



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

**Expresión de genes *Hsp70* de múltiples exones en respuesta al
estrés térmico en la especie tropical *Heliconius erato*.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: HILLARY GABRIELLE GALÁRRAGA CARRILLO
TUTOR: PhD. CAROLINE NICOLE BACQUET PÉREZ

Napo - Ecuador
2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Hillary Gabrielle Galárraga Carrillo, con documento de identidad N°1003198288, 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, 14 de septiembre del 2023



Hillary Gabrielle Galárraga Carrillo
C.I: 1003198288

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Hillary Gabrielle Galárraga Carrillo, con documento de identidad N° 1003198288, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Expresión de genes *Hsp70* de múltiples exones en respuesta al estrés térmico en la especie tropical *Heliconius erato*” de conformidad con el Art. 144 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Tena, 14 de septiembre del 2023



Hillary Gabrielle Galárraga Carrillo
C.I: 1003198288

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Expresión de genes *Hsp70* de múltiples exones en respuesta al estrés térmico en la especie tropical *Heliconius erato*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Hillary Gabrielle Galárraga Carrillo, 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, 14 de septiembre del 2023



Caroline Nicole Bacquet Pérez

C.I: 1756516041

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi querida familia ya que siempre ha sido un pilar indispensable en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia que siempre estuvo confiando y apoyándome en cada momento ya sean buenos o malos.

Agradezco al grupo de Estrés térmico de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, que gracias a ellos no habría podido acabar este gran capítulo de mi vida.

Agradezco a mi tutora PhD. Caroline Bacquet que siempre fue mi modelo a seguir desde que inicie la Universidad.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD	ii
Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO	
INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN	
CURRICULAR	iii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
RESUMEN x	
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1 Cambio climático e extinción de especies	1
1.1.2 Adaptación de ectotermos a cambios climáticos	1
1.1.3 Proteínas <i>Hsp</i>	2
1.1.4 Expresión genética constitutiva o inducible	2
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación de la investigación	3
1.4. Objetivos de la investigación.....	4
1.1.5 Objetivo general.....	4
1.1.6 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	5
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	13
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	19
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	23

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen y concentraciones a usar para la PCR convencional.....	9
Tabla 2. Volumen y concentraciones a usar para la PCR en tiempo real.	11
Tabla 3. Resultados obtenidos de los análisis BLAST en la herramienta acoplada a Lepbase de ensembl.....	14
Tabla 4. Datos técnicos de los <i>primers</i> diseñados con base a los análisis de BLAST.....	15
Tabla 5. Significancia estadística del efecto de los factores en la expresión relativa de los genes <i>Hsp70_A1</i> y <i>Hsc_71</i>	18
Tabla 6. Valores de probabilidad de la Prueba de Levene y Shapiro Wilk de los genes <i>Hsp70_A1</i> y <i>Hsc_71</i>	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Curvas de calibración de <i>primers</i> para RT-qPCR. A) Curva de <i>HSP70_A1</i> . B) Curva de <i>Hsc_71</i>	16
Figura 2.	Comparación de genes de referencia más estables entre: <i>RPL3, S3A, Ubiquinol, pAbp, GAPDH, Tubulina2</i>	16
Figura 3.	Cuantificación relativa de la expresión génica de <i>Hsc_71</i> y <i>Hsp70_A1</i> por RT-qPCR.	17

RESUMEN

El cambio climático ha ocasionado un aumento en la variabilidad de las temperaturas a nivel global en las últimas décadas. Esta imprevisibilidad climática plantea un desafío para la conservación de la biodiversidad en todo el mundo. En respuesta a este estrés térmico, las proteínas de choque térmico, que actúan como proteínas acompañantes, desempeñan un papel crucial al estabilizar y prevenir la desnaturalización de otras proteínas en el organismo. Estas proteínas se inducen como parte de un mecanismo genético para hacer frente al estrés térmico. En el caso de la mariposa *H. e. lativita*, una especie endémica del Neotrópico que habita en bosques húmedos y ha sido ampliamente estudiada durante el último siglo, se ha observado que está siendo influenciada por los cambios climáticos. Sin embargo, aún existe incertidumbre en cuanto a los mecanismos epigenéticos involucrados. Por primera vez, se ha cuantificado la expresión génica de 2 genes de la familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (*Hsp70*), específicamente los genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71*, utilizando la técnica de RT-qPCR y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en diferentes temperaturas. Estos genes fueron identificados mediante el uso de la herramienta Nucleotide BLAST y se caracterizan por tener un solo exón en su estructura genética. Se analizó la expresión génica de la cabeza, tórax y secciones del abdomen. El choque térmico a 40 °C dio como resultado una sobreexpresión significativa de todos los genes, mientras que el choque térmico a 4 °C dio como resultado una sobreexpresión leve. Para los genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71* en hembras en presencia de calor su expresión fue mayor en cabeza y abdomen, seguido del tórax. Mientras que para machos en presencia de frío su expresión fue leve tanto para los dos genes. Se observó que la variabilidad en la expresión génica relativa estaba muy influenciada por el tratamiento térmico, los tagmas y el sexo. Este estudio revela los efectos del choque térmico por alta y baja temperatura en la mariposa *H. e. lativita* brindando información valiosa para comprender los impactos epigenéticos causados por el cambio climático en las mariposas neotropicales.

Palabras clave: Cambio climático, choque térmico, *H. e. lativita*, mariposas, neotropico.

ABSTRACT

Climate change has caused an increase in global temperature variability in recent decades. This climatic unpredictability poses a challenge for biodiversity conservation around the world. In response to this heat stress, heat shock proteins, which act as companion proteins, play a crucial role in stabilizing and preventing the denaturation of other proteins in the body. These proteins are induced as part of a genetic mechanism to cope with heat stress. In the case of the *H. e. lativita* butterfly, an endemic species of the Neotropics that inhabits humid forests and has been widely studied during the last century, it has been observed that it is being influenced by climatic change. However, there is still uncertainty regarding the epigenetic mechanisms involved. For the first time, we have quantified the gene expression of two genes of the 70 kDa heat shock protein (*Hsp70*) family, specifically the *Hsp70_A1* and *Hsc_71* genes, using the RT-qPCR technique and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method at different temperatures. These genes were identified by using the Nucleotide BLAST tool and are characterized by having a single exon in their genetic structure. Gene expression was analyzed from head, thorax, and abdomen sections. Heat shock at 40 °C resulted in significant overexpression of all genes, while cold shock at 4 °C resulted in mild overexpression. For the *Hsp70_A1* and *Hsc_71* genes in females in the presence of heat, their expression was higher in the head and abdomen, followed by the thorax. While for males in the presence of cold, their expression was slight for both genes. We found that variability in relative gene expression was highly influenced by heat treatment, tagmata, and sex. This study reveals the effects of high and low temperature heat shock on the butterfly *H. e. lativita* and provides valuable information for understanding the epigenetic impacts caused by climate change on Neotropical butterflies.

