

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

BIOTECNOLOGÍA

**DETECCIÓN DE CAMBIOS EN LA METILACIÓN DE *Heliconius erato lativitta*
MEDIANTE FINGERPRINTING**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JORGE ANDREI FLORES DE VALGAS JÁCOME

TUTOR: PhD CAROLINE NICOLE ORIANA BACQUET PÉREZ

Napo, Ecuador 2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Jorge Andrei Flores de Valgas Jácome, con documento de identidad N°1314344035, 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, día 15 de septiembre del año 2023



Jorge Andrei Flores de Valgas Jácome
1314344035

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Jorge Andrei Flores de Valgas Jácome, con documento de identidad N°1314344035, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Detección de cambios en la metilación de *Heliconius erato lativitta* mediante fingerprinting”. de conformidad con el Art. 114 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, día 15 de septiembre del año 2023



Jorge Andrei Flores de Valgas Jácome
1314344035

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: DETECCIÓN DE CAMBIOS EN LA METILACIÓN DE *Heliconius erato lativitta* MEDIANTE FINGERPRINTING, en la modalidad: Tesis, fue realizado por: Jorge Andrei Flores de Valgas Jácome, 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, día 15 de septiembre del año 2023



firmado electrónicamente por:
CAROLINE NICOLE
ORIANA BACQUET
PEREZ

Caroline Nicole Oriana Bacquet Pérez

1756516041

DEDICATORIA

A mi hermano Sebastián con quien compartí 19 años de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mi familia, mis padres, hermanos y tutores por apoyarme todo el camino hasta llegar hasta aquí. Agradezco de forma especial a Caroline Baquet por instruirme como su alumno.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	II
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	III
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO	VI
TABLA DE CONTENIDO.....	VII
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.1.1 <i>Epigenética y Biodiversidad</i>	1
1.1.2 <i>Epigenética y Evolución</i>	1
1.1.3 <i>Epigenética y plasticidad fenotípica</i>	2
1.1.4 <i>Metilación del ADN</i>	3
1.1.5 <i>Metilación en Insectos</i>	4
1.1.6 <i>Mariposas Heliconius</i>	5
1.1.7 <i>Técnicas de Evaluación de Metilación del ADN</i>	6
1.1.7.1 <i>Enzimas de restricción</i>	7
1.1.8 <i>5-Azacitidina</i>	8
1.1.9 <i>Amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP)</i>	8
1.1.10 <i>Enzimas de restricción sensibles a la metilación acoplado a</i> <i>PCR en tiempo real (MSRE-qPCR)</i>	11
1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	15
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
1.4 HIPÓTESIS	17
1.5 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	17
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	17
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	18

2.1	FASE DE CAMPO	18
2.1.1	<i>Colecta de especímenes</i>	18
2.1.2	<i>Crianza</i>	19
2.1.3	<i>Tratamiento con 5-Azacidina</i>	20
2.2	FASE IN-SÍLICO	20
2.2.1	<i>Obtención de genoma de referencia</i>	20
2.2.2	<i>Simulación de MSAP in-sílico</i>	20
2.3	DISEÑO DE PARTIDORES ESPECIALIZADOS PARA MSAP	24
2.3.1	<i>Amplificación de fragmentos de genes en MSAP</i>	24
2.4	FASE DE LABORATORIO MSAP	25
2.4.1	<i>Extracción de ADN</i>	25
2.4.2	<i>Detección del patrón de metilación por MSAP</i>	25
2.5	FASE DE LABORATORIO MSRE-QPCR	29
2.5.1	<i>Digestión enzimática</i>	29
2.5.2	<i>Selección de partidores</i>	29
2.5.3	<i>Validación de partidores</i>	30
2.5.4	<i>PCR en tiempo real de partidores seleccionados</i>	31
2.5.5	<i>Análisis de datos MSRE-qPCR</i>	31
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....		35
3.1	PROGRAMA MSAP <i>IN-SÍLICO</i>	35
3.2	FASE EXPERIMENTAL MSAP.....	36
3.2.1	<i>Visualización de fragmentos en gel</i>	37
3.2.2	<i>Comparación de fragmentos amplificados in-vitro e in-sílico</i>	40
3.3	ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA TÉCNICA MSAP	41
3.3.1	<i>Limitaciones y posibles fuentes de error</i>	41
3.4	FASE EXPERIMENTAL MSRE-QPCR	42
3.4.1	<i>Partidores seleccionados</i>	42
3.4.2	<i>Validación de partidores</i>	43
3.4.3	<i>PCR en tiempo real</i>	44
3.4.4	<i>Representación gráfica de Diferencia de metilación (DM)</i>	44
3.4.5	<i>Representación gráfica de Índice de Desmetilación (DI)</i>	45
3.4.6	<i>Análisis de la metilación específica mediante la técnica MSRE-qPCR</i>	47
3.4.7	<i>Evaluación del efecto del inhibidor enzimático 5-Azacidina</i>	47
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN		49
4.1	DIFERENCIAS EN EL EFECTO DEL INHIBIDOR 5-AZACITIDINA EN CABEZA Y TÓRAX.....	49
4.1.1	<i>Posibles mecanismos de acción de 5AzaC en cabeza</i>	49

4.2	METILACIÓN ESPECÍFICA SOBRE EL GEN <i>Hsp90</i>	51
4.3	DIFERENCIA ENTRE LA METILACIÓN DE TÓRAX Y CABEZA.....	52
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		54
5.1	CONCLUSIONES	54
5.2	RECOMENDACIONES E INVESTIGACIONES FUTURAS	54
BIBLIOGRAFIA		56
ANEXOS		64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales enzimas implicadas en la metilación y desmetilación del ADN.....	4
Figura 2. Diferencias entre la digestión de fragmentos metilados y no metilados entre las enzimas de restricción HpaII y MspI	8
Figura 3. Representación esquemática de la técnica MSAP	10
Figura 4. Representación esquemática de la técnica MSRE-qPCR.	13
Figura 5. Relación entre enzimas y tratamientos para el análisis de metilación específica mediante índices distintos (DM y DI) y sus resultados esperados en escenarios de metilación completa.	14
Figura 6. Diseño experimental resumido para la aplicación de las técnicas de fingerprinting MSAP y MSRE-qPCR.	16
Figura 7. Herramientas del sistema de crianza de <i>H. erato</i> . A. Envase plástico diseñado para la incubación de huevos y B. Sistema de alimentación de larvas con brotes de <i>P. punctata</i> L	19
Figura 8. Representación esquemática del algoritmo de simulación de la técnica MSAP, denominado “Digestión enzimática”	22
Figura 9. Representación esquemática del algoritmo para simulación de la técnica MSAP, denominado “Amplificación selectiva”.	23
Figura 10. Resultado de MSAP in-sílico con tres pares distintos de partidores: Optix, Dco y BarH1.	35
Figura 11. Resultado de MSAP in-sílico por tres pares de partidores, en recuadro celeste el fragmento del gen BarH1.	36
Figura 12. Separación de 18 muestras digeridas con HpaII/MspI - EcoRI y amplificadas con BarH1_fw1 y BarH1_rv1.	37
Figura 13. Separación de 11 muestras digeridos con MspI - EcoRI y amplificadas con BarH1_fw1 y BarH1_rv1.	38
Figura 14. Separación de 14 muestras digeridas con HindIII-MspI amplificadas con cebadores Optix_HindIII_fw1 y Optix_HindIII_rv1 rv1.	39
Figura 15. Identificación de fragmentos <i>in-vitro</i> e <i>in-silico</i> de la digestión EcoRI-MspI con el gen BarH1.	40
Figura 16. Diferencia de metilación (DM) en individuos tratados y no tratados con 5 Azacitidina por gen en tórax.....	44
Figura 17. Comparación del índice de desmetilación entre tratamientos para Hsp90 en tórax y cabeza	46

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. “H._erato_lativitta_V1.” producto de digestión con HpaII/Mspl y EcoRI.....	36
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes y concentración de reactivos para digestión enzimática	26
Tabla 2. Volúmenes y concentración de reactivos para PCR	27
Tabla 3. Cebadores especializados empleados en la técnica MSAP	28
Tabla 4. Lista de genes seleccionados para MSRE-qPCR.....	30
Tabla 5. Componentes y concentraciones de reactivos empleados en qPCR.....	31
Tabla 6. Partidores seleccionados para MSRE-qPCR.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico	64
Anexo 2. Repositorio de programas	65
Anexo 3. Tabla p-valor de las comparaciones entre grupos DI y DM	65
Anexo 4. Evaluación de normalidad y homocedasticidad entre grupos DM y DI	66

RESUMEN

La epigenética se ha reconocido como una fuente de adaptación adicional que puede generar cambios tanto en el fenotipo como en el genotipo de un organismo. Debido a la rapidez con la que se producen estos cambios y a su conexión con el medio ambiente, se considera que comprenderlos es esencial para determinar cuál será el impacto en la respuesta adaptativa de los organismos ante cambios bruscos en el ambiente, como lo es el cambio climático. La mariposa *Heliconius erato lativitta* es considerada una especie modelo emergente para estudios de evolución y biodiversidad, y la metilación es una de las marcas epigenéticas mejor caracterizadas. En este estudio se exploró la metilación en el genoma de *H. e. lativitta* al comparar el patrón de metilación en ADN entre individuos adultos tratados con el inhibidor enzimático 5AzaC e individuos naturales, los individuos fueron criados en cautiverio y tratados después de siete días de haber emergido de la crisálida. La metilación en ADN fue analizada a nivel genómico y a nivel gen específico mediante las técnicas de fingerprinting “MSAP” y “MSRE-qPCR” respectivamente, y se desarrollaron herramientas *in-silico* para la optimización de ambas técnicas. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de metilación en el genoma de la especie *H. e. lativitta* como resultado de la identificación de metilación sobre un exón del gen *Hsp90*, también se comprobó el efecto del tratamiento con inhibidor 5AzaC obteniendo porcentajes de metilación inferiores en individuos tratados que en no tratados.

Palabras clave: ectotermos, epigenética, MSAP, MSRE-qPCR, 5AzaC.

ABSTRACT

Epigenetics has been recognized as an additional source of adaptation that can generate changes in both the phenotype and genotype of an organism. Because of the rate at which these changes occur and their connection to the environment, understanding them is considered essential to determine what the impact will be on the adaptive response of organisms to abrupt changes in the environment, such as climate change. The butterfly *Heliconius erato lativitta* is considered an emerging model species for evolutionary and biodiversity studies, and methylation is one of the best characterized epigenetic marks. In this study we explored methylation in the genome of *H. e. lativitta* by comparing the pattern of DNA methylation between adult individuals treated with the enzyme inhibitor 5AzaC and natural individuals, which were reared in captivity and treated seven days after emergence from the chrysalis. DNA methylation was analyzed at the genomic and gene-specific levels by fingerprinting techniques "MSAP" and "MSRE-qPCR", *in-silico* tools were developed for the optimization of both techniques. The results obtained suggest the presence of methylation in the genome of the *H. e. lativitta* species as a result of the identification of methylation on an exon of the *Hsp90* gene. The effect of treatment with 5AzaC inhibitor was also verified, obtaining lower methylation percentages in treated individuals than in untreated individuals.

Key words: ectotherms, epigenetics, MSAP, MSRE-qPCR, 5-AzaC.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Epigenética y Biodiversidad*

La biodiversidad global se desarrolló en base a procesos evolutivos [1]. El neotrópico contiene algunos de los hábitats más biodiversos del planeta [2]. El oeste de la cuenca amazónica es uno de estos biomas; contiene la mayoría de las especies de aves, mamíferos y anfibios de toda América del sur [3]. Sus diferentes pisos altitudinales y su abundancia de recursos naturales son clave para que fenotipos únicos se adapten a las diferentes condiciones ambientales.

A nivel molecular, aunque todas las células de un organismo eucariota tengan el mismo genoma, la regulación en la expresión de los genes puede producir diferentes tipos de células con funciones únicas [4]. Esta variabilidad en la expresión de los genes afecta activamente a la célula, al organismo y a la población en general, y es clave de la divergencia fenotípica y por ende en la biodiversidad [4]. La epigenética estudia cómo el patrón de expresión de los genes desencadena cambios heredables en el fenotipo del organismo, estos cambios se diferencian de la herencia genética al no requerir modificaciones en la secuencia del ADN [5].

En vertebrados, la epigenética influye en la expresión génica a través de cambios en el plegamiento de las fibras de cromatina en el núcleo, la apertura o el cierre de estas fibras condiciona la accesibilidad de la maquinaria molecular responsable de la transcripción del ADN [4]. Al igual que con la genética, la información epigenética es heredable en cada división celular y puede modificarse a lo largo de la vida del organismo, estas modificaciones se conocen como epimutaciones y se consideran una fuente adicional de variación natural de rasgos ecológicamente importantes con implicaciones evolutivas [4-6].

1.1.2 *Epigenética y Evolución*

La evolución se define como el cambio en las características heredables de las especies a lo largo de generaciones sucesivas [1]. La teoría predominante sostiene que las

mutaciones genéticas son las responsables de la variación de las características heredables y que estas son el medio por el cual actúan las principales fuerzas evolutivas [7].

Durante mucho tiempo se ha considerado que la epigenética no tiene ningún efecto sobre la evolución debido a que en la reproducción las marcas epigenéticas presentes en el ADN de embriones jóvenes son eliminadas y posteriormente restablecidas en un proceso llamado reprogramación [4], esto sugiere que no es posible que exista una herencia epigenética como tal. Actualmente, se ha demostrado que mecanismos epigenéticos como la transmisión de ADN no codificante, los estados de la cromatina y modificaciones químicas del ADN, pueden transmitirse a las células germinales [4]. Esto quiere decir que sí existen mecanismos moleculares por los cuales la herencia epigenética tiene lugar, algunos de estos mecanismos se han observado en humanos [8], moscas de la fruta [9] y variedades de arroz [10].

Los cambios en la información epigenética conocidos como epimutaciones pueden ser claves en los procesos de adaptación necesarios para la evolución, a diferencia de la adaptación producto de mutaciones genéticas estas pueden generarse con mayor facilidad y presentan sensibilidad a cambios en el ambiente [11]. La comparación entre epimutaciones y mutaciones genéticas ha sido estudiada en plantas donde se cree que la tasa de epimutación es al menos 100.000 veces más alta que la tasa de mutación genética, así mismo, modelos matemáticos estiman que las epimutaciones son capaces de producir variantes fenotípicas a mayor velocidad en escenarios de variabilidad ambiental [5]. Es por ello, que las modificaciones epigenéticas son capaces de mediar la respuesta entre el fenotipo y el ambiente, debido a esto se presentan como posibles elementos clave en la evolución de los organismos [5].

1.1.3 Epigenética y plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica, que se define como la capacidad de un genotipo para producir diferentes fenotipos en respuesta a las presiones ambientales, engloba diversos aspectos como la morfología, el comportamiento, la bioquímica, la fisiología y el desarrollo del organismo [12]. La epigenética es uno de los componentes que conforman la plasticidad fenotípica, y ambos están estrechamente relacionados. Un ejemplo de esta relación es el caso del ratón auguti amarillo que puede cambiar el color de su pelaje

de amarillo a pseudoagouti en individuos genéticamente idénticos debido a un cambio en la metilación de elementos transponibles en el locus del color del pelaje [3,11,12].

Se teje la conexión que existe entre epigenética, plasticidad, ambiente y evolución afirmando qué: la capacidad de las presiones ambientales para generar variantes epigenéticas que desencadenan en fenotipos distintos (plasticidad) puede con el tiempo sostener variantes genotípicas adaptadas a dichas presiones. Esta conexión es fundamental para comprender cómo la epigenética puede ser crucial en la adaptación de organismos hacia ambientes cambiantes [14]. Esto es de especial importancia para organismos ectotermos como las mariposas *H. e. lativitta* y ecosistemas frágiles como la Amazonía donde pequeños cambios en las temperaturas podrían afectar en gran medida al ecosistema y a la supervivencia de los organismos que lo habitan [15,16].

1.1.4 Metilación del ADN

Las principales alteraciones químicas de la molécula de ADN que funcionan como marcas epigenéticas son; acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de los núcleos de histonas [17]. Estas marcas, en conjunto con variantes de histonas y ARN pequeño no codificante (ARNp), son los principales factores que determinan la estructura de la cromatina y su empacamiento [18]. El resultado es la regularización de la compartimentalización nuclear y el establecimiento de las regiones de la eucromatina y heterocromatina que establecerán las regiones del ADN accesibles para la transcripción [15].

Gracias a la variedad de técnicas moleculares bien establecidas que permiten encontrar el nivel de metilación en citosinas, la metilación del ADN se convierte en una de las marcas epigenéticas mejor caracterizadas [5,19]. En los genomas eucariotas la C5-metilcitosina es la metilación más prevalente, que consiste en la adición de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de la citosina, esta reacción es catalizada por enzimas ADN metiltransferasas [15]. La metilación del ADN ocurre en plantas, animales, hongos y bacterias, involucra 3 tipos de enzimas que regulan la transferencia del grupo metilo. Como se observa en la figura 1 la ADN metiltransferasa 3 (DNMT3) es responsable de la metilación *de-novo* del ADN, la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) es responsable del mantenimiento de las marcas metilo del ADN durante la mitosis [19,20], y la familia de enzimas translocasa (TET) "ten-eleven-translocase" catalizan la oxidación de la 5-

metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina [8], esta última es una de las principales responsables de la reversibilidad de las marcas metilo en el ADN.

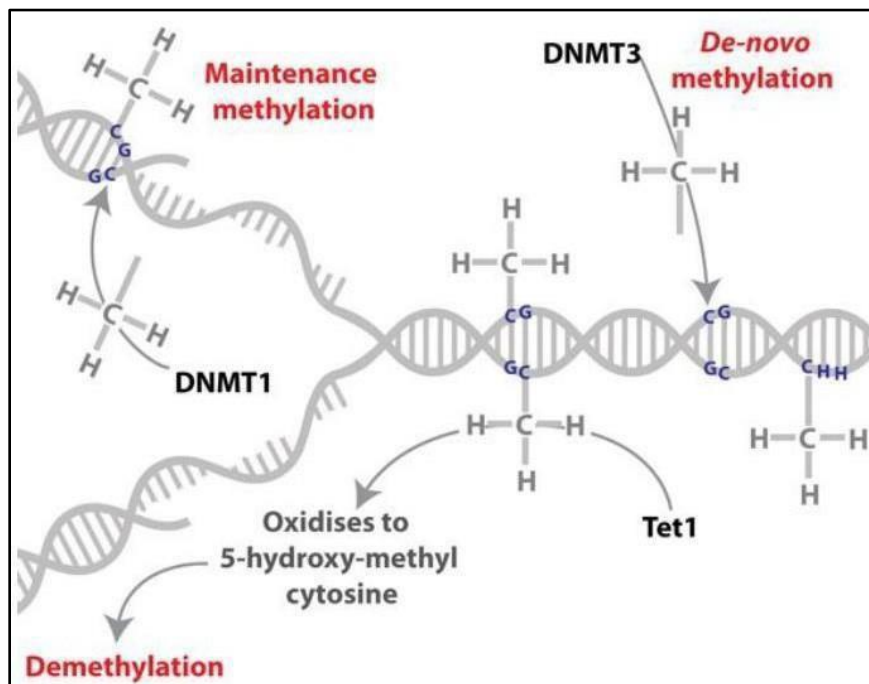


Figura 1. Principales enzimas implicadas en la metilación y desmetilación del ADN
Retribuido de: Duncan et al, 2022.

Se ha identificado que la metilación se encuentra implicada en la regulación genética, el silenciamiento de transgenes y la impronta genómica [19]. En mamíferos esto ocurre en sitios en el genoma denominados Islotes CpG que consisten en varios dinucleótidos CpG (citosina seguido de guanina) condensados sobre regiones del genoma, estas regiones suelen ser promotores que desencadenan la transcripción de ciertos genes [20].

1.1.5 Metilación en Insectos

La metilación es un proceso epigenético recientemente estudiado en insectos, se encuentra presente en las etapas del ciclo de vida; desde la embriogénesis hasta la madurez, y se ha demostrado su papel en la diferenciación celular y el desarrollo de tejidos del individuo [21]. En adición, la metilación de histonas en insectos al igual que en mamíferos afecta la expresión de los genes y puede ser modulada por factores ambientales como la temperatura o la nutrición [22,23]. A diferencia de los mamíferos la metilación es menos abundante en el genoma de los insectos, se encuentra mayormente sobre las secuencias del cuerpo de los genes y no está asociada obligatoriamente a una disminución en la expresión génica [3]. Además, se ha

descubierto que en insectos como *Apis mellifera* existe herencia transgeneracional de metilación en ADN, alegando que la conocida reprogramación de las marcas epigenéticas en embriones puede no suceder en insectos [24].

Entre taxones de insectos existen diferencias en la cantidad de metilación genómica que presentan, de 41 especies de insectos de seis taxones distintos se ha encontrado una alta variabilidad en el nivel de metilación genómico global que presentan [19]. En el orden Lepidóptera el porcentaje entre especies oscila entre 0.5% y 4% en regiones codificantes y entre 0% y 2% en el genoma total [19]. Adicionalmente, en lepidóptera también se han identificado los genes DNMT1 y TET1, dos de los tres genes vinculados a la metilación y desmetilación del ADN [3].

A diferencia de los mamíferos, el rol de la metilación en el genoma de los insectos no parece tener una función única o preestablecida. Un ejemplo de esto es la frecuente asociación entre expresión génica y metilación, relación que pese a ser citada en numerosas ocasiones en insectos [25], no es conservada incluso entre especies muy emparentadas. Es así como en varios estudios realizados en especies de insectos como abejas [24,26–28], hormigas [29,30] y avispas [31] no se encontró ninguna relación entre metilación y expresión génica [3]. En consecuencia, a pesar de las correlaciones entre metilación y expresión génica, aún no existen evidencias suficientes para establecer el rol que cumple la metilación en el genoma de insectos.

