentración inicial	Volumen 1 Rx [μL]	Concentración final
BlasTaq™ qPCR MasterMix (abm®)	2X	5	1X
Primer forward	10 μM	0.25	0.25 μM
Primer reverse	10 μM	0.25	0.25 μM
Agua libre de nucleasas	-	2.5	-
Albúmina de suero bovino (BSA)	5 μg/μL	1	0.5 μg/10μL
Templado de ADN	-	1	<500ng
Total	-	10	-

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

Los valores de Ct proporcionados por el software CFX Maestro (BIO-RAD™) fueron recopilados para posteriormente analizar el ciclo de umbral, además se realizó un procesamiento de datos para obtener el promedio de los valores de duplicado de Ct y las desviaciones estándar por cada muestra.

2.12. Análisis de expresión génica

2.12.1. Cuantificación de expresión génica absoluta

Para la cuantificación de la expresión génica absoluta (EGA) de los genes constitutivos, se obtuvieron las curvas estándar en base a las ecuaciones resultantes en la validación de primers, esto permitió obtener la cantidad en gramos de la sección del gen amplificada por cada primer seleccionado usando la siguiente fórmula [34].

$$x = 10^{\frac{C_T - b}{-m}}$$

Donde:

- x = cantidad de amplicón [g]
- Ct = Ciclo de umbral (*treshhold line*)
- b = intersección de la recta con el eje Y
- m = pendiente de la recta

A continuación, se usó los valores obtenidos de la cantidad de amplicón para calcular el número de copias de ADN por μL .

$$\frac{\text{Copias de ADN}}{\mu\text{L}} = \frac{L \cdot x}{TA \cdot PB}$$

Donde:

- L = constante de Avogadro = $6.022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{Copias de ADN}}{\text{mol}} \right)$
- x = cantidad de amplicón (g)
- TA = tamaño del amplicón (pb)
- PB = peso molecular promedio de un par de bases $\left(\frac{660 \text{ g/mol}}{\text{pb}} \right)$

2.12.2. Análisis de varianza en los genes de referencia

Se analizó la varianza de los genes de referencia en el software R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022), tanto para los valores de copias de ADN obtenidas de la EGA. Se emplearon modelos lineales generalizados (GLMs) usando las librerías readxl (versión 1.4.1), rstatix (versión 0.7.2), ggplot2 (versión 3.4.0) y ggpubr (versión 0.5.0). Se emplearon los valores del número de copias resultante de cada gen de referencia y se los relacionó con los factores y covariables mediante función de enlace. Se realizó una prueba de normalidad de datos con Shapiro Wilk, se compararon las distribuciones de probabilidades con un gráfico Q-Q y se analizó la varianza del número de copias mediante modelos lineales generalizados.

2.13. Análisis de la estabilidad en los genes de referencia

Para determinar cuál de los genes presentan la mejor estabilidad se usaron análisis en base a los Ct de la PCR de tiempo real de los genes de referencia. Los factores analizados fue la estabilidad que presentan los genes en relación al sexo (macho y hembra) y en relación a las tagmas (abdomen, cabeza y tórax) sobre los tratamientos de frío, calor y control aplicados. En este caso se utilizó los algoritmos de Normfinder y GeNorm, bajo la herramienta RefFinder, la cual se encuentra basada en la web, desarrollada para evaluar y seleccionar genes de referencia a partir de extensos conjuntos de datos experimentales [35,36]. Una vez completado los análisis, se obtuvo un ranking de los genes de referencia según su estabilidad. Los genes con los valores de estabilidad más bajos se consideraron los más estables y se recomendaron como genes de referencia para la normalización de los datos de expresión génica en este estudio.

2.13.1. Normfinder

NormFinder, algoritmo desarrollado por Andersen et al. (2004) [37] utiliza un enfoque basado en modelos para estimar la varianza y seleccionar los genes más adecuados para la normalización. Para aplicar NormFinder, se utilizó un conjunto Ct de los genes de referencia. Se cargaron los datos RefFinder para realizar el análisis y se identificó los genes con los valores más bajos relacionados a la mayor estabilidad de NormFinder [38].

2.13.2. GeNorm

GeNorm, algoritmo desarrollado por Vandesompele et al. (2002) [3] utiliza un enfoque basado en la media geométrica de múltiples genes de referencia para estimar la estabilidad de los genes. GeNorm, igualmente se aplicó utilizando los datos de Ct de los genes de referencia. Se cargaron los datos RefFinder para realizar el análisis y se identificó los genes con los valores más bajos relacionados a la mayor estabilidad de GeNorm.

2.14. Expresión génica relativa con *Hsp90*

Para probar los genes de referencia y medir su respuesta respecto a la expresión génica relativa (EGR), se utilizó el par de genes que presentó mayor estabilidad y como comparación se realizó el mismo análisis con el par de genes que presentó la menor estabilidad en ensayos por separado. Se aplicó el método descrito por Vandesompele et al. (2002) para la obtención de la EGR mediante múltiples genes de referencia [11].

$$EGR = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{GeoMean[(E_{REF})^{\Delta Ct_{REF}}]}$$

Donde:

- E = base de la amplificación exponencial (eficiencia de la reacción)
- GOI = gen de interés
- GeoMean = media geométrica
- REF = gen de referencia
- ΔCt = diferencia de Ct

El gen seleccionado para medir la EGR, fue la proteína de choque térmico *Hsp90*, la cual ha demostrado cambios en su expresión génica tras ser inducido a tratamientos térmicos en tejidos de cabeza, tórax y abdomen, de mariposas *H. e. lativitta* [39]. Su expresión será comparada en relación a los valores del control.

3. CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Selección de primers y obtención del perfil térmico

En los genes de referencia *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* se seleccionó aquellos que presentaron las mayores coincidencias significativas en la base de datos CDS de *H. e. lativitta*. Para cada uno de los genes se diseñaron 3 pares de primers basándose en los parámetros del diseño de primers para qPCR (**Tabla 1**). Los primers sometidos a estandarizados por su perfil térmico son mostrados a continuación.

Tabla 4. Lista de primers de genes de referencia

Primer	Dirección	Secuencias 5' – 3'	Long [pb]	Tm [°C]	CG [%]	TaE [°C]	TA [pb]
F2 <i>GAPDH</i>	Forward	CTACTGCCTCAACTGGTGCA	20	60	55	59.5	122
R2 <i>GAPDH</i>	Reverse	ACTGACACATTGGCTACGGG	20	60	55		
F1pAbp	Forward	AAATTTTCAGCAGCCTGCCG	20	60	50	58	108
R1pAbp	Reverse	AGGGATGGATCTCGTTGGGA	20	60	55		
F1 <i>RPL3</i>	Forward	AAGCTGGTATGACCCACGTG	20	60	55	60.5	111
R1 <i>RPL3</i>	Reverse	CACACACCATAGGAGGCGTT	20	60	55		
F1 <i>RPS3A</i>	Forward	ATGCTGAGAGGTCTTTCCGC	20	60.1	55	59.5	132
R1 <i>RPS3A</i>	Reverse	GCGTCTGCCATTTCTTGACC	20	59.8	55		
F1 <i>Tubulina 2</i>	Forward	CAACCGGATGGACAAATGCC	20	59.8	55	54.5	86
R1 <i>Tubulina 2</i>	Reverse	CCAGCACCTGTCTCGCTAAA	20	60	55		
F1 <i>UCCR</i>	Forward	TGAAACCAGTGGTAGCGGTC	20	60	55	58	93
R1 <i>UCCR</i>	Reverse	GGGCTCCATTCAACGATTGC	20	59.9	55		

Los primers fueron sometidos a estandarización de perfil térmico. **Long**: Longitud del primer, **Tm**: Temperatura de melting teórica, **CG**: Proporción CitocinasGuaninas, **TaE**: Temperatura de annealing experimental, **TA**: Tamaño del amplicón.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

3.2. Evaluación de eficiencias de los genes de referencia

Los perfiles de temperatura de *annealing* experimental, fueron usados en las curvas de calibración de los genes de referencia (**Anexo Fig. 1.**), con lo que se obtuvo la eficiencia. Los rangos de aceptación de las curvas de calibración fueron de eficiencias de amplificación de 90 a 110% y valores de R^2 mayores a 95 [40]. A continuación, se muestran las eficiencias obtenidas.

Tabla 5. Eficiencia de los genes de referencia

Gen de referencia	Eficiencia	R^2	Pendiente	Intercepto en y	Media de Ct
<i>GAPDH</i>	98,12%	0.993	-3.368	25.234	23.473
<i>pAbp</i>	95,34%	0.996	-3.439	27.662	25.746
<i>RPL3</i>	103,70%	0.989	-3.236	24.802	23.109
<i>RPS3A</i>	102,97%	0.957	-3.253	25.686	24.114
<i>Tubulina 2</i>	94.13%	0.982	-3.471	26.266	24.451
<i>UCCR</i>	103,17 %	0.989	-3.248	25.56	23.64

Realizado: Ruiz, Joshué, 2023.

3.3. Cuantificación génica absoluta (EGA)

La cuantificación génica absoluta (EGA) muestra el número de copias de ADN (NC) de los genes de referencia seleccionados para el estudio, tras ser analizado por la RT-qPCR.

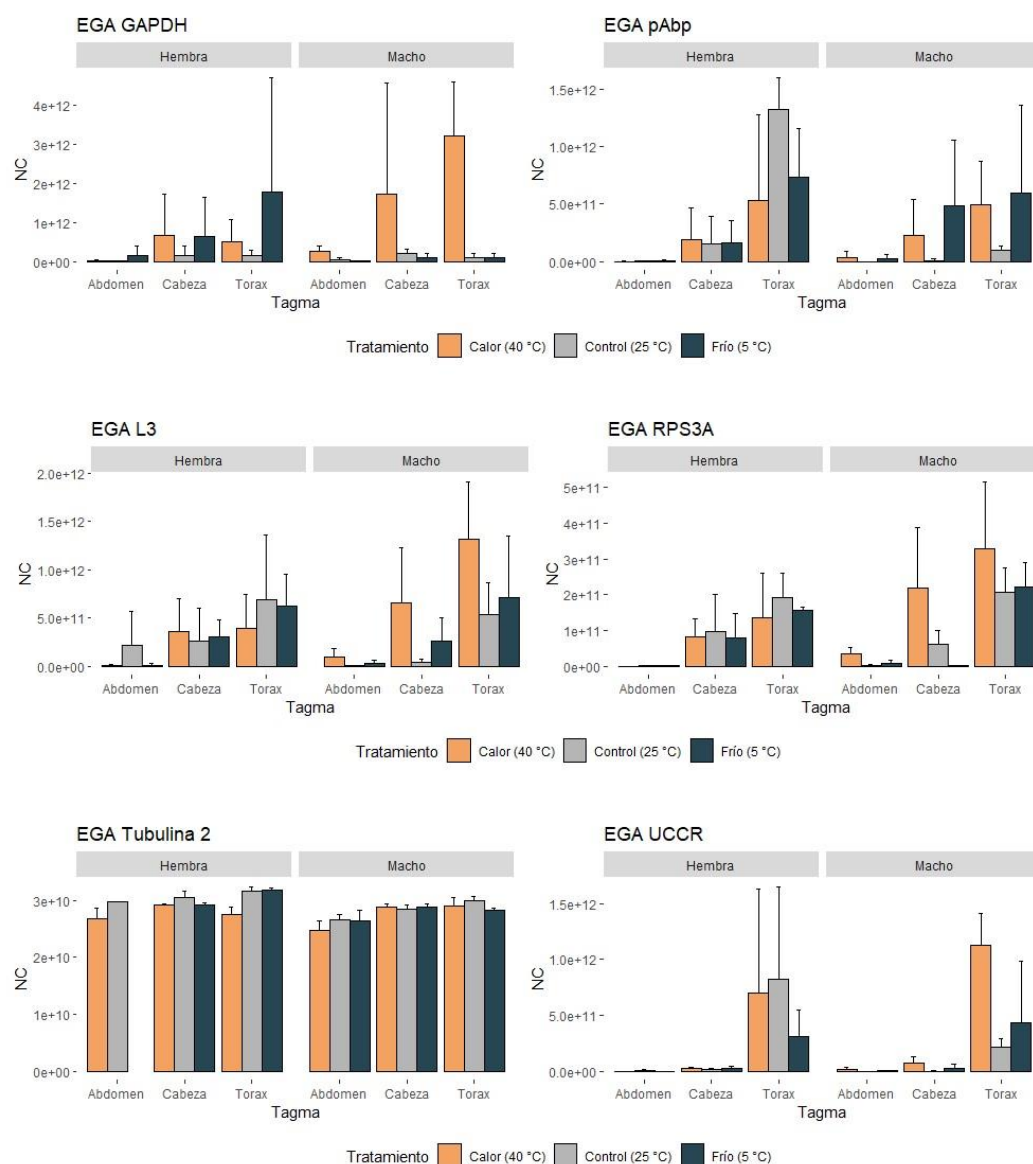


Figura 1. Expresión génica absoluta de los genes de referencia. Representada por el número de copias de ADN (NC) de los genes *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR* en las tagmas de abdomen, cabeza y tórax bajo sus 3 tratamientos.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

Los resultados obtenidos de la EGA muestran que los genes ribosomales presentan una tendencia similar en los NC obtenidas en la mayoría de las condiciones. *pAbp* y *UCCR* muestran una tendencia similar en la tagma tórax de macho y hembra. *GAPDH* y *Tubulina 2* muestra una tendencia en sus valores de NC distinta al resto de genes, en *GAPDH* hay valores más altos en los tratamientos de calor en macho que los presentados en hembra y *Tubulina 2* aunque presente valores cercanos a los controles

de los tratamientos en ambos sexos, es el gen que presenta los valores de NC más altos.

3.4. Varianza de los genes de referencia

Para todos los datos del número de copias de ADN (NC) de los genes de referencia, se aplicó la prueba de Shapiro – Wilk la cual indicó que la distribución de los datos no seguía una distribución normal. Bajo este precepto, los GLMs permitieron describir la varianza de los datos, mediante transformaciones de los datos. Se evidencia además que los valores de Ct no muestran variaciones significativas debido a que los promedios y barras de error se encuentran entre rangos de valores cercanos (**Anexo Fig. 5.**), la homogeneidad medida con el Test de Levene, demuestra que los datos siguen una distribución homogénea en sus varianzas (del **Anexo Fig. 7** al **Anexo Fig. 12**).