Keywords: Climate change, butterfly, thermal shock, neotropic, *H. e. lativite*,

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1 Cambio climático y extinción de especies

El cambio climático se ha identificado como una fuerza impulsora de extinciones masivas, ocasionando la desaparición de más del 75% de las especies en los últimos 450 millones de años, principalmente debido a las fluctuaciones significativas en la temperatura global. Se estima que, entre el 1% y el 10% de las especies se extinguen en una década, lo que se traduce en la desaparición de al menos 27,000 especies cada año atribuido al cambio climático [3]. Además de esta pérdida alarmante de biodiversidad, el cambio climático ha ocasionado notables cambios fenotípicos y genotípicos en los organismos, también promoviendo la extinción de una multitud de plantas y animales [1,2]. Estas perturbaciones ambientales representan una amenaza para la biodiversidad global, evidenciada por la relación directa entre las alteraciones térmicas y las tasas de extinción [2].

1.1.2 Adaptación de ectotermos a cambios climáticos

Entre los retos que los organismos enfrentan para su supervivencia, el mantenimiento de una temperatura corporal óptima es un factor crítico [1]. La mayoría de los insectos, debido a su pequeño tamaño y condición ectotérmica, carecen de la capacidad para regular su temperatura corporal como lo hacen ciertas especies de mayor tamaño [2,4]. Es bien sabido que, el funcionamiento metabólico y fisiológico de los insectos está intrínsecamente vinculado a su temperatura corporal [1,5,6]. Por ende, es esencial que mantengan una exposición térmica adecuada para preservar la homeostasis, ya que las temperaturas extremas pueden desestabilizar sus funciones vitales y aumentar la mortalidad [10]. Sin embargo, se considera a *Heliconius erato lativitta*, un lepidóptero de gran prevalencia en la Amazonía ecuatoriana, como un modelo de estudio en ectotermos. Su relevancia radica en un amplio registro de investigación, que abarca alrededor de dos siglos, debido a que su genoma se encuentra secuenciado y particularmente, su habilidad de tolerar variaciones térmicas. Esta última característica, esencial para su supervivencia ante los desafíos del cambio climático, fue confirmada por Camino (2022) y Ojeda (2023) [8,9]

1.1.3 Proteínas Hsp

Estos mecanismos de tolerancia térmica, también llamados proteínas de choque térmico (*Hsp*), permiten a los organismos reestablecer su homeostasis tras experimentar estrés térmico [5,6,7]. Estas proteínas han jugado un papel crítico en la historia de la supervivencia de los ectotermos frente a las fluctuaciones globales de temperatura [10,11].

Las *Hsp* actúan como un sistema de defensa celular, protegiendo a las proteínas contra: desnaturalización, cambios conformacionales y plegamiento incorrecto causados por el estrés celular [12]. Las *Hsp* se dividen en diferentes familias según su homología de secuencia y su masa molecular [12], que incluyen *Hsp90*, *Hsp100*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70* y pequeñas *Hsp* (sHsp) [6,13].

La familia *Hsp70* ha sido ampliamente estudiada en relación con la respuesta al estrés térmico. Las proteínas de esta familia son esenciales a lo largo del desarrollo, porque facilitan el plegamiento de proteínas sintetizadas y son críticas para la supervivencia de los artrópodos [14]. Estos genes, que codifican para *Hsp* de 70 kDa captó interés de la comunidad científica debido a su capacidad de expresarse en respuesta a diversos tipos de estrés fisiológico [15,16].

1.1.4 Expresión genética constitutiva o inducible

Los genes que codifican para *Hsp70* se clasifican en dos tipos: genes constitutivos y genes inducibles. Los genes constitutivos codifican proteínas de choque térmico cognadas (*Hsc*) y están constantemente activos transicionalmente en la mayoría de las células [14,17-20]; sin embargo, su expresión no se ve afectada por el estrés fisiológico [10,11]. Por otro lado, los genes inducibles codifican proteínas de choque térmico (*Hsp*) [18-24] y responden a diferentes tipos de estrés [6,10,11,21,23,24].

La inducción transcripcional de *Hsp70* es mediada principalmente por genes de un único exón que carecen del empalme transcripcional o contienen varios exones [6]. Esta es una de las razones por las que es un mecanismo de respuesta adaptativa al estrés térmico y se considera importante para la supervivencia de ectotermos ante las alteraciones extremas de temperatura [11,21,23].

1.2. Planteamiento del problema

El cambio climático tiene importantes repercusiones en la biodiversidad. Estudios paleoclimáticos que se remontan a 542 millones de años han demostrado que un cambio de 5.2 °C en la temperatura global media es capaz de generar extinciones masivas [2]. A pesar esta amenaza, la temperatura global ha aumentado 1°C desde 1960 [25]. Basándose en estos datos, las predicciones actuales aseguran una pérdida catastrófica de la biodiversidad a escala global [16].

Los insectos son especialmente vulnerables a los cambios [5]. Las mariposas, por ejemplo, han tenido que adaptarse dispersándose entre microhábitats y modificando su fotoperíodo [30]. Además, el cambio climático ha influido en varios de sus aspectos genéticos, como el tamaño corporal, el melanismo y la diversidad genética [4,26,28].

El Neotrópico es una de las zonas más biodiversas del mundo, cuenta con alrededor de 1.6 millones de insectos ectotermos [21,32]. Estos organismos constituyen la mitad de todas las especies de animales descritas a escala mundial. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre su capacidad de tolerancia térmica en condiciones naturales es insuficiente, lo que limita nuestra capacidad para predecir sus respuestas frente al cambio climático [18].

De igual forma, las investigaciones sobre la transcripción de genes *Hsp70* en respuesta al estrés térmico se han limitado a especies como *Drosophila melanogaster* lo que deja un vacío importante en nuestro entendimiento de la expresión génica de *Hsp70* en mariposas tropicales, en particular *H. e. lativita* [10,15,30–32]. Esta falta de información limita la comprensión de los mecanismos genéticos que estas mariposas emplean para mitigar las fluctuaciones de temperatura. Del mismo modo, los estudios sobre la respuesta de *Hsp70* frente al estrés térmico generalmente se han centrado en una única tagma o sexo, dejando de lado una perspectiva más completa y diversa [10,11,19,21,23,30,31].

1.3. Justificación de la investigación

El cambio climático tiene importantes consecuencias en la fauna, entre ellas el declive y extinción de numerosas especies [33-35]. En este sentido, existe un interés creciente por comprender por comprender cómo afectan estos cambios los organismos ectotermos [18].

Dado que estas especies representan la mitad de todas las especies en el Neotrópico, su papel como bioindicadores de la salud del ecosistema es crítico y se utilizan para predecir los efectos del cambio climático en la biodiversidad [18]. Por ello, entender cómo se adaptan térmicamente las poblaciones de insectos tropicales se han convertido en un importante campo de investigación [33].

H. e. lativita es una especie modelo ideal para este tipo de estudios, gracias a su abundancia en el Neotrópico y a su distribución a lo largo de un amplio gradiente altitudinal [32]. Adicionalmente, su genoma ha sido completamente secuenciado y anotado [38–40]. A pesar de que la mayoría de las investigaciones sobre tolerancia térmica en mariposas se han centrado en especies de climas templados [32], los estudios de genes *Hsp70* inducibles y constitutivos son incipientes para esta especie.

Por lo tanto, el presente estudio plantea evaluar los genes de *Hsp70* con múltiples exones y cuantificar su respuesta ante temperaturas extremas. Esta investigación se enfoca en aportar a la comprensión de los mecanismos epigenéticos de *H. e. lativita* ante el cambio climático.