1.1.6 Mariposas *Heliconius*

El género *Heliconius* pertenece al orden Lepidóptera y a la familia *Nymphalidae*, siendo una de las familias de mariposas más estudiadas a lo largo de los años [26,27]. Con más de 40 especies y más de 400 subespecies distribuidas en el Neotrópico, las mariposas *Heliconius* han sido ampliamente utilizadas como modelos para comprender los procesos de especiación y adaptación [24,28–30]. Además de su papel en los procesos de especiación, las mariposas *Heliconius* son valoradas como modelos biológicos debido a su relativa abundancia en el campo y en colecciones, su capacidad de cría en insectarios, su genoma moderadamente pequeño y su participación en sistemas de mimetismo complejos [26,31–37].

Las mariposas del género *Heliconius* destacan por sus alas alargadas y un vuelo suave y direccional y a diferencia de otras mariposas parecen tener una clara idea de hacia

dónde se dirigen [31]. Tienen antenas relativamente largas y ojos grandes comparados con otras mariposas [28]. Los huevos de las larvas son amarillos o blancos y son depositados en plantas del género *Passiflora sp.*, donde al eclosionar las larvas usarán sus hojas como alimento [28]. Su hábitat se extiende desde el norte de Argentina atravesando sur y centro américa, hasta el sur de los Estados Unidos [28] y abarcando un rango altitudinal de cero hasta 1,600 m s.n.m [38], de este extenso hábitat el pico de diversidad se encuentra entre la Amazonía Alta y la parte baja de los Andes [28].

La provincia de Napo comprende ambos hábitats, desde el piedemonte Andino hasta las zonas altas de la Amazonía Ecuatoriana. Entre las *Heliconius* que habitan la provincia se encuentra la especie *Heliconius erato lattivita*, esta es una de las subespecies de *Heliconius erato* en donde su genoma se encuentra descrito y secuenciado [35]. Actualmente, en campos como neurobiología las *Heliconius* son uno de los pocos sistemas donde es posible conseguir una comprensión integrada del aislamiento conductual [6]. Esto es posible ya que se conocen aspectos como la ecología del grupo, el gran número de poblaciones y especies híbridas relacionadas [8].

La metilación en el género *Heliconius* es poco conocida. La especie *Heliconius melpomene*, mimética de *Heliconius erato*, presenta un porcentaje genómico de metilación de alrededor de un 1% en todo el genoma y alrededor de un 3% en exones [36].

1.1.7 Técnicas de Evaluación de Metilación del ADN

Existen varios métodos disponibles para el análisis de la metilación dentro del genoma y diversas formas de agruparlos según sus similitudes [37]. Los más conocidos son los métodos basados en secuenciación, estos son de gran utilidad para detectar la metilación del ADN a nivel de bases individuales y a grandes escalas del genoma. Las principales técnicas son: secuenciación con bisulfito (BS-Seq) [39], secuenciación del genoma completo con bisulfito (WGBS) [40], secuenciación de ADN de una sola molécula en tiempo real (SMRT-Seq) [41], secuenciación por nanoporos o oxford nanopore [42]. Técnicas basadas en el enriquecimiento por inmunoprecipitación emplean anticuerpos para detectar la metilación dentro del genoma, las principales técnicas son: Inmunoprecipitación de metilación con microarreglos (MeDIP-chip) o con secuenciación (MeDIP-seq) [43], inmunoprecipitación de ADN glucosilado (gDIP). Existen técnicas basadas en enzimas de restricción, la mayoría de estas utilizan una combinación de enzimas de restricción sensibles y no sensibles a la metilación del ADN

para generar fragmentos cuyo patrón será detectado y definirá el estado de la metilación en su ADN, algunos ejemplos de estas técnicas son: Microarreglos para metilación [44], enzimas de restricción sensibles a la metilación acoplado a qPCR (MSRE-qPCR) [45], amplificación de ADN polimórfico sensible a la metilación (MSAP) [46].

Se debe tener en cuenta que la elección del método para analizar la metilación del ADN dependerá del número de muestras a investigar, el tipo de análisis necesario que responde la pregunta biológica en cuestión [38], así como de la disponibilidad a los equipos y reactivos necesarios para la aplicación de la técnica.

1.1.7.1 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas que cortan el ADN en un sitio específico denominado sitio de restricción [47], este es generalmente una secuencia palindrómica [47]. Existen enzimas de restricción sensibles a la metilación, esto significa que, si la secuencia del sitio de restricción está metilada, la enzima no cortará [48]. Las enzimas que tienen el mismo sitio de restricción que otras son conocidas como isoesquizómeros, algunos enfoques clásicos de análisis de metilación del ADN utilizan esta cualidad para emplear enzimas isoesquizómeros con diferente sensibilidad a la metilación del ADN.

Este es el caso de las técnicas MSRE-qPCR y MSAP que emplean dos enzimas isoesquizómeros una sensible a la metilación y la otra no para generar fragmentos de ADN de diferente tamaño, mediante la diferenciación de dichos fragmentos se puede analizar la metilación del ADN en regiones específicas del genoma [45,46]. En la figura 2 se describe la diferencia entre HpaII y MspI dos isoesquizómeros que reconocen el sitio 5'-CCGG-3', siendo HpaII sensible a la metilación y MspI no:

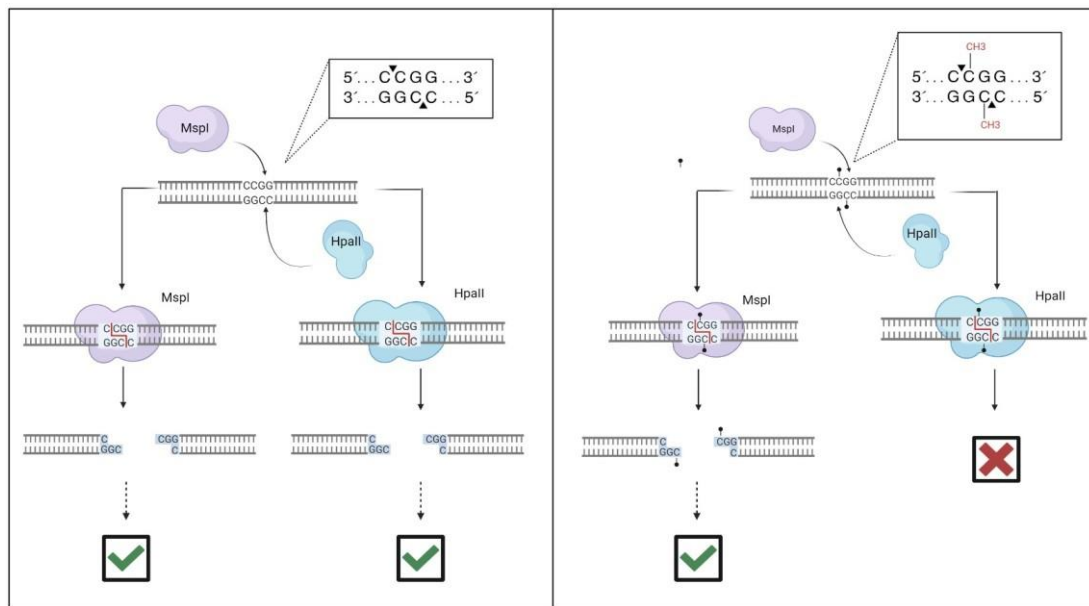


Figura 2. Diferencias entre la digestión de fragmentos metilados y no metilados entre las enzimas de restricción HpaII y MspI.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

1.1.8 5-Azacitidina

La 5-Azacitidina es un análogo nucleósido pirimidínico que posee actividad antineoplásica y se utiliza en farmacología con este propósito. Al incorporarse al ADN, esta molécula inhibe de manera irreversible las enzimas DNMTs, responsable de mantener las marcas metilo en el ADN durante cada división celular. En consecuencia, su aplicación conlleva al bloqueo de la metilación del ADN, lo que la convierte en un agente hipometilante o desmetilador, y forma parte de un grupo de compuesto químicos denominados DNMTi o inhibidores de metiltransferasas [50].

Entre las alternativas para explorar el papel ecológico de la variación epigenética se encuentra la modificación del perfil epigenético de la especie en estudio. Uno de los enfoques para alterar dicho perfil es a través de la manipulación de la metilación de los individuos. Para lograrlo, se utilizan fármacos capaces de inhibir a las enzimas responsables de este proceso, tales como DNMT1 y DNMT3. Esta estrategia puede resultar valiosa para entender el impacto de los cambios epigenéticos en la adaptación y evolución de los organismos [3,46].

1.1.9 Amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP)

La técnica MSAP (Methyl Sensitive Amplified Polymorphism), también conocida como "polimorfismos amplificados sensibles a la metilación", es utilizada para analizar la metilación global dentro del genoma y ha sido empleada para estudiar la metilación de secuencias anónimas "CCGG" en organismos como plantas, hongos y animales [39,40]. MSAP es una modificación de la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), utilizada para evaluar la diversidad genética entre individuos de la misma especie o entre especies relacionadas. Al igual que AFLP, la técnica MSAP se basa en la amplificación selectiva de una muestra de fragmentos generados mediante restricción enzimática. La información acerca de las diferencias entre el tamaño de estos fragmentos es utilizada para evaluar huellas únicas en el genoma, lo que la convierte en una herramienta valiosa para el estudio de la variación epigenética y la diversidad genética en diferentes organismos [51]. Tanto AFLP como MSAP son técnicas utilizadas en el análisis de huellas dactilares genéticas o "fingerprinting".

La técnica MSAP difiere de AFLP en el uso de enzimas de restricción isoesquizómeros, las cuales cortan el ADN genómico en el mismo sitio de restricción, pero una de ellas solo cuando la secuencia no está metilada [40]. Dos enzimas isoesquizómeros bien conocidas, MspI y HpaII, reconocen la secuencia 5'-CCGG-3' y generan extremos cohesivos después de cortar. Cuando la citosina interna se encuentra metilada HpaII no cortará mientras que MspI sí [52], como se observa en la figura 2.

El diagrama presentado a continuación en la Figura.3 divide la técnica MSAP en 4 etapas principales [53]:

- 1) Digestión enzimática: se digiere ADN genómico para producir fragmentos generados por los cortes con el par de enzimas de restricción HpaII/EcoRI y MspI/EcoRI.
- 2) Ligación de adaptadores: fragmentos de ADN complementarios se unen a los extremos clivados en la digestión, un par de adaptadores para el extremo clivado por MspI-HpaII (adaptador azul) y otro para el extremo EcoRI (adaptador gris).
- 3) Amplificación selectiva: se emplea un par de cebadores específicos para hibridar una parte de la secuencia del adaptador junto con una región del fragmento, esta región del fragmento comprende la secuencia clivada por la enzima y una pequeña región compuesta de uno o más nucleótidos, en la figura se representa por "NNN" al final de cada cebador. La secuencia de nucleótidos correspondiente a "NNN" se la denominó nucleótidos de segmentación.

4) Visualización de fragmentos: se utiliza un método para dividir por tamaño los fragmentos amplificados, en este caso la electroforesis en gel.

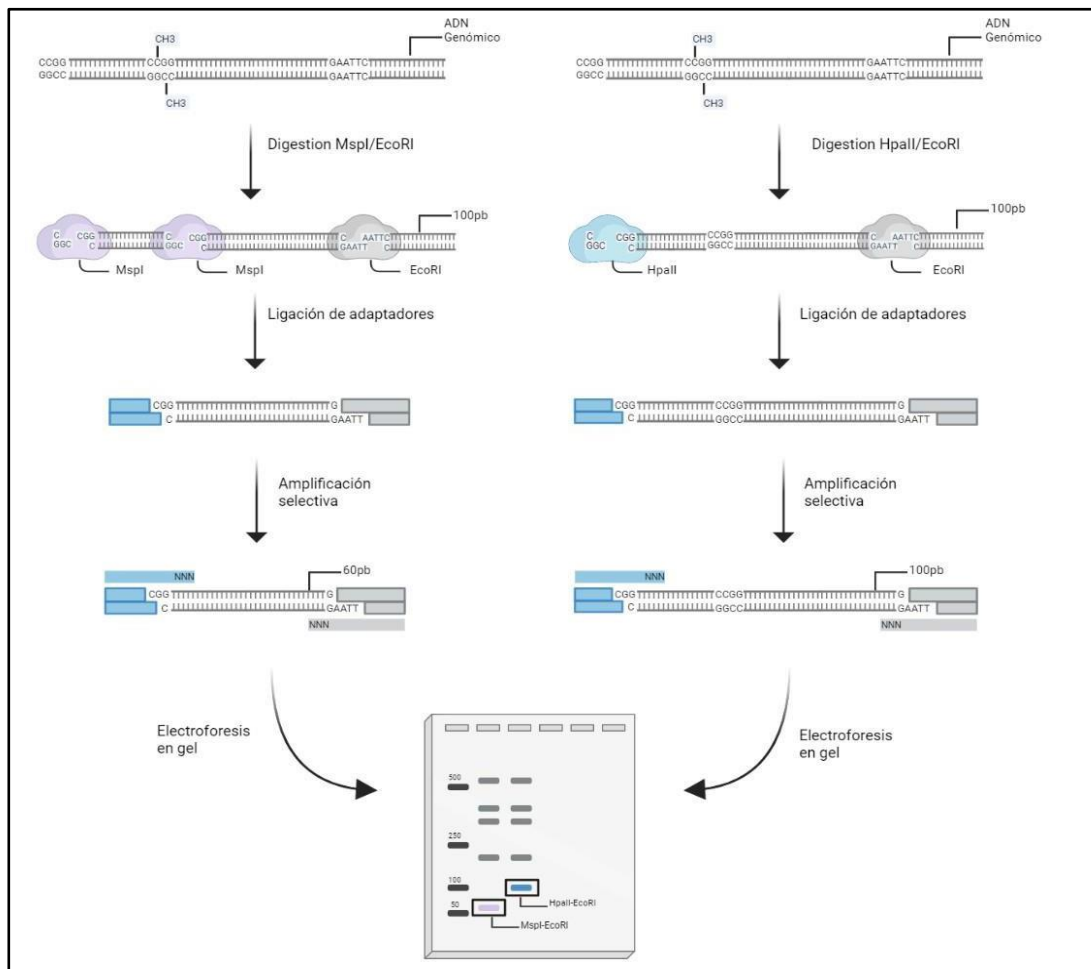


Figura 3. Representación esquemática de la técnica MSAP
Elaborado por: Andrei Flores de Valgas, Biorender 2023.

Si el ADN está metilado, la longitud y el número de fragmentos generados por las enzimas HpaII y MspI difiere [54]. En consecuencia, la muestra digerida con HpaII tendrá menos fragmentos y algunos de ellos no tendrán la misma longitud que los fragmentos digeridos con MspI. La variación en el tamaño y número de fragmentos es un indicador del estado de metilación del genoma [52]. En la figura 2 ambas digestiones parten de una muestra de aproximadamente 100 pb con tres sitios de restricción, dos para MspI/HpaII y uno para EcoRI, uno de los sitios MspI/HpaII al estar metilado impide la digestión HpaII amplificando un fragmento con una longitud superior al fragmento producido por la digestión MspI. Esta diferencia se observa en la figura 2 en la etapa de electroforesis en gel donde se representa el fragmento producido por MspI con una banda color lila y el producido por HpaII con una banda color azul.

La técnica MSAP es ampliamente utilizada para investigar patrones de metilación genómica entre poblaciones sin la necesidad de secuenciar el genoma [54]. Además, es una de las técnicas más económicas para analizar la metilación [37]. Esto se debe principalmente a su capacidad evaluar marcas metilo en varios individuos simultáneamente utilizando el equipamiento básico de cualquier laboratorio de biología molecular.

Dentro de las principales dificultades de esta técnica se encuentra el diseño de los partidores utilizados para amplificar los fragmentos digeridos, esto se debe principalmente a que los fragmentos amplificados deben tener un tamaño y un número ideal para su posterior visualización en gel [55]. En especies como *H. e. lativitta* donde su genoma se encuentra secuenciado es considerado una herramienta novedosa usar simulaciones *in-silico* para predecir el número de fragmentos amplificados por la técnica MSAP, en función de a esas simulaciones se puede decidir el número de nucleótidos de segmentación “NNN” (figura 3) a utilizar en los partidores [56].

Parte del diseño experimental de esta investigación emplea la técnica MSAP para estudiar la metilación en ADN, y gracias a la disponibilidad del genoma secuenciado se desarrolló un programa *in-silico* para predecir el número y tamaño de fragmentos producidos después de la amplificación selectiva. Se desarrolló una metodología novedosa para diseñar partidores a partir del funcionamiento de este programa, estos partidores son capaces de amplificar un número y tamaño de fragmentos ideal para la visualización en gel y adicionalmente amplificar un solo fragmento de un gen de interés. Estos últimos partidores fueron utilizados en este experimento y reciben el nombre de “partidores especializados”.

1.1.10 Enzimas de restricción sensibles a la metilación acoplado a PCR en tiempo real (MSRE-qPCR)

La técnica MSRE-qPCR o “Enzimas de restricción sensibles a metilación en PCR tiempo real” utiliza de igual forma los isoesquizómeros HpaII/MspI para digerir ADN genómico, a partir de esa digestión se amplifica mediante qPCR aquellos fragmentos que no hayan sido clivados [57]. A diferencia del uso común de la qPCR para analizar expresión génica por medio de la cuantificación de ARNm, esta técnica cuantifica el ADN que no haya sido degradado por enzimas de restricción, mediante la comparación de templado

producido por la digestión entre HpaII, MspI y el ADN genómico sin digerir se establece si existe metilación dentro de la secuencia de ADN. El beneficio de acoplar esta técnica a una PCR en tiempo real es que permite inferir estados de metilación parciales, es decir, el porcentaje del ADN que se encontraba metilado en esa secuencia específica.

El diagrama presentado en la figura 4 muestra las tres principales etapas de la técnica MSRE-qPCR:

- 1) Digestión: se digiere el ADN genómico con ambas enzimas de digestión HpaII y MspI por separado.
- 2) Amplificación: se amplifica únicamente la secuencia no clivada.
- 3) PCR en tiempo real (qPCR): se obtiene el ciclo de cuantificación (C_q) de ambas digestiones. Cuando el ADN está metilado el C_q de la digestión HpaII es menor al C_q de la digestión con MspI.

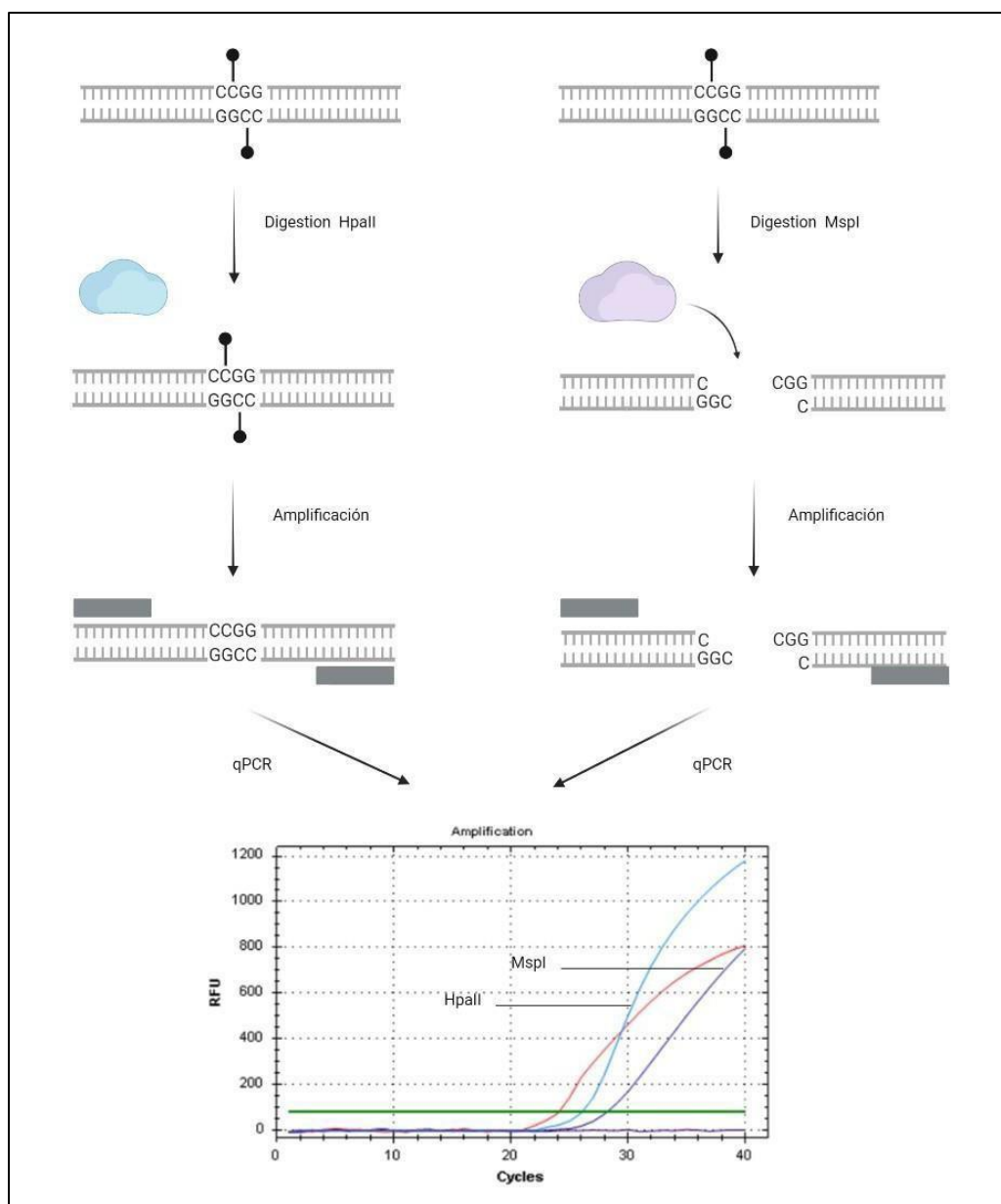


Figura 4. Representación esquemática de la técnica MSRE-qPCR.
Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023

En PCR en tiempo real el valor C_q en inglés “Treshold cycle” o “Quantification cycle” representa el número de ciclos necesarios para que la secuencia amplificada sea detectable para el equipo. [13]. En la gráfica qPCR está representada por una línea horizontal paralela a las abscisas, el valor C_q corresponde al punto donde se encuentra dicha línea con la curva de crecimiento. En la figura 4 la línea se representa en color verde.