Las mejores combinaciones de familias de distribución y funciones de enlace de modelos de GLM se determinaron por el valor AIC (Akaike's Information Criterion) que permite encontrar el modelo con el mejor ajuste a los datos, evitando el sobreajuste de estos [41]. Además, a través del GLM en cada uno de los genes, se analizó los factores en los que existe variabilidad, tomando en cuenta el valor de significancia del 5% ($p < 0.05$). A continuación, se pueden observar cuáles fueron los valores de significancia en el análisis de varianza de los genes de referencia asociados a diferentes factores y sus combinaciones.

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza GLM de los genes de referencia

GAPDH / AIC: -781.817. Familia: gamma. Función de enlace: logit.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	2.020e-16	1.012e-16	0.699	0.504	NS
Sexo	1	2.410e-16	2.408e-16	1.663	0.205	NS
Tagma	2	1.810e-16	9.043e-17	0.625	0.541	NS
Tratamiento:Sexo	2	1.660e-16	8.308e-17	0.574	0.568	NS
Tratamiento:Tagma	4	6.720e-16	1.680e-16	1.161	0.344	NS
Sexo:Tagma	2	1.820e-16	9.090e-17	0.628	0.539	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	7.500e-16	1.875e-16	1.296	0.290	NS
pAbp / AIC: -2327.024. Familia: gamma. Función de enlace: inversa.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	9.028e+10	4.514e+10	0.531	0.5925	NS
Sexo	1	1.248e+11	1.248e+11	1.468	0.2336	NS
Tagma	2	3.324e+12	1.662e+12	19.553	1.78e-06	***
Tratamiento:Sexo	2	5.204e+11	2.602e+11	3.061	0.0592	NS
Tratamiento:Tagma	4	1.822e+11	4.556e+10	0.536	0.7102	NS
Sexo:Tagma	2	3.450e+11	1.725e+11	2.029	0.1462	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	3.186e+11	7.964e+10	0.937	0.4537	NS

RPL3 / AIC: -2443.316. Familia: gamma. Función de enlace: identidad.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	5.480e-19	2.740e-19	0.566	0.5727	NS
Sexo	1	5.320e-19	5.324e-19	1.100	0.3013	NS
Tagma	2	2.781e-18	1.390e-18	2.872	0.0696	NS
Tratamiento:Sexo	2	1.094e-18	5.471e-19	1.130	0.3341	NS
Tratamiento:Tagma	4	1.258e-18	3.145e-19	0.650	0.6308	NS
Sexo:Tagma	2	9.370e-19	4.684e-19	0.968	0.3896	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	1.930e-18	4.826e-19	0.997	0.4218	NS
RPS3A / AIC: -2330.334. Familia: gamma. Función de enlace: identidad.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	1.285e-16	6.427e-17	1.675	0.2015	NS
Sexo	1	7.210e-17	7.215e-17	1.881	0.1787	NS
Tagma	2	2.538e-16	1.269e-16	3.308	0.0480	*
Tratamiento:Sexo	2	1.847e-16	9.234e-17	2.407	0.1044	NS
Tratamiento:Tagma	4	2.689e-16	6.722e-17	1.752	0.1600	NS
Sexo:Tagma	2	1.561e-16	7.806e-17	2.035	0.1455	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	3.563e-16	8.906e-17	2.322	0.0754	NS

Tubulina 2 / AIC: -2359.139. Familia: gamma. Función de enlace: identidad.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	3.591e-23	1.795e-23	7.583	0.00224	**
Sexo	1	5.160e-23	5.160e-23	21.791	6.38e-05	***
Tagma	2	1.188e-22	5.939e-23	25.082	4.74e-07	***
Tratamiento:Sexo	2	4.920e-24	2.460e-24	1.039	0.36672	NS
Tratamiento:Tagma	4	1.285e-23	3.210e-24	1.357	0.27306	NS
Sexo:Tagma	2	1.433e-23	7.160e-24	3.025	0.06407	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	1.315e-23	4.380e-24	1.851	0.16012	NS
UCCR / AIC: -764.0854. Familia: gamma. Función de enlace: logit.						
Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
Tratamiento	2	2.170e-17	1.085e-17	1.141	0.3308	NS
Sexo	1	1.550e-17	1.553e-17	1.633	0.2095	NS
Tagma	2	8.470e-17	4.234e-17	4.452	0.0187	*
Tratamiento:Sexo	2	4.120e-17	2.060e-17	2.166	0.1294	NS
Tratamiento:Tagma	4	3.420e-17	8.540e-18	0.898	0.4754	NS
Sexo:Tagma	2	9.700e-18	4.850e-18	0.510	0.6049	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	5.440e-17	1.360e-17	1.430	0.2441	NS

p < 0.01: **, p < 0.001: ***, p < 0.0001: ****, **GL**: grados de libertad, **SumC**: suma de cuadrados corregidos, **MediaC**: media de cuadrados corregidos, **F**: estadística F, **Pr(F)**: valor de p asociado con la estadística F, **AIC**: Criterio de Información de Akaike, **NS**: no significativo.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

En pAbp y UCCR la variación es evidente en la tagma, hallándose una variación mayor en pAbp ante UCCR. En S3A hay una leve variación en el factor tagma y en tubulina 2 a pesar de presentar menor variación a través del gráfico de NC, presenta variación en los 3 factores analizados individualmente lo cual indica a que existe una menor estabilidad del gen. *RPL3* y *GAPDH* no demostraron variación en alguno de los factores analizados. Finalmente, la combinación de los factores no evidenció variación alguna, lo que indica que estos factores no influyen en los resultados

El análisis a través del gráfico Q-Q, demuestra una correcta distribución de cuantiles entre el modelo teórico y los residuos (**Anexo Fig. 6.**) A su vez, es notorio que los resultados del análisis de varianza concuerdan con la EGA de los genes.

3.5. Análisis de la estabilidad en los genes de referencia

Los resultados de los análisis de estabilidad, brindan una medida estadística que relaciona los Ct de los genes de referencia tratados, ya que entre más bajo sea el valor obtenido, indica una mejor estabilidad del gen.

3.5.1. Normfinder

En el método aplicado con el algoritmo Normfinder, se obtiene como resultado un valor S, calculado sobre la base de la variación dentro de los grupos (intragrupo) y entre los grupos (intergrupo) [42].

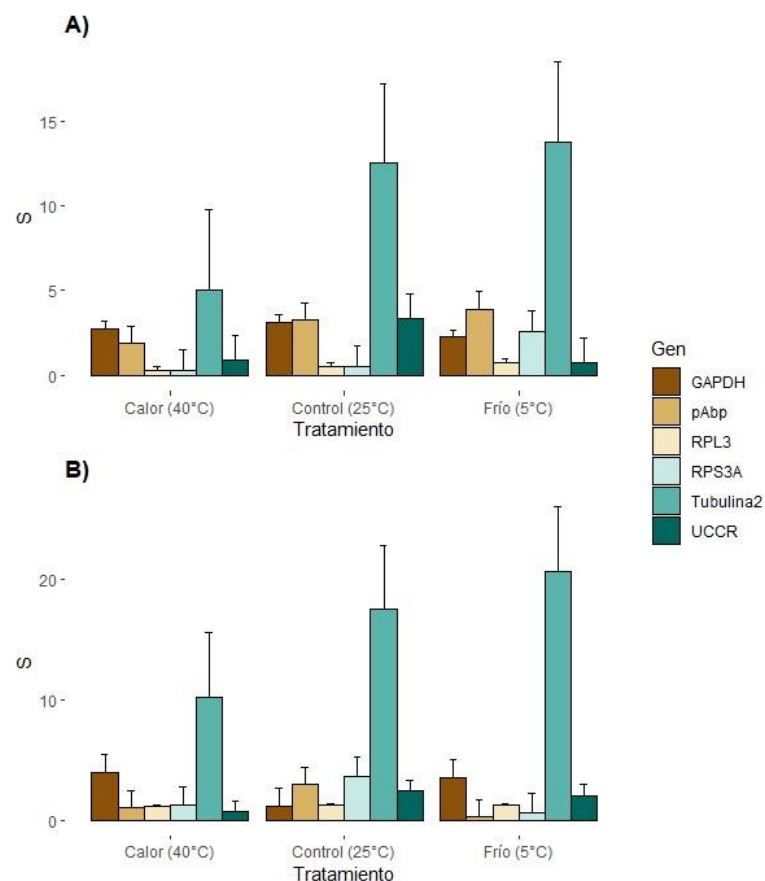


Figura 2. Análisis NormFinder de los genes de referencia en relación al sexo. Se muestran los valores de estabilidad S de los genes de referencia, en los tratamientos en macho **(A)** y los tratamientos en hembra **(B)**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023. RefFinder.

La estabilidad en los genes respecto al sexo demuestra que son más estables los genes *RPL3*, *RPS3A* y *UCCR*, siendo *RPL3* el más estable en todos los tratamientos de ambos géneros. Los genes *pAbp* y *GAPDH* muestran menor estabilidad en la mayoría de condiciones, aunque *pAbp* muestra ser estable para los tratamientos de frío y calor en hembra. *Tubulina 2* tuvo la menor estabilidad en todos los escenarios.

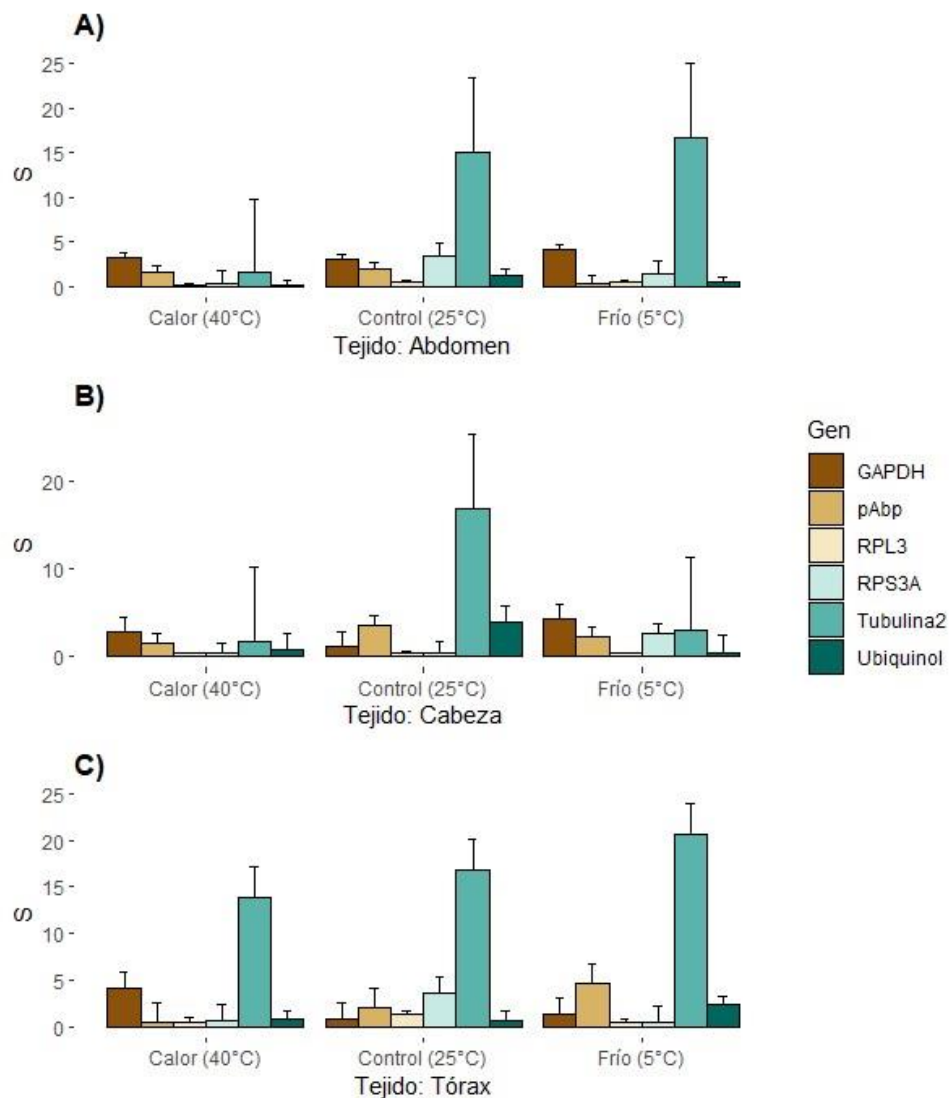


Figura 3. Análisis NormFinder de los genes de referencia en tagmas.

Se muestran los valores de estabilidad S de los genes de referencia, en los tratamientos de abdomen **(A)**, cabeza **(B)** y tórax **(C)**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023. RefFinder

Para los tratamientos aplicados sobre las 3 tagmas se evidencia una mayor estabilidad de los genes *RPL3*, *UCCR* y *RPS3A*, volviendo a presentar mayor estabilidad sobre *RPL3*. Esta misma tendencia ocurre en las tagmas de cabeza y tórax a diferencia del abdomen en donde *UCCR* es el gen más estable. *pAbp*, *GAPDH* y *Tubulina 2*, tuvieron la menor estabilidad respecto a las tagmas.

3.5.2. GeNorm

En el método de normalización del algoritmo GeNorm, se obtiene como resultado un valor M que mantiene el mismo principio de Normfinder: valores más bajos, mayor estabilidad del gen.

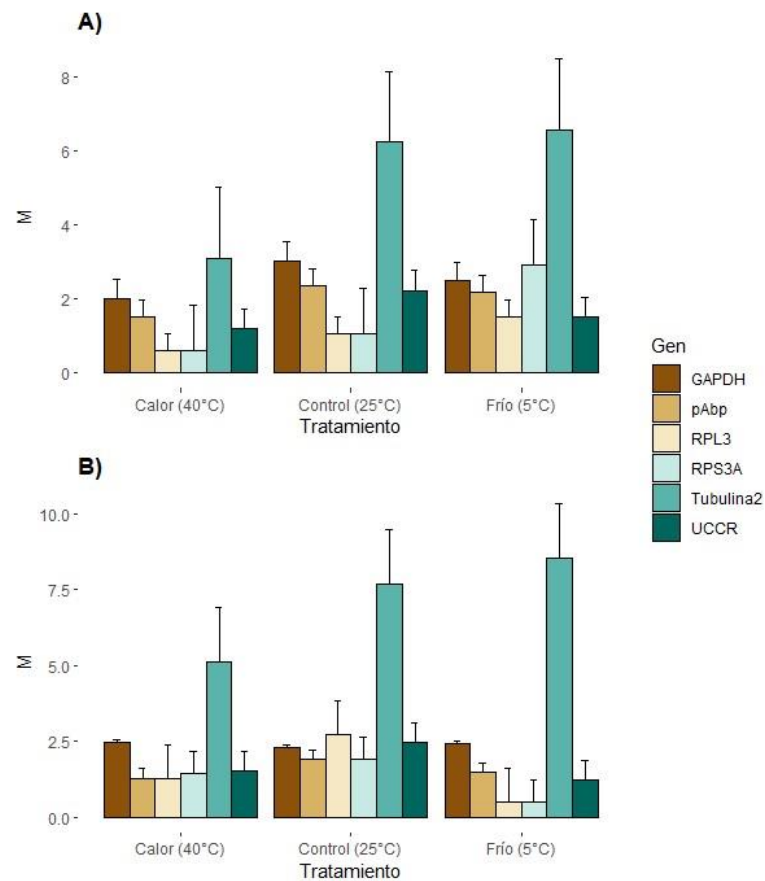


Figura 4. Análisis GeNorm de los genes de referencia en relación al sexo.