1.4. Objetivos de la investigación

1.1.5 Objetivo general

- Identificar el efecto del estrés térmico sobre la expresión de genes *Hsp70* de múltiples exones en distintos sexos y tagmas en *H. e. lativita*

1.1.6 Objetivos específicos

- Cuantificar la expresión de los genes con múltiples exones de la familia *Hsp70* en *H. e. lativita* sometidas a estrés térmico en condiciones de calor y frío.
- Evaluar la variación en la expresión de los genes con múltiples exones de *Hsp70* de *H. e. lativita* en ambos sexos, machos y hembras.
- Comparar la expresión de los genes con múltiples exones de la familia *Hsp70* en *H. e. lativita* entre los tejidos de cabeza, tórax y abdomen.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Recolección y cuidado de mariposas *H. e. lativita*

2.1.1 Recolección de especímenes

De acuerdo con el contrato marco de recursos genéticos, otorgado por el ministerio del ambiente bajo el código MAATE-CM-2021-0176, se recolectaron 18 especímenes de *H. e. lativita* de los alrededores de la reserva ecológica Colonso Chalupas en Napo, Ecuador, en las zonas cercanas al mariposario científico de Ikiam y la vía hacia la granja de Shitig. Los sitios de muestreo se encontraron alrededor de los 625 y 675 m s.n.m. respectivamente. Las mariposas se almacenaron y criaron en el insectario científico de la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

2.1.2 Reproducción y cuidado

Para el apareamiento en el mariposario científico de Ikiam, se colocaron mariposas en parejas (macho y hembra) en una jaula construida con malla plástica de 2mx2m. Se utilizó la planta hospedera *Passiflora punctata* en el interior de la jaula, donde las mariposas depositaron sus huevos. Se monitoreó diariamente a la hembra utilizando un código asignado previamente y se registró el progreso de la puesta de huevos [55,56].

Los huevos encontrados en la planta hospedera fueron recolectados, se colocaron en pequeños envases de plástico y se incubaron en una habitación con una temperatura de 25°C, 12h luz controladas durante aproximadamente cinco días [59]. Los huevos que eclosionaron fueron transferidos a vasos plásticos cerrados. Se añadió un brote de *P. punctata* como fuente de alimento para las larvas [58]. Las orugas fueron monitoreadas hasta completar el proceso de metamorfosis, aproximadamente 28 días. Finalmente, emergiendo como mariposas adultas se identificó el sexo de las mariposas, se les asignó un código en la zona discal del ala derecha y se cuidó durante 15 días, alimentándolas con néctar hecho a base de azúcar y polen [60].

2.2 Análisis BLAST

Se usó el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para identificar genes con múltiples exones de *Hsp70* en el genoma de *H. e. lativita*, anotado en *Ensembl* con la extensión de *Lepbase* (acrónimo en inglés para: *The Lepidopteran Genome Database*) [38]. El análisis BLAST se realizó en dos genes candidatos para controles endógenos utilizados en estudios de expresión génica en insectos: *RPL3* [45] y *S3A* [46]. *E-value* de las secuencias utilizadas como referencia para genes de la familia *Hsp70* fueron obtenidas de *Drosophila melanogaster*. Se identificaron los genes candidatos de *Hsp70* utilizando la secuencia del gen inducible con múltiples exones *Hsp 70A1* y *Hsp 71*. Sus secuencias CDS (*Coding Sequences*) se obtuvieron de *FlyBase* [47] y los análisis BLAST se realizaron en la herramienta *Lepbase* [44].

2.3 Diseño de *primers*

Se utilizó el software *Geneious Prime (Dotmatics)* [45] para diseñar *primers* de las secuencias de los dos genes *Hsp70* con múltiples exones (SEG) y de los dos genes endógenos, usando como material de partida las secuencias resultantes del análisis BLAST. Los parámetros para la selección de *primers* se establecieron en un rango de longitud del primer de 18 a 30 pares de bases, una temperatura de *melting* (*T_m*) entre 55 y 60 °C, una diferencia de *T_m* entre la cadena *forward* y *reverse* inferior a 2 °C, de uno a tres nucleótidos C o G en las cinco bases de la cola 3', un contenido de C+G entre 40 a 60 % y un producto amplificado de 90 a 150 pares de bases.

2.4 Pruebas de estrés térmico

Se sometió a 18 individuos constituidos por 9 hembras y 9 machos a pruebas de estrés térmico con tres temperaturas diferentes, basadas en bibliografía [19,21], con el fin de someterles a estrés térmico e inducir la expresión génica. Las mariposas de ambos sexos fueron tratadas con una temperatura baja de 4 °C, una temperatura intermedia de 25 °C y una temperatura elevada de 40 °C [18]. Los individuos fueron colocados en un plástico hermético con suficiente oxígeno y se los introdujo al interior del baño maría WB10 (*PoliScience®*). Las mariposas estuvieron sometidas a estrés térmico por un lapso de 60 minutos, tiempo en el cual se espera inducir la actividad de los genes de proteínas de choque térmico en los tratamientos con frío y calor [7,18]. Al final del tratamiento las

mariposas fueron sacrificadas, diseccionadas en sus diferentes tagmas (cabeza, tórax y abdomen) y almacenadas en *RNA Later de Invitrogen®* para la futura extracción de ARN.

2.5 Extracción ARN total

Se extrajo ARN total de las 18 mariposas almacenadas en *RNA Later (Invitrogen®)*. Se utilizó el Kit de extracción *SV Total Isolation System (Promega®)*. Cada tagma se pesó en un microtubo de 2 mL y dependiendo de su peso se añadió un volumen de tampón de lisis (30mg: 1 mL). El tejido fue homogenizado a temperatura ambiente mediante vórtex. Posteriormente, se transfirieron 175 µL del lisado a un nuevo microtubo, al cual se añadieron 350 µL de tampón de precipitación y se mezcló por inversión. Se incubó a 70 °C durante 3 minutos en el baño maría WB10 (*PoliScience®*). Luego, se centrifugó a 13,000 g durante 10 minutos para separar la impureza del tejido. Finalmente, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se añadieron 200 µL de etanol al 95% y se mezcló por pipeteo.

Toda la mezcla se transfirió a una columna de purificación, e inmediatamente se centrifugó a 13,000 g durante 1 minuto. Se desechó el tubo colector, se añadieron 600 µL de solución de lavado y se centrifugó a 13,000 g por 1 minuto. Después, se realizó un paso de digestión de ADNg, usando una combinación de 40 µL de *Yellow Core Buffer*, 5 µL de 0.09M MgCl₂ y 5 µL de enzima ADNsa I mezclada por pipeteo. Se incubó en la columna durante 15 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la acción de la enzima añadiendo 200 µL de *ADNse Stop Solution*. A continuación, se centrifugó a 13,000 g durante 1 minuto para luego realizar dos lavados, el primero usando 600 µL de solución de lavado y centrifugación a 13,000 g por 1 minuto, y el segundo añadiendo 250 µL de la misma solución, con centrifugado a 13,000 g por 2 minutos.

El ARN fue eluído en un microtubo nuevo, usando 100 µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 13,000 g por 1 minuto. El ARN total se cuantificó usando 1 µL de cada muestra, con ayuda de un espectrómetro Nanodrop ND-ONEC-W (*Thermo Scientific™*) y se almacenó a -80 °C.