Parte del diseño experimental de esta investigación incorpora la técnica MSRE-qPCR para el análisis de metilación gen específica, así como también para evaluar el efecto del inhibidor enzimático 5AzaC sobre la metilación. A continuación, se presenta un

esquema donde se emplean dos fórmulas para comparar el Cq producido por el tipo de enzima y por el tipo de tratamiento, además de la representación de sus resultados en un escenario donde la el fragmento analizado por qPCR se encontró muy metilado (figura 5).

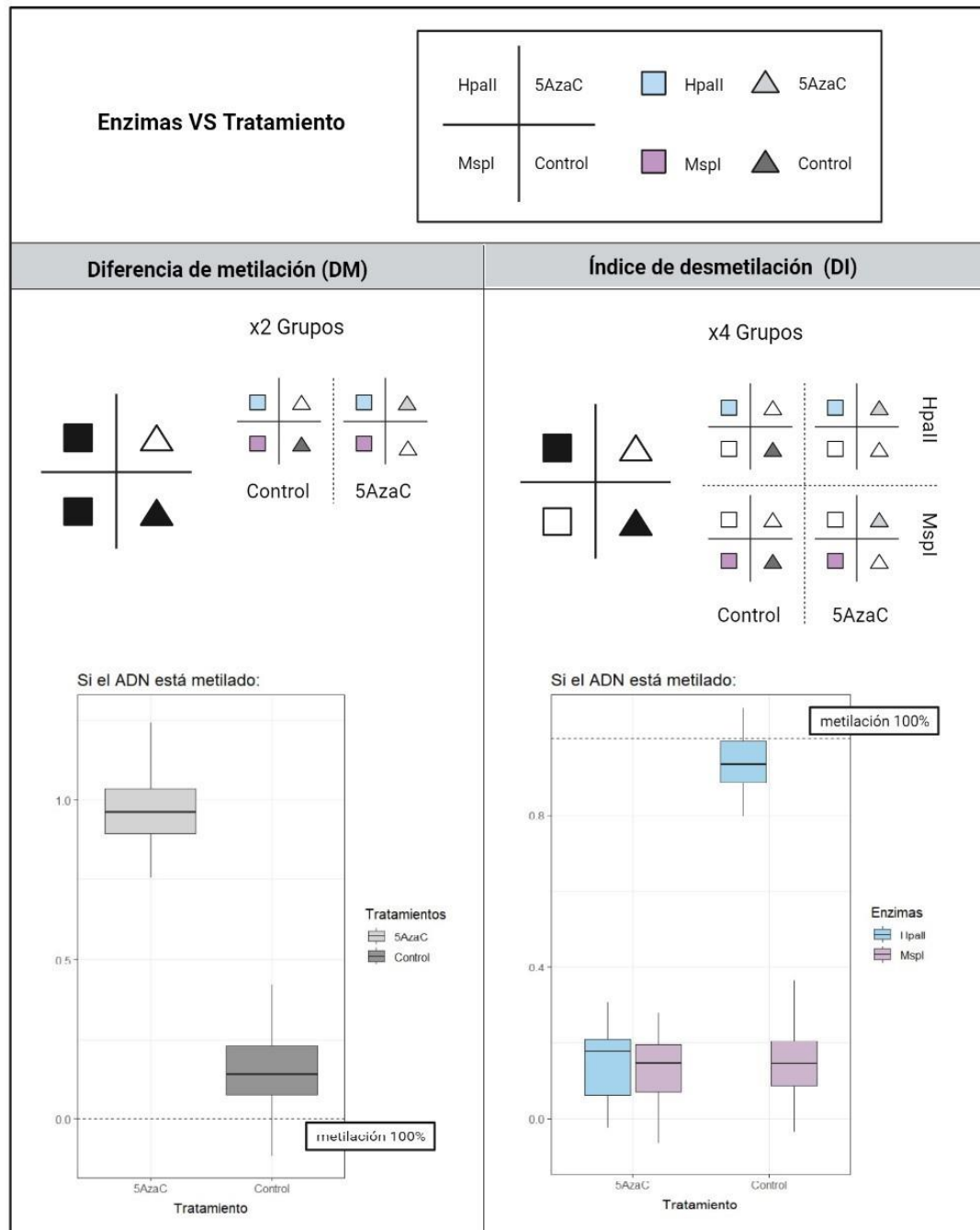


Figura 5. Relación entre enzimas y tratamientos para el análisis de metilación específica mediante índices distintos (DM y DI) y sus resultados esperados en escenarios de metilación completa.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, Biorender 2023.

La diferencia de metilación (DM) utiliza ambas enzimas para analizar un solo tratamientos, mientras que el índice de desmetilación (DI) considera una sola enzima para analizar un solo tratamiento. En la parte superior la figura sin color representa en negro el número de variables que toma cada índice, y las formas son el tipo de variable que contiene: cuadrados para enzimas y triángulos para los tratamientos.

1.2 Justificación de la Investigación

Pese a la importancia de las mariposas *H. e. lativitta* como especies modelo, hay muy pocas investigaciones sobre los patrones epigenéticos de sus genomas. La especie *H. e. lativitta* ha sido bien caracterizada en aspectos relacionados a la ecología de grupo, especies relacionadas, comportamiento y aprendizaje, y es una de las especies del género *Heliconius* en donde el genoma completo ha sido secuenciado y anotado [33]. Sin embargo, se ha caracterizado la metilación únicamente en *Heliconius melpomene* [36] y pese a que en *Heliconius* se registran mecanismos epigenéticos que afectan la expresión de cromosomas sexuales [58] la información con respecto a este y otros patrones epigenéticos implicados en el genoma aún es reciente o inexistente.

Un gran desafío en biología evolutiva es identificar genes que conlleven a la diversidad morfológica y adaptativa entre poblaciones y entre especies. En mariposas *Heliconius*, recientes investigaciones establecen que aspectos asociados a la diversidad morfológica y adaptativa como la variación en la heredabilidad de la toxicidad cianogénica [59] y como el patrón de color de las alas [23] pueden estar relacionados con factores epigenéticos. En respuesta, investigaciones que exploren marcas epigenéticas son valiosas para investigar la conexión entre dichas modificaciones epigenéticas y la aparición de novedades morfológicas y comportamentales en *Heliconius*. Además, dado que este tipo de modificaciones pueden heredarse, conocer su dinámica ayudaría a comprender mejor la historia evolutiva de estas especies.

Los patrones epigenéticos varían según las condiciones ambientales [60] y, por lo tanto, su estudio permitirá recolectar información sobre la ecofisiología de estas poblaciones [61]. A largo plazo, la información obtenida puede ser utilizada para investigar el efecto de un ambiente cambiante en los procesos ecológicos y evolutivos de las poblaciones de *Heliconius*, y de forma indirecta a contribuir en responder preguntas sobre la vulnerabilidad de los ectotermos tropicales frente al Antropoceno [62].

La Universidad Ikiam cuenta con un insectario especializado para la crianza de mariposas, y en su campus se encuentra habilitado un laboratorio de biología molecular de investigación. De la misma forma, la especie *Heliconius erato lativitta* se encuentra ampliamente distribuida en la región amazónica ecuatoriana [33], área que a su vez comprende zonas cercanas a la universidad. Y debido a proyectos desarrollados y en desarrollo entre Ikiam en conjunto con universidades extranjeras existen varios sitios de

colecta de *H. e. lativitta* en Tena y en la provincia de Napo en general. Conociendo el potencial emergente de las mariposas *Heliconius* como organismos modelo en campos como la evolución, neurobiología y comportamiento animal, y considerando a la epigenética como un campo emergente en insectos destacando el rol clave que puede desempeñar en la evolución de ectotermos bajo ambientes cambiantes [49]. Esta investigación pretende obtener información acerca del estado de metilación global y específica de *H. e. lativitta* por medio de las técnicas de fingerprinting “MSAP” y “MSRE-qPCR” usando como control negativo el tratamiento con el inhibidor enzimático 5-AzaC.

El experimento contará con una fase de campo donde se colectará, criará y tratará parte de los individuos con 5-AzaC, una fase *in-sílico* donde se elaboran sondas especializadas para ambas técnicas de fingerprinting, y una fase experimental donde se evaluará la metilación genómica por medio de MSAP y la metilación gen específica por medio de MSRE- qPCR (figura 6).

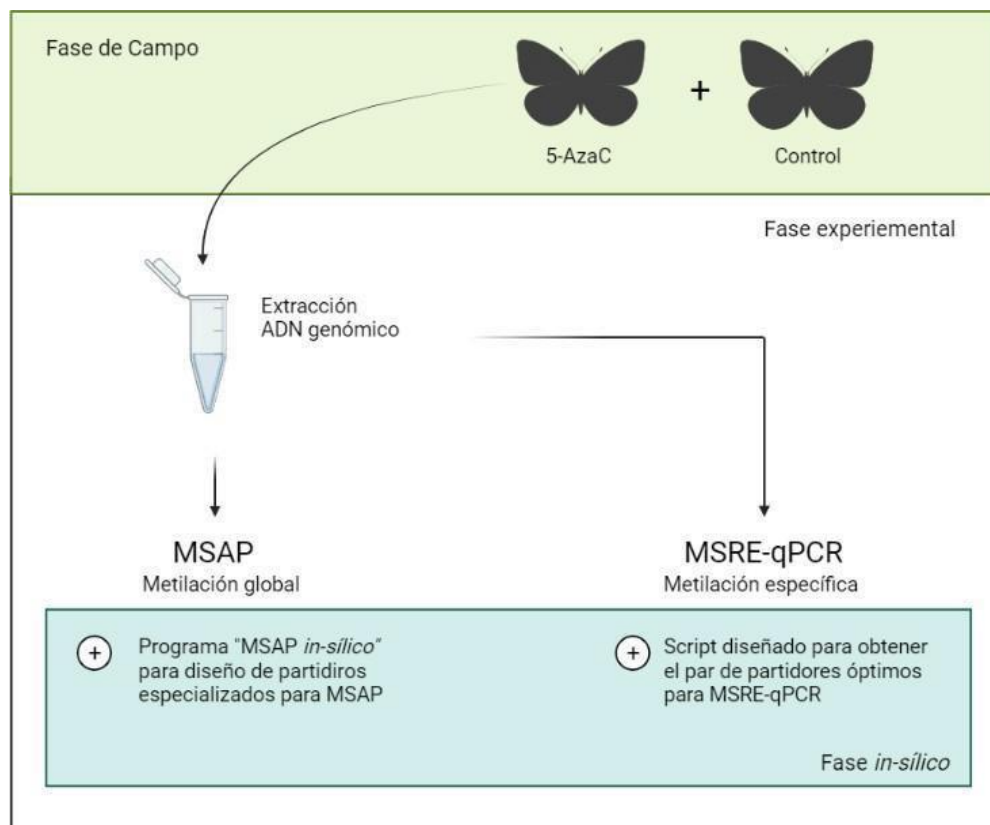


Figura 6. Diseño experimental resumido para la aplicación de las técnicas de fingerprinting MSAP y MSRE-qPCR.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Con este acercamiento será posible inferir el estado de la metilación de *H. e. lativitta*. y el efecto en la metilación de mariposas tratadas con 5-AzaC. Además, de forma simultánea, por medio de partidores especializados para la técnica MSAP diseñados a través de simulaciones *in-sílico*, la técnica MSAP será capaz de arrojar información acerca de la metilación no sólo de fragmentos aleatorios en el genoma, sino también sobre genes putativos implicados en la adaptación y la evolución de estas mariposas

1.3 Pregunta de Investigación

¿Cómo cambia la metilación CpG en mariposas adultas *H. e. lativitta* tratadas con el agente desmetilante 5-Azacidina?

1.4 Hipótesis

Sí es posible determinar el estado de la metilación de individuos adultos de la especie *H. e. lativitta* naturales y tratados con el inhibidor enzimático 5-AzaC mediante las técnicas de fingerprinting “MSAP” y “MSRE-qPCR”

1.5 Objetivos de Investigación

1.5.1 Objetivo general

Evaluar mediante las técnicas de fingerprinting MSAP y MSRE-qPCR la metilación en ADN de individuos adultos de la especie *H. e. lativitta* naturales y tratados con el inhibidor 5AzaC.

1.5.2 Objetivos específicos

- Diseñar mediante simulaciones *in-sílico* partidores especializados de la técnica MSAP para la identificación de fragmentos de genes seleccionados en *H. e. lativitta*.
- Detectar por medio de la técnica MSRE-qPCR cambios específicos en la metilación en el gen *Hsp90* en individuos adultos *H. e. lativitta*.
- Detectar por medio de la técnica MSAP cambios en la metilación genómica de individuos adultos *H. e. lativitta*.
- Establecer mediante las técnicas MSAP y MSRE-qPCR la diferencia entre la metilación en ADN de individuos tratados con 5AzaC e individuos naturales.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Fase de Campo

2.1.1 Colecta de especímenes

Los individuos usados para la experimentación fueron los descendientes de mariposas *H. e. lativitta* hembras salvajes colectadas en campo. Se planificó un total de 9 salidas, en un total de cinco localidades alrededor de la provincia de Napo: “Mina negra”, “La Y de Misahualli”, “Venecia”, “Suchipakari” y “La casa de Lin”. El equipo de colección consta de dos implementos: Una red aérea de 14 pulgadas de diámetro de la marca “RESTCLOUD”, empleada para colectar insectos voladores de gran tamaño como libélulas y mariposas [63], y sobres transparentes de milar o glasina usados para almacenar mariposas en campo [64]

El protocolo de colección fue explicado de forma empírica por PhD Patricio Salazar y consta de dos partes importantes para la introducción de especímenes salvajes a cautiverio:

- Alimentación previa: Se acostumbra a la mariposa a la dieta artificial compuesta de agua, azúcar y polen suministrándose gotita a gotita sobre la probóscide. Esta alimentación artificial se realiza una o dos veces en un lapso de 12 a 24 horas, entre comidas la mariposa se coloca en una pequeña jaula cubierta para imitar un ambiente con poca luz.
- Entrenamiento: Pasadas las 24 horas de alimentación artificial, se introduce al individuo al mariposario y se entrena para reconocer el comedero donde se encuentra la dieta. El entrenamiento consiste en colocar la mariposa sobre el comedero mientras se sostienen sus alas con unas pinzas especiales y simultáneamente colocarle poco a poco gotas hasta que la mariposa introduzca la probóscide dentro del comedero.

Las jaulas donde se colocaron a las mariposas contaron de comederos suspendidos, plantas con flores naturales tales como *Lantana camara* y *Stachytarpheta jamaicensis* para proveer de polen natural necesario para el correcto desarrollo de las mariposas [14], y brotes de la planta hospedera *Passiflora punctata* spp. donde las mariposas

depositarán sus huevos [65]. Cabe mencionar que las mariposas hembras salvajes colectadas son en su mayoría fecundadas en la naturaleza pocas horas después de salir de la pupa, en campo esto se reconoce por el fuerte olor que despiden las hembras que ya hayan sido fecundada [66]. Por tanto, la mayoría de las hembras colectadas no necesitan ser fertilizadas una vez introducidas a cautiverio.

2.1.2 Crianza

Se colectaron los huevos de forma diaria y se colocaron dentro de vasos plásticos con tapa de forma individual (figura 7). En cada uno de ellos se etiquetó la fecha en el que eclosionan junto con un código de identificación. Al eclosionar cada larva se coloca de forma individual en envases plásticos con brotes de *P. punctata* L., figura 7. Los individuos que nacieron y llegaron a mariposas formaron parte de la muestra de estudio. Se conformó una muestra total de 63 individuos de la primera generación de las mariposas *H. e. lativitta* hembras colectadas; 33 individuos para el grupo de control y 30 individuos para el grupo experimental.



Figura 7. Herramientas del sistema de crianza de *H. e. lativitta*, a la derecha envase plástico diseñado para la incubación de huevos y a la izquierda sistema de alimentación de larvas con brotes de *P. punctata* L.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, Biorender 2023.

2.1.3 Tratamiento con 5-Azacitidina

Se elaboró un nuevo protocolo para la introducción del agente desmetilante 5AzaC. Consiste en mezclar una solución de 4mM de 5-Azacitidina dentro de una solución fraccionaria de la dieta artificial (polen, azúcar y agua) y alimentar por medio de una jeringa *ad-libitum*. La dieta artificial es una disolución en agua que contiene 3% de azúcar y 0.2% de polen. Se usó esta disolución para alimentar dos veces al día por siete días a los individuos del grupo de tratamiento. Debido a que la 5AzaC no tiene mucha estabilidad a temperatura ambiente todas las raciones diarias fueron preparadas antes de los 7 días de tratamiento, almacenadas a aproximadamente -20°C y descongeladas al momento de usar [67]. La concentración de 5-Azacitidina empleada es la misma descrita por Aegi et al. [61], para el tratamiento de polillas de *Bombix mori*. El grupo control constó de individuos naturales no tratados con el inhibidor enzimático 5AzaC, estos individuos fueron alimentados con jeringa *ad-libitum* únicamente con la dieta artificial.

2.2 Fase in-sílico

2.2.1 Obtención de genoma de referencia

Se obtuvo el genoma de referencia de la mariposa *H. e. lativitta* desde el repositorio genómico de lepidópteros “lepbases”. Este genoma consta de 142 andamios o en inglés “scaffolds”. Los andamios corresponden a secuencias contiguas agrupadas y clasificadas según al cromosoma al que pertenecen en *H. e. lativitta*. El genoma fue ensamblado en el laboratorio de Robert Reed en 2016 y se descargó como archivo.fasta bajo el nombre “*Heliconius erato lativitta* v1” [33].

2.2.2 Simulación de MSAP in-sílico

El programa se diseñó mediante código en Python para simular un gel producto de la digestión y posterior amplificación de fragmentos de ADN, similar a la técnica MSAP. Este programa utiliza tres variables: 1) El archivo FASTA del genoma completo de la especie, 2) El par de enzimas de restricción, y 3) El par de cebadores a utilizar para la amplificación de los fragmentos. Como resultado, la salida gráfica del programa retorna una imagen similar a un gel tradicional de agarosa, en el que se puede visualizar cada fragmento representado como una banda y una descripción donde se encuentra inscrito el número total de fragmentos amplificados.

Se usó la salida gráfica del programa para predecir el número y el tamaño de fragmentos obtenidos través de la técnica MSAP, en base a esta predicción se escogió los partidores a usar en nuestro experimento. El programa se compone de dos *scripts* en python que simulan dos partes fundamentales de la técnica MSAP: la digestión enzimática y la amplificación selectiva. Ambas partes necesitan librerías adicionales para el correcto funcionamiento del código, de entre ellas destaca la librería “biopython”, que fue indispensable tanto para operar los datos genómicos como para ofrecer herramientas que permitan trabajar con enzimas de restricción [68].

2.2.2.1 Digestión enzimática

La digestión opera con el archivo “fasta” del genoma a ser analizado, en este caso “*Heliconius erato lativitta* v1”, y con el par de enzimas que pretendamos usar en nuestro experimento, en nuestro caso HpaII/MspI - EcoRI. Al finalizar del programa se obtiene un nuevo archivo “fasta” con todos los fragmentos generados a partir de la digestión por el par de enzimas escogidas.

El programa no hace distinción entre HpaII y su isoesquizómero MspI, ya que ambos reconocen el mismo sitio de restricción en el ADN, por ello no hay diferencia en usar una u otra enzima en el programa. El programa no puede distinguir entre citosinas metiladas y no metiladas debido a que esta información no está disponible en el genoma ensamblado. En consecuencia, únicamente analiza secuencias nucleotídicas (A, T, C, G) en archivos en formato “fasta” y no la metilación.

A continuación, el esquema de la figura 8 representa de forma general el algoritmo denominado “Digestión enzimática”: el programa parte de una secuencia de una longitud hipotética de 500 pb (pares de bases) e identifica los sitios de restricción de las dos enzimas seleccionadas (MspI y EcoRI), estos sitios tienen una posición dentro de la secuencia y se presentan en el diagrama de forma numérica. En base a la posición se puede determinar la longitud de cada fragmento producido en la digestión y restando las posiciones de cada uno de los puntos se obtiene la secuencia de cada fragmento generado. Al finalizar, tanto el tamaño como la secuencia de los fragmentos generados son guardados en formato tipo “fasta” en un “archivo.fasta”.

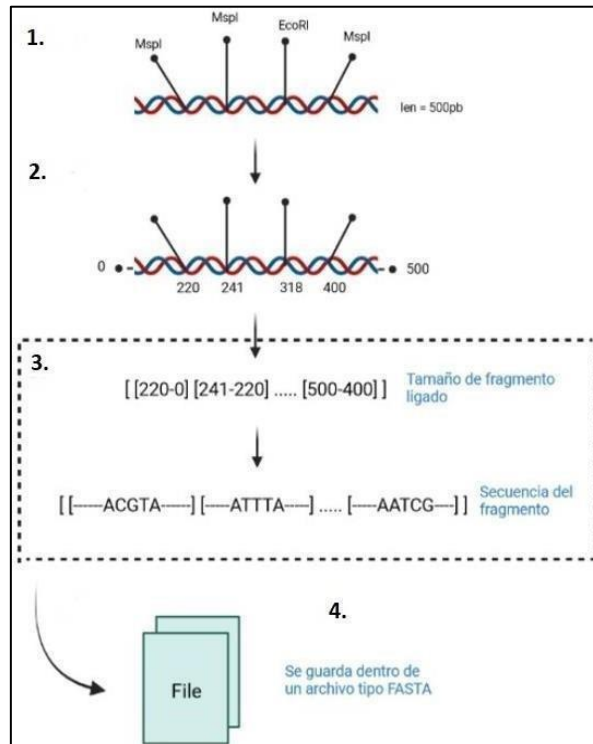


Figura 8. Representación esquemática del algoritmo de simulación de la técnica MSAP, denominado "Digestión enzimática".

Elaborado por: Andrei Flores de Valgas, 2022.