Se muestran los valores de estabilidad M de los genes de referencia, en los tratamientos en macho **(A)** y los tratamientos en hembra **(B)**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023. RetFinder.

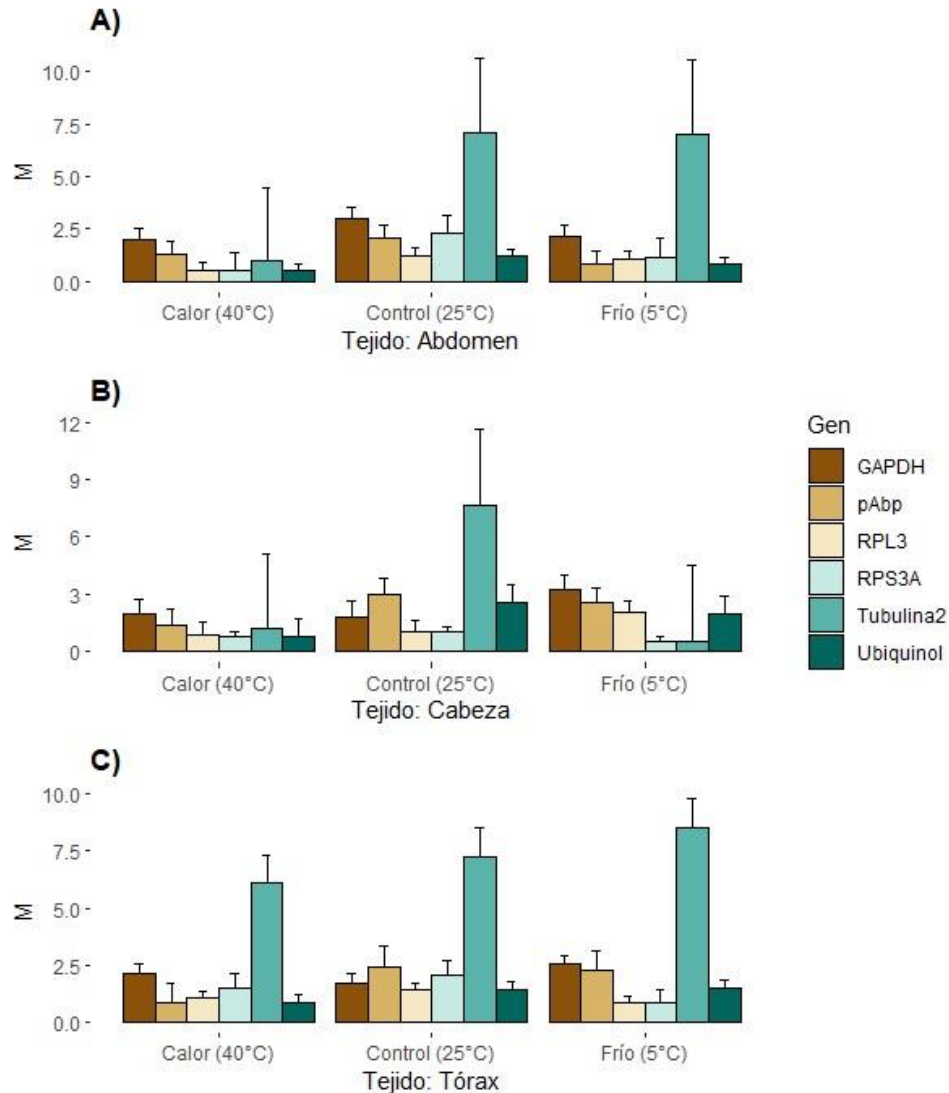


Figura 5. Análisis GeNorm de los genes de referencia en relación a las tagmas.

Se muestran los valores de estabilidad M de los genes de referencia, en los tratamientos de abdomen **(A)**, cabeza **(B)** y tórax **(C)**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023. RetFinder.

El análisis de GeNorm mostró una tendencia similar en los tratamientos respecto al sexo y a las tagmas. Los genes con la mayor estabilidad fueron también *RPL3*, *RPS3A* y *UCCR*, a diferencia de que *UCCR* fue puntuado como el gen más estable en todas las condiciones de sexo y de tagmas. En cambio, los genes *pAbp*, *GAPDH* y *Tubulina 2* fueron los menos estables, siendo estos dos últimos los que presentaron la menor estabilidad.

3.6. Expresión génica relativa de *Hsp90*

Los genes que presentaron mayor estabilidad en los análisis de GeNorm y NormFinder fueron los dos genes ribosomales *RPL3* y *RPS3A*, al contrario de *GAPDH* y *Tubulina 2* que presentaron la menor estabilidad en la mayoría de los análisis. Por lo tanto, estos genes fueron seleccionados para mostrar su respuesta en la EGR de *Hsp90*.

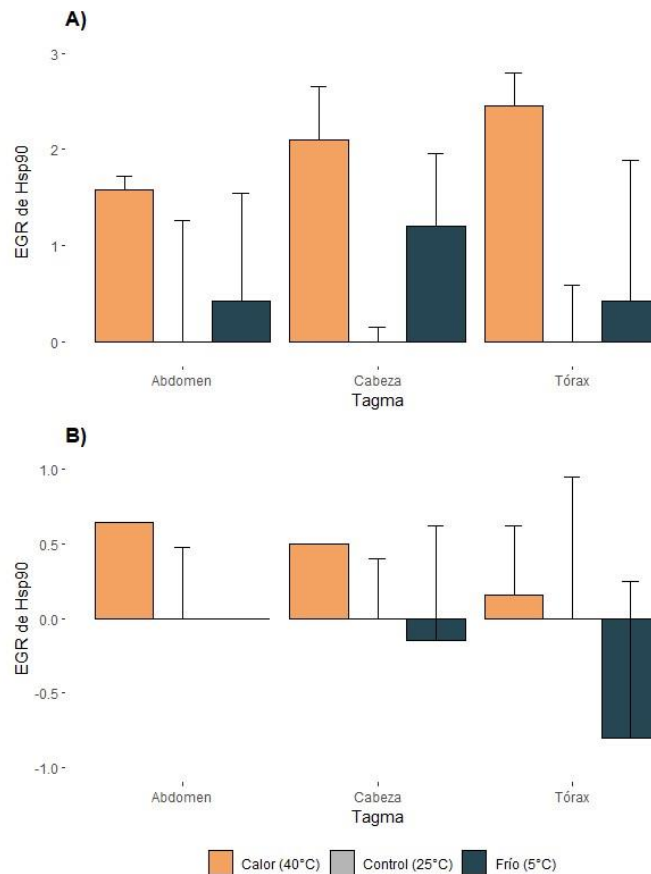


Figura 6. EGR de *Hsp90* en ambos sexos con los genes *RPL3+RPS3A*.

Se evidencia la cantidad de EGR en los tratamientos sobre el abdomen, cabeza y tórax en los individuos macho **(A)** y hembra **(B)**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

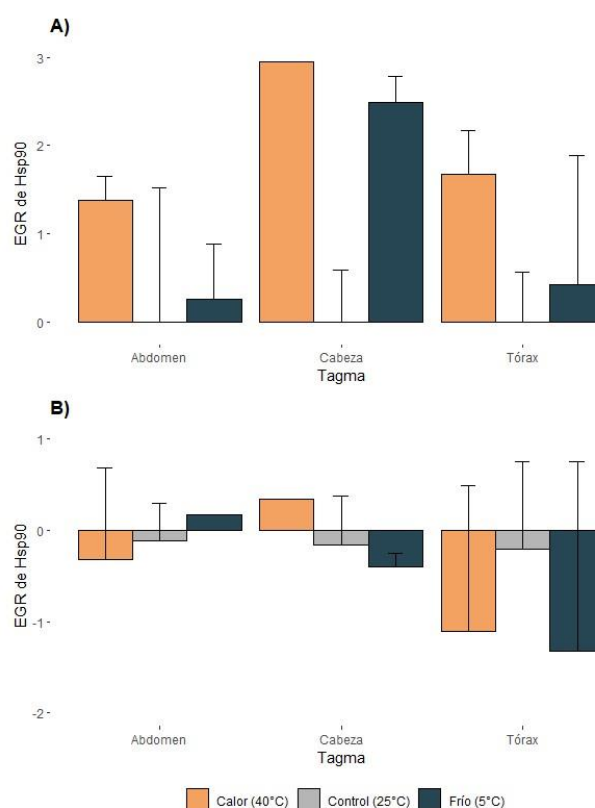


Figura 7. EGR de *Hsp90* en ambos sexos con los genes *GAPDH+Tubulina 2*.

Se evidencia la cantidad de EGR en los tratamientos sobre el abdomen, cabeza y tórax en los individuos macho (A) y hembra (B).

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

La ERG de *Hsp90* con los genes más estables (**Figura 6**) presentó sobreexpresión en las tres tagmas sometidas al calor en machos, siendo valores de EGR superiores en el tórax y la cabeza con 2.4 y 2 veces más al control, respectivamente. En el caso de las hembras, el calor vuelve a presentar sobreexpresión en abdomen y la cabeza, mientras que en los tratamientos fríos de la cabeza y el tórax, muestra una infraexpresión de -0.15 y -0.8 veces al control, respectivamente. La EGR del tratamiento frío en machos también muestra ser superior al control, pero menor a las obtenida en los tratamientos de calor.

La EGR aplicada con los genes menos estables (**Figura 7**) muestra sobreexpresiones e infraexpresiones más altas que las obtenidas con los genes más estables. En los controles de hembra hay infraexpresión y valores de EGR que difieren en la mayoría de las condiciones de la **Figura 6**. En el caso de los machos la sobreexpresión de calor en cabeza y tórax y la de frío en la cabeza, difieren de los valores de EGR obtenidos con los genes más estables.

4. CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño experimental

La estandarización de genes para estudios de expresión génica, depende de varios factores que van desde la calidad de las muestras utilizadas, el diseño-manejo de los ensayos y los procesos de validación de los mismos mediante replicados biológicos y técnicos para asegurar fiabilidad de los resultados obtenidos [43]. Así mismo, la aplicación de la técnica de RT-qPCR presenta un funcionamiento basado en la sensibilidad y facilidad de aplicar los ensayos, por lo que las consideraciones técnicas como el correcto manejo de los protocolos y filtración de los resultados obtenidos aumentan la seguridad de tener análisis estadísticos más confiables [31].

Dentro del diseño experimental aplicado, los elementos críticos que se estandarizaron y validaron bajo los parámetros aceptables descritos en la literatura científica incluyen el material genético de partida, la selección de primers y los perfiles térmicos.

4.1.1. Ácidos nucleicos usados en el estudio

La calidad de las muestras utilizadas es esencial tanto para las estandarizaciones de los perfiles térmicos como para las curvas de calibración y los ensayos. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando kits de extracción que aseguran la reproducibilidad y el manejo de múltiples muestras. De los 18 individuos seleccionados y tratados, se generó una librería de 54 muestras, distribuidas según el individuo y el tratamiento correspondiente. Además, se obtuvieron muestras adicionales de ADN para las estandarizaciones y las curvas de calibración.

Estas muestras al ser cuantificadas se validaron que se encuentren dentro de los parámetros de absorbancia aceptables: de 1.8 a 2.0 en absorbancia A260/A280, y de la absorbancia 260/230 que tenga valores cercanos o mayores a 2.0 [44,45]. Estos criterios garantizan la ausencia de contaminantes que podrían interferir con las reacciones de los ensayos y estandarizaciones. Las cuantificaciones de ARN obtenidas

mediante Nanodrop (Thermo Scientific™) demuestran que los índices de contaminación son adecuados en la mayoría de las muestras (ver **Anexo Tabla 1**).

La calidad del ARN también se confirmó durante la síntesis de la librería de ADNc, donde se evidenció la ausencia de contaminantes en los controles negativos. El control sin la enzima RT permitió descartar la contaminación de ADNg, mientras que el control sin la muestra de ARN descartó la posibilidad de contaminación cruzada [46]. Esto se probó a través de electroforesis con geles de agarosa al 2% de las muestras de ADNc sintetizadas en las que no se reflejó amplificación de bandas en los controles negativos.

En las estandarizaciones del perfil térmico y las curvas de calibración se usó ADNg como representación del genoma completo, esto puede detectar contaminación o deterioro de las muestras utilizadas [9,47]. Sin embargo, las estandarizaciones mostraron bandas consistentes en el tamaño del amplicón correspondiente a los primers, y las curvas de calibración demostraron que no existe inespecificidad, ya que solo se observaron picos únicos en las gráficas de *melting* de qPCR. Por lo tanto, el ADNg resultó ser un material de partida idóneo para obtener la eficiencia de cada uno de los primers.

4.1.2. Elección de genes de referencia y construcción de primers

La selección de genes de referencia se basó en estudios que enumeran aquellos genes comúnmente utilizados en lepidópteros para funciones de referencia en análisis de expresión génica. Las especies *H. numata*, *S. litura* y *B. mori* sirvieron como guía para identificar estos genes, y el diseño de los primers se ajustó a los parámetros recomendados para qPCR (ver **Tabla 1**) [31,32]. Se procuró seleccionar varios genes para ser probados ya que esto permite identificar los genes más estables entre varias opciones. Un factor clave en esta elección fue la preferencia por genes conservados o que desempeñan funciones básicas, manteniendo una expresión constante en distintas condiciones o tejidos individuales [48].

Por ejemplo, en *Heliconius numata*, la combinación de genes como la proteína ribosomal L3 (*RPL3*), el factor de elongación 1 alfa (*eF1 α*) y la proteína de unión a la poliA (*polyABP*) son genes adecuados para realizar estudios relacionados a variaciones fenotípicas en el patrón del color de las alas [17]. Otros estudios de expresión génica en lepidópteros también han permitido encontrar que existen diferentes genes de referencia

incluso para especies que pueden estar evolutivamente cercanas por los perfiles de expresión génica que pueden variar dependiendo el tejido o la especie [49].