2.6 Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Usando el ARN total se logró obtener una librería de ADNc utilizando el kit de transcripción reversa *GoScript® (Promega™)*. Primero se realizó una mezcla de 2.5 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de ARN total (30ng/µL) y 0.5 µL de *primers* Oligo dT aleatorios. Se utilizó un control negativo para descartar una posible contaminación con ADNg y se utilizó un control negativo donde se reemplazó el ARN total por agua libre de nucleasas. Usando el termociclador *Proflex™ PCR Systems (Applied Biosystems™)*, se incubó a 70°C durante 5 minutos y luego a 4 °C por un tiempo indefinido.

Seguido, se preparó la mezcla de la reacción de transcripción reversa con un volumen final de 20 µL utilizando: 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL del tampón de reacción *GoScript 5x*, 2 µL de *MgCl₂* 25 mM, 1 µL de mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5 µL de Inhibidor de ribonucleasas 20 U, 1 µL de la enzima transcriptasa reversa y 5 µL del ARN preparado en el paso anterior. Se realizó la síntesis aplicando una temperatura de 25 °C por 5 minutos, seguido de 42 °C por una hora y finalmente 70 °C por 5 minutos, usando el termociclador *Proflex PCR Systems (Applied Biosystems™)*.

El ADNc obtenido fue cuantificado con ayuda del *Nanodrop™ ND-ONEC-W (Thermo Scientific™)* en el cual se aplicó 2 µL de cada muestra en el espectrofotómetro de micro volúmenes, se estandarizó la librería de ADNc a una concentración de 20 ng/µL y un volumen de 50 µL, adicionando un volumen de ADNc y agua libre de nucleasas correspondientes y se almacenó a -20 °C.

2.7 Pruebas de perfiles térmicos

Para evaluar las temperaturas óptimas de *melting* y *annealing* se realizaron pruebas de perfiles térmicos para cada par de *primers*. El perfil térmico fue de una temperatura inicial de 95 °C durante 5 minutos. Se continuó con 35 ciclos de PCR, iniciando con una temperatura de 95 °C por 30 segundos. Luego se utilizó un gradiente de temperatura de 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C hasta 62°C por 30 segundos. Tras el gradiente de temperaturas, se fijó una temperatura de 72 °C por 45 segundos. Una vez finalizados los 35 ciclos, una temperatura de extensión final de 72 °C fue establecida durante 5 minutos. Se realizó una PCR convencional del cDNA y de los *primers* con la finalidad de verificar su funcionalidad, como control de calidad frente a posibles contaminaciones se añadió un

control negativo a cada perfil térmico. La PCR convencional se realizó con el Kit de *Platinum® Taq DNA Polymerase de Invitrogen™*. Las reacciones tuvieron un volumen final de 10 µL. La cantidad de reactivos utilizada en cada reacción se presenta en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Volumen y concentraciones a usar para la PCR convencional

Componente	Concentración inicial	Volumen 1Rxn(µL)	Concentración final 10 µL
Agua libre de nucleasas	-	4.6	-
Buffer	10X	1	1X
dNTP mix	2.5 µM/dNTP	1	0.25 µM/dNTP
Primer forward	10 µM	0.5	0.5 µM
Primer reverse	10 µM	0.5	0.5 µM
MgCl ₂	50nM	0.3	1.5nM
ADN polimerasa Taq Platinum™	200U	0.1	2U
Templado ADN	-	1	<500ng
BSA	-	1	-
Total	-	10 µL	-

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

2.7.1 Visualización de productos de PCR

Los amplicones de la PCR convencional fueron revelados y analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE de concentración 1X. Fueron cargados 4 uL de cada producto de PCR con su respectivo control negativo. Como marcador de peso molecular se utilizó el reactivo 100-1000 pares de bases DNA *Ladder Promega™*. Para la revelación de resultados se utilizaron 3uL del tampón de carga Blue Juice™ a una concentración final de 2X en cada muestra. Las condiciones de la corrida de electroforesis fueron de 400 mAmp y 70 Voltios por 60 minutos en la cámara de *Thermo Scientific™*. Se utilizaron peines de 10, 14 y 20 pocillos para la preparación de los geles. Para visualizar las bandas de ADN, al gel se le añadió SYBR™ Safe DNA gel stain con una relación de 1:10.000. Finalmente, el gel fue revelado en el fotodocumentador equipado con luz UV Enduro GDS touch 1302 *Labnet™*.

2.8 qPCR

2.8.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)

Fue utilizado el kit *DNeasy® Blood & Tissue* de *QIAGEN*. Se comenzó diseccionando las mariposas por sus diferentes tagmas (cabeza, tórax y abdomen) con bisturí y depositando

el tejido en el tubo de eppendorf (1,5 ml), luego se añadió 270 µL de tampón *Tissuelysis Buffer* (ATL) conjunto con 30 µL de proteinasa K y se maceró vigorosamente con ayuda de pistilos. Se incubó por 3h a 56°C en el baño maría *WB10* (*PoliScience*®) y se procedió a agitar la muestra cada 15min con ayuda de un vortex. Luego del tiempo transcurrido se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm durante 10min. Se tomó el sobrenadante y se lo traspasó a una columna de microcentrifuga, se adicionó 300 µL de lisis de buffer (AL) y se homogenizó. Tras ello, se centrifugó a 8 000 rpm por 1min. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección, se agregó *Wash Buffer I* (AW1) y se centrifugó a 8000rpm por 1min. Continuamente, se colocó la columna en otro tubo de recolección y se añadió 500 µL de *Wash Buffer II* (AW2) y se centrifugó a 14 000rpm por 3min. Nuevamente se trasladó la columna a otro tubo de recolección y se añadió 200 µL de *Elution Buffer*, se incubó 1min a temperatura ambiente. Finalmente. Se centrifugó 8 000rpm por 1min y el ADNg obtenido fue almacenado a -20 °C.

Finalmente, la columna de spin fue agregada a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se eluyó el ADN añadiendo 200 µL de tampón AE al centro de la membrana de la columna y centrifugando por 2 minutos a 3200 rpm. El ADNg obtenido fue almacenado a -20 °C.

2.8.2 Curvas estándar de *primers* de genes de interés y endógenos

Se realizaron cinco diluciones seriadas de gDNA de *H. e. lativitta* conjunto con agua para obtener razones 1:1, 1:3, 1:9, 1:27 y 1:81 partiendo de una concentración inicial de 30 ng/µL registrada por Qubit 3™ con el Kit de alta sensibilidad de doble hebra (*high sensitivity 1X dsDNA*). Los *primers* fueron probados para cada dilución seriada en reacciones triplicadas de PCR en tiempo real.

Se utilizó el kit *SYBR™ Green PCR Master Mix* (*Thermo Fisher™*) para lo cual se usó volumen final de reacción de 10 µL, las cantidades que se usaron se pueden visualizar en la Tabla 2.

Tabla 2. Volumen y concentraciones a usar para la PCR en tiempo real.