2.2.2.2 Amplificación selectiva

Una vez obtenido el archivo donde se encuentran los fragmentos producidos por la digestión de las 142 secuencias del genoma "Heliconius erato lativitta v1" (primera parte del programa), se procede a identificar cual de esos fragmentos será amplificado. Los fragmentos identificados se mostrarán mediante un gráfico a la salida del programa, este gráfico representa a un gel tradicional de agarosa donde cada banda representa un solo fragmento amplificado y la distancia que recorre cada banda es proporcional al tamaño de dicho fragmento.

A continuación, se muestra una representación esquemática del algoritmo empleado en la segunda parte del programa denominado "Amplificación selectiva":

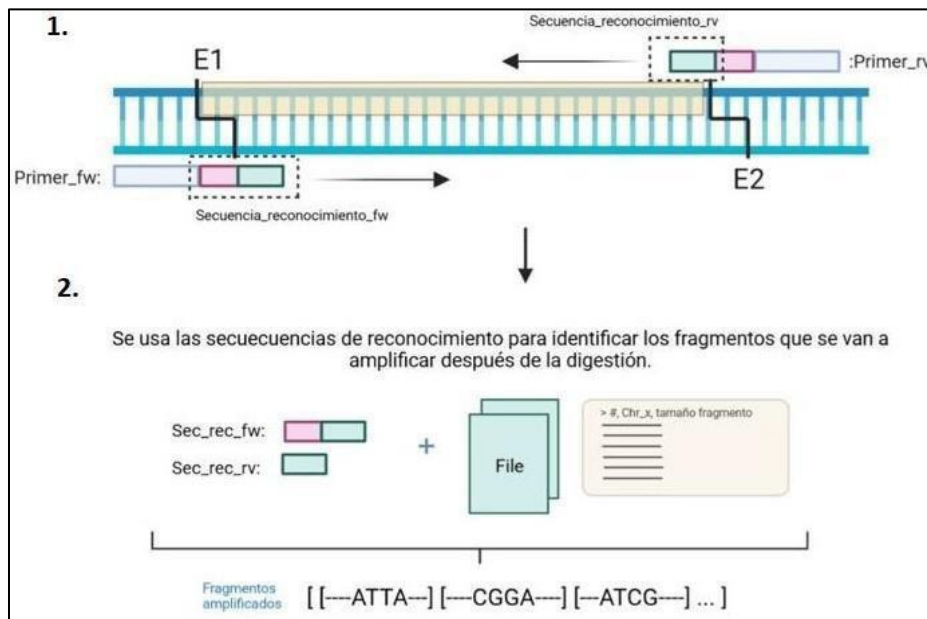


Figura 9. Representación esquemática del algoritmo para simulación de la técnica MSAP, denominado "Amplificación selectiva".

Elaborado por: Andrei Flores de Valgas, 2022.

En esta última parte del programa se usó parte de la secuencia de los cebadores para reconocer cuál de todos los fragmentos en el "archivo.fasta" serán amplificados. Para ello se debe establecer qué parte del cebador tanto *forward* como *reverse* será complementario a los fragmentos digeridos. Este segmento complementario se encuentra justo después del sitio de corte de ambas enzimas y en el cebador está de entre 5 a 10 nucleótidos antes del extremo 5', a esta zona se la nombró como "Secuencia de reconocimiento".

En la parte uno de la figura 9 observamos en recuadros punteados la secuencia de reconocimiento de cada par de cebadores "Primer_fw" y "Primer_rv". Cada cebador se dividió en 3 colores, el gris azulado representa la parte que hibrida con los adaptadores ligados, el rosa la parte cohesiva o los extremos de cadena simple que quedan en los fragmentos después de la digestión, y el verde representa los nucleótidos de segmentación "-NNN". Los bloques rosa y verde serán los elementos de los que se compone la secuencia de reconocimiento y la inclusión del bloque rosa dependerá del cebador, de la forma de corte de la enzima y del orden en que cortan las enzimas al fragmento.

Una vez obtenidas las secuencias de reconocimiento, por cada cebador se creó una función que utiliza estos sitios para reconocer cual de todos los fragmentos en el archivo

fasta coinciden con dicha secuencia, aquellos que coinciden son almacenados en una lista donde consta el tamaño de cada uno de ellos y su secuencia, figura 9.

2.3 Diseño de partidores especializados para MSAP

Los partidores especializados y los adaptadores para la ligación son una modificación de los partidores diseñados por Ovidou et al. [49]. La modificación de los partidores tuvo lugar en la secuencia que hibrida con el fragmento digerido y con el sitio de corte de la enzima. En consecuencia, se necesita un adaptador por cada sitio de corte. Se obtuvo tres adaptadores específicos para los cortes con EcoRI, HindIII y MspI/HpaII, nótese que HpaII y MspI tienen el mismo sitio de corte por tanto usan el mismo adaptador.

2.3.1 Amplificación de fragmentos de genes en MSAP

La parte final del diseño de partidores especializados es la modificación de los nucleótidos de segmentación “-NNN” para amplificar tanto a fragmentos aleatorios dentro del genoma como a un fragmento del gen de interés. Para lograrlo, se descargó en formato fasta las secuencias exónicas de los genes *Optix*, *BarH1*, *Dco* en la plataforma virtual benchling versión 1.7.0 [69], mediante la herramienta “digest” se obtuvo un fragmento producto de la digestión con HpaII/MspI y EcoRI, y un fragmento producto de HpaII/MspI y HindIII. El gen *BarH1* es responsable de codificar proteínas homeobox implicadas en el desarrollo del sistema nervioso periférico [50], el gen *Optix* es encargado de producir el color rojo de las alas en mariposas *Heliconius* [51], y el gen *Dco*, es asociado al ritmo circadiano y a la neurodegeneración en *Drosophila melanogaster* [52].

Por cada gen se escogió un solo fragmento producto de ambas digestiones, su secuencia debe presentar cortes en un extremo por EcoRI o HindIII y en el otro extremo por MspI/HpaII. La secuencia obtenida se utilizó como molde para diseñar los nucleótidos de segmentación, los cuales corresponden a los primeros y los últimos nucleótidos del fragmento.

Los partidores diseñados fueron probados *in-silico*, disminuyendo o aumentando el número de nucleótidos de segmentación en función del número y tamaño de fragmento mostrado por el programa. Para determinar cuál de todos los cebadores diseñados serán ideales para la amplificación selectiva, se tomó en consideración el número de fragmentos amplificados y la diferencia de tamaño entre ellos. Idealmente se pensó en

un rango aproximado de 10 a 60 fragmentos amplificados y una distancia de al menos 10 pb entre ellos.

2.4 Fase de laboratorio MSAP

2.4.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción Dneasy Blood and Tissue de la compañía Qiagen empleando el protocolo modificado por Nadeu et al. [25], descrito para la extracción de ADN de mariposas *Heliconius*. Se utilizaron tijeras de cutícula y pistilos para fragmentar el tejido de la mariposa.

La extracción de ADN se llevó a cabo en cabeza y tórax. Se empleó ½ tórax de cada individuo y la cabeza entera sin antenas, el resto del tejido fue almacenado en DMSO (dimetilsulfóxido) a -20 °C a excepción de las alas que fueron desechadas. Al finalizar la extracción, se eluyó el ADN en 200 µl de buffer AE (10mM Tris HCL y 0.5mM EDTA). La concentración final de ADN fue de 20 ng/µl a 50 ng/µl para tórax y de 100 ng/µl a 130 ng/µl en cabeza, la concentración y calidad del ADN fue medido en el espectrómetro UV-vis Nano Drop One.

2.4.2 Detección del patrón de metilación por MSAP

En la detección del patrón de metilación se utilizó los partidores especializados diseñados *in-silico*: BarH1_EcoRI_fw y BarH1_EcoRI_rv, y Optix_HindIII_fw y Optix_HindIII_rv para amplificar un número y tamaño de fragmento predecible, e identificar a tanto el fragmento correspondiente al gen *BarH1* en la digestión EcoRI-MspI/HpaII y tanto al fragmento correspondiente al gen *Optix* en la digestión HindIII-MspI/HpaII.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en una cámara para la visualización de geles de agarosa ThermoScientist teñidos químicamente por; “SYBR™ Safe DNA Gel Stain”.

2.4.2.1 Digestión enzimática

Se incubó 21.5 µl de ADN genómico con 1 µl de cada enzima de restricción en una solución amortiguadora adecuada: rCutSmart Buffer para EcoRI y NEBuffer™ r2.1 para

HindIII. Las digestiones se realizaron a 37°C durante tres horas y se bloquea la actividad de las enzimas HpaII y EcoRI mediante shock térmico en baño maría por 20 minutos a 80°C y 65°C, respectivamente. Finalmente, todas las muestras se etiquetaron y almacenaron en tubos de microcentrífuga a una temperatura aproximada de -20 °C. El volumen y la concentración final de cada reactivo empleado en la digestión se muestra a continuación:

Tabla 1. Volúmenes y concentración de reactivos para digestión enzimática

Componente	Concentración Inicial	Volumen 1Rx (μl)	Concentración final en 25 μl
ug DNA	25 ng/μl	21.5	21.5 ng/μl
rCutSmart Buffer	10X	2.5	1 X
NEBuffer™ r2.1	10X	2.5	1 X
HpaII	10 U/μl	0.5	0.2 U/μl
MspI	10 U/μl	0.5	0.2 U/μl
HindIII	20 U/μl	0.5	0.4 U/μl
EcoRI	20 U/μl	0.5	0.4 U/μl

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

2.4.2.2 Ligación de adaptadores

Para la ligación de los fragmentos producto de las digestiones se utilizan 2 pares de adaptadores de doble cadena. Para la ligación de fragmentos digeridos por EcoRI y HpaII- MspI se usó el par de adaptadores HpaII/MspI y el adaptador para EcoRI. Para la ligación de fragmentos digeridos por HindIII y HpaII-MspI, el adaptador HindIII y el adaptador HpaII/MspI. Los detalles de la secuencia de los adaptadores se encuentran descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Adaptadores para ligación MSAP

Enzima	Adaptador	Secuencia 5' - 3'	Long (pb)	GC %
MspI	superior	GACGATGAGTCTCGAT	16	50
	inferior	CGATCGAGACTCAT	14	50
EcoRI	superior	CTCGTAGACTGCGTACC	17	58
	inferior	AATTGGTACGCAGTCTAC	18	44
HindIII	superior	CTCGTAGACTGCGTAA	16	50
	inferior	AGCTTTACGCAGTCTAC	17	47

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Se realizó la hibridación de las cadenas simples de los adaptadores a una concentración de 10 mM para MspI/HpaII, 5 mM para HindIII y 5 mM para EcoRI. Se calentó cada reacción a 95 °C por 2 minutos, seguido de 5 minutos a 54 °C y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos más. La ligación se llevó a cabo en una reacción final de 20 µl, utilizando 12 µl del ADN a una concentración de 21.5 ng/µl genómico previamente digerido, 1 µl de cada par de adaptador de doble cadena, 10mM para MspI y 5mM para EcoRI o HindIII y 5 µl de 5X Ligase Buffer. La reacción se incubó a temperatura ambiente (22°C) durante una hora y se dejó en refrigeración a aproximadamente 4°C por la noche.

2.4.2.3 Amplificación Selectiva

Tabla 3. Volúmenes y concentración de reactivos para PCR

Componente	Concentración Inicial	Volumen 1Rx (µl)	Concentración final en 10 µl
Agua libre de nucleasas	-	3	-
PhiroTaq PCR Mix	-	5	-
Primer forward	10 µM	0.5	0.5 µM
Primer reverse	10 µM	0.5	0.5 µM
Templado de ADN	21.5	1	2.15 ng/µl
Total	-	10	-

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Se utilizó el protocolo elaborado por Li, Ai et al [70] para la amplificación de fragmentos en la amplificación selectiva. El perfil térmico consta de dos etapas: la primera etapa abarca 13 ciclos con diferentes temperaturas de alineamiento ordenadas a manera de gradiente, este gradiente comienza con una temperatura inicial de 65 °C en el primer ciclo y disminuye 0.7 °C en cada ciclo hasta llegar a una temperatura de 56 °C en el ciclo 13. La segunda etapa consta de 23 ciclos a una temperatura única de alineamiento de 56 °C. Cada uno de los ciclos de ambas etapas comenzó con una temperatura de 94 °C por 30 segundos y terminó con una temperatura de extensión de 72 °C por 2 minutos. El tiempo de alineamiento de cada ciclo fue de 30 segundos, la temperatura inicial de desnaturalización fue de 94°C por 5 minutos y al cabo de la segunda etapa se ocupó una temperatura final de 60°C por 30 minutos. El termociclador utilizado fue el Proflex PCR Systems (Applied Biosystems™). Los pares de partidores seleccionados a partir del análisis *in-sílico* se resumen en la tabla a continuación:

Tabla 4. Cebadores especializados empleados en la técnica MSAP

Primer	Dirección	Secuencia 5' - 3'	Long (pb)	GC %	Tm (C°)	Amplicones producidos
BarH1_EcoRI	Forward	GATGAGTCTCGATCGGCC G	19	60.16	54.7	17
BarH1_EcoRI	Reverse	GACTGCGTACCAATTCTTA	19	53.11	49.8	
Optix_HindIII	Forward	GACTGCGTAAGCTTCTC	17	52.94	49.4	23
Optix_HindIII	Reverse	GATGAGTCTCGATCGGTC G	19	57.89	54	

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

2.4.2.4 Visualización de Fragmentos

Las muestras fueron corridas en un gel de 2% de Agarosa y con voltaje de 75 voltios por 3 horas. Los geles se tiñeron de dos formas: empleando 10 µl del tinte “Diamond™ Nucleic Acid Dye” a una concentración final de 1X al finalizar la corrida electroforética [71], o por medio de 5 µl “SYBR™ Safe DNA Gel Stain” a una concentración final de 0.5X agregado directamente en la preparación del gel [72].

2.4.2.5 Comparación de fragmentos *in-vivo* e *in-sílico*

Se determinó el porcentaje de similitud entre las bandas producidas por la simulación *in-sílico* y las bandas producidas por la migración electroforética experimental al dividir el número de bandas con un tamaño similar por la cantidad total de bandas observadas *in-vivo*. Este proceso se repitió por cada muestra de ADN analizada en gel y a partir de este cálculo se obtuvo el porcentaje máximo de similitud, el cual hace referencia a la muestra que presentó un mayor número de bandas similares entre la técnica MSAP y la simulación *in-sílico*.

2.5 Fase de laboratorio MSRE-qPCR

2.5.1 Digestión enzimática

Se realizaron nuevas digestiones de una sola enzima empleando ADN extraído de individuos de *H. e. lativitta* tratados y no tratados con 5AzaC, se ocuparon 20 muestras de ADN genómico de cabeza y 20 muestras de ADN genómico de tórax. En tórax, 9 de ellos fueron tratados con 5AzaC y los 11 restantes fueron parte del grupo control, en cabeza, se utilizaron muestras de 10 individuos tratados con 5AzaC y de 10 individuos pertenecientes al grupo control. Por cada individuo se realizaron dos digestiones por separado, una de ellas con la restrictasa HpaII y la otra con la restrictasa MspI. El volumen final de ambas reacciones fue de 12 µl empleando 0.5 U de HpaII y 0.5 U de MspI en 1.5 µl de buffer AE del NEB, se incubó cada reacción por dos horas a 37°C en baño maría y al finalizar se inactivó aquellas muestras digeridas con HpaII por shock térmico a 80°C por 20 minutos. La concentración de cada reactivo se encuentra descrito en la tabla No. 1 sección 2.4.2.1.

2.5.2 Selección de partidores

Se analizó una lista de 77 pares de partidores almacenados en un archivo “.xlsx”, los cuales fueron diseñados para amplificar genes relacionados al estrés térmico, aprendizaje y memoria en mariposas *H. e. lativitta*. Se diseñó un script en Python v.3.9 con dependencias de los paquetes biopython v.1.79, numpy v.1.22.4 y pandas v.1.5.3 para evaluar cada par de partidores en el archivo “.xlsx” e identificar a través de la secuencia del genoma de *H. e. lativitta* el amplicón resultante. En base a dichos amplicones se devuelve sólo aquellos que contengan en su secuencia un solo sitio de

reconocimiento para las restrictasas HpaII-MspI (3'-CCGG-5'). A continuación, se despliega la tabla de los partidores seleccionados:

Tabla 5. Lista de genes seleccionados para MSRE-qPCR

Gen	Longitud gen (kb)	Lepbase_id	Hebra	Exones	Longitud amplicon (pb)	5'- CCGG- 3'
<i>DnaJ-5</i>	1.3		(-)	2	122	0
		HEL_006641-RA				
<i>Hsp90</i>	2.16		(+)	2	112	1
		HEL_005376-RA				
<i>GAPDH</i>	1.42		(+)	4	122	0
		HEL_005745-RA				

Realizado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

2.5.3 Validación de partidores

Se realizó curvas de calibración de ADN genómico (ADNg) por medio diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 30 ng/μl por triplicado. El volumen final de cada reacción fue de 10 μl empleando 5 μl de SYBR™ Green PCR Máster Mix (Termo Fisher™), 0.5 μl de cada primer a 6 mM y 2.5 μl de ADN genómico. Se utilizó el equipo de PCR en tiempo real CFX96 Touch (BIO-RAD™) para obtener los valores del ciclo del umbral resultante (C_q) de una reacción que comprendió 40 ciclos de un minuto y medio comenzando con una temperatura inicial de fue de 50°C por 2 minutos seguido de la temperatura desnaturalización a 95°C por 2 minutos. Cada ciclo comenzó a 95°C por 15 segundos, seguido de 15 segundos a la temperatura de alineamiento de cada primer y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto. En base a los valores C_q obtenidos se determinó la línea de tendencia, la ecuación de la recta y el valor de R^2 para cada par de partidores.

En base a la pendiente (m) de la ecuación de la recta obtenida a partir de los valores C_q , se calculó la eficiencia de cada par de partidores empleando la siguiente fórmula:

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

Donde E es la eficiencia porcentual y m es la pendiente de la recta en $C_q/\log$

2.5.4 PCR en tiempo real de partidores seleccionados

A partir del ADN genómico de cada individuo y del ADN genómico digerido obtenido en la sección 2.4.1, se llevó a cabo una PCR en tiempo real con un volumen final 10 μ l (Tabla no. 5). Se emplearon placas de 96 pocillos MicroAmp™ (AppliedBiosistemas™) para la reacción compatibles con el termociclador en tiempo real CFX96 Touch (BIO-RAD™), el perfil térmico abarca 40 ciclos de un minuto y medio cada uno: 15 segundos a 95°C, 15 segundos a la temperatura de alineamiento de cada partidor seleccionado y 72°C por 1 minuto. Las lecturas de placa se efectuaron al final de cada ciclo y la temperatura inicial de la reacción fue de 50°C por 2 minutos seguido de 95°C por 2 minutos.

Tabla 6. Componentes y concentraciones de reactivos empleados en qPCR.

Componente	Concentración	Volúmen 1Rxn (μ l)	Concentración final en 10 μ l
Agua libre de nucleasas		2	
SYBR™ Green PCR Master Mix	2X	5	1X
Primer forward	10 μ M	1	1 μ M
Primer reverse	10 μ M	1	1 μ M
ADNg, ADNdig	8 ng/ μ L	1	8
Total		10	

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Mediante el software CFX Maestro (BIO-RAD™) se determinó la ubicación de las muestras en las placas, así como el perfil térmico para cada reacción. Cada placa se usó para un solo tipo de tejido y un único par de partidores. Se recopiló la información de la tabla de datos obtenida a partir del software CFX maestro (BIO- RAD™) donde constan los valores C_q resultantes de cada muestra.

2.5.5 Análisis de datos MSRE-qPCR

Se agruparon los valores C_q obtenidos en cada placa en una sola base de datos en donde consta: el código del individuo, el gen amplificado por el par de partidores, el tejido de donde se extrajo el ADN genómico, el C_q del ADN genómico, el C_q del ADN genómico digerido con HpaII, y el C_q del ADN genómico digerido con MspI.

2.5.5.1 Cálculo de la Diferencia de metilación (DM)

Se adaptó el método doble delta de Livak para MSRE-qPCR utilizando el C_q del ADN genómico como secuencia control y por medio de este medir la diferencia entre el C_q de las muestras digeridas con HpaII y el C_q de las muestras digeridas con MspI. Por motivos prácticos se denominó a esta adaptación como: diferencia de metilación (DM) y la fórmula obtenida se muestra a continuación:

$$\Delta\Delta C_q = (2 * E)^{-((C_{q \text{ MspI}} - C_{q \text{ ADNg}}) - (C_{q \text{ HpaII}} - C_{q \text{ ADNg}}))} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde E es la eficiencia del par de partidores, $C_{q \text{ MspI}}$ y $C_{q \text{ HpaII}}$ es el C_q obtenido de la muestra digerida con MspI y HpaII respectivamente y $C_{q \text{ ADNg}}$ es el C_q de la muestra sin digerir.

2.5.5.2 Análisis estadístico del Doble delta de Livak ($\Delta\Delta C_q$)

Mediante el software R v.4.2.3 y las librerías readxl v.1.4.1 y ggplot2 v.3.4.0 se analizó los datos obtenidos a partir del cálculo Doble delta de Livak ($\Delta\Delta C_q$). Se usó la prueba Shapiro

- Wilk para evaluar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de varianzas entre los grupos comparados. Se empleó la prueba no paramétrica de Mann - Whitney y la prueba paramétrica T de student para determinar la diferencia entre individuos tratados y no tratados con 5-Azacitidina, se consideró niveles de significancia de $p = 0.05$ *, $p = 0.01$ **, y $p = 0.001$ ***. Este proceso se realizó una vez por cada uno de los partidores seleccionados en tórax

2.5.5.3 Cálculo del índice de desmetilación DI

En base a los valores C_q obtenidos a partir de una sola muestra de ADN genómico, es decir, el C_q del ADN genómico de un solo individuo y los C_q obtenidos a partir del mismo ADN genómico digerido por HpaII, se calculó el índice de desmetilación (DI) [73] y el delta de C_q de las muestras digeridas con MspI (ΔC_q). El DI representa la fracción del ADN total metilada y el ΔC_q representa la fracción de ese mismo ADN que no fue digerida. Las ecuaciones utilizadas para estos cálculos se describen a continuación:

$$DI = (2 * E)^{-(C_{q \text{ HpaII}} - C_{q \text{ ADNg}})} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\Delta C_q = (2 * E)^{-(C_q \text{ MspI} - C_q \text{ ADNg})} \quad \text{Ec. 2}$$

E es la eficiencia del par de partidores, $C_q \text{ ADNg}$ es el C_q obtenido a partir del ADN genómico, y $C_q \text{ HpaII}$ y $C_q \text{ MspI}$ son el C_q producto del ADN genómico digerido con HpaII y MspI respectivamente.