Un análisis exhaustivo llevado a cabo por Lü et al. (2018), que revisó 90 investigaciones sobre la selección de genes de referencia para normalización en RT-qPCR, identificó que las proteínas ribosomales L y S, actina, tubulina y *GAPDH* son los más utilizados en estos contextos [8]. Las proteínas ribosomales se encuentran entre las más conservadas en todas las formas de vida y, en los últimos diez años, han sido ampliamente empleadas para la normalización de RT-qPCR debido a su alta estabilidad [50]. Otros genes como Tubulina basan su estabilidad en artrópodos por codificar proteínas estructurales [51], o *GAPDH* que su expresión se ha demostrado estable en tejido, sexo, fotoperíodo o tratamiento con ARN bicatenario en *Hippodamia convergens* [52].

Entre los genes seleccionados para este estudio, se encuentran *GAPDH*, *pAbp*, *RPL3*, *RPS3A*, *Tubulina 2* y *UCCR*, todos los cuales presentaron eficiencias de amplificación dentro del rango del 90 al 110%, acompañadas de valores de correlación (R^2) aceptables. Estos resultados validan su idoneidad para continuar con los análisis de RT-qPCR y evaluar su estabilidad frente a los tratamientos de frío y calor en las distintas tagmas de ambos sexos de las mariposas.

4.2. Expresión génica absoluta

La expresión génica absoluta se refiere a la cantidad real de ARNm que es sintetizado a partir de un gen específico. Esta medida proporciona información sobre la cantidad relativa de proteínas que podrían ser producidas a partir de ese gen. El análisis de la expresión génica absoluta se basa en análisis previos que fundamentan la varianza de los factores y permite entender los parámetros que influyen en las variaciones de expresión de los genes de interés [53].

Los resultados de la EGA de los 6 genes demuestran que cada gen presenta niveles distintos de ARNm sintetizado. Se observan algunas condiciones compartidas en los resultados. Por ejemplo, el tratamiento de calor en el tórax de machos muestra un mayor número de copias en los genes *GAPDH*, *RPL3*, *RPS3A* y *UCCR*. Además, en el tratamiento de frío, se observan números de copias que superan los valores de los

controles en los tórax de hembras y en el gen *pAbp* de machos. Esta elevación en la expresión podría estar relacionada con procesos de regulación génica destinados a mitigar los efectos del calor y el frío.

Los genes ribosomales *RPL3* y *RPS3A* comparten una tendencia similar en ambos sexos. Se observa un aumento en el número de copias de ADN en las tagmas de cabeza y tórax en los tratamientos de calor. Además, estos dos genes exhiben valores más altos de número de copias en el tratamiento control en los tórax de ambos sexos. Esta misma tendencia se observa en el gen *UCCR*, donde el control de hembras presenta un mayor número de copias que los tratamientos. Por otro lado, el gen *Tubulina 2* muestra los valores más altos de número de copias en los tratamientos de ambos sexos.

En el caso de *GAPDH* en machos, los tratamientos parecen seguir la tendencia de una mayor expresión en los tratamientos de calor en las tagmas. Sin embargo, en hembras, esta tendencia cambia, mostrando una mayor expresión en los tratamientos fríos en las tagmas. Esto sugiere que los mecanismos de expresión génica en cada individuo podrían responder de manera inversa según el contexto.

Al analizar los valores de número de copias que se asemejan y son cercanos a los controles, se insinúa una expresión del ARNm estable. Este patrón se observa en genes como *RPL3*, *RPS3A* y *UCCR*, que presentan números de copias significativamente similares a los controles y no exhiben valores elevados como los observados en *Tubulina 2*.

4.3. Análisis estadísticos de varianza

La estabilidad de los genes seleccionados en diversas condiciones puede verse influida por el estado de desarrollo o los distintos tejidos donde una proteína se expresa. Por lo tanto, es crucial analizar la variabilidad estadística para identificar en qué condiciones los genes son más estables, considerando que la expresión génica puede variar según el contexto experimental.

Los análisis de varianza (ANOVA) permiten comparar diferentes grupos y determinar si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Dado que los datos obtenidos no seguían una distribución normal, se emplearon modelos lineales

generalizados (GLM) para analizar la varianza. Los GLM son apropiados para modelar variables de respuesta que no se distribuyen normalmente, como binomiales, de Poisson o gamma. Además, permiten seleccionar funciones de enlace adecuadas para relacionar las variables explicativas con la variable de respuesta de manera precisa y flexible [54].

Por ejemplo, los GLM se han empleado en análisis de asociación genética de poblaciones para variables que no cumplen con la normalidad, como el recuento de glóbulos blancos. Su ventaja radica en la posibilidad de considerar covariables como edad, género e índice de masa corporal [55]. Del mismo modo, la aplicación de estos modelos a los ensayos realizados nos permitió analizar la expresión génica absoluta, teniendo en cuenta covariables como tratamientos, tagmas y sexos de las mariposas.

Para la correcta realización de los GLM, sobre los valores de EGA se aplicó una transformación inversa ($1/\text{número de copias}$) a todos los genes a excepción de GAPDH que se le realizó una doble transformación ($\sqrt{1/NC}$), la familia de distribución fue gamma, mientras que las funciones de enlace variaron para cada gen. Esto permitió aproximar los residuos a una distribución normal (ver **Anexo Fig. 6.**) e identificar que el modelo teórico se ajusta más a los datos.

La mayor varianza en los datos de número de copias se observó en *Tubulina 2*, que mostró diferencias significativas en los valores de sexo ($p = 6.38 \times 10^{-5}$), tagma ($p = 4.74 \times 10^{-7}$), y tratamiento ($p = 0.00224$). Tubulina es una proteína estructural esencial que compone los microtúbulos, una parte crucial del citoesqueleto. Los microtúbulos experimentan cambios estructurales constantes durante la división celular, el movimiento celular e incluso en condiciones de estrés [56,57]. La respuesta del citoesqueleto podría ser la razón detrás de la mayor variabilidad en los factores observada en *Tubulina 2*.

Por otro lado, se encontró variabilidad en función del factor tagma. El gen que mostró mayor variabilidad en relación con este factor fue *pAbp* ($p = 1.78 \times 10^{-6}$), seguido en menor medida de *UCCR* ($p = 0.0187$) y *RPS3A* ($p = 0.0480$). Esta variación puede atribuirse a la expresión variable que presentan los genes según el tejido donde se analizan. Si bien este factor puede influir en la variabilidad de *pAbp*, esto se debe en parte a su papel fundamental en la síntesis y estabilidad del ARNm. *pAbp* codifica la proteína de unión a

la poli(A), cuya expresión puede ajustarse en función de las necesidades de regulación de la síntesis de proteínas, dando lugar a expresiones más pronunciadas en ciertos tejidos [58].

Los resultados de la EGA también demuestran estar en línea con los análisis de varianza realizados en los genes de referencia propuestos. Estos análisis mostraron que solo los genes *RPL3* y *GAPDH* no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). En contraste, los genes con varianzas estadísticamente significativas fueron *Tubulina 2* y *pAbp*. No obstante, la varianza observada en *RPS3A* está cerca del límite de confianza ($p = 0.0480$), lo que podría considerarse una diferencia significativa leve.

4.4. Estabilidad de los genes de referencia

La utilización de RefFinder simplifica el proceso de analizar la estabilidad de los genes de referencia basándose en los valores de Ct. RefFinder, al ser una plataforma de libre acceso y de fácil aplicación, ha ganado popularidad en estudios de estandarización de genes tanto en especies animales como vegetales [59]. Los resultados proporcionados por esta plataforma evidenciaron los genes más estables en los diversos escenarios de tratamientos por sexo y tagma.

Los dos análisis de estabilidad aplicados utilizan enfoques ligeramente distintos para evaluar la estabilidad de los genes de referencia, ofreciendo información valiosa sobre los genes más apropiados para normalizar los datos de expresión génica. Tanto GeNorm como NormFinder asignan puntuaciones a cada gen, siendo los valores más bajos indicativos de mayor estabilidad. La diferencia más significativa radica en que GeNorm evalúa la variación en la expresión de los genes de referencia en relación con los otros genes de referencia dentro del mismo conjunto de muestras [11], mientras que NormFinder considera la estabilidad de los genes de referencia a partir de las diferencias en sus niveles de expresión entre las muestras y las condiciones experimentales (tratamientos de calor y frío en relación al sexo y la tagma) [37].

El análisis de estabilidad en relación al sexo reveló que para ambos sexos, los genes más estables son *RPL3* y *RPS3A*. Esto podría estar relacionado con sus funciones biológicas, que conllevan una expresión constante en una variedad de condiciones celulares. Asimismo, el gen *pAbp* demostró ser estable en los diferentes tratamientos

en hembras, especialmente bajo la perspectiva de NormFinder, lo que sugiere estabilidad en distintas condiciones experimentales.

Los análisis con relación a la tagma indican que los genes más estables bajo ambos análisis son *RPL3*, *UCCR* y *RPS3A*. En este contexto, *UCCR* podría denotar una expresión constante, dado que el gen está asociado a procesos metabólicos. Es plausible que su expresión se regule de manera uniforme para garantizar un funcionamiento óptimo de la maquinaria celular en diversos tejidos [60].

4.5. Expresión génica relativa de *Hsp90*

Los genes de mayor estabilidad obtenidos hasta este punto permiten normalizar o ajustar los niveles de expresión de un gen de interés en función de un gen de referencia o genes de referencia. Esto posibilita la eliminación o reducción del efecto de variaciones técnicas o biológicas en los datos de expresión, permitiendo una comparación y análisis más adecuado de las diferencias en la expresión génica entre muestras o condiciones experimentales [61]. En consecuencia, la identificación de genes de referencia estables conlleva a obtener datos de EGR más confiables.

La EGR de un gen de interés se calcula en relación con la expresión de los genes de referencia, proporcionando una medida relativa de la expresión del gen en cuestión. Numerosos estudios han enfatizado la necesidad de utilizar al menos dos genes de referencia validados para lograr una normalización adecuada en análisis de expresión génica [62]. Por lo tanto, en este estudio se optó por medir la expresión génica relativa utilizando *RPL3* y *RPS3A* como los genes más estables, mientras que *GAPDH* y *Tubulina 2*, identificados como menos estables, se utilizaron para medir su impacto en la normalización.

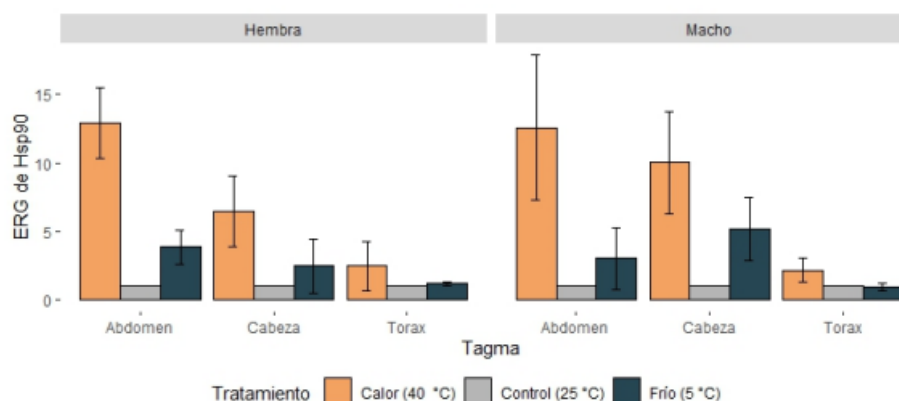


Figura 8. Expresión génica relativa de *Hsp90* comparado con *GAPDH*.

Se muestra la cantidad de EGR en los tratamientos sobre el abdomen, cabeza y tórax en los individuos macho (A) y hembra (B).

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023 [39].

El análisis de EGR realizado en el estudio de Ojeda (2023) se basó únicamente en el uso de *GAPDH* como gen de referencia para medir la expresión relativa de *Hsp90* (Figura 8.). En comparación con los resultados obtenidos utilizando los genes de referencia más estables, se observa que la expresión muestra cierta similitud en las tagmas de cabeza y abdomen en hembras, con una sobreexpresión evidente en los tratamientos de calor (Figura 6.). Sin embargo, los valores de EGR con relación al control y los resultados obtenidos en machos presentan discrepancias respecto a los resultados obtenidos mediante el uso de los genes de referencia más estables.

Este contraste demuestra que la EGR puede manifestar un comportamiento diferente cuando se emplean genes de mayor estabilidad. La estabilidad observada en el gen *GAPDH* en este estudio fue una de las más bajas, lo que puede explicar por qué su uso como gen de referencia en la EGR bajo las condiciones aplicadas genera resultados distintos. En contraste, la aplicación de *RPL3* y *RPS3A*, genes que demostraron una mayor estabilidad en las condiciones experimentales, conduce a un patrón de EGR diferente.

Esta estabilidad menor en *GAPDH* puede deberse a que se encuentra relacionada a vías metabólicas esenciales en la producción de energía que depende de estímulos celulares y condiciones fisiológicas [63]. Cabe mencionar que *GAPDH* sigue siendo un gen ampliamente utilizado como gen de referencia ya que ha demostrado estabilidad en ciertos estudios de expresión génica en artrópodos [8].

Es importante resaltar que los resultados de la EGR en hembras son coherentes con factores biológicos que inducen respuestas ante los estreses a los que los individuos son sometidos. La sobreexpresión de *Hsp90* en la cabeza y el abdomen podría relacionarse con la necesidad de proteger los órganos sensoriales y los órganos digestivos y reproductivos en el abdomen [39,64,65]. Por otro lado, los resultados de la EGR en machos presentan diferencias significativas, lo que requiere análisis más profundos para comprender la respuesta de *Hsp90* en las tres tagmas.

Por otra parte, el uso de los genes de referencia menos estables para la normalización de la EGR resulta en una expresión apenas perceptible en la mayoría de las condiciones o en casos de una sobreexpresión notable, como se evidencia en el tratamiento de calor en la cabeza de los machos o el tratamiento de frío en el abdomen de las hembras. El uso inadecuado de genes de referencia normalizados puede tener un impacto profundo en las conclusiones extraídas de los estudios de expresión génica. Por lo tanto, la utilización de varios genes de referencia estandarizados confiere mayor confiabilidad a los resultados y se alinea mejor con las respuestas biológicas de los genes en cuestión [62].