Componente	Concentración inicial	Volumen 1Rxn(μL)	Concentración final 10 μL
Agua libre de nucleasas	-	1.5	-
SYBR TM Green PCR Master Mix	2X	5	1X
Primer forward	6 μM	0.5	0.3 μM
Primer reverse	6 μM	0.5	0.3 μM
Templado ADN	20ng/μL	2	30 ng
BSA	-	1	-
Total	-	10 μL	-

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

Se utilizó el termociclador en tiempo real CFX96 Touch (*Bio-Rad*TM) para someter a la reacción a una temperatura inicial de 50 °C por 2 minutos, seguido de 95 °C por 2 minutos, luego 40 ciclos que comprendieron: 15 segundos a 95 °C, 15 segundos en la temperatura de *annealing* estandarizada para cada *primer* (Ver sección 2.7), 72 °C por 1 minuto y finalmente se estableció una lectura de la fluorescencia de las reacciones.

Los resultados de PCR se utilizaron para producir curvas de ciclos de umbral vs log (concentración ADN). Tras ello, se identificaron y registraron los resultados de las ecuaciones lineales, pendientes y valores de R² de las curvas. Los cálculos y figuras se realizaron con el programa R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022).

2.8.3 Cálculo de eficiencia de amplificación de *primers*

La eficiencia de amplificación de los *primers* (E), se calculó utilizando las ecuaciones obtenidas de las curvas estándar. Se utilizó la ecuación de la eficiencia de PCR [45,49], donde “m” representa la pendiente de la curva estándar: $E = 10^{(-\frac{1}{m})}$

2.8.4 Validación de *primers* por curvas de *melting*

Para la validación de la calidad de los *primers* y de las reacciones de PCR en tiempo real, se realizarán curvas de *melting* con un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C. Se usó las mismas concentraciones y cantidades que se muestran en la sección 2.8.2. La temperatura en °C se la relacionará con los resultados de unidades referenciales de fluorescencia (RFU) para construir las curvas. Las gráficas se obtendrán directamente del software CFX Maestro del termociclador Biorad de tiempo real CFX 96 Touch.

2.8.5 PCR a tiempo real de genes *Hsp70* y endógenos

Se llevó a cabo una PCR en tiempo real partiendo de la librería de ADNc con reacciones en triplicado de volumen final de 10 μ L (Tabla No. 2). La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos *MicroAmp*[™] (*ApliedBiosystems*[™]) usando el termociclador en tiempo real CFX96 *Touch* (*Bio-Rad*[™]) con un perfil térmico que comprende una temperatura inicial de 50 °C por 2 minutos, seguido de 95 °C por dos minutos, después se efectuaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos en la temperatura de *annealing* estandarizada para cada *primer*, 72 °C por un minuto y para finalizar, una lectura de la placa por cada final de ciclo. Se recopiló las gráficas y valores de C_t para su procesamiento, obtenidos mediante el software CFX Maestro (*Bio-Rad*[™]).

2.9 Transformación de datos de PCR cuantitativa y análisis estadísticos

2.9.1 ANOVA factorial del gen endógeno

Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk, homocedasticidad de Levene, identificación de valores extremos, gráficas Q-Q y ANOVA factoriales fueron realizados en R Studio usando los paquetes Rstatix, Datarium, ggplot2 y ggpubr.

2.9.2 Cuantificación relativa por método de $\Delta\Delta C_T$

Se utilizó el método de Livak en para la normalización de datos de cuantificación relativa [45,51]. Para ello, primero se restaron los C_T de los genes *Hsp70* de los C_T del gen endógeno.

$$\Delta C_{T(\text{tratamiento})} = C_{T(Hsp70)} - C_{T(\text{genes de referencia})}$$

Los ΔC_T del tratamiento control fueron promediados. Tras ello, se realizó otra resta del valor ΔC_T de los tratamientos con calor y frío frente al ΔC_T de los tratamientos control promediados, tal que:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{tratamiento})} - \Delta C_{T(\text{control})}$$

La expresión normalizada se la calculó utilizando la fórmula: $RGE = 2^{-\Delta\Delta_{CT}}$. Finalmente, se realizaron las gráficas de expresión genética relativa normalizadas en el software R Studio utilizando la librería ggplot².

2.9.3 Modelos lineales generalizados

Se identificó el tipo de distribución de los datos de expresión génica relativa y se ajustó el modelo con una función de enlace de tipo raíz cuadrada para distribuciones de Poisson e inversa para distribuciones Gamma. Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para las distribuciones residuales y gráficas Q-Q. Finalmente, los resultados del modelo fueron analizados a través de un ANOVA tipo II.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.1 Blast de genes

En el genoma de *H. e. lativita* se encontraron coincidencias con valores $E < 0.05$ de todos los genes de *D. melanogaster* utilizados para el alineamiento de secuencias nucleotídicas (Tabla 3). Para los genes de referencia se tomaron *RPL3* y *SA3*, dado que se obtuvieron de un artículo en marcha donde se especifica la calidad de los genes, también se los tomaron por la coincidencia con menor valor E. Para los genes de *Hsp70* se tomaron en cuenta las cinco secuencias encontradas. La coincidencia 1/5 (HEL_010335-RA) que se la denominó como *Hsc_71*, corresponde a una proteína de choque térmico cognada (*Hsc*) de 71 KDa con 9 intrones [61], mientras que la 5/5 (HEL_010373- RA) que se la denominó *Hsp70_A1*, corresponde a una *Hsp70* con 6 intrones [62]. Las coincidencias 2/5, 3/5 y 4/5 de *Hsp70* son genes de un único exón. *Hsp70_A1* se encuentra en la hebra con extremo 5' a 3' del cromosoma 3, mientras que el gene *Hsc_71* se encuentran en la hebra de los extremos 5' a 3' del cromosoma 6.

Tabla 3. Resultados obtenidos de los análisis BLAST en la herramienta acoplada a Lepbase de ensembl. Hits marcados con “*” hacen referencia a genes de múltiples exones.

Gen	Hit	Score	E value	CDS Query Cover	Length(pb)	Flybase ID	Lepbase ID
<i>Hsp70*</i>	1/5	996.09	0	1329/1852 (71.96 %)	3009	FBgn0013275	HEL_010335-RA
<i>Hsp70</i>	2/5	711.81	0	1111/1580 (70.32 %)	1641	FBgn0013275	HEL_005377-RA
<i>Hsp70</i>	3/5	520.66	6.43E-147	836/1200 (69.67 %)	1284	FBgn0013275	HEL_013537-RA
<i>Hsp70</i>	4/5	520.66	6.43E-147	836/1200 (69.67 %)	1512	FBgn0013275	HEL_013538-RA
<i>Hsp70*</i>	5/5	109.49	3.80E-23	186/270 (68.89 %)	1215	FBgn0013275	HEL_012373-RA
RPL3	1/1	1407.91	0	990/1131 (87.53 %)	1131	FBgn0286832	HEL_011520-RA
SA3	1/1	199.66	2.28E-50	245/335 (73.13 %)	795	FBgn0017545	HEL_010107-RA

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

3.2 Primers de genes de interés y de referencia

Se sintetizaron un total de dos pares de *primers* para los genes *Hsp70* SEG y dos pares de *primers* para los genes endógenos con tamaños entre 18 a 26 pares de bases, amplicones entre 102 a 154 pares de bases, CG entre 30 y 62 % y Tm teórico < 62.2 °C (Tabla 4).

Los *primers* para *Hsp* mostraron amplificación en las temperaturas: 61°C para *Hsp70_A1* F1/R1 y 60.5°C para *Hsc_71* F2/R2 en las pruebas de perfiles térmicos (Anexo B).