Se calculó la diferencia entre el C_q obtenido del ADN genómico y el C_q obtenido de la digestión de este ADN genómico con MspI, para determinar la eficiencia del corte enzimático sobre las secuencias a amplificar. Se consideró una digestión nula o incompleta a aquella con una eficiencia de corte enzimático ($E \text{ Corte enzimático}$) inferior a 4.5, se empleó la fórmula descrita a continuación:

$$E \text{ Corte enzimático} = C_q \text{ MspI} - C_q \text{ ADNg} \quad \text{Ec. 3}$$

El resultado de las Ec. 1 y Ec. 2 se utilizó para estimar la cantidad de metilación presente de forma porcentual ($\% \text{ metilación}$) y de estimar el porcentaje de la muestra sin digerir ($\% \text{ ADNg no digerido}$), las estimaciones porcentuales se calcularon en base a las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ ADNg no digerido} = \Delta C_q * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

$$\% \text{ metilación} = DI * 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Al finalizar se utilizaron los valores obtenidos a partir de la Ec. 4 y la Ec. 5 para calcular el porcentaje promedio del ADN genómico digerido y el porcentaje promedio de metilación en individuos tratados y no tratados con 5AzaC. Este cálculo se realizó para cada uno de los partidores seleccionados y por cada tipo de tejido (tórax o cabeza).

2.5.5.4 Análisis estadístico del índice de desmetilación DI

El análisis estadístico fue similar al descrito en la sección 2.5.5.2 para el análisis de la Diferencia de metilación (DM). Se evaluó la normalidad de los datos del índice de desmetilación DI y el ΔC_q utilizando el software R v.4.2.3 empleando las librerías readxl v.1.4.1 y ggplot2 v.3.4. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. Además, se calculó el valor promedio de la eficiencia del corte enzimático (Ec. 3) para identificar qué partidores seleccionados y en

qué tipos de tejidos no se produjo digestión del ADN. Estos últimos no se tomaron en consideración para el cálculo del índice de desmetilación DI ni para el cálculo de ΔC_q .

Se utilizó la prueba no paramétrica Mann – Whitney y paramétrica T de Student para determinar si existe diferencia significativa entre DI y ΔC_q entre grupos tratados y no tratados con 5AzaC. Estas pruebas permiten comparar dos grupos a la vez y determinar la significancia estadística entre ellos. Por tanto, se analizó cada par de partidores y cada tejido comparando los individuos tratados y no tratados en 2 grupos.

Los grupos en los que se comparan son los siguientes:

1. Comparación DI y ΔC_q en individuos tratados con 5 AzaC
2. Comparación DI y ΔC_q en individuos no tratados con 5 AzaC

Este proceso se llevó a cabo por el par de partidores seleccionados en tórax y cabeza y en todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $p = 0.05$ *, $p = 0.01$ **, y $p = 0.001$ ***.

3.1 Programa MSAP *in-silico*

Se analizó 200 pares de partidores de 5 pares distintos de enzimas de restricción sobre el genoma de *H. e. lativitta*. La figura 10 muestra el análisis de 3 pares de partidores diferentes para una digestión con HpaII/MspI y EcoRI:

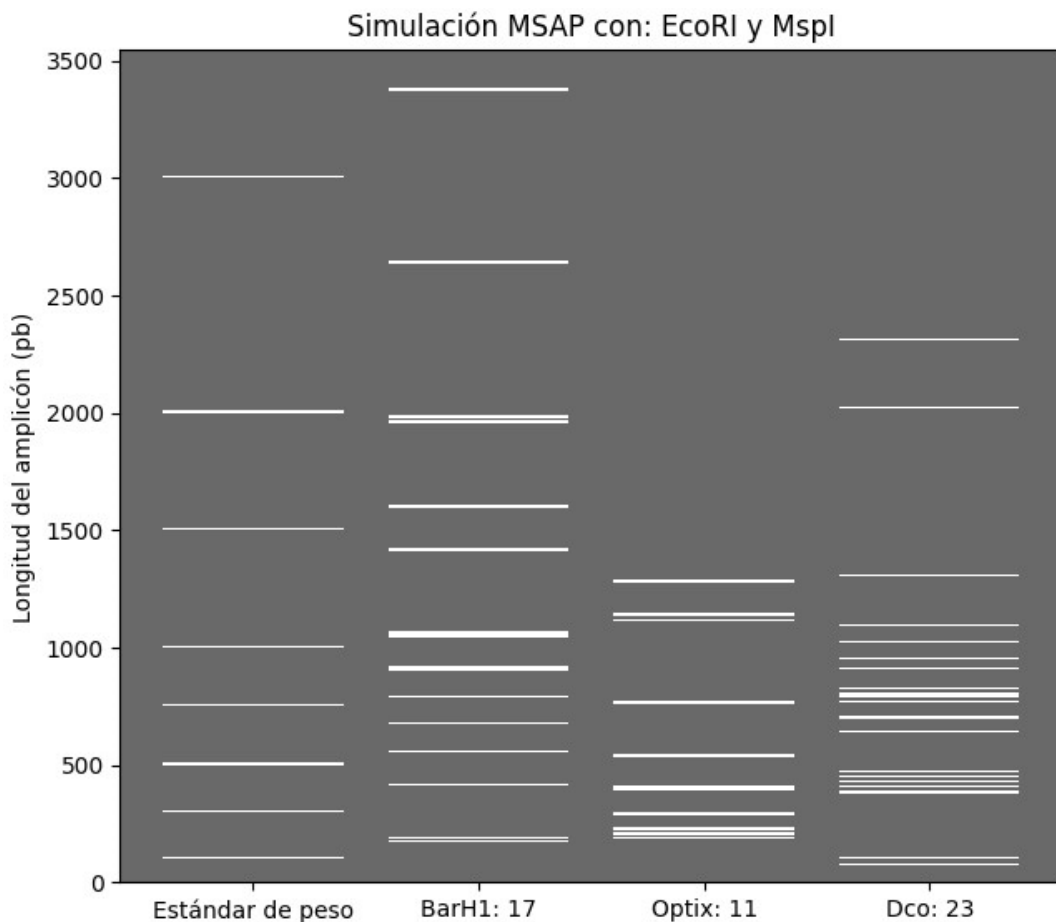


Figura 10. Resultado de MSAP *in-silico* con tres pares distintos de partidores: *Optix*, *Dco* y *BarH1*.

Elaborado por: Andrei Flores de Valgas, 2022.

En el encabezado las enzimas usadas para la digestión, en las ordenadas el tamaño del fragmento en pb, en la parte inferior el fragmento del gen que amplifica y el número de fragmentos amplificados. El estándar de peso molecular simula a el estandar Gene Ruler Express DNA Ladder (Thermo Scientific™).

Se identificó el fragmento correspondiente al gen de interés por medio de la plataforma virtual benchling comparando la longitud del fragmento identificado con los fragmentos producidos por el programa. Del gen diana *BarH1* se obtiene un fragmento de 2611 pb que después de la ligación aumenta a 2635 pb (Imagen 1). Se identificó dicho fragmento en la simulación del programa (figura 11).

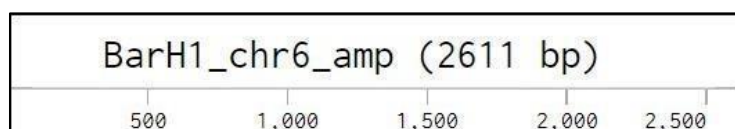


Imagen 1. Fragmento del gen BarH1 obtenido del archiv “H_erato_lativitta_V1.” producto de digestión con HpaII/MspI y EcoRI
Elaborado por: Andrei Flores de Valgas, 2022.

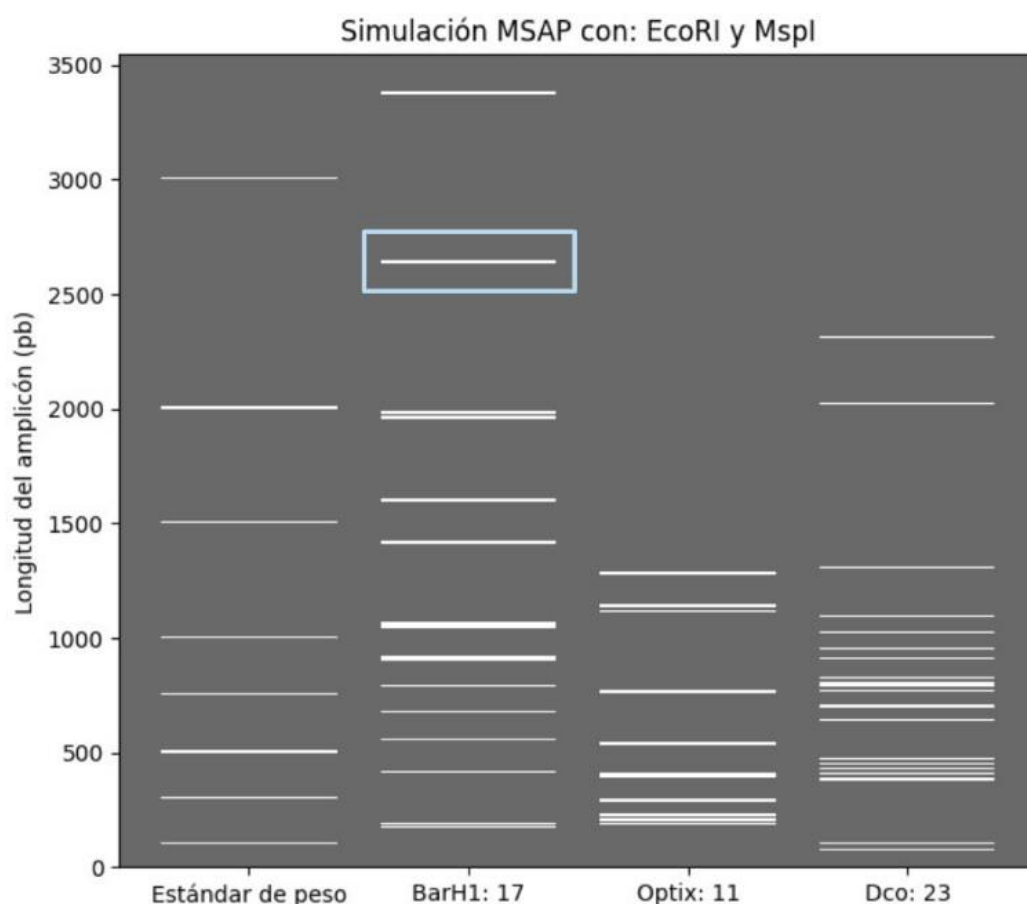


Figura 11. Resultado de MSAP *in-silico* por tres pares de partidores, en recuadro celeste el fragmento del gen BarH1.
Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023

3.2 Fase experimental MSAP

Se realizaron un total de 36 migraciones electroforéticas de ADN digerido con EcoRI-MspI y EcoRI-HpaII con el par de partidores para el gen BarH1: “BarH1_fw1” y “BarH1_rv1” y de ADN digerido con HindIII-MspI y HindIII-HpaII con el par de partidores para el gen Optix: “Optix_HindIII_fw1” y “Optix_HindIII_rv1”.

3.2.1 Visualización de fragmentos en gel

La visualización de fragmentos en electroforesis en gel de agarosa presentó una alta variabilidad en el número de fragmentos visibles en el gel, una alta variabilidad del número de fragmentos contabilizado por cada individuo, y una baja reproducibilidad de los resultados obtenidos al comparar diferentes geles.

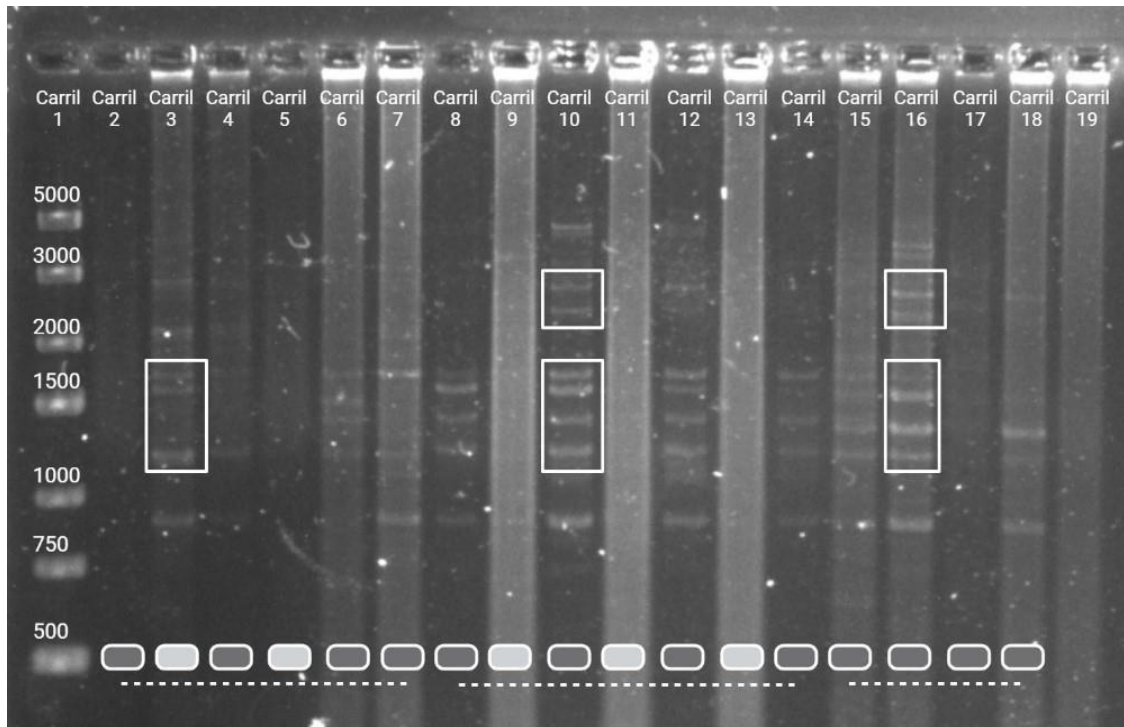


Figura 12. Separación de 18 muestras digeridas con HpaII/MspI - EcoRI y amplificadas con BarH1_fw1 y BarH1_rv1 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de SYBR™ Safe.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023

En puntos gris muestras digeridas con MspI-EcoRI y en blanco digeridos con HpaII-EcoRI. Carril 1: estándar de peso molecular GeneRuler Express DNA Ladder, carril 19: blanco. Las líneas punteadas señalan los carriles donde el ADN empleado proviene de un solo individuo. En recuadros blancos se indican los fragmentos cuyo tamaño coincide entre individuos: el carril 3, 10 y 16 pertenecen a individuos distintos

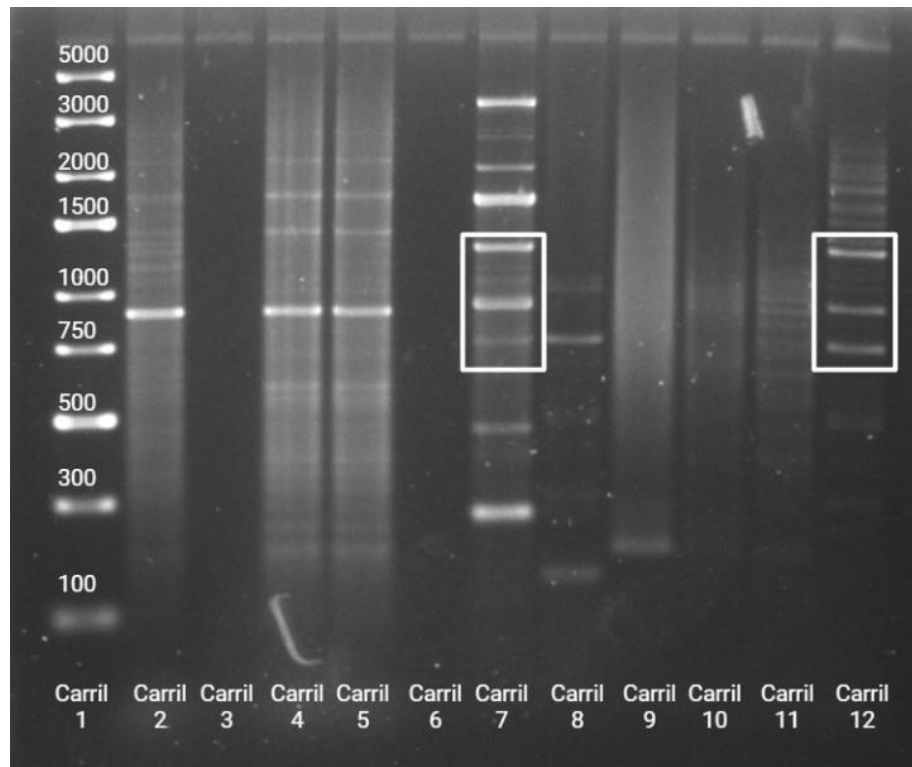


Figura 13. Separación de 11 muestras digeridos con MspI - EcoRI y amplificadas con BarH1_fw1 y BarH1_rv1 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción SYBRTM Safe.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Carril 1: corresponde al estándar de peso molecular GeneRuler Express DNA Ladder. Cada carril del 2 al 12 corresponde a fragmentos de ADN de individuos distintos, en recuadros blancos bandas aparentemente similares entre el carril 7 y el carril 12. El carril 12 contiene la misma muestra de ADN analizada en el carril 10 de la figura 12.

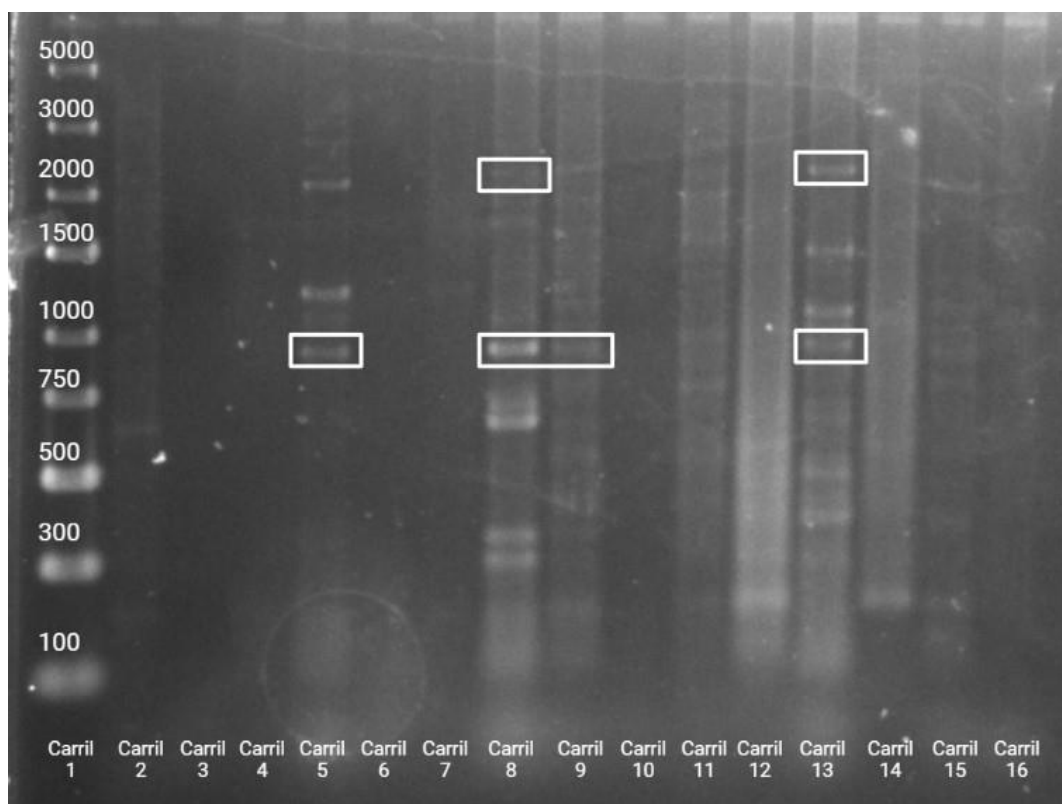


Figura 14. Separación de 14 muestras digeridas con HindIII-MspI amplificadas con cebadores Optix_HindIII_fw1 y Optix_HindIII_rv1 rv1 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción SYBR™ Safe.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Carril 1: estándar de peso molecular Gene Ruler Express DNA Ladder, carril 16: blanco. En recuadros blancos señalan fragmentos de similar tamaño entre muestras. Carriles del 2 al 15 amplifican fragmentos provenientes de individuos distintos entre sí.

3.2.2 Comparación de fragmentos amplificados *in-vitro* e *in-silico*

Se identificó por medio de la simulación MSAP *in-silico* aquellos fragmentos que coinciden con el resultado de la aplicación de la técnica MSAP en laboratorio. Para ello se identificó los fragmentos producidos por los tres geles correspondientes a las figuras 12, 13, 14, y se comparó con los obtenidos en la simulación. Adicionalmente, se trató de identificar el fragmento del gen correspondiente a *Optix* en la digestión HindIII-MspI y al gen *BarH1* en la digestión EcoRI-HpaII/MspI.

A continuación, una parte de la identificación de fragmentos obtenidos en la digestión con el par de enzimas EcoRI-MspI y la identificación del fragmento del gen *BarH1*.