4.6. Actividades biológicas en los genes ribosomales

A lo largo de los análisis de estabilidad de los genes, ha sido posible identificar comportamientos más consistentes en ciertos genes, los cuales están estrechamente relacionados con los resultados obtenidos en términos de varianza y EGA. Estos patrones podrían estar íntimamente vinculados con las funciones biológicas que desempeñan los genes en lepidópteros y, en general, en los artrópodos.

Las proteínas ribosomales desempeñan un papel crucial en la síntesis de proteínas en todos los organismos. Los genes de referencia más estables en este estudio forman parte de este grupo de genes altamente conservados, que tienden a mostrar expresiones constantes debido a sus funciones fundamentales, tales como la síntesis de proteínas, la regulación de la traducción y el mantenimiento celular [66].

RPL3, una proteína ribosomal de gran tamaño, es esencial para la formación y estabilidad del ribosoma. Desempeña un papel crucial en la unión al ARN ribosomal,

contribuyendo al ensamblaje adecuado de la subunidad mayor del ribosoma. Por otro lado, *RPS3A*, una proteína ribosomal de menor tamaño, participa en el reconocimiento y la unión al codón de inicio del ARNm durante la formación del complejo de iniciación, marcando el comienzo de la traducción. Además, facilita la interacción entre el ARNm y los ARN de transferencia (ARNt) [66,67].

Estas características subrayan que la estabilidad de los genes *RPL3* y *RPS3A* podría estar intrínsecamente ligada a sus funciones biológicas esenciales en el proceso de síntesis de proteínas. La expresión constante y estable de ambos genes ribosomales en diversos tratamientos, ya sea de frío, calor o control, refleja su importancia vital. Variaciones drásticas en los niveles de expresión de estos genes podrían tener efectos adversos en las funciones celulares y en la síntesis de proteínas, la cual es necesaria para el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis [68].

4.7. Análisis futuros

La información recopilada en este estudio resalta la utilidad continua de los genes de referencia en la exploración de las funciones epigenéticas y adaptativas en el género de mariposas *Heliconius* en respuesta a estreses ambientales. Sin embargo, también sugiere la necesidad de ampliar el alcance de la investigación al incluir variables adicionales, que podrían influir en las expresiones génicas y brindar un panorama más completo.

En este contexto, se presenta la oportunidad de contribuir significativamente en áreas como la comprensión de la adaptación de las especies. Mediante la comparación de genes de referencia constantemente expresados y estables, es posible obtener una medida más precisa de los cambios relativos en la expresión génica en diversas condiciones o entre diferentes especies [69].

Este avance en la investigación podría arrojar luz sobre la plasticidad genética de las especies en respuesta a condiciones desafiantes como la adaptación a la altitud o estreses ambientales. Los estreses ambientales también pueden ser medidos más a profundidad, observando su respuesta en la expresión bajo periodos de tiempo más prolongados. Un ejemplo de esto, es el estudio del cambio de patrones de la metilación

del ADN en abejas melíferas tras 24 horas de inhibición del aprendizaje [70], acercamiento que puede ser aplicado en las mariposas de interés.

De igual forma se puede analizar otros tipos de estrés como el químico, fotoperiodo, pesticidas, inanición y falta de oxígeno, en diferentes etapas del desarrollo. Estos estreses pueden brindar información relevante de la adaptación al comparar la respuesta del estrés en individuos adaptados a condiciones como la altitud. Esto sucede en varias especies de *Heliconius*, que presentan dimorfismo sexual y diferencias en la forma del ala, asociados a la altitud a la que están adaptadas, ya que hay especies que habitan desde los 500 hasta los 1200 msnm [14,15]. Analizar si los estreses afectan de manera diferente en las especies con variaciones fenotípicas, permitiría elucidar la forma en que las especies logran adaptarse a través de su expresión génica.

Tras obtener esta información, se puede tener el potencial de informar enfoques tanto para la conservación de las especies como para el entendimiento de su desarrollo evolutivo [71,72].

5. CONCLUSIONES

El presente estudio ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de la estabilidad de los genes de referencia en la mariposa *Heliconius erato lativitta* en respuesta a distintos tratamientos de calor y frío en diferentes tagmas y sexos. La elección adecuada de genes de referencia es de vital importancia en los estudios de expresión génica, ya que permite la normalización de los datos y la obtención de resultados más confiables y precisos. A través de análisis rigurosos, se han identificado los genes más estables que pueden ser utilizados con confianza en futuros estudios de expresión génica en esta especie.

Los resultados obtenidos revelan que los genes ribosomales *RPL3* y *RPS3A* son los más estables en las condiciones experimentales analizadas. Estos genes desempeñan roles esenciales en la síntesis de proteínas y el ensamblaje del ribosoma, lo que sugiere que su expresión está altamente conservada y constante en diferentes tejidos y bajo distintos tratamientos. La estabilidad de estos genes se corrobora mediante análisis de varianza, expresión génica absoluta y métodos de evaluación de estabilidad como GeNorm y NormFinder.

En contraste, los genes *pAbp* y *UCCR* también presentaron niveles de estabilidad en ciertas condiciones. Por otro lado, *GAPDH* y *Tubulina 2* exhibieron una menor estabilidad en general, lo que podría estar relacionado con su participación en vías metabólicas y procesos celulares que son más sensibles a las variaciones en las condiciones experimentales.

Es importante mencionar que aunque los genes *UCCR*, *pAbp* y *GAPDH* mostraron niveles de estabilidad menores que los genes ribosomales, no se descarta totalmente la posibilidad de usarlos como genes de referencia. *UCCR* demostró estabilidad al ser analizada sobre la tigma sobre todo en las condiciones de frío y control. *pAbp* demostró estabilidad una similar a *RPS3A* en los análisis NormFinder de los tratamientos asociados al sexo. *GAPDH* en cambio, a pesar de tener menor estabilidad, sus valores no se alejan tanto de los genes más estables como lo ocurrido en la mayoría de los casos con *Tubulina 2*. Además, *GAPDH* no demostró diferencias significativas en los análisis de varianza, lo que representa que su uso como gen de referencia, también es

aceptable. Bajo estas condiciones se puede usar la combinación de estos genes de referencia junto a los ribosomales para normalizar la expresión génica.

La selección y validación de estos genes de referencia estables no solo contribuyen al estudio específico de la mariposa *H. e. lativitta*, sino que también tienen implicaciones más amplias. La utilización de genes de referencia confiables es esencial para comprender los mecanismos genéticos subyacentes a las respuestas adaptativas y evolutivas de las especies frente a estreses ambientales. Al utilizar estos genes de referencia estandarizados en futuros estudios, se podrán obtener datos más precisos y comparables sobre la expresión génica en diferentes condiciones y tejidos. Esto permitirá un análisis más profundo de cómo las respuestas génicas contribuyen a la adaptación y evolución de la mariposa *H. e. lativitta* en su entorno cambiante.

En resumen, este estudio ha proporcionado una base sólida para la selección de genes de referencia estables en *H. e. lativitta* y ha demostrado su importancia en la investigación de aspectos evolutivos y adaptativos en esta especie. La identificación de genes de referencia confiables permitirá avances significativos en la comprensión de cómo las mariposas enfrentan los desafíos ambientales y cómo estas respuestas contribuyen a su éxito evolutivo en un mundo cambiante.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda la evaluación cuidadosa de los genes de referencia en diferentes estados de desarrollo de *H. e. lativitta*, así como en diferentes condiciones ambientales, como variaciones de temperatura y humedad. Esto permitiría comprender mejor la respuesta de la mariposa a estreses ambientales y garantizar la comparabilidad de los resultados entre diferentes estudios. Además, se sugiere la utilización de múltiples genes de referencia en estudios de expresión génica en *H. e. lativitta*, para aumentar la precisión de los resultados y reducir la posibilidad de interpretaciones erróneas. Se recomienda la estandarización de los genes de referencia en futuros estudios de expresión génica en esta especie, para garantizar la comparabilidad de los resultados entre diferentes estudios. En general, la aplicación de los resultados de este estudio en futuros estudios de adaptación de *H. e. lativitta* podría ser útil para comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen a la adaptación de este género de mariposas a diferentes condiciones ambientales.

7. REFERENCIAS

1. Cornwallis CK, van 't Padje A, Ellers J, Klein M, Jackson R, Kiers ET, et al. Symbioses shape feeding niches and diversification across insects. *Nat Ecol Evol.* 2023;7: 1022–1044. doi:10.1038/s41559-023-02058-0
2. Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *Am Nat.* 1991;138: 1315–1341. Available: <http://www.jstor.org/stable/2462549>
3. Arbeitman MN, Furlong EEM, Imam F, Johnson E, Null BH, Baker BS, et al. Gene Expression During the Life Cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* (1979). 2002;297: 2270–2275. doi:10.1126/science.1072152
4. CRICK F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature.* 1970;227: 561–563. doi:10.1038/227561a0
5. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447: 396–398. doi:10.1038/nature05913
6. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961;3: 318–356. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
7. Ray JCJ, Tabor JJ, Igoshin OA. Non-transcriptional regulatory processes shape transcriptional network dynamics. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9: 817–828. doi:10.1038/nrmicro2667
8. Lü J, Yang C, Zhang Y, Pan H. Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review. *Front Physiol.* 2018;9. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01560>
9. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50: S1–S5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
10. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27: 95–125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
11. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3: research0034.1. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
12. Brusca RC, Moore W, Shuster SM. *Invertebrates*. 3rd Edition. Sunderland, Massachusetts USA: Sinauer Associates, Inc.; 2016.
13. Woods HA, Dillon ME, Pincebourde S. The roles of microclimatic diversity and of behavior in mediating the responses of ectotherms to climate change. *J Therm Biol.* 2015;54: 86–97. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.10.002>
14. Montejo-Kovacevich G, Martin SH, Meier JI, Bacquet CN, Monllor M, Jiggins CD, et al. Microclimate buffering and thermal tolerance across elevations in a tropical butterfly. *Journal of Experimental Biology.* 2020;223: jeb220426. doi:10.1242/jeb.220426
15. Montejo-Kovacevich G, Salazar PA, Smith SH, Gavilanes K, Bacquet CN, Chan YF, et al. Genomics of altitude-associated wing shape in two tropical butterflies. *Mol Ecol.* 2021;30: 6387–6402. doi:<https://doi.org/10.1111/mec.16067>

16. Tsai C-C, Childers RA, Nan Shi N, Ren C, Pelaez JN, Bernard GD, et al. Physical and behavioral adaptations to prevent overheating of the living wings of butterflies. *Nat Commun.* 2020;11: 551. doi:10.1038/s41467-020-14408-8
17. Piron Prunier F, Chouteau M, Whibley A, Joron M, Llaurens V. Selection of Valid Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Analysis in *Heliconius numata* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Science.* 2016;16: 50. doi:10.1093/jisesa/iew034
18. Moein S, Javanmard S, Abedi M, Izadpanahi M, Gheisari Y. Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells. *Adv Biomed Res.* 2017;6: 15. doi:10.4103/2277-9175.200790
19. Sharath Chandra G, Asokan R, Manamohan M, Krishna Kumar NK, Sita T. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Mol Biol.* 2014;48: 813–822. doi:10.1134/S0026893314060156
20. Romero IG, Ruvinsky I, Gilad Y. Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2012;13: 505–516. doi:10.1038/nrg3229
21. Van Belleghem SM, Lewis JJ, Rivera ES, Papa R. *Heliconius* butterflies: a window into the evolution and development of diversity. *Curr Opin Genet Dev.* 2021;69: 72–81. doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.01.010
22. Montejo-Kovacevich G, Meier JI, Bacquet CN, Warren IA, Chan YF, Kucka M, et al. Repeated genetic adaptation to altitude in two tropical butterflies. *Nat Commun.* 2022;13: 4676. doi:10.1038/s41467-022-32316-x
23. Counterman BA, Araujo-Perez F, Hines HM, Baxter SW, Morrison CM, Lindstrom DP, et al. Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in *Heliconius erato*. Nachman MW, editor. *PLoS Genet.* 2010;6: e1000796. doi:10.1371/journal.pgen.1000796
24. Gatti L V., Cunha CL, Marani L, Cassol HLG, Messias CG, Arai E, et al. Increased Amazon carbon emissions mainly from decline in law enforcement. *Nature* 2023. 2023; 1–6. doi:10.1038/s41586-023-06390-0
25. James DG, James TS, Seymour L, Kappen L, Russell T, Harryman B, et al. Citizen Scientist Tagging Reveals Destinations of Migrating Monarch Butterflies, *Danaus plexippus* (L.) from the Pacific Northwest. *The Journal of the Lepidopterists' Society.* 2018;72: 127–144. doi:10.18473/lepi.v72i2.a5
26. Beccaloni G, Vilorio Á, Hall S, Robinson G. Catalogue of the Hostplants of the Neotropical Butterflies/ Catálogo de las Plantas Huésped de las Mariposas Neotropicales. m3m Monografías Tercer Milenio. 2008.
27. Rodrigues D, Moreira GRP. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology.* 2002;62: 321–332. doi:10.1590/S1519-69842002000200016
28. Bustin S, Dhillon HS, Kirvell S, Greenwood C, Parker M, Shipley GL, et al. Variability of the Reverse Transcription Step: Practical Implications. *Clin Chem.* 2015;61: 202–212. doi:10.1373/clinchem.2014.230615
29. Challi RJ, Kumar S, Dasmahapatra KK, Jiggins CD, Blaxter M. Lepbase: the Lepidopteran genome database. *bioRxiv.* 2016; 056994. doi:10.1101/056994
30. Priyam A, Woodcroft BJ, Rai V, Munagala A, Moghul I, Ter F, et al. Sequenceserver: a modern graphical user interface for custom BLAST databases. *bioRxiv.* 2015; 033142. doi:10.1101/033142

31. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*. Fourth Edition. Washington DC: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
32. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*. 2017;14: 19–28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
33. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3: 9–16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
34. Sivaganesan M, Haugland RA, Chern EC, Shanks OC. Improved strategies and optimization of calibration models for real-time PCR absolute quantification. *Water Res*. 2010;44: 4726–4735. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.066>
35. Xie F, Wang J, Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct Integr Genomics*. 2023;23: 125. doi:10.1007/s10142-023-01055-7
36. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. 2012;80: 75–84. doi:10.1007/s11103-012-9885-2
37. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res*. 2004;64: 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
38. Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DLH, Orengo C, Kohl M. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics*. 2012;13: 296. doi:10.1186/1471-2164-13-296
39. Ojeda Á. Expresión génica de HSP40 y HSP90 en respuesta al estrés térmico en *Heliconius erato laticitta* (Lepidóptera: Nymphalidae). Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2023.
40. Molomjants M, Ingolfssland EC. Identification of reference genes for the normalization of retinal mRNA expression by RT-qPCR in oxygen induced retinopathy, anemia, and erythropoietin administration. Chen J, editor. *PLoS One*. 2023;18: e0284764. doi:10.1371/journal.pone.0284764
41. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974;19: 716–723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705
42. Wang M, Bhullar NK. Selection of Suitable Reference Genes for qRT-PCR Gene Expression Studies in Rice. In: Bandyopadhyay A, Thilmony R, editors. *Rice Genome Engineering and Gene Editing: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US; 2021. pp. 293–312. doi:10.1007/978-1-0716-1068-8_20
43. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010;50: 227–230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
44. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7: 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3
45. Dahm-Daphi W, Alberti J. CS. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol*. 2000;76: 67–75. doi:10.1080/095530000139023
46. Promega Corporation. GoScript™ Reverse Transcription System Technical Manual. In: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript->

reverse-transcription-system-

protocol.pdf?rev=8e451c3dd0ee4728a9f03cf95ed0313b&sc_lang=en. Sep 2018 pp. 13–14.

47. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55: 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
48. Sellamuthu G, Amin S, Bílý J, Synek J, Modlinger R, Sen MK, et al. Reference Gene Selection for Normalizing Gene Expression in *Ips Sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Under Different Experimental Conditions. *Front Physiol*. 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.752768
49. Teste M-A, Duquenne M, François JM, Parrou J-L. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol*. 2009;10: 99. doi:10.1186/1471-2199-10-99
50. Yang C, Preisser EL, Zhang H, Liu Y, Dai L, Pan H, et al. Selection of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in *Coccinella septempunctata* to Assess Un-intended Effects of RNAi Transgenic Plants. *Front Plant Sci*. 2016;7. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01672>
51. Yan X, Zhang Y, Xu K, Wang Y, Yang W. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in *tuta absoluta meyrick* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insects*. 2021;12. doi:10.3390/insects12070589
52. Pan H, Yang X, Siegfried BD, Zhou X. A Comprehensive Selection of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in a Predatory Lady Beetle, *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). Lin B, editor. *PLoS One*. 2015;10: e0125868. doi:10.1371/journal.pone.0125868
53. Dabney J, Meyer M. Length and GC-biases during sequencing library amplification: A comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries. *Biotechniques*. 2012;52: 87–94. doi:10.2144/000113809
54. Wang T, He P, Ahn KW, Wang X, Ghosh S, Laud P. A re-formulation of generalized linear mixed models to fit family data in genetic association studies. *Front Genet*. 2015;6. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00120>
55. DeVogel N, Auer PL, Manansala R, Rau A, Wang T. A unified linear mixed model for familial relatedness and population structure in genetic association studies. *Genet Epidemiol*. 2021;45: 305–315. doi:<https://doi.org/10.1002/gepi.22371>
56. Mabuchi I, Giansanti MG, Chang F. Editorial: Mechanisms of Cytokinesis in Eukaryotes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.668705>
57. Khorramnejad A, Perdomo HD, Palatini U, Bonizzoni M, Gasmi L. Cross Talk between Viruses and Insect Cells Cytoskeleton. *Viruses*. 2021;13: 1658. doi:10.3390/v13081658
58. Opyrchal M, Anderson JR, Sokoloski KJ, Wilusz CJ, Wilusz J. A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35: 1321–1334. doi:10.1016/J.IBMB.2005.08.004
59. Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC. Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. Stoecklin G, editor. *PLoS One*. 2012;7: e47510. doi:10.1371/journal.pone.0047510

60. Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, et al. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*. 2013;8: e68059. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0068059
61. Lee C, Kim J, Shin G, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2006;123: 273–280. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.014
62. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One*. 2015;10: e0141853. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0141853
63. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39: 674–679. doi:10.1111/J.1440-1681.2011.05599.X
64. Guertin MJ, Petesch SJ, Zobeck KL, Min IM, Lis JT. *Drosophila* Heat Shock System as a General Model to Investigate Transcriptional Regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75: 1–9. doi:10.1101/SQB.2010.75.039
65. Casey TM. Thermoregulation and Heat Exchange. *Adv In Insect Phys*. 1988;20: 119–146. doi:10.1016/S0065-2806(08)60024-7
66. Polymenis M. Ribosomal proteins: Mutant phenotypes by the numbers and associated gene expression changes. *Open Biol*. 2020;10. doi:10.1098/RSOB.200114/
67. Melnikov S, Manakongtreecheep K, Söll D. Revising the Structural Diversity of Ribosomal Proteins Across the Three Domains of Life. *Mol Biol Evol*. 2018;35: 1588–1598. doi:10.1093/MOLBEV/MSY021
68. Petibon C, Malik Ghulam M, Catala M, Abou Elela S. Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021;12. doi:10.1002/WRNA.1632
69. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26: 509–515. doi:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47
70. Biergans SD, Giovanni Galizia C, Reinhard J, Claudianos C. Dnmts and Tet target memory-associated genes after appetitive olfactory training in honey bees. *Scientific Reports* 2015 5:1. 2015;5: 1–15. doi:10.1038/srep16223
71. Liang J, Xu J, Xie S, Cao J, Tan B. Selection of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Normalization in Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *Turk J Fish Aquat Sci*. 2022;22. doi:10.4194/TRJFAS20646
72. Gustafsson J, Robinson J, Nielsen J, Pachter L. BUTTERFLY: addressing the pooled amplification paradox with unique molecular identifiers in single-cell RNA-seq. *Genome Biol*. 2021;22: 174. doi:10.1186/s13059-021-02386-z

8. ANEXOS

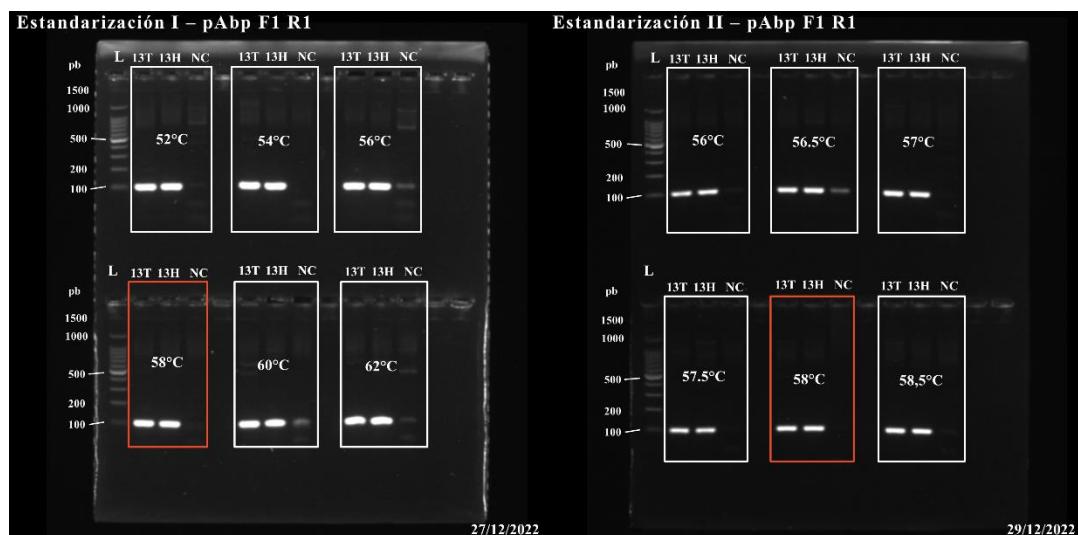
Anexo Tabla 1. Concentraciones de ARN extraído

Muestra	ID	Tagma	Tratamien to	Sexo	Con(ng/ ul)	A260/28 0	A260/23 0
1	01.H	Cabeza	Frío	Hembra	273.7	2.04	1.8
2	01.T	Tórax	Frío	Hembra	338.7	2.14	1.78
3	01.A	Abdome n	Frío	Hembra	256.9	2.04	1.82
4	02.H	Cabeza	Frío	Hembra	323.1	2.03	1.76
5	02.T	Tórax	Frío	Hembra	506.5	2.21	1.77
6	02.A	Abdome n	Frío	Hembra	209	1.22	1.45
7	03.H	Cabeza	Frío	Hembra	534.9	2.01	1.66
8	03.T	Tórax	Frío	Hembra	101.1	2.12	1.83
9	03.A	Abdome n	Frío	Hembra	167.8	1.78	1.82
10	04.H	Cabeza	Control	Hembra	37.3	1.93	1.17
11	04.T	Tórax	Control	Hembra	161.9	2.17	2.02
12	04.A	Abdome n	Control	Hembra	313	1.99	1.64
13	05.H	Cabeza	Control	Hembra	65.7	1.99	1.87
14	05.T	Tórax	Control	Hembra	85.5	2.11	1.75
15	05.A	Abdome n	Control	Hembra	419.5	2.15	1.81
16	06.H	Cabeza	Control	Hembra	81.7	1.95	0.87
17	06.T	Tórax	Control	Hembra	22.1	1.92	1.88
18	06.A	Abdome n	Control	Hembra	146.6	1.92	1.87
19	08.H	Cabeza	Frío	Macho	252.8	1.92	2.1
20	08.T	Tórax	Frío	Macho	190.6	2.19	1.98
21	08.A	Abdome n	Frío	Macho	93.3	2.08	1.55
22	09.H	Cabeza	Frío	Macho	412.5	2.09	1.76

23	09.T	Tórax	Frío	Macho	325.6	2.21	2.24
24	09.A	Abdome n	Frío	Macho	366.2	2.11	2.17
25	10.H	Cabeza	Frío	Macho	84.9	1.97	1.72
26	10.T	Tórax	Frío	Macho	85.6	2.06	1.87
27	10.A	Abdome n	Frío	Macho	122.6	1.98	1.78
28	12.H	Cabeza	Control	Macho	306.1	2.08	1.99
29	12.T	Tórax	Control	Macho	689.1	2.21	1.91
30	12.A	Abdome n	Control	Macho	142.6	1.59	1.61
31	13.H	Cabeza	Control	Macho	518.9	2.11	1.88
32	13.T	Tórax	Control	Macho	476.9	2.25	1.97
33	13.A	Abdome n	Control	Macho	251	2.13	1.65
34	14.H	Cabeza	Control	Macho	510.5	2.03	2.08
35	14.T	Tórax	Control	Macho	335.1	2.24	1.85
36	14.A	Abdome n	Control	Macho	743.4	2.19	2.01
37	17.H	Cabeza	Calor	Hembra	437.4	2.13	1.89
38	17.T	Tórax	Calor	Hembra	240.7	2.23	2.06
39	17.A	Abdome n	Calor	Hembra	235.2	2.12	2.21
40	18.H	Cabeza	Calor	Hembra	263.2	2.09	1.72
41	18.T	Tórax	Calor	Hembra	254.8	2.21	1.88
42	18.A	Abdome n	Calor	Hembra	506.1	2.05	2.22
43	19.H	Cabeza	Calor	Hembra	104	2.2	1.19
44	19.T	Tórax	Calor	Hembra	67.6	2.18	1.88
45	19.A	Abdome n	Calor	Hembra	371.9	2.19	1.69
46	23.H	Cabeza	Calor	Macho	143.1	2.19	2.28
47	23.T	Tórax	Calor	Macho	145.4	2.23	1.87
48	23.A	Abdome n	Calor	Macho	120.5	2.18	1.26

49	24.H	Cabeza	Calor	Macho	472	2.13	1.77
50	24.T	Tórax	Calor	Macho	301.6	2.22	2.01
51	24.A	Abdome n	Calor	Macho	1003.8	2.15	2.26
52	25.H	Cabeza	Calor	Macho	253.6	2.15	1.96
53	25.T	Tórax	Calor	Macho	517.4	2.24	1.83
54	25.A	Abdome n	Calor	Macho	678.9	2.16	1.73

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

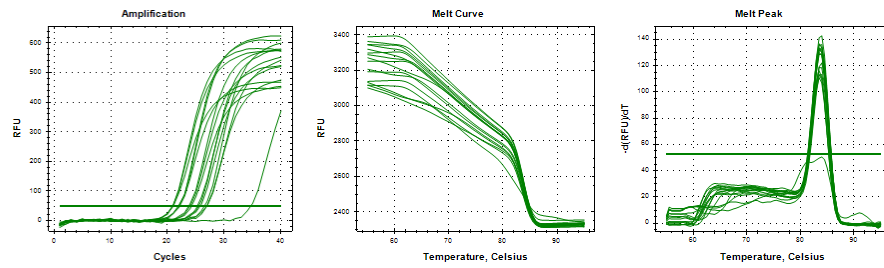


Anexo Fig. 1. Estandarización de la temperatura de *annealing*

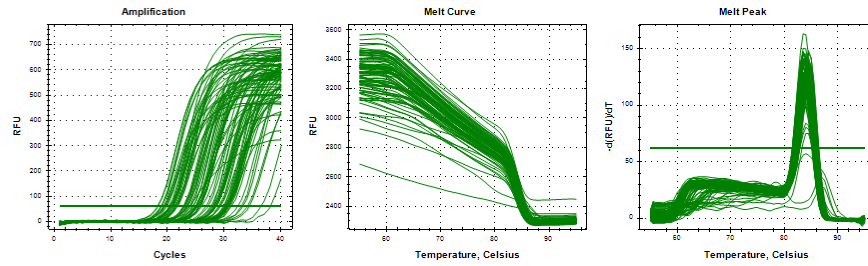
Ejemplo de uno de los genes seleccionados: *pAbp* con su primera estandarización en rango de temperatura de 52 a 62 °C (izq) y la segunda estandarización de 56 a 58.5 °C con la temperatura de *annealing* experimental escogida de 58 °C (der).

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.