Los *primers* para genes de referencia mostraron amplificación en las temperaturas: 58°C para *RPL3* F1/R1 y 54.5°C para *S3A* F1/R1. La especificidad de todos los *primers* fue determinada por pruebas *in silico* con Primer-BLAST para el genoma de *H. e. lativita* [63].

Tabla 4. Datos técnicos de los *primers* diseñados con base a los análisis de BLAST.

Cebador	Dirección	Secuencia 5' – 3'	Longitud del cebador (pb)	%GC	Tm(°C)	Longitud del amplicón (pb)
F1 <i>Hsc_71</i>	Forward	GTGGTCAGTGATGGAGGCAA	20	55	60	123
R1 <i>Hsc_71</i>	Reverse	GTACGCCTCAGCTGTTTCCT	20	55	60	123
F1 <i>Hsp70_A1</i>	Forward	ATGAAGGAGAACGGGCGATG	20	55	60.2	89
R1 <i>Hsp70_A1</i>	Reverse	AGTTACGCCTCTTGGAGCTG	20	55	59.8	89
F1 <i>RPL3</i>	Forward	AAGCTGGTATGACCCACGTG	20	55	60	111
R1 <i>RPL3</i>	Reverse	CACACACCATAGGAGGCGTT	20	55	60	111
F1 <i>S3A</i>	Forward	ATGCTGAGAGGTCTTTCCGC	20	55	60.1	132
R1 <i>S3A</i>	Reverse	GCGTCTGCCATTTCTTGACC	20	55	59.8	132

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

Para la validación de los *primers* para su uso en qPCR se utilizó una curva de calibración para cada *primer* tomando en cuenta el perfil térmico previamente estandarizado (Figura 1) con una curva de *melting* de los productos de amplificación (Anexo C). De las curvas de calibración se puede destacar la obtención de valores de R^2 mayores a 0.89, eficiencias de amplificación de entre 97.16 a 106.38 %.

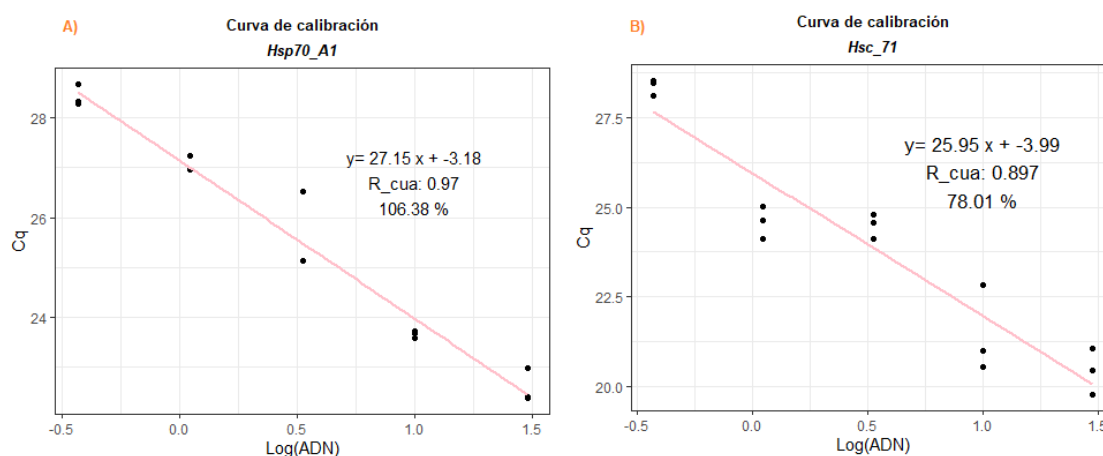


Figura 1. Curvas de calibración de *primers* para RT-qPCR. A) Curva de *Hsp70_A1*. B) Curva de *Hsc_71*.
Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023

3.3 Cuantificación de ARN total

Las 54 muestras extraídas de ARN fueron cuantificadas. El promedio de concentración fue de 324.24 ng/uL con SD = 212.05. A 260/280 presentó un promedio de 2.11 con SD = 0.14 y A260/230 tuvo un promedio de 1.86 con SD = 0.27 (Anexo A).

3.4 Genes de referencia

Los genes de referencia usados en este trabajo derivaron de la investigación realizada por Ruiz (2023). En dicho estudio se reporta que los genes RPL3 y S3A presentan una eficiencia de 103.7% y 101.93%. Estos valores se encuentran dentro del rango aceptado de eficiencia por lo que se consideran como los genes más estables para ser utilizados en este estudio (Figura 2).

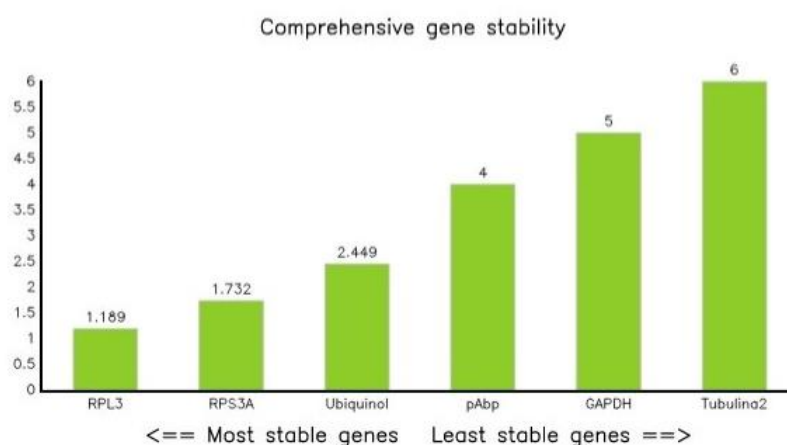


Figura 2. Comparación de genes de referencia más estables entre: *RPL3*, *S3A*, *Ubiquinol*, *pAbp*, *GAPDH*, *Tubulina2*.
Realizado por: Ruíz, Joshue, 2023.

3.5 Cuantificación relativa de genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71*

Como se observa en la Figura 3 los valores marcados por anaranjado representan la sobre expresión causado por el tratamiento calor, los de azul tratamiento por frío y el color plomo tratamiento control. La expresión génica relativa (ERG) de los genes de interés se encuentran distribuidos en la Figura 3. Se puede denotar que el gen *Hsc_71* presentan sobreexpresión en el tratamiento con calor, de hasta 82 000 veces en comparación con el control. Por otro lado, *Hsp70_A1* presentó una sobreexpresión en el tratamiento de calor de hasta 35 veces más que el control, la expresión en el tratamiento de frío de ambos genes fueron superior al control con hasta 4 veces más expresión. Al analizar los valores entre las distintas tagmas y sexos se demuestra que los valores para los genes de *Hsc_71* tienden a una sobre expresión a altas temperaturas en los tagmas de cabeza y tórax de mariposas hembras, mientras que para machos se encontró una sobreexpresión al frío que se encuentran principalmente en la cabeza y tórax. *Hsp70_A1* tiende una sobreexpresión

inducido por calor en abdomen y cabeza de hembras. Por otra parte, en el caso del estrés por frío ocasiono una leve sobreexpresión en abdomen y cabeza.