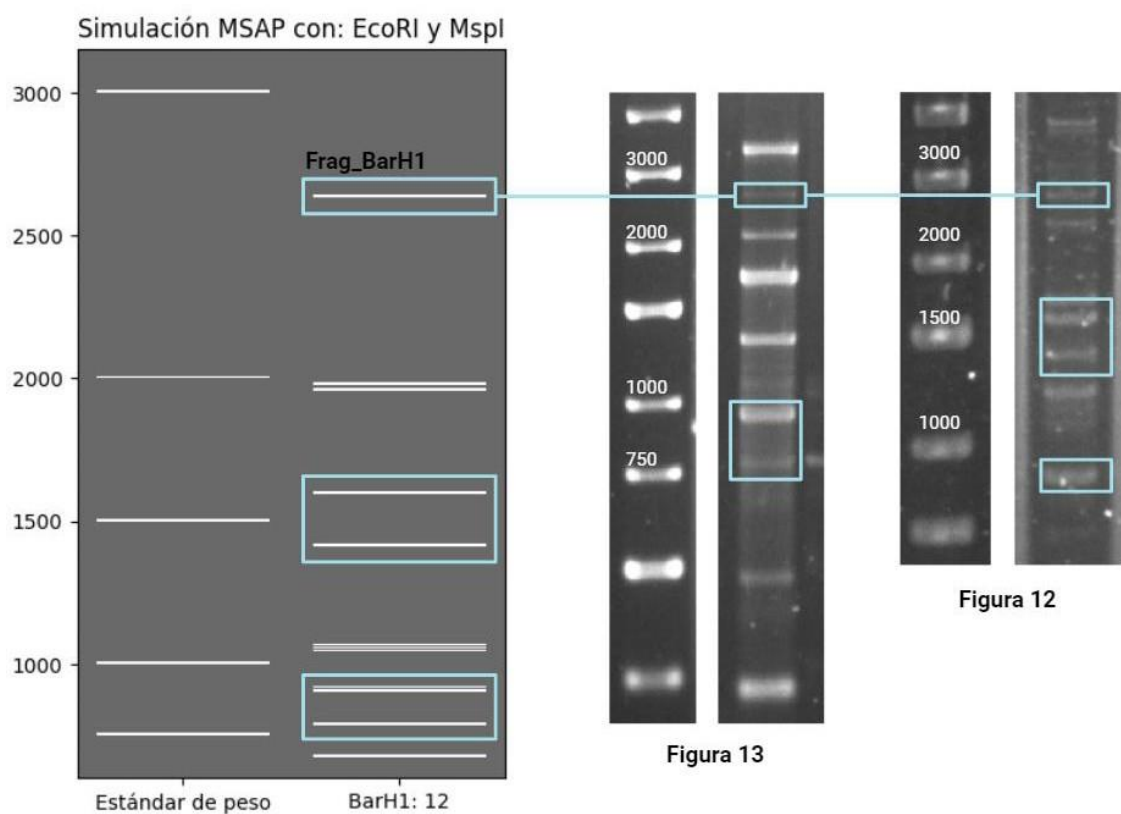


Figura 15. Identificación de fragmentos *in-vitro* e *in-silico* de la digestión EcoRI-MspI con el gen *BarH1*.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023

En recuadros celestes las bandas de longitud similar entre el carril 7 de la figura 13, carril 10 de la figura 12 y la simulación *in-silico*. El fragmento perteneciente al gen *BarH1* se inscribe en la figura con el nombre: Frag_BarH1. A la izquierda de los carriles comparados se encuentra el respectivo marcador de peso molecular.

La figura 15 representa la comparación entre los fragmentos visualizados en el carril 10 de la figura 5 y el carril 7 de la figura 6 junto a la simulación de una digestión con EcoRI-MspI/HpaII. Como resultado, se puede identificar 6 de los 12 fragmentos generados por el programa, además del fragmento del gen *BarH1* en ambas muestras. Cabe resaltar

que en la Figura No. 8 no se visualizan los 17 fragmentos generados *in-silico* puesto que corresponde a una vista reducida de entre los 600 a 3200 pb del gel. Al comparar todas las bandas producidas experimentalmente se identificaron 9 de los 17 fragmentos generados *in-silico* para el perfil EcoRI-MspI/HpaII y 6 de los 24 fragmentos generados *in-silico* para el perfil HindIII-MspI/HpaII.

3.3 Análisis de resultados de la técnica MSAP

La técnica de fingerprinting "MSAP" no pudo realizarse de manera reproducible en *H. e. lativitta* en este experimento. Esto se debe principalmente a la aparente diversidad en el patrón de metilación de cada individuo, junto a la baja resolución de bandas en gel y al limitado número de fragmentos contabilizados por muestra (figuras 12, 13, 14). Sin embargo, se logró desarrollar exitosamente la herramienta de simulación *in-silico* de la técnica MSAP llamada MSAP *in-silico*. Esta herramienta demostró su utilidad al predecir ciertos fragmentos de las migraciones electroforéticas realizadas. En la digestión EcoRI y MspI/HpaII se pudo reproducir un 53% de los fragmentos observados por muestra, y para la digestión HindIII y MspI/HpaII pudo reproducir un 26% de los fragmentos observados por muestra. Además, MSAP *in-silico* fue capaz de identificar el fragmento del gen *BarH1* en los geles resultantes de la digestión HpaII/MspI-EcoRI y el fragmento del gen *Optix* en ciertas muestras en geles de la digestión HpaII/MspI-HindIII.

3.3.1 Limitaciones y posibles fuentes de error

Resultados fallidos de las técnicas derivadas de AFLP, como MSAP, se los ha relacionado una menor cantidad de bandas de las esperadas, algunas de ellas con una alta intensidad en gel y otras, al contrario, con bandas de menor intensidad [74]. Ambas descripciones mencionadas son observadas en la mayoría de los geles producidos en este experimento (figuras 13, 14).

La literatura indica que dichos resultados son causados principalmente por una parcial digestión de los extractos de ADN y una mala ligación de los adaptadores [57], así como también con una mala calidad del ADN o una baja calidad de los reactivos [75]. En el transcurso de este estudio, se realizaron varios cambios al protocolo original de digestión y ligación en respuesta a dichos inconvenientes, siendo el protocolo descrito en metodología aquel que presentó los mejores resultados en favor de la visualización de fragmentos en gel. Las modificaciones realizadas abarcan cambios en el volumen, la concentración y tiempos de incubación en ambas reacciones enzimáticas (ligación-

Digestión), también abarcan el uso de reactivos de diferentes casas comerciales para la ligación y el empleo de enzimas de restricción con diferente fecha de manufactura. Todas estas modificaciones del protocolo causaron cambios muy moderados o inexistentes en la cantidad y calidad de fragmentos amplificados en gel, por ello se piensa que otros factores deben estar implicados en la eficiencia de la técnica MSAP desarrollada.

Se sostiene que los errores también pueden estar sujetos a cambios estructurales en el desarrollo de la técnica MSAP, es decir las diferencias entre el protocolo desarrollado en este estudio y los protocolos desarrollados en literatura [46,74,76]. El cambio más evidente del protocolo experimental desarrollado en esta investigación fue la omisión de la “pre-amplificación” de los fragmentos digeridos. La etapa de pre-amplificación es de utilidad para enriquecer la muestra con fragmentos con mayor posibilidad de ser amplificados [55]. En consecuencia, los fragmentos producidos por ciclo en una única amplificación tienen menos posibilidades de ser amplificados y ser correctamente visualizados en el gel. Esta omisión de una amplificación previa podría ser una de las causas de la limitada cantidad de fragmentos visualizados en los geles resultantes en este estudio.

3.4 Fase experimental MSRE-qPCR

3.4.1 Partidores seleccionados

Se emparejaron *in-sílico* las 77 secuencias de cada par de partidores con el genoma de *H. e. lativitta*, lo que resultó en la obtención de 12 amplicones que presentan un único sitio de reconocimiento HpaII-MspI (3'-CCGG-5'). De esta lista se seleccionó el par de partidores “Hsp90_F1” y “Hsp90_R1” el cual codifica parte del gen Hsp90. Además, se seleccionaron dos pares de cebadores sin sitios de reconocimiento HpaII-MspI a forma de control. Los partidores de control seleccionados fueron: “DnaJ5_F1 - DnaJ5_R1” y “GAPDH_F1 - GAPDH_R2” estos codifican para uno de los genes de la familia *Hsp40* y para el gen endógeno *GAPDH*, respectivamente. *Hsp40* codifica para una familia de proteínas de choque térmico denominadas “Hsp” y *GAPDH* codifica para la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, clave en la producción de energía en el metabolismo de los carbohidratos [77].

3.4.2 Validación de partidores

Los pares de partidores seleccionados para los genes *GAPDH*, *Hsp40* y *Hsp90* mostraron curvas de calibración con valores de R^2 mayores a 0.95 y eficiencias de amplificación que oscilan entre el 97.16% y el 101.60%. Los datos se presentan en la tabla a continuación:

Tabla 7. Partidores seleccionados para MSRE-qPCR

Primer	Dirección	Secuencia 5' - 3'	Long (pb)	Tm (C°)	TaE (C°)	E	R2
F1 DnaJ-5	Forward	AATCCGCTGGTGCTGAAGAA	20	60	61	0.995	0.95
R1 DnaJ-5	Reverse	TCCCATTCCACCCTTCAAGC	20	60			
F1 Hsp90	Forward	ATCAAAGCTCGACAGTGGCA	20	60	58	1.016	0.99
R1 Hsp90	Reverse	AACCAAGTCGGCCTTTGTCA	20	60			
F3 GAPDH	Forward	CCCGTAGCCAATGTGTCAGT	20	55	58	0.971	0.98
R3 GAPDH	Reverse	TGGTCCATTTGCAGCTTCCT	20	60			

Long: Longitud del partidor, **Tm:** Temperatura de *melting* teórica, **TaE:** Temperatura de *annealing* experimental, **E:** Eficiencia en curva de calibración, **R²:** Varianza en curva de calibración.

Realizado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

De la misma forma, las curvas de *melting* obtenidas a partir de los productos de amplificación de las curvas de calibración de *GAPDH*, *DnaJ5* y *Hsp90* muestran condiciones óptimas para realizar experimentos de PCR en tiempo real. Los tres pares de partidores exhibieron un único pico en sus curvas de *melting*, lo que indica la amplificación selectiva de un único amplicón.

3.4.3 PCR en tiempo real

Se utilizó el par de partidores del gen Hsp90 para amplificar tanto muestras de ADN extraídas de cabeza como de tórax, y los dos pares de partidores control de los genes GAPDH y DnaJ5 para amplificar ADN proveniente de tórax únicamente.

3.4.4 Representación gráfica de Diferencia de metilación (DM)

Se calculó el Doble Delta de Livak ($\Delta\Delta C_q$) [78] para comparar la cantidad de templado presente después de cada digestión enzimática y en este experimento se lo denominó diferencia de metilación (DI). El análisis no mostró tendencia normal y homocedasticidad para ninguno de los grupos comparados y se empleó la prueba no paramétrica Mann – Whitney para su análisis estadístico. Se utilizó el par de partidores del gen Hsp90 y los dos pares de partidores control de los genes *GAPDH* y *DnaJ5* para amplificar ADN proveniente de tórax.

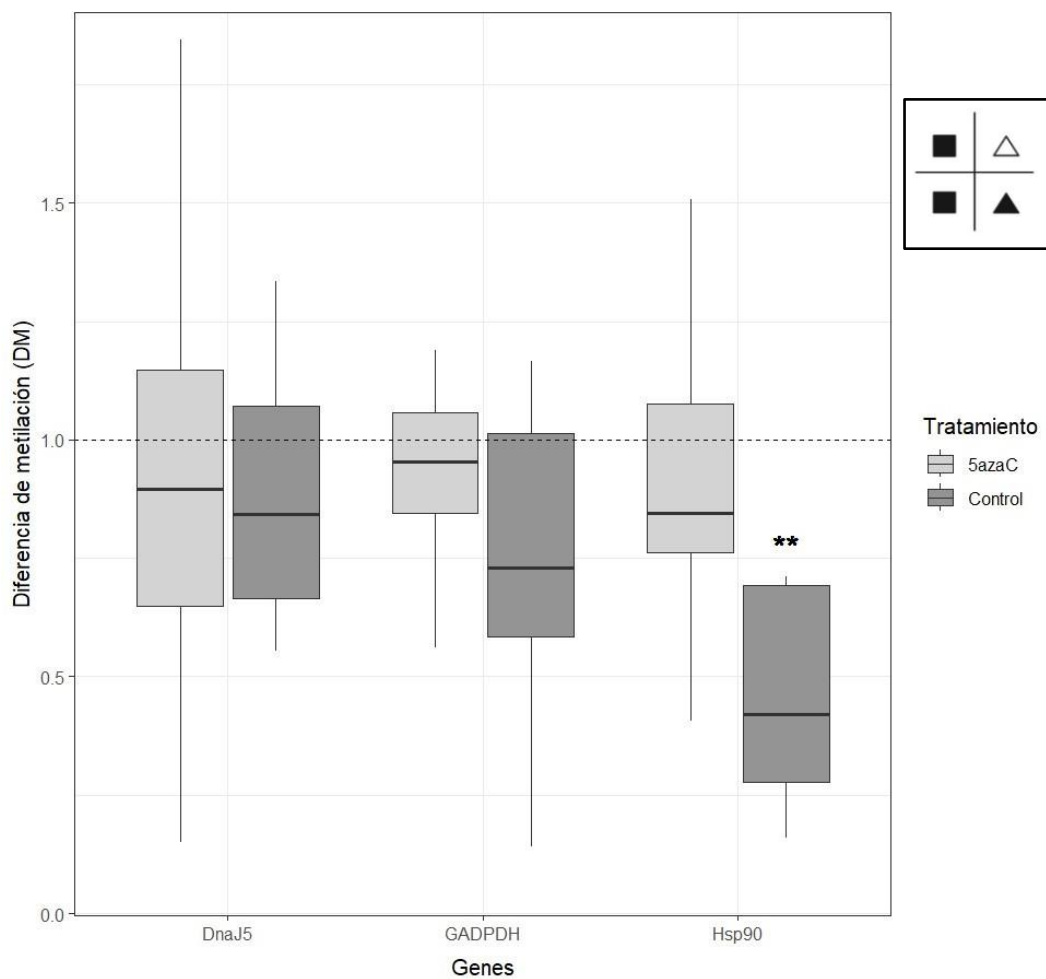


Figura 16. Diferencia de metilación (DM) en individuos tratados y no tratados con 5-Azacitidina por gen en tórax.

Realizado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

El diagrama de cajas representa la distribución de los valores (DM) para los genes evaluados, las cajas color gris claro representan los valores de DM calculados a partir de los datos de individuos tratados con 5AzaC y la caja gris oscura a partir de los datos de individuos control. La significancia estadística se obtiene de la comparación entre 5AzaC y control: P < 0.05: *, P < 0.01: **, P < 0.001: ***

Como se observa en la figura 16, se encontró diferencias significativas entre individuos tratados y no tratados con 5AzaC únicamente en muestras de tórax amplificadas con *Hsp90*, ($p < 0.01$). Por otro lado, las muestras amplificadas con el mismo par de partidores *Hsp90* en cabeza no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. En la figura. 16 se observa que las muestras evaluadas tanto en el grupo control como en el grupo 5AzaC para los genes *GAPDH* - *DnaJ5* y las muestras tratadas con 5AzaC evaluadas para el gen *Hsp90*, se acercaron a el valor $\Delta\Delta C_q = 1$ representado con una línea horizontal punteada. El valor Doble Delta de livak = 1 indica la igualdad entre el C_q de las digestiones con ambas enzimas ($C_q \text{ HpaII} = C_q \text{ MspI}$), es decir, cuando la diferencia entre $C_q \text{ HpaII}$ y $C_q \text{ MspI}$ es igual a cero.

Los valores $\Delta\Delta C_q$ cercanos al cero muestran que el C_q obtenido de la digestión con HpaII es menor que el C_q obtenido de la digestión con MspI ($C_q \text{ HpaII} < C_q \text{ MspI}$), lo que sugiere una posible metilación de citosina en el sitio de reconocimiento HpaII-MspI. Este comportamiento de los datos se observó en la figura. 16 utilizando el par de partidores para el gen *Hsp90* en individuos no tratados con 5AzaC (Control) en tórax.

3.4.5 Representación gráfica de Índice de Desmetilación (DI)

Se calculó el índice de desmetilación (DI) Ec. 1 y el delta de C_q (ΔC_q) Ec. 2. La prueba Shapiro – Wilk en conjunto con el Test de Levene determinó que ninguno de los grupos de datos usados en la comparación DI y ΔC_q mostró tendencia normal y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) a excepción del grupo control en tórax. En consecuencia, se empleó la prueba no paramétrica Mann-Witney y la prueba T en ese último grupo para determinar la significancia estadística entre los grupos comparados.

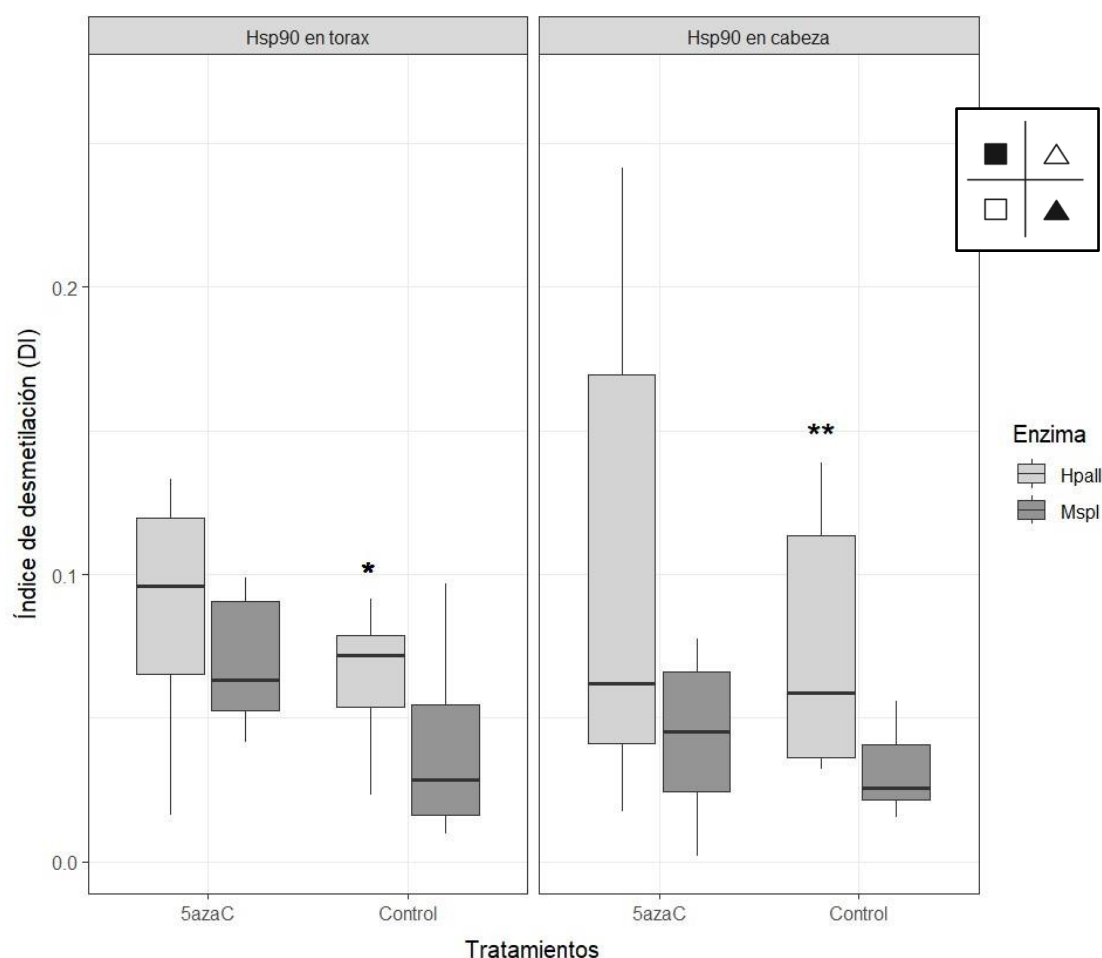


Figura 17. Comparación del índice de desmetilación entre tratamientos para *Hsp90* en tórax y cabeza, cada figura geométrica representa la distribución de los valores DI para cada tratamiento.

Realizado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Para las cajas color gris claro (HpaII) el eje de las abscisas representa el valor calculado del índice de desmetilación (DI) y para las cajas gris oscuro (MspI) las abscisas representan el valor calculado de delta de Cq (ΔCq). La significancia estadística se obtiene de la comparación entre HpaII (DI) y MspI (ΔCq): $P < 0.05$: *, $P < 0.01$: **, $P < 0.001$: ***

En la figura. 10 se puede observar diferencias significativas tanto en cabeza ($p < 0.01$) como en tórax ($p < 0.05$) únicamente en individuos pertenecientes al grupo control. En consecuencia, los resultados sugieren la presencia de metilación en la secuencia amplificada para el gen *Hsp90* para ambos tejidos (cabeza y tórax). Además, al no exhibir diferencias significativas entre los grupos tratados con 5AzaC pero sí en los grupos control se evidencia el efecto del inhibidor enzimático 5AzaC sobre los individuos tratados.

Al finalizar se obtuvo el % *Metilación* promedio de la secuencia amplificada por el par de partidores del gen *Hsp90* mediante el cálculo de la mediana y la media en individuos no tratados con 5AzaC. Se utilizó únicamente los valores obtenidos a partir de individuos

no tratados (control), debido a que son el único grupo en donde se encontró diferencias significativas entre DI y ΔC_q . En cabeza se obtuvo una media de 8.56% de metilación y una mediana de 6.21%, en tórax la media alcanzó el 8.76% de metilación y la mediana alcanzó un 7.27%. Puesto que se empleó estadísticos no paramétricos se tomó los valores porcentuales de metilación producidos por la mediana como la aproximación más cercana al porcentaje real de metilación de Hsp90 en tórax y cabeza.