A)

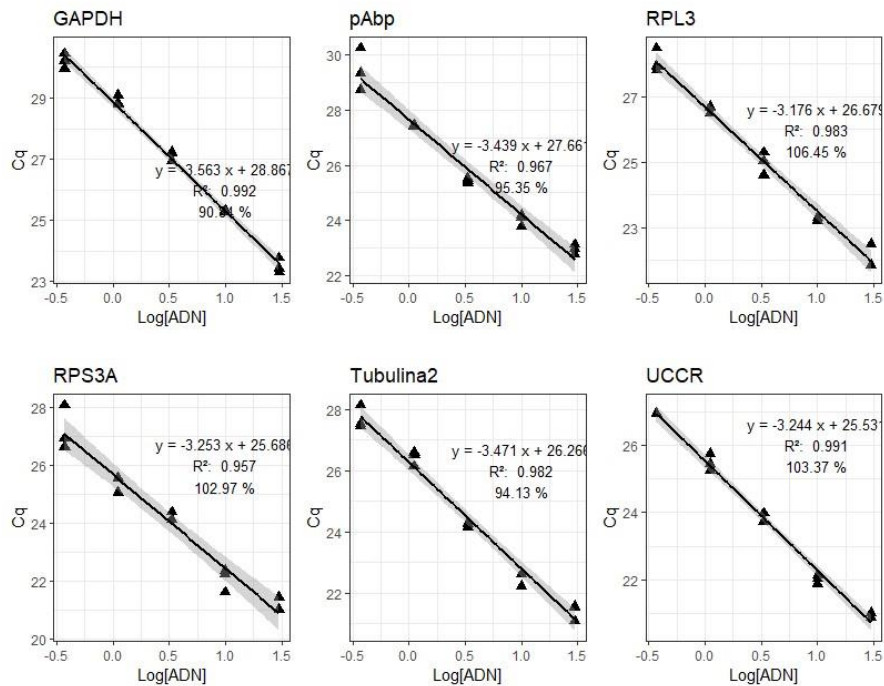


B)



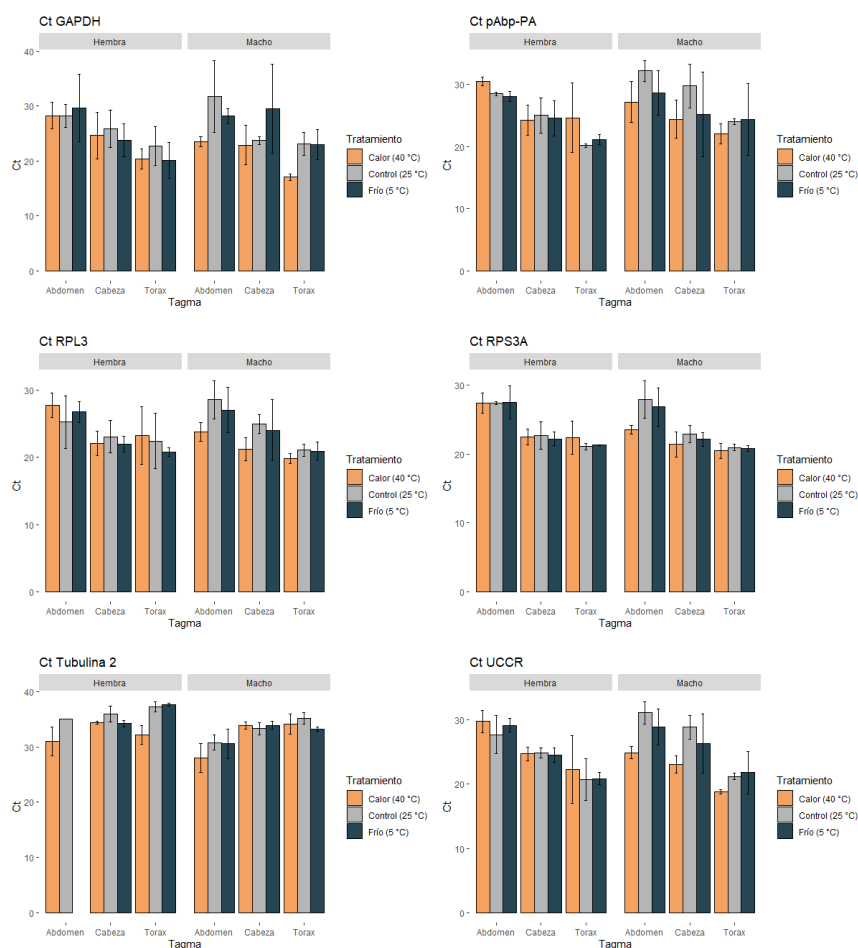
Anexo Fig. 2. Ejemplo de curva de calibración sobre un gen de referencia
Ejemplo de uno de los genes seleccionados: Ubiquinol-citocromo. En **A** se observa las curvas de amplificación bajo el gradiente de concentración, los negativos sobre el Ct 38 son descartados. En la fila **B**, ensayo de tagmas, tratamientos y sexo de los genes de *UCCR*.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



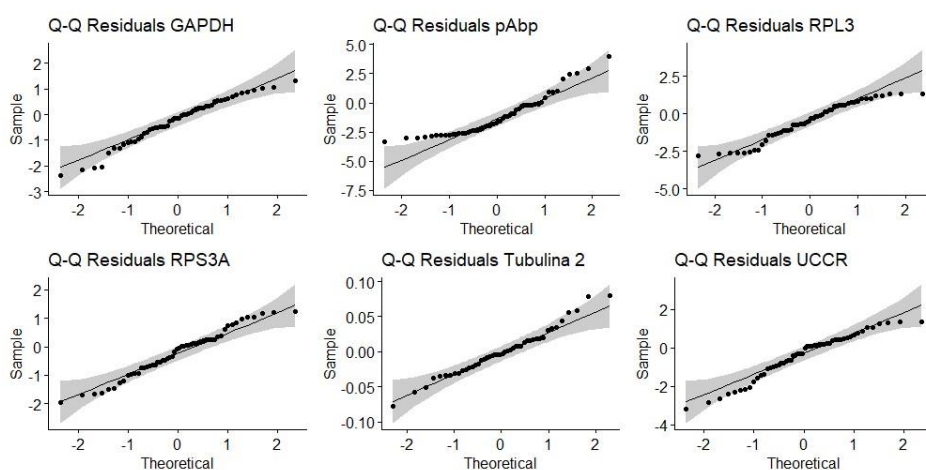
Anexo Fig. 3. Curvas de calibración y eficiencia de los genes referencia

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



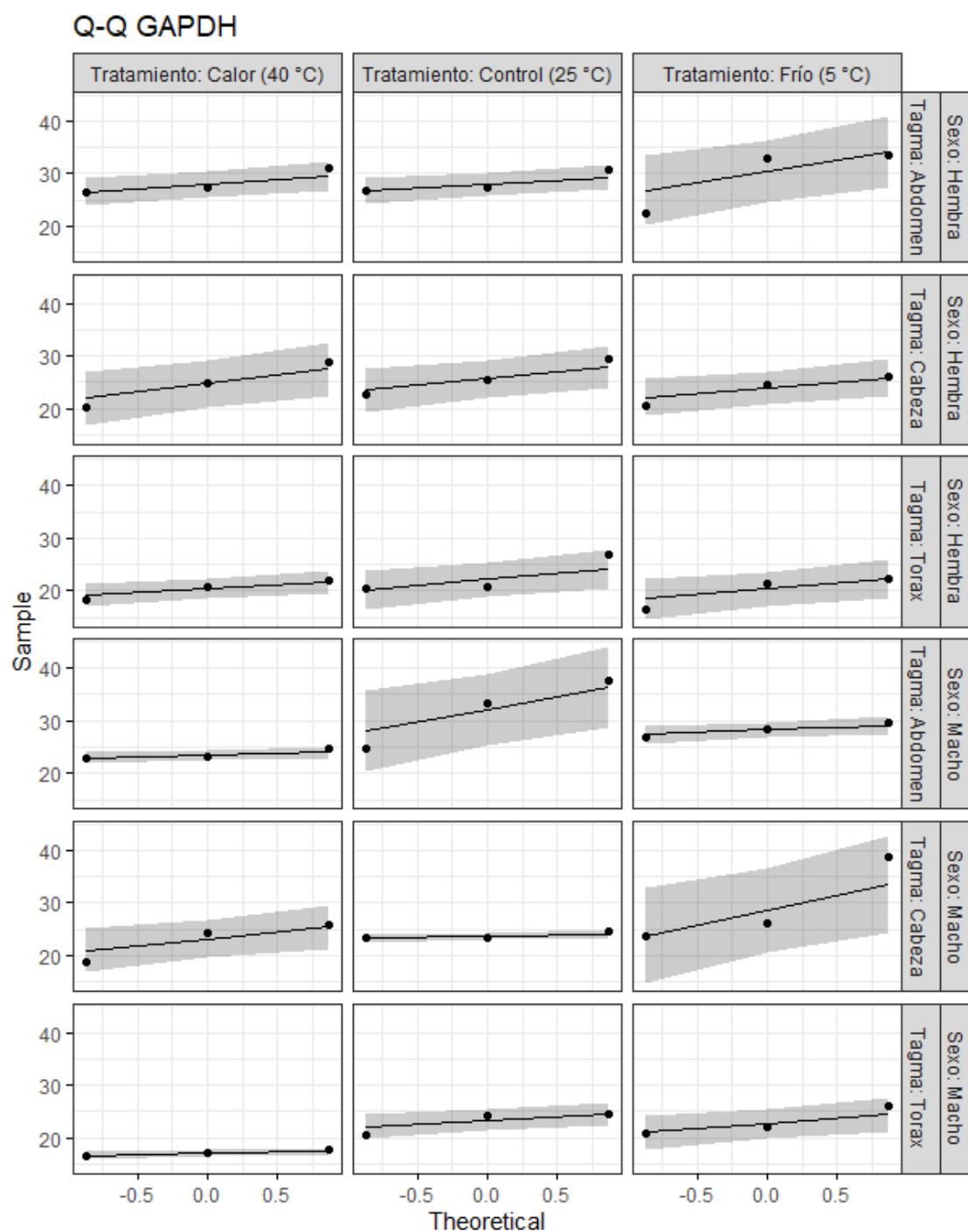
Anexo Fig. 4. Valor de Ct de los genes de referencia en los factores Tagma, Sexo y Tratamiento.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



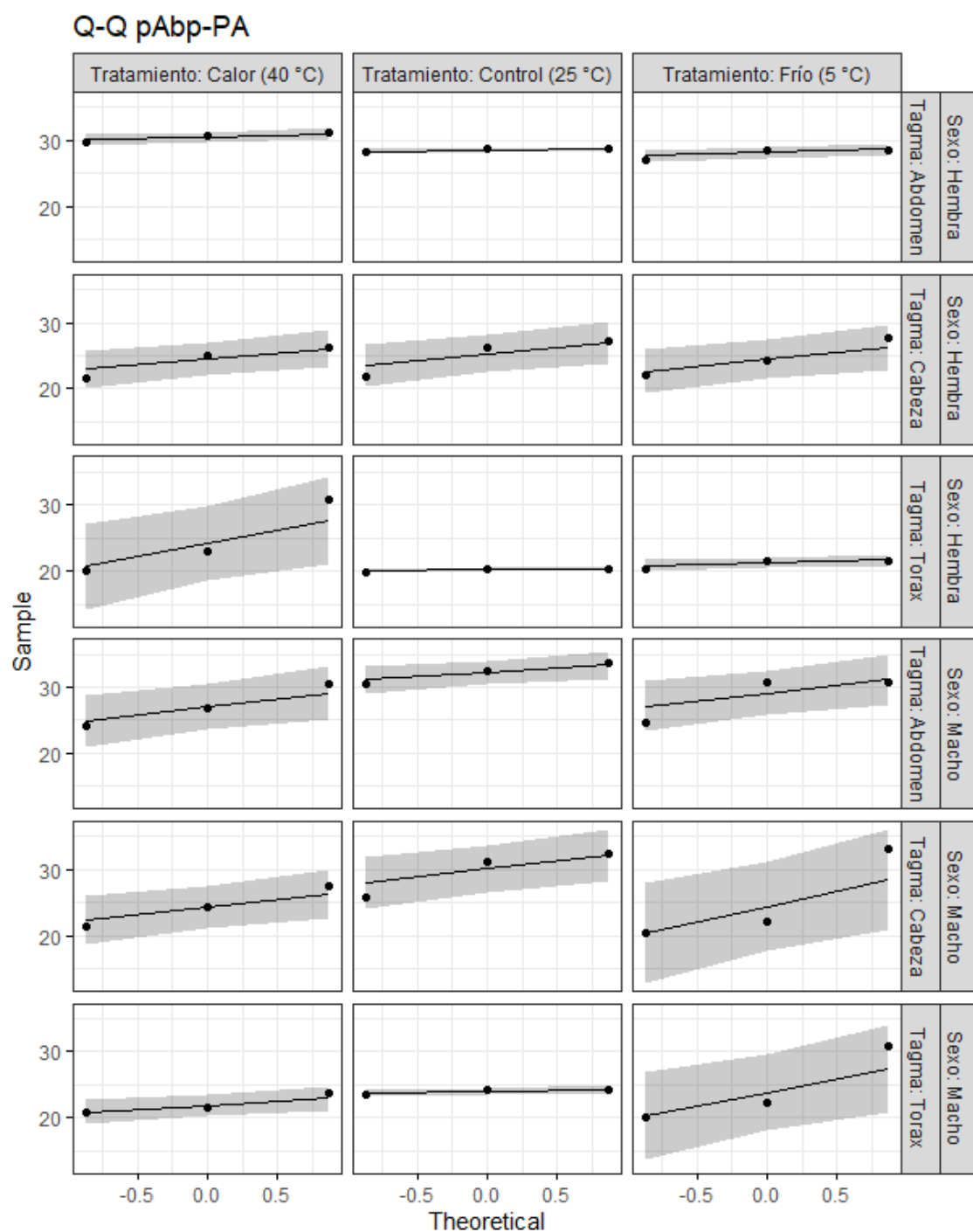
Anexo Fig. 5. Gráfica Q-Q de valores residuales de los genes de referencia