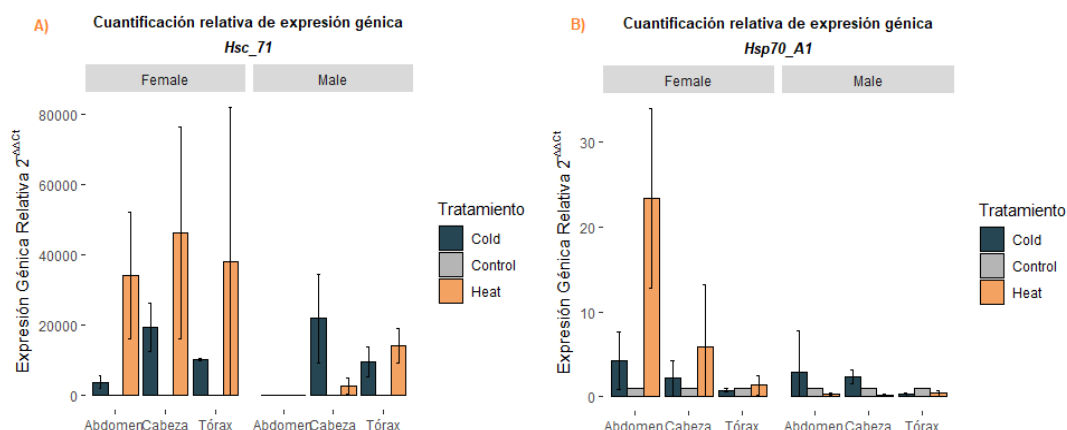


Figura 3. Cuantificación relativa de la expresión génica de A) *Hsc_71* y B) *Hsp70_A1* por RT-qPCR.
Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

3.6 Variación en la expresión relativa de *Hsp70_A1* y *Hsc_71*

El uso de Modelos Lineales Generalizados (GLMs del inglés *Generalized Linear Models*) permitió modelar la relación entre las variables predictoras (tratamiento y tagma) y la variable respuesta (expresión relativa de los genes) de manera no lineal y con distribuciones de error, que no necesariamente se ajusten a una distribución normal. Se identificó el tipo de distribución de los datos de expresión génica relativa y se ajustó el modelo con una función de enlace de tipo raíz cuadrada para distribuciones de Poisson e inversa para distribuciones Gamma; además, permitiendo incorporar factores categóricos como el tagma, el tratamiento y el sexo.

El análisis mediante GLMs permite una mayor precisión en la estimación de los efectos de los factores en la expresión relativa de los genes y una mejor interpretación de los resultados. Como se puede observar en la Tabla No. 5, para los dos casos, el factor sexo y tagma influyen en el valor ERG con una significancia estadística del 99%. La variable tagma y sexo de *Hsp70_A1* presentó un $p = 3.59e-05$ y $p = 6.29e-4$, mientras que el tratamiento tuvo un valor de 0.025235. En el caso del gen *Hsc_71*, los valores de p en tagma y sexo son: $8.94e-4$ y $1.20e-05$, mientras que para los tratamientos fue: $1.50e-11$. Para los dos genes, se aplicó una transformación de raíz cuadrada para que se cumpla el supuesto de normalidad. La comprobación de los supuestos de distribución Gaussiana y homogeneidad se pueden verificar en la Tabla 6, donde todas las probabilidades son mayores a la significancia estadística de 0.05. Todos estos resultados se pueden observar

gráficamente en la Figura 3, donde el tratamiento calor y frío, así como tagma abdomen y cabeza difieren con el control.

Tabla 5. Significancia estadística del efecto de los factores en la expresión relativa de los genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71*.

Dónde $p < 0.01$: ‘*’, $p < 0.001$: ‘**’, $p < 0.0001$: ‘***’, GL: grados de libertad, Sum C: suma de cuadrados corregidos, Media C: media de cuadrados corregidos, F: estadística F, Pr(F): valor de p asociado con la estadística F, NS: no significativo.

Gen	Factor	GL	F	Pr(F)	Significancia
<i>Hsp70_A1</i>	Tratamiento	2	4.083	0.025235	*
	Sexo	1	22.217	3.59E-05	***
	Tagma	2	9.109	0.000629	***
<i>Hsc_71</i>	Tratamiento	2	53.89	1.50E-11	***
	Sexo	1	25.729	1.20E-05	***
	Tagma	2	8.585	0.000894	***

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

Los datos presentan homogeneidad de varianzas, según lo confirmado por la prueba de Levene, cuyos resultados satisfactorios se detallan en la Tabla 6. Sin embargo, la prueba de Shapiro indica que los datos no siguen una distribución normal. Tras la elaboración de un histograma para visualizar la distribución de los datos ajustados, se identificó que la distribución se asemeja a la de Poisson. (Anexo D).

Tabla 6. Valores de probabilidad de la Prueba de Levene y Shapiro Wilk de los genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71*.

Gen	Transformación	Test	Estadístico	P-Value
<i>Hsp70_A1</i>	Raíz Cuadrada	Levene	1.13	0.364
		Shapiro	0.836	0.0000032
<i>Hsc_71</i>	Raíz Cuadrada	Levene	1.28	0.259
		Shapiro	0.687	1.89E-09

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Modelo experimental

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se ha consolidado como una técnica confiable y reproducible para el análisis de la expresión génica. En este contexto, la normalización de datos usando genes de referencia es esencial para obtener resultados precisos [69]. Además, los estudios de expresión génica relativa se basan en tres aspectos importantes. En primer lugar, se lleva a cabo el análisis de uno o varios factores experimentales. A continuación, se realiza un ajuste de los genes de referencia. Finalmente, se requiere un tamaño muestral suficientemente extenso para llevar a cabo un análisis estadístico sólido [66-68].

En este experimento, se diseñaron réplicas biológicas, utilizando tres mariposas para cada combinación de sexo, tratamiento y tagma, dando un total de 18 muestras. Se emplearon genes de referencia y un análisis de $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Este enfoque permite comparar la expresión génica relativa entre diferentes condiciones experimentales y obtener una evaluación cuantitativa de las modificaciones. De este modo, se puede adquirir un entendimiento más preciso de los mecanismos de regulación génica en el contexto específico del estudio.

4.2 Primers

4.2.1 Análisis de blast

El diseño de *primers* es un aspecto crucial en la PCR, y se considera, probablemente, el factor más determinante [48,49,65]. Si los *primers* no funcionan adecuadamente, pueden afectar los resultados esperados de un experimento, conduciendo a alteraciones o errores, especialmente cuando se prueban por primera vez [65]. En este estudio, se empleó el análisis BLAST para identificar secuencias de genes de *H. e. lativita* basándose en las anotaciones del genoma de *D. melanogaster*. Dentro de este contexto, los parámetros del BLAST, como el valor E y la puntuación S, se utilizaron para validar estadísticamente las coincidencias obtenidas [70]. Es importante mencionar que un valor E más bajo indica una coincidencia estadísticamente significativa [70]. Todos los resultados de BLAST mostraron

valores $E < 3.80E-23$, sugiriendo que son estadísticamente significativos en los 4 genes utilizados para este estudio (*RPL3*, *S3A*, *Hsc_71* y *Hsp70_A1*).