3.4.6 *Análisis de la metilación específica mediante la técnica MSRE-qPCR*

Mediante el análisis MSRE-qPCR en individuos tratados y no tratados con 5AzaC fue posible obtener información acerca del estado de la metilación del gen de choque térmico *Hsp90* en cabeza y en tórax. Al comparar ambos tratamientos en tórax y cabeza se encontró que existe una metilación parcial promedio de alrededor de 6.21 % en cabeza y alrededor de 7.27 % en tórax para la secuencia del gen Hsp90. También fue posible evaluar el efecto del inhibidor enzimático 5-Azacitidina sobre la metilación de los individuos tratados y no tratados con este. El efecto se pudo determinar a través del cálculo del Doble Delta de Livak modificado ($\Delta\Delta C_q$) y del índice de desmetilación (DI), obteniendo diferencias significativas en tórax para ambos parámetros y obteniendo diferencias significativas en cabeza únicamente sobre el índice de desmetilación (DI).

3.4.7 *Evaluación del efecto del inhibidor enzimático 5-Azacitidina*

El Doble Delta de Livak ($\Delta\Delta C_q$) modificado denominado Diferencia de metilación (DM), se desarrolló para comparar la variación del C_q producido por la amplificación de la digestión genómica por HpaII con la variación del C_q producido por la amplificación de la digestión genómica con MspI [17].

Para comparar dicha variación se restan los C_q de HpaII y MspI y se usa el valor obtenido para elevar a la potencia en negativo a la eficiencia del cebador empleado, revisar Ec. 6 sección 2.5.5.3. Esto quiere decir que, entre más pequeña sea la diferencia entre el C_q de HpaII y el C_q de MspI más cercano será el valor de Doble Delta de Livak a uno. Es así como se pudo observar en la figura 16 la diferencia entre los valores C_q de HpaII y MspI entre sí, por la relación de estos valores con un $\Delta\Delta C_q = 1$. En la figura 9 el valor $\Delta\Delta C_q = 1$ es representado por una línea punteada, los datos menores a esta línea representarán aquellas muestras donde su secuencia amplificada se encontró metilada.

De la misma forma, se utilizó el valor $\Delta\Delta C_q = 1$ para determinar si el efecto del inhibidor 5-Azacidina fue realmente la desmetilación del ADN. Idealmente, si esto ocurre, no debería haber diferencias entre el C_q medido de la digestión con HpaII y el C_q medido de la digestión con MspI, por tanto, para confirmar el efecto desmetilante de dicho inhibidor las muestras tratadas con 5-Azacidina deberían presentar valores de $\Delta\Delta C_q$ cercanos a 1. En la figura 16 se presenta mediante un diagrama de cajas la dispersión de los valores de $\Delta\Delta C_q$ entre individuos tratados y no tratados con 5-Azacidina en amplificaciones con los genes de control GAPDH y DnaJ5, y dos amplificaciones con el gen Hsp90 en tórax. Podemos observar esta tendencia de acercamiento hacia la línea punteada ($\Delta\Delta C_q = 1$) sin distinción por tratamientos en los dos controles (GAPDH y DnaJ5), mientras que con Hsp90 en tórax vemos como el grupo tratado con 5-Azacidina se acerca a la línea punteada mientras que el grupo control no.

El índice de metilación (DI) fue otro parámetro usado para el análisis del efecto del inhibidor enzimático 5-Azacidina. Esta comparación fue limitada a él gen Hsp90 en tórax y en cabeza, la diferencia entre el C_q de la digestión MspI y el C_q del ADN genómico fue inferior a 1.5, esto se debe principalmente a la falta de sitios de corte MspI-HpaII en la secuencia de los genes control (GAPDH, DnaJ5), es decir que su secuencia no debería ser clivada por ninguna de las enzimas. La comparación estadística se la realiza esta vez entre los valores obtenidos del DI y del ΔC_q en muestras tratadas y muestras control para Hsp90 en tórax y cabeza, (figura 17). Para identificar el efecto de la 5-Azacidina sobre la metilación usando el índice de desmetilación (DI), es necesario que, mientras el grupo tratado no presente diferencias significativas entre el ΔC_q y el DI , el grupo control sí exhiba diferencias significativas entre el ΔC_q y el DI . Este fue el caso en tanto en cabeza como en tórax para el gen Hsp90 (figura 17), en ambos tejidos no existió diferencias significativas en el grupo tratado con 5-Azacidina, mientras que si existieron diferencias en el grupo control.

En síntesis, se pudo evaluar de forma satisfactoria el efecto de la 5-Azacidina sobre la metilación del gen Hsp90, en dos tejidos distintos: cabeza y tórax. En tórax el efecto fue evidente al observar diferencias significativas en ambos parámetros calculados: $\Delta\Delta C_q$ y DI , mientras que en cabeza el efecto del inhibidor fue limitado por lo que solo se observó diferencias significativas en uno de ellos (DI). Adicionalmente, se pudo comprobar el efecto desmetilador del inhibidor enzimático por medio del parámetro $\Delta\Delta C_q$ al observar una tendencia de los datos hacia valores cercanos a uno, sugiriendo que sí presentó el efecto desmetilador.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Diferencias en el efecto del inhibidor 5-Azacitidina en cabeza y tórax

El inhibidor enzimático 5-Azacitidina es una molécula análoga a la citosina que interacciona con enzimas metiltransferasas DNMT1/DNMT3 bloqueando su actividad en la síntesis *de-novo* (DNMT3) y en la síntesis de mantenimiento (DNMT1) [79]. Esta última efectuada por DNMT1 es la responsable de mantener los patrones de metilación del ADN en cada división celular, o de forma más precisa en cada duplicación del ADN. En consecuencia, la efectividad de la 5- Azacitidina para bloquear la metilación dependerá en gran medida del tiempo de replicación de las células del tejido analizado. El gen que codifica para la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 se encuentra presente en insectos del orden Lepidoptera, como *H. e. lativitta*, pero el gen de síntesis *de-novo* DNMT3 no [5], por lo tanto, el efecto de la replicación de las células sobre la efectividad del bloqueo de la metilación por la 5-Azacitidina será clave en individuos de la especie *H. e. lativitta*.

En nuestro experimento se encontraron diferencias en el efecto del agente desmetilador 5- Azacitidina entre los tejidos del tórax y cabeza en individuos *H. e. lativitta*. En cabeza, nuestros datos sugieren que el ADN genómico extraído de mariposas tratados con 5- Azacitidina no tuvo un efecto homogéneo entre individuos, siendo este efecto insignificante en uno de los parámetros calculados (DM) pero muy significativo en el segundo (DI). En tórax el efecto fue igualmente significativo para ambos parámetros medidos DI y DM.

4.1.1 Posibles mecanismos de acción de 5AzaC en cabeza

Es ampliamente conocido que las células neuronales tienen una capacidad de duplicación limitada, son usualmente catalogadas como células post mitóticas conducidas a la apoptosis al final de su ciclo celular [80]. Sin embargo, se conoce la existencia de mecanismos presentes en ciertas células neuronales que pueden conducir a la duplicación o neurogénesis inclusive en etapas donde el sistema nervioso ya se ha desarrollado por completo (adultos) [80]. En insectos las grandes duplicaciones de células neuronales se dan en las diferentes etapas del desarrollo del organismo, en especial en etapas donde existen grandes cambios morfológicos como la metamorfosis

[81]. En el presente estudio se usó tejido de cabeza de individuos adultos de la especie *H. e. lativitta* con un mínimo de 7 días de haber sido emergido de la crisálida, lo que supone un sistema nervioso maduro antes del tratamiento con el inhibidor enzimático 5AzaC. Por tanto, se esperaría que en tejidos de cabeza no hayan existido diferencias significativas entre el tratamiento y el grupo control.

En mamíferos, las células madre neuronales y precursoras continúan existiendo en la zona giro dentada del hipocampo (GD), donde la neurogénesis persiste durante el tiempo de vida restante del organismo [6]. En el cerebro de insectos los denominados cuerpos champiñón son la principal estructura que integra la información sensorial de ojos y antenas, y está relacionada con la memoria y el aprendizaje [82]. Los cuerpos champiñón contienen neuroblastos que continúan produciendo interneuronas a lo largo del ciclo de vida del insecto (neurogénesis) incluso después de llegar a la adultez [83]. En *Heliconius* los cuerpos champiñón son más grandes en relación con sus especies emparentadas [31,84], lo que ocasiona una mejor memoria visual a largo plazo y una mejor respuesta a procesos de aprendizaje [82]. Teniendo en cuenta estos aspectos, se considera que la posible neurogénesis en el cuerpo champiñón de *H. erato* pudo ser uno de los mecanismos por el cual la división celular en cabeza pudo haber tenido lugar, y por tanto justificar el efecto hipometilador del inhibidor 5 AzaC sobre el gen *Hsp90* en cabeza.

En el proceso de la neurogénesis adulta en humanos, la enzima DNMT1 es necesaria para la supervivencia de nuevas neuronas en el hipocampo [85], de la misma forma, la metilación diferencial de ciertos genes en el hipocampo se encuentra directamente relacionada al mantenimiento y a la formación de nuevas memorias [85]. En insectos como *Apis Mellifera* la inhibición de DNMTs en cerebro por medio del inhibidor enzimático de metiltransferasa (DNMTi) zebularina causó sobreexpresión del DNMT3 únicamente en los cuerpos champiñón y no en otras estructuras del cerebro [86]. *Apis Mellifera* a diferencia de *Heliconius erato* presenta tres de las enzimas asociadas a la metilación del ADN (DNMT3, DNMT1, TETs), mientras que *H. erato* solo 2 (DNMT1, TETs) [87]. El rol de DNMT1 en insectos que no presentan su homólogo DMT3 se relaciona con la metilación génica en la embriogénesis [88], pero su relación con el tejido neuronal o los cuerpos champiñón no ha sido descrita. Al conocer que las enzimas encargadas de la eliminación de las marcas metilo (TETs) participan en el ciclo de remoción y mantenimiento de las marcas metilo en el ADN [11], se propone que el tratamiento con 5AzaC pudo haber causado un desbalance en el ciclo de mantenimiento y remoción de marcas metilo al inhibir únicamente la enzima DNMT1, provocando así,

una posible desmetilación del ADN por TET sin la necesidad de una previa duplicación celular.

Para finalizar, los presentes resultados abren la puerta hacia posibles sistemas alternativos donde ocurre la metilación en insectos sin implicar división celular. Uno de estos mecanismos puede ser las duplicaciones del ADN a poliploidías, esta generación de poliploides se destaca por no requerir de una división celular y ha sido observado en diferentes taxones de insectos [89] y también en mamíferos donde ya ha sido identificada en poblaciones de células neuronales [80].

4.2 Metilación específica sobre el gen *Hsp90*

En base a los resultados obtenidos en este estudio, el análisis de metilación específica mediante la técnica MSRE-qPCR en individuos de la especie *H. e. lativitta* y a el análisis de dichos resultados mediante los parámetros: $\Delta\Delta C_q$ y *DI*. Se pudo evaluar la metilación gen específica en *Hsp90* sobre tejidos de tórax y cerebros obteniendo una metilación parcial en ambos tejidos: 7.27 % en tórax y 6.21 % en cabeza. La metilación parcial observada en ambos tejidos sugiere que no todo el ADN genómico se encontraba metilado. Esto se puede explicar debido a la alta variabilidad de las marcas epigenéticas entre células, tejidos e individuos [81], esta es una de las razones por las que se prefiere usar un reducido número de individuos cuando se pretende medir la metilación a nivel genómico o de locus, aunque dichos resultados omitan potenciales regulaciones epigenéticas divergentes [81].

La metilación en insectos se encuentra estrechamente relacionada a una alta expresión genética de ciertos genes [87,90] así como también en la represión de la expresión de algunos otros [11,87]. La variabilidad en el patrón de metilación del ADN en insectos puede cambiar a lo largo del ciclo de vida del organismo [11], se ha observado que en lepidópteros la metilación en genes constitutivos es favorecida durante las etapas tempranas del desarrollo, mientras que, en etapas adultas es favorecida a genes relacionados con funciones específicas del organismo [88] En un estudio reciente en *H. e. lativitta* se identificó la diferencia en la expresión de *Hsp90* en función de la temperatura, sobre tres secciones del cuerpo de la mariposa: Tórax, abdomen y cabeza (Tagma). Se evidenció sobreexpresión del gen *Hsp90* tanto en cabeza como en tórax en situaciones de estrés térmico [75]. En este estudio se identificó la presencia de metilación CpG sobre el gen *Hsp90* en *H. e. lativitta* en tanto tórax como abdomen. Por tanto, se piensa que tanto la metilación del gen *Hsp90* como la expresión del gen *Hsp90*

bajo estrés térmico pueden estar correlacionadas entre sí. Tomando en consideración que en lepidópteros como *H. e. lativitta* la metilación se encuentra favorecida en genes con funciones especializados, se espera que bajo situaciones de estrés el gen *Hsp90* se encuentre desmetilado, causando así la sobreexpresión observada de este gen bajo situaciones de estrés térmico [75]

Aún es pronto para establecer un nexo evidente entre la sobreexpresión del gen *Hsp90* bajo estrés térmico y la metilación, pero ciertamente es puerta a preguntas acerca de la relación entre genes inducibles por factores ambientales como los Hsp y marcas epigenéticas como la metilación.

4.3 Diferencia entre la metilación de tórax y cabeza

En lepidópteros la cabeza comprende estructuras tanto de alimentación como sensoriales. El denominado intestino anterior empieza desde la probóscide pasando por la cabeza y llegando hasta el abdomen [91]. El sistema sensorial comprende estructuras del sistema nervioso, como el cerebro y órganos sensoriales como los ojos y las antenas [92]. En contraparte, el tórax está formado en mayor medida por tejido adiposo, el espiráculo está ubicado en la parte inferior del tórax, y estructuras del sistema digestivo, nervioso, circulatorio pasan a través y conectan la cabeza con el abdomen [91,93]. Considerando que el genoma de lepidópteros presenta bajos niveles de metilación global en comparación a los mamíferos [3,88,89], el ADN extraído a partir de múltiples tejidos puede mostrar una imagen subestimada de la metilación en tejidos específicos y poblaciones de células relacionadas [5]. Esto es especialmente cierto en ADN extraído de tórax y cabeza donde ambos segmentos presentan varios tipos de órganos y tejidos.

En lepidópteros se ha estudiado la diferencia en el estado de la metilación entre varias etapas del desarrollo [95,96], mas no entre tagmas o tejidos distintos. En insectos del orden *Hymenoptera* como *apis mellifera* sí se ha realizado esta comparación, encontrando tejidos procedentes de tórax con un nivel de metilación genómica superior a tejidos provenientes de cabeza [93,97]. Cabe mencionar, que al igual que en *lepidoptera*, el cuerpo de la abeja *a. mellifera* se divide en tres secciones: cabeza, tórax, y abdomen [93]. En esta investigación se encontró una metilación del 6.21 % en cabeza y un 7.27 % en tórax, siendo la metilación en tórax ligeramente superior a la observada en cabeza, sugiriendo una tendencia similar a lo reportado en *a. mellifera* [87]. Adicionalmente, un estudio encontró que la metilación en cabeza de la mariposa *Vanessa cardui* oscila entre el 4% ~ 15% en el cuerpo de los genes [98], entre dicho

rango se encuentra el 6.21% de metilación observado en el exón del gen Hsp90 en la cabeza de *H. e. lativitta*. Esto quiere decir, que tanto la diferencia entre tórax y abdomen como el porcentaje de metilación observado para el gen Hsp90 en cabeza coincide con los resultados reportados en literatura [87,92]. Sin embargo, al comparar únicamente la metilación en un gen específico y al tener una diferencia de alrededor de un 1% entre tórax y cabeza, se considera que aún no es posible establecer si existe diferencia entre la metilación en tórax y cabeza en *H. e. lativitta*.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El presente estudio exploratorio de la metilación en el genoma de insectos identificó por primera ocasión la presencia de metilación en el genoma de la especie modelo *H. e. lativitta*. La misma fue identificada sobre el cuerpo del gen *Hsp90* y su presencia fue confirmada en dos tejidos: tórax y cabeza. De forma simultánea el tratamiento con 5-Azacidina demostró ser eficaz en la desmetilación del ADN en tejidos de tórax y medianamente eficaz en tejidos de cabeza. Sin embargo, las técnicas empleadas de fingerprinting no tuvieron una efectividad similar en el análisis de la metilación en el genoma de *H. e. lativitta*, pudiendo analizar únicamente la metilación gen específica y no el patrón de metilación global.

La implementación de un programa capaz de predecir los fragmentos resultantes producto de la técnica MSAP demostró ser de utilidad, mediante su empleo se diseñó partidores especializados que mejoran la eficiencia de la visualización de los fragmentos en gel y que a su vez fueron capaces de amplificar fragmentos relacionados al gen de interés. Debido a la limitada eficiencia de la técnica MSAP *in-vitro* fue imposible evaluar de forma apropiada la efectividad de este programa, sin embargo, debido a su utilidad en la visualización y contabilización de fragmentos se propone como una herramienta adicional para el desarrollo de técnicas AFLP.

Los resultados presentados en esta investigación aún son insuficientes para vincularse con factores biológicos de importancia, sin embargo, la identificación de metilación en genes inducidos por presiones ambientales en ectotermos, como *Hsp90*, puede ser una pista para determinar el rol que cumple la metilación en insectos y como esta puede estar sujeta a presiones ambientales, como el cambio climático.

5.2 Recomendaciones e investigaciones futuras

Es importante destacar que pese a que esta investigación arrojó resultados acerca de la metilación en *H. e. lativitta*, esta información aún es preliminar y exploratoria. Por tanto, se requiere de técnicas moleculares con metodologías más robustas que permitan validar los resultados obtenidos y establecer nuevas conexiones entre la metilación del

ADN y su relación con la expresión génica de Hsp90. Para ello, métodos como el ensayo dot blot [99] cuya efectividad para el análisis de la metilación global en ectotermos ya ha sido probada, se presenta como una forma rápida, efectiva y poco costosa para el análisis global de la metilación en ADN sobre múltiples individuos de la especie *H. erato*.

Se propone que en futuras investigaciones se contemple el método dot plot [99] para evaluar el efecto de los inhibidores enzimáticos DNMTi en la metilación genómica de *H. erato*. Además, para evaluar el rol que cumple la metilación en la expresión del gen Hsp90 se propone que a más de la técnica MSRE-qPCR, limitada por el número de sitios de restricción presentes en el gen Hsp90, se utilicen técnicas como la representación reducida de secuenciación por bisulfito (RRBS) [11] para aumentar la cobertura de detección de la metilación sobre el cuerpo del gen Hsp90, así mismo que se cuantifique dicha metilación en escenarios de estrés térmico. Complementario a lo antes mencionado, se recomienda también evaluar nuevamente la expresión génica de Hsp90 bajo dichos escenarios y la expresión de los genes DNMT1 y TETs implicados en la metilación del ADN de *H. erato*.

En el presente estudio, el inhibidor enzimático 5-AzaC sí presentó efectos significativos en muestras de ADN genómico de cabeza. Sin embargo, dicho efecto no parece haber sido exhibido por todos los individuos del grupo de tratamiento. Los resultados obtenidos apuntan a mecanismos como neurogénesis, poliploidías, y desmetilación por TETs como posibles explicaciones, sin embargo, es necesario llevar a cabo nuevos estudios para identificar el mecanismo por el cual inhibidores enzimáticos de metiltransferasas afectan a la metilación en cerebro.