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



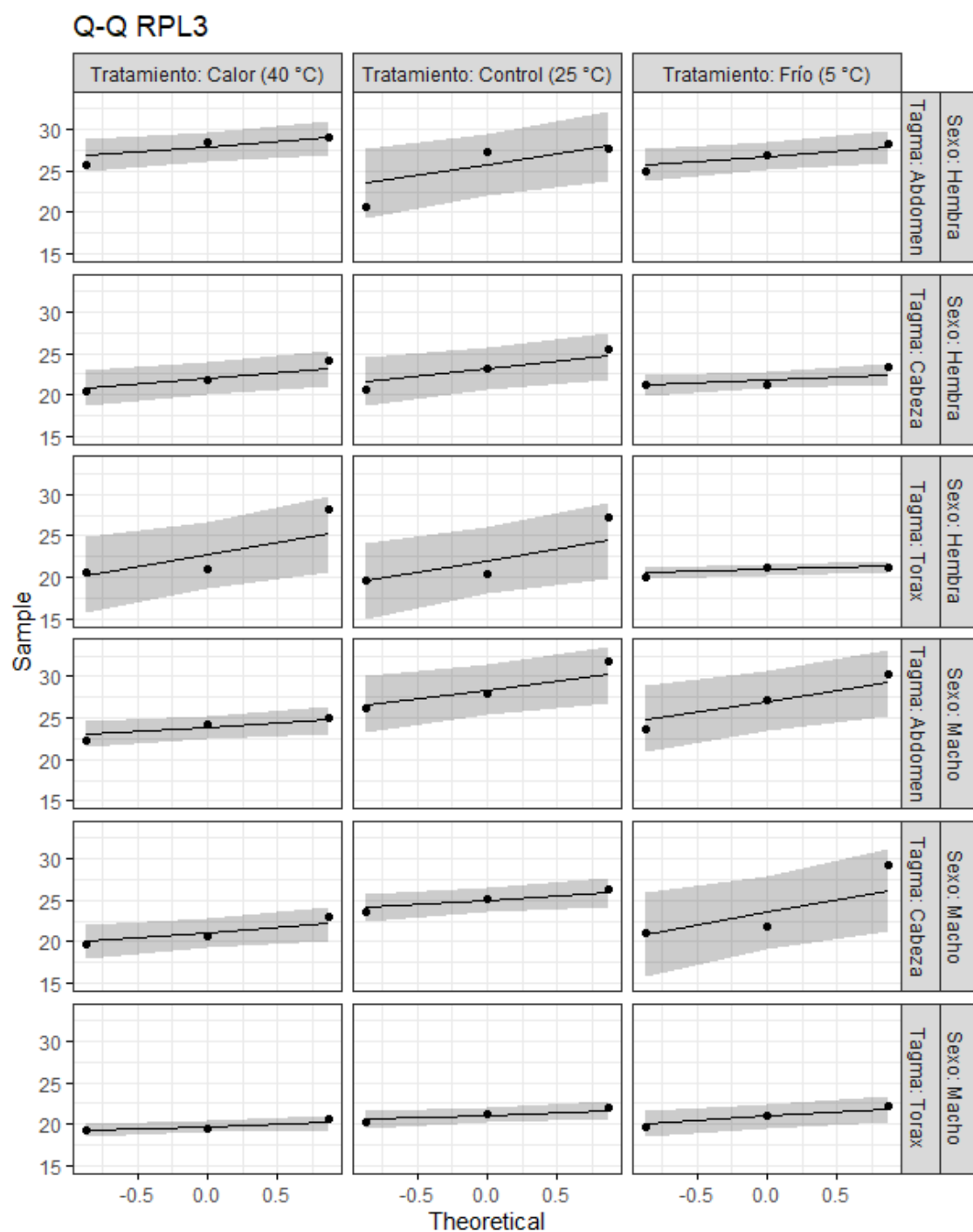
Anexo Fig. 6. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia *GAPDH*.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



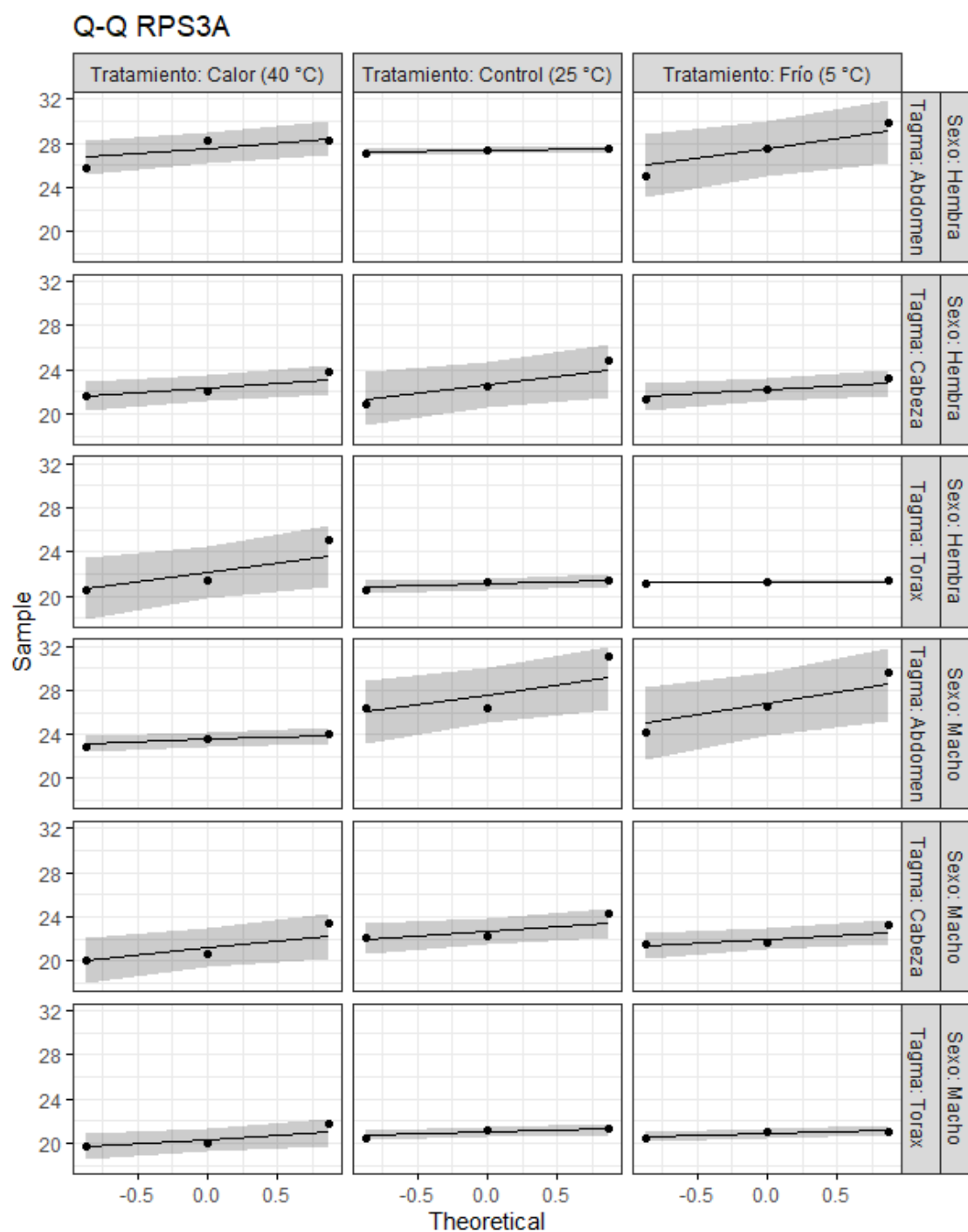
Anexo Fig. 7. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia *pAbp*.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



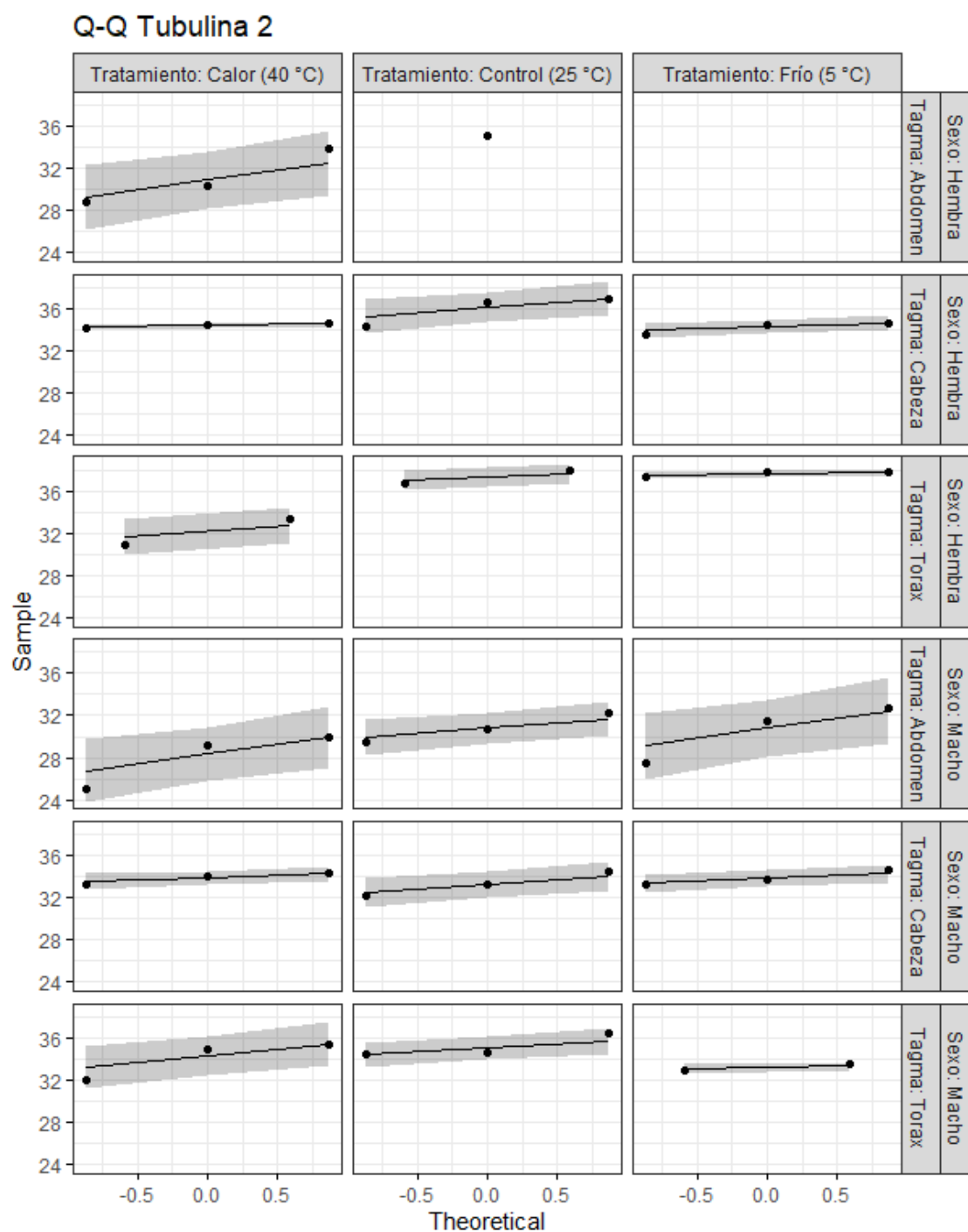
Anexo Fig. 8. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia **RPL3**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



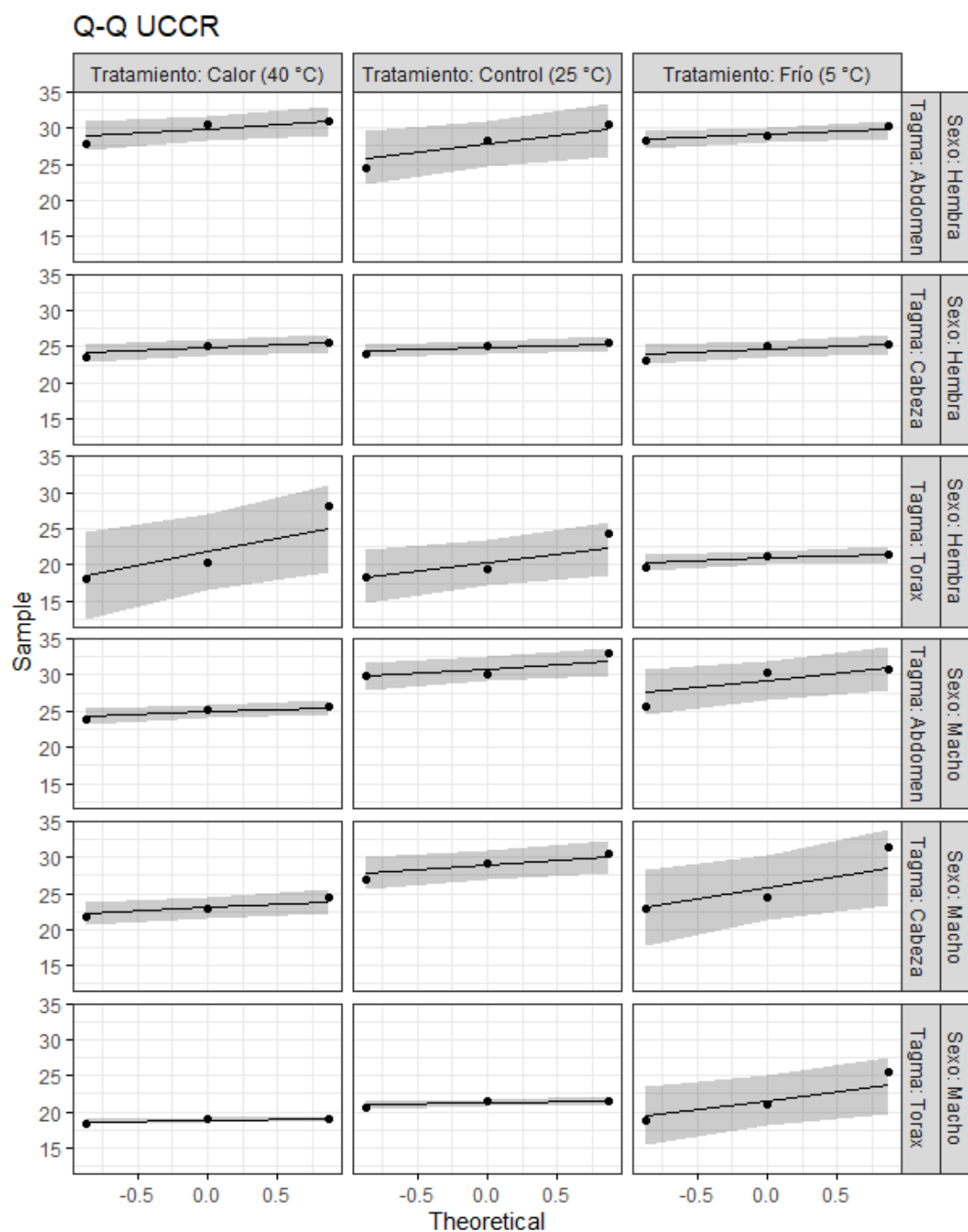
Anexo Fig. 9. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia **REPS3A**.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



Anexo Fig. 10. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia *Tubulina 2*.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.



Anexo Fig. 11. Gráfico Q-Q de normalidad Ct del gen de referencia *UCCR*.

Realizado por: Ruiz, Joshué, 2023.