BIBLIOGRAFIA

1. Carl T. Bergstrom; Lee Alan Dugatkin. *Evolution*. 2016.
2. Arias CF, Salazar C, Rosales C, Kronforst MR, Linares M, Bermingham E, et al. Phylogeography of *Heliconius cydno* and its closest relatives: disentangling their origin and diversification. *Mol Ecol*. 2014;23: 4137–4152. doi:10.1111/MEC.12844
3. Tuomisto H, Ruokolainen K, Kalliola R, Linna A, Danjoy W, Rodriguez Z. Dissecting Amazonian Biodiversity. *Science* (80-). 1995;269: 63–66. doi:10.1126/SCIENCE.269.5220.63
4. Margres MJ, Rautsaw RM, Strickland JL, Mason AJ, Schramer TD, Hofmann EP, et al. The Tiger Rattlesnake genome reveals a complex genotype underlying a simple venom phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118. doi:10.1073/PNAS.2014634118/-/DCSUPPLEMENTAL
5. Duncan EJ, Cunningham CB, Dearden PK. Phenotypic Plasticity: What Has DNA Methylation Got to Do with It? *Insects*. 2022;13: 110. doi:10.3390/INSECTS13020110/S1
6. Bossdorf O, Zhang Y. A truly ecological epigenetics study. *Mol Ecol*. 2011;20: 1572–1574. doi:10.1111/J.1365-294X.2011.05044.X
7. Skinner MK, Gurerrero-Bosagna C, Muksitul Haque M, Nilsson EE, Koop JAH, Knutie SA, et al. Epigenetics and the Evolution of Darwin's Finches. *Genome Biol Evol*. 2014;6: 1972–1989. doi:10.1093/GBE/EVU158
8. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324: 930–935. doi:10.1126/SCIENCE.1170116
9. Jahan C. Mécanismes de la régulation traductionnelle médiée par la voie piARN dans le contrôle de la mise en place de l'axe antéro-postérieur chez *Drosophila melanogaster*. <http://www.theses.fr>. 2019.
10. Zheng X, Chen L, Xia H, Wei H, Lou Q, Li M, et al. Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/SREP39843
11. Aparicio NL. The DNA methylation of the snail *Biomphalaria glabrata*, role and impact on the generation of phenotypic plasticity. 2021 [cited 23 Jul 2023]. Available: <https://theses.hal.science/tel-03223120>
12. Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol*. 2006;209: 2362–2367. doi:10.1242/JEB.02070
13. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23: 5293. doi:10.1128/MCB.23.15.5293-5300.2003
14. Fusco G, Minelli A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010;365: 547. doi:10.1098/RSTB.2009.0267

15. Bozinovic F, Cavieres LA. LA VULNERABILIDAD DE LOS ORGANISMOS AL CAMBIO CLIMÁTICO: ROL DE LA FISIOLOGÍA Y LA ADAPTACIÓN. [cited 22 Aug 2023]. Available: www.capes.cl/www.ieb-chile.cl
16. Peniche S. Primer seminario internacional sobre la cuenca del río Santiago VOCES Y REACCIONES ENTORNO A LA MODIFICACIÓN DE LA 4T AL PROYECTO PRESA EL ZAPOTILLO View project. 2020 [cited 22 Aug 2023]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/344105502>
17. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* (80-). 2010;330: 612–616. doi:10.1126/SCIENCE.1191078
18. Sha AH, Lin XH, Huang JB, Zhang DP. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Mol Genet Genomics*. 2005;273: 484–490. doi:10.1007/S00438-005-1148-3
19. Wedd L, Maleszka R. DNA Methylation and Gene Regulation in Honeybees: From Genome-Wide Analyses to Obligatory Epialleles. *Adv Exp Med Biol*. 2016;945: 193–211. doi:10.1007/978-3-319-43624-1_9
20. Jouve de la Barreda N. La epigenética. Sus mecanismos y significado en la regulación genética. *Cuad bioética*, ISSN 1132-1989, ISSN-e 2386-3773, Vol 31, N° 103, 2020, págs 405-422. 2020;31: 405–422. doi:10.30444/CB.79
21. Girart Aguilar A. Estudio de la programación metabólica por metilación del ADN en nutrición perinatal: estrategia y diseño óptimos y aplicación en un caso práctico. 2021 [cited 27 Mar 2023]. Available: <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/158370>
22. Anastasiadi D. Influencias intrínsecas y del medio ambiente sobre la metilación del ADN y la expresión génica en peces. *Rev Aquat*. 2018;0: 17–19. Available: <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/324>
23. Bewick AJ, Vogel KJ, Moore AJ, Schmitz RJ. Evolution of DNA methylation across insects. *Mol Biol Evol*. 2017;34: 654–665. doi:10.1093/MOLBEV/MSW264
24. Cardoso-Júnior CAM, Yagound B, Ronai I, Remnant EJ, Hartfelder K, Oldroyd BP. DNA methylation is not a driver of gene expression reprogramming in young honey bee workers. *Mol Ecol*. 2021;30: 4804–4818. doi:10.1111/MEC.16098
25. Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, et al. Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Res*. 2013;23: 1817. doi:10.1101/GR.159426.113
26. Bebane PSA, Hunt BJ, Pegoraro M, Jones ARC, Marshall H, Rosato E, et al. The effects of the neonicotinoid imidacloprid on gene expression and DNA methylation in the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris*. *Proc R Soc B*. 2019;286. doi:10.1098/RSPB.2019.0718
27. Arsenault S V., Hunt BG, Rehan SM. The effect of maternal care on gene expression and DNA methylation in a subsocial bee. *Nat Commun*. 2018;9. doi:10.1038/S41467-018-05903-0
28. Libbrecht R, Oxley PR, Keller L, Kronauer DJC. Robust DNA Methylation in the Clonal Raider Ant Brain. *Curr Biol*. 2016;26: 391–395. doi:10.1016/J.CUB.2015.12.040

29. Cunningham CB, Ji L, McKinney EC, Benowitz KM, Schmitz RJ, Moore AJ. Changes of gene expression but not cytosine methylation are associated with male parental care reflecting behavioural state, social context and individual flexibility. *J Exp Biol.* 2019;222. doi:10.1242/JEB.188649
30. Shi YY, Liu H, Qiu YF, Ma ZY, Zeng ZJ. DNA methylation comparison between 4-day-old queen and worker larvae of honey bee. *J Asia Pac Entomol.* 2017;20: 299–303. doi:10.1016/J.ASPEN.2017.01.014
31. Jiggins CD. The ecology and evolution of Heliconius butterflies. Oxford University Press; 2017.
32. Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, et al. Genome-wide evidence for speciation with gene flow in Heliconius butterflies. *Genome Res.* 2013;23: 1817. doi:10.1101/GR.159426.113
33. Heliconius erato lativitta - LepBase - Lepidoptera genome browser. [cited 17 Mar 2023]. Available: http://ensembl.lepbase.org/Heliconius_erato_lativitta_v1/Info/Index
34. Lewis SH, Ross L, Bain SA, Pahita E, Smith SA, Cordaux R, et al.-----Widespread conservation and lineage-specific diversification of genome-wide DNA methylation patterns across arthropods. *PLOS Genet.* 2020;16: e1008864. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1008864
35. Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods.* 2021;187: 28–43. doi:10.1016/J.YMETH.2020.10.002
36. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biol* 2016, Vol 5, Page 3. 2016;5: 3. doi:10.3390/BIOLOGY5010003
37. Chatterjee A, Rodger EJ, Morison IM, Eccles MR, Stockwell PA. Tools and Strategies for Analysis of Genome-Wide and Gene-Specific DNA Methylation Patterns. *Methods Mol Biol.* 2017;1537: 249–277. doi:10.1007/978-1-4939-6685-1_15
38. Chen M, Vijay V, Shi Q, Liu Z, Fang H, Tong W. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discov Today.* 2011;16: 697–703. doi:10.1016/j.drudis.2011.05.007
39. Chen YR, Yu S, Zhong S. Profiling DNA Methylation Using Bisulfite Sequencing (BS-Seq). *Methods Mol Biol.* 2018;1675: 31–43. doi:10.1007/978-1-4939-7318-7_2
40. Lin Q ting, Yang W, Zhang X, Li Q gang, Liu Y feng, Yan Q, et al. Systematic and benchmarking studies of pipelines for mammal WGBS data in the novel NGS platform. *BMC Bioinformatics.* 2023;24: 1–17. doi:10.1186/S12859-023 05163-W/FIGURES/5
41. Tse OYO, Jiang P, Cheng SH, Peng W, Shang H, Wong J, et al. Genome-wide detection of cytosine methylation by single molecule real-time sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118: e2019768118. doi:10.1073/PNAS.2019768118/SUPPL_FILE/PNAS.2019768118.SAPP.PDF
42. Simpson JT, Workman RE, Zuzarte PC, David M, Dursi LJ, Timp W. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods* 2017 144. 2017;14: 407–410. doi:10.1038/nmeth.4184
43. Cavalcante RG, Qin T, Sartor MA. Novel bioinformatics methods for toxicoepigenetics. *Toxicoepigenetics Core Princ Appl.* 2018; 265–288. doi:10.1016/B978-0-12-812433-8.00012-5

44. Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: 528. doi:10.1093/NAR/GKJ461
45. Beikircher G, Pulverer W, Hofner M, Noehammer C, Weinhaeusel A. Multiplexed and Sensitive DNA Methylation Testing Using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes “MSRE-qPCR.” *Methods Mol Biol.* 2018;1708: 407–424. doi:10.1007/978-1-4939-7481-8_21
46. Albertini E, Marconi G. Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker to investigate drought-stress response in Montepulciano and Sangiovese grape cultivars. *Methods Mol Biol.* 2014;1112: 151–164. doi:10.1007/978-1-62703-773-0_10
47. Mariani S, Bekkevold D. The Nuclear Genome: Neutral and Adaptive Markers in Fisheries Science. *Stock Identif Methods Appl Fish Sci Second Ed.* 2013; 297–327. doi:10.1016/B978-0-12-397003-9.00014-X
48. Brahmachari V, Jain S. Methylation-sensitive Restriction Endonucleases. *Encycl Syst Biol.* 2013; 1300–1301. doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_852
49. Paun O, Schönswetter P. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods Mol Biol.* 2012;862: 75. doi:10.1007/978-1-61779-609-8_7
50. Catalan A, Maclas-Munoz A, Briscoe AD. Evolution of Sex-Biased Gene Expression and Dosage Compensation in the Eye and Brain of *Heliconius* Butterflies. *Mol Biol Evol.* 2018;35: 2120–2134. doi:10.1093/MOLBEV/MSY111
51. Mattila ALK, Jiggins CD, Opedal ØH, Montejo-Kovacevich G, De Castro ÉCP, McMillan WO, et al. Evolutionary and ecological processes influencing chemical defense variation in an aposematic and mimetic *Heliconius* butterfly. *PeerJ.* 2021;9. doi:10.7717/PEERJ.11523
52. Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A, Fraga MF. Epigenetics and environment: a complex relationship. *J Appl Physiol.* 2010;109: 243–251. doi:10.1152/JAPPLPHYSIOL.00068.2010
53. Guevara MÁ, de María N, Sáez-Laguna E, Vélez MD, Cervera MT, Cabezas JA. Analysis of DNA Cytosine Methylation Patterns Using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). *Methods Mol Biol.* 2017;1456: 99–112. doi:10.1007/978-1-4899-7708-3_9
54. Guevara MÁ, de María N, Sáez-Laguna E, Vélez MD, Cervera MT, Cabezas JA. Analysis of DNA Cytosine Methylation Patterns Using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). *Methods Mol Biol.* 2017;1456: 99–112. doi:10.1007/978-1-4899-7708-3_9
55. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T Van De, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23: 4407–4414. doi:10.1093/NAR/23.21.4407
56. Meudt HM, Clarke AC. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 2007;12: 106–117. doi:10.1016/j.tplants.2007.02.001
57. Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Levenson V V. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: e93. doi:10.1093/NAR/GNI092

58. Dillon ME, Lozier JD. Adaptation to the abiotic environment in insects: the influence of variability on ecophysiology and evolutionary genomics. *Curr Opin insect Sci.* 2019;36: 131–139. doi:10.1016/J.COIS.2019.09.003
59. 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. *J Exp Biol.* 2020;223. doi:10.1242/JEB.220426/VIDEO-1
60. Burraco P, Orizaola G, Monaghan P, Metcalfe NB. Climate change and ageing in ectotherms. *Glob Chang Biol.* 2020;26: 5371–5381. doi:10.1111/GCB.15305
61. Egi Y, Tsubouchi JH, Sakamoto K, Tsubouchi H. Does DNA methylation play a role in photoperiodic diapause of moths? ~ 458 ~ *J Entomol Zool Stud.* 2016;4: 458–460. Available: <http://shigen.nig.ac.jp/wildmoth/>
62. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, et al. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics.* 2009;25: 1422–1423. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP163
63. Luna JM. Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Soc Entomológica Aragon* n1. 2005;37: 385–408.
64. Collecting or Glassine Envelope - Collecting Methods - Mississippi Entomological Museum Home. [cited 19 Aug 2023]. Available: <https://mississippientomologicalmuseum.org.msstate.edu/collecting.preparation.methods/Envelopes.htm>
65. Bardales JV, Gómez RZ, Canaquiri PH, Jiménez JP, Hernández JJR, Lamas G, et al. Plantas alimenticias de 19 especies de mariposas diurnas (Lepidoptera) en Loreto, Perú. *Rev Peru Biol.* 2017;24: 35–42. doi:10.15381/RPB.V24I1.13109
66. Thurman TJ, Brodie E, Evans E, McMillan WO. Facultative pupal mating in *Heliconius erato*: Implications for mate choice, female preference, and speciation. *Ecol Evol.* 2018;8: 1882. doi:10.1002/ECE3.3624
67. Walker SE, Charbonneau LF, Law S, Earle C. Stability of Azacitidine in Sterile Water for Injection. *Can J Hosp Pharm.* 2012;65: 352. doi:10.4212/CJHP.V65I5.1172
68. Biopython · Biopython. [cited 17 Mar 2023]. Available: <https://biopython.org/>
69. Cloud-based platform for biotech R&D | Benchling. [cited 20 Aug 2023]. Available: <https://www.benchling.com/>
70. Li A, Hu BQ, Xue ZY, Chen L, Wang WX, Song WQ, et al. DNA Methylation in Genomes of Several Annual Herbaceous and Woody Perennial Plants of Varying Ploidy as Detected by MSAP. *Plant Mol Biol Report.* 2011;29: 784–793. doi:10.1007/S11105-010-0280-3/FIGURES/4
71. Promega Global Corporation. Diamond™ Nucleic Acid Dye - Technical Manual. Promega Glob Corp Corp. 2013; 1–7.

72. Invitrogen™ Tinte de gel de ADN SYBR™ Safe 400 µl Invitrogen™ Tinte de gel de ADN SYBR™ Safe | Fisher Scientific. [cited 17 Mar 2023]. Available: <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-sybr-safe-dna-gel-stain-1/10328162>
73. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3: 71. Available: [/pmc/articles/PMC4280562/](https://pmc/articles/PMC4280562/)
74. Meza-Ramírez N. Validación del protocolo AFLP para Caracterización Molecular y Análisis de Diversidad Genética en *Dipteryx panamensis* (Pitt.) (Fabaceae). 2010 [cited 24 Mar 2023]. Available: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6337>
75. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005 611. 2005;6: 847–859. doi:10.1038/nrg1707
76. Papa R, Troggio M, Ajmone-Marsan P, Nonnis Marzano F. An improved protocol for the production of AFLPTM markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *J Anim Breed Genet*. 2005;122: 62–68. doi:10.1111/J.1439-0388.2004.00476.X
77. GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>
78. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition). [cited 14 Jul 2023]. Available: <https://www.cshlpress.com/default.tpl?--eqskudatarq=934>
79. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002 2135. 2002;21: 5483–5495. doi:10.1038/sj.onc.1205699
80. Frade JM, Ovejero-Benito MC. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle*. 2015;14: 712. doi:10.1080/15384101.2015.1004937
81. Zhang B, Zhou Y, Lin N, Lowdon RF, Hong C, Nagarajan RP, et al. Functional DNA methylation differences between tissues, cell types, and across individuals discovered using the M&M algorithm. *Genome Res*. 2013;23: 1522. doi:10.1101/GR.156539.113
82. Young FJ, Alcalde A, Melo-Flórez L, Couto A, Foley J, Monllor M, et al. Enhanced long-term memory and increased mushroom body plasticity in *Heliconius* butterflies. *bioRxiv*. 2023; 2023.07.11.548546. doi:10.1101/2023.07.11.548546
83. Sophie Scotto Lomassese, Colette Strambi, Alain Strambi, Pierre Charpin, Aïcha Aouane, Myriam Cayre. Influence of environmental stimulation on neurogenesis in the adult insect brain - Scotto Lomassese - 2000 - *Journal of Neurobiology* - Wiley Online Library. 2000 [cited 23 Jul 2023]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/1097-4695%2820001115%2945%3A3%3C162%3A%3AAID-NEU4%3E3.0.CO%3B2-X>
84. Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglia DD, Hanly JJ, Huber B, et al. The diversification of *Heliconius* butterflies: What have we learned in 150 years? *J Evol Biol*. 2015;28: 1417–1438. doi:10.1111/JEB.12672

85. Noguchi H, Kimura A, Murao N, Matsuda T, Namihira M, Nakashima K. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res.* 2015;95: 1–11. doi:10.1016/J.NEURES.2015.01.014
86. Lockett GA, Helliwell P, Maleszka R. Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee. *Neuroreport.* 2010;21: 812–816. doi:10.1097/WNR.0B013E32833CE5BE
87. Xu G, Yi Y, Lyu H, Gong C, Feng Q, Song Q, et al. DNA methylation suppresses chitin degradation and promotes the wing development by inhibiting Bmara-mediated chitinase expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Epigenetics and Chromatin.* 2020;13: 1–16. doi:10.1186/S13072-020-00356-6/FIGURES/5
88. Xu G, Tian Y, Peng Y, Zheng S. Knock down of target genes by RNA interference in the embryos of lepidopteran insect, *Bombyx mori*. *STAR Protoc.* 2022;3: 101219. doi:10.1016/J.XPRO.2022.101219
89. Ren D, Song J, Ni M, Kang L, Guo W. Regulatory Mechanisms of Cell Polyploidy in Insects. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 361. doi:10.3389/FCELL.2020.00361
90. Kausar S, Abbas MN, Gul I, Liu R, Li Q, Zhao E, et al. Molecular Identification of Two DNA Methyltransferase Genes and Their Functional Characterization in the Anti-Bacterial Immunity of *Antheraea pernyi*. *Front Immunol.* 2022;13: 855888. doi:10.3389/FIMMU.2022.855888/BIBTEX
91. Perveen FK, Khan A, Perveen FK, Khan A. Introductory Chapter: Lepidoptera. *Lepidoptera.* 2017 [cited 23 Aug 2023]. doi:10.5772/INTECHOPEN.70452
92. Ferguson DC (Douglas C. Host records for Lepidoptera reared in Eastern North America. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture; 1975.
93. Rasmussen EMK, Vågbø CB, Münch D, Krokan HE, Klungland A, Amdam G V., et al. DNA base modifications in honey bee and fruit fly genomes suggest an active demethylation machinery with species- and tissue-specific turnover rates. *Biochem Biophys reports.* 2016;6: 9–15. doi:10.1016/J.BBREP.2016.02.011
94. Liu Y, Ma S, Chang J, Zhang T, Chen X, Liang Y, et al. Programmable targeted epigenetic editing using CRISPR system in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2019;110: 105–111. doi:10.1016/J.IBMB.2019.04.013
95. Xiang H, Zhu J, Chen Q, Dai F, Li X, Li M, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. *Nat Biotechnol.* 2010;28: 516–520. doi:10.1038/NBT.1626
96. Jones CM, Lim KS, Chapman JW, Bass C. Genome-Wide Characterization of DNA Methylation in an Invasive Lepidopteran Pest, the Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*. *G3 (Bethesda).* 2018;8: 779–787. doi:10.1534/G3.117.1112
97. Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biol.* 2010;8: 1000506. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1000506
98. Boman J, Zhu Y, Höök L, Vila R, Talavera G, Backström N. Environmental stress during larval development induces head methylome profile shifts in the migratory painted lady butterfly (*Vanessa cardui*). *bioRxiv.* 2022; 2022.11.10.515964. doi:10.1101/2022.11.10.515964

99. Luviano N, Diaz-Palma S, Cosseau C, Grunau C. A simple Dot Blot Assay for population scale screening of DNA methylation. *bioRxiv*. 2018; 454439. doi:10.1101/454439
96. Ojeda A. EXPRESIÓN GÉNICA DE HSP40 Y HSP90 EN RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO EN *HELICONIUS ERATO* LATIVITTA. Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2022

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico

Protocolo del DNeasy Blood & Tissue Kit para Heliconius

- Limpiar el equipo de disección con etanol antes de empezar
- Incubadora encendida a 56
- 1. Cortar 1/3 - 1/2 del tórax, colocar en tubo tissue-lyser con 270 µl de Buffer ATL y una perla.
- 2. Usar la Tijeras de cutícula para triturar la muestra en un tubo de eppendorf lo más pequeño posible el torax.
- 3. Centrifugar durante 1 min a 8000 rpm.
- 4. Añadir 30 µl de Proteinasa K (frasco pequeño marrón). Mezclar mediante vórtex.
- 5. Incubar a 56°C durante 3 horas.
- 6. Vortex de muestras cada 15 minutos.
- 7. Centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm. Mientras tanto, etiquetar los tubos. Sacar el sobrenadante con una pipeta grande, pipetear en un nuevo tubo de microcentrífuga. Volver a centrifugar durante unos minutos y retirar el resto del sobrenadante. (vaciar las perlas sobre una toalla de papel).
- 8. Añade 6 µl de RNasa A. Mezcla con un vórtex. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min.
- 9. Añadir 300 µl de tampón AL. Mezclar con un vórtex.
- 10. Pipetear la mitad de la mezcla en una columna de centrifugación. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Desechar el flujo a través y el tubo de recogida en un vaso de precipitados para facilitar. Repetir la operación con la otra mitad. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Añadir 500 µl de tampón AW1. Centrifugar durante 1 minuto a 8 000 rpm. Desechar el flujo y el tubo de recogida.
- 11. Coloque la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Añadir 500 µl de tampón AW2. Centrifugar durante 3 min a 14 000 rpm. Desechar el flujo y el tubo de recogida.
- 12. Transfiera la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga (en el que almacenará el ADN. Etiquete con la identificación completa y la fecha en el lateral).
- 13. Eluya el ADN añadiendo 200 µl de tampón AE al centro de la membrana de la columna de centrifugación. Incubar durante 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 min a 8000 rpm.

Anexo 2. Repositorio de programas

Repositorio de git-hub donde se encuentran los programas en código python, tanto de fingerprinting “MSAP” como del ensayo enzimático.

https://github.com/andreifloresdevalgas/MSAP_insilico.git

Anexo 3. Tabla p-valor de las comparaciones entre grupos DI y DM

Gen_Tejido	Tratamientos	DM	Enzimas	DI	Enzimas	DI
DnaJ5_T	Aza5c	0.8954	HpaII			
			MspI			
	Control		HpaII			
			MspI			
GAPDH_T	Aza5c	0.1382	HpaII	NC		
			MspI			
	Control		HpaII			
			MspI			
Hsp90_T	Aza5c	0.001161	HpaII	0.5054	HpaII	0.081
			MspI	0.03629	MspI	
	Control		HpaII			
			MspI			
Hsp90_C	Aza5c	0.8358	HpaII	0.1044	HpaII	0.004135
			MspI	0.00607	MspI	
	Control		HpaII			
			MspI			

Los números en negrillas representan un p-valor inferior a 0.05 en la prueba no paramétrica Mann – Whitney, **NC**: No cumple.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.

Anexo 4. Evaluación de normalidad y homocedasticidad entre grupos DM y DI

Gen_Tejido	Tratamientos	DM		Enzimas		DI		Enzimas		DI
		Var.	Norm.	Var.	Norm.	Var.	Norm.			
DnaJ5_T	Aza5c	-		Hpall						
			-	MspI						
	Control	***		Hpall						
				MspI						
GAPDH_T	Aza5c	-		Hpall			NC			
			-	MspI						
	Control	***		Hpall						
				MspI						
Hsp90_T	Aza5c	***		Hpall	-	-	Hpall	***		
			-	MspI	**					
	Control	***		Hpall	***	**	MspI	***		
				MspI	***					
Hsp90_C	Aza5c	**		Hpall	-	-	Hpall	*		
			***	MspI	-					
	Control			Hpall	*		MspI			
		**		MspI	*	-		-		

P < 0.05: *, P < 0.01: **, P < 0.001: ***, **NC**: No cumple, **Norm.** : Prueba de normalidad Shapiro- Wilk, **Var.** : Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.

Elaborado por: Flores de Valgas, Andrei, 2023.