4.2.2 Análisis de *primers* de *Hsp70* y referencia

Las proteínas de choque térmico de 70 kDa juegan un papel importante en la protección de los organismos contra el estrés ambiental. Estas se dividen en formas inducibles por estrés (*Hsp70*) y las cognadas de choque térmico (*Hsc_71*) [71]. Por otro parte, los genes de referencia *RPL3* y *S3A* se utilizan como control interno en estudios de expresión génica en artrópodos debido a su estabilidad y expresión constante [68]. Su empleo permite la normalización de los datos y una comparación precisa de los niveles de expresión de los genes de interés bajo diferentes condiciones experimentales y diversos tejidos [68].

4.4 Validación de las curvas de calibración

La eficiencia de amplificación (E) se define como la fracción de moléculas diana que son copiadas en un ciclo de PCR [73]. Como lo menciona, Jurado, *et al.* (2017) se aceptan diferentes parámetros para las curvas de calibración como: Una eficiencia de amplificación menor a 78%, mayor a 110% y valores de R^2 de 0,999 para la regresión lineal con un comportamiento de datos no lineal. Por el contrario, se puede suponer un R^2 más bajo para una relación lineal dependiendo el propósito del método. En ese contexto, los valores de eficiencia de amplificación obtenidos para cada gen fueron: 106.38% (*Hsp70_A1*), 78.01% (*Hsc_71*), 103.7% (*RPL3*) y 101.93% (*S3A*), cumpliendo así lo estipulado anteriormente.

4.5 Expresión génica relativa

La expresión génica relativa se utiliza para comparar los niveles de expresión de genes de interés en diferentes condiciones experimentales, y el método de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ comparativo es una técnica comúnmente utilizada para cuantificar y presentar dicha expresión génica relativa. Este enfoque proporciona un protocolo general para estudios cuantitativos de expresión génica basados en la RT-qPCR [74]. El método livak o el método comparativo Ct es el más adecuado en este estudio debido a que se comparó los niveles de expresión de un gen de interés entre diferentes muestras o condiciones experimentales con ayuda de un gen interno.

4.5.1 Expresión génica entre tratamientos de temperatura

Las mariposas fueron sometidas a un periodo de estrés térmico de una hora, lo que significa que los resultados obtenidos reflejan los efectos a corto plazo del estrés térmico en *H. e. lativita*. Existe la posibilidad de que una exposición prolongada de las mariposas a condiciones de estrés térmico podría desencadenar una plasticidad genotípica. Esto sugiere que una vez que la mariposa se ha adaptado a las nuevas condiciones, los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico podrían normalizarse, lo que además podría conferir cierto grado de resistencia frente a este tipo de eventos [11].

El factor de tratamiento con temperatura tuvo un efecto significativo en la EGR de los genes acorde a los resultados de los GLMs, obteniendo valores de $p = 0.025235$ y $1.50e-11$ para los dos genes. *Hsc_71* con valores de p altamente significativos ($p < 0.001$) y *Hsp70_A1* con valores de p con una significancia moderada ($p < 0.05$).

Los valores de EGR de los genes *Hsp70_A1* y *Hsc71* fueron en promedio mayores bajo condiciones de estrés a 40°C, en comparación con el tratamiento frío y grupo de control. Estos resultados son acordes al ensayo de estrés térmico de *Bombyx mori* donde se evidenció un aumento de la expresión génica en el tratamiento calor [71].

Por lo tanto, se puede presumir que los datos obtenidos reflejan con mayor precisión la sobreexpresión debido al calor, dado que los genes de referencia *RPL3* y *S3A* tienen afinidad a la expresión en temperaturas altas. Ruíz (2023) demuestra que la expresión térmica en *H. e. lativita* obtuvo datos en los cuales la expresión de *RPL3* y *S3A* fueron unos de los genes de referencia más estables en condiciones de estrés térmico.

4.5.2 Expresión génica entre sexos

El factor sexo tuvo un efecto significativo ($p < 0.001$) en la expresión relativa de los tres genes, acorde al análisis con GLM, con valores de $p = 3.59e-05$ y $1.20e-05$ para *Hsp70_A1* y *Hsc_71*, respectivamente. Hubo diferencias significativas en la expresión de proteínas de choque térmico entre machos y hembras, siendo las hembras quienes presentaron valores de expresión más altos. La capacidad de conservar el calor entre las mariposas hembras y los machos puede estar relacionada con varias razones fisiológicas y comportamentales.

Entre ellas puede ser dimorfismo sexual, necesidades reproductivas, comportamiento de apareamiento o metabolismo y actividad [75]. Dada esta capacidad de conservar el calor es una de las variables que se pueden ver reflejadas en los datos obtenidos del EGR.

4.5.3 Expresión génica entre tagmas

El factor tagma tuvo un efecto significativo de ($p < 0.001$) en la expresión relativa de los tres genes, de acuerdo con el análisis GLM, con valores de $p = 6.29e-4$ y $8.94e-04$ para *Hsp70_A1* y *Hsc71*, respectivamente. La expresión génica de las proteínas de *Hsp70* demostró tener una expresión mayor en el abdomen y tórax de las hembras en presencia de calor, mientras que los machos tuvieron mayor expresión en abdomen y cabeza en presencia de frío.

Por otro lado, *Hsc_71* muestra un comportamiento de sobreexpresión en cabeza seguido de abdomen y tórax en presencia de calor, mientras que para los machos se encuentra una expresión alta en cabeza y tórax en presencia de frío. Bodlah (2023) indica que la regulación interna causada por el estrés térmico abarca desde las antenas hasta la parte inferior del abdomen en los insectos. En su estudio, la sobreexpresión en *Drosophila melanogaster* se encuentra en la cabeza debido a la presencia de las neuronas termorreceptoras en las células anteriores del cerebro y otras células sensoriales. Estas neuronas desempeñan un papel crucial en la detección del estrés por calor, respondiendo al cambio de temperatura y liberando mensajeros químicos, como aminos biogénicas, péptidos y aminoácidos, a través del flujo de iones en sus membranas. Estos mensajeros químicos actúan como neurotransmisores y neurohormonas, interactuando con otras neuronas para desarrollar respuestas adaptativas al estrés térmico [76]. Es por ello que, la expresión de *Hsc_71* se ve sobre expresado en la parte de la cabeza y disminuye hasta el tórax y luego abdomen.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica de RT-qPCR ha demostrado ser un método robusto y fiable para cuantificar la variabilidad de la expresión genética relativa de genes de la familia *Hsp70* en mariposas *H. e. lativitta*. A través de este estudio, se identificó una marcada sobreexpresión de los genes *Hsp70_A1* y *Hsc_71* en muestras sometidas a condiciones de altas temperaturas, específicamente a 40 °C. No obstante, las muestras tratadas a 4 °C también evidenciaron una ligera sobreexpresión, lo que destaca la sensibilidad de estos genes a cambios térmicos.

En relación con las tagmas, emergió una variabilidad significativa en términos de expresión genética. Particularmente, la cabeza y el abdomen presentaron valores de expresión genética relativa promedios superiores, contrastando con los registros más bajos observados en el tórax. Por otro lado, el factor sexo demostró tener un papel sustancial en esta variabilidad, con las hembras mostrando una expresión genética relativa superior en comparación con los machos para ambos genes.

Uno de los hallazgos clave de este estudio fue la confirmación, a través de modelos lineales generalizados, de que la variabilidad de temperatura es el principal factor influenciador en la sobreexpresión genética de los genes estudiados. Este descubrimiento tiene profundas implicaciones ecológicas, especialmente considerando el papel vital que desempeñan estas proteínas en la respuesta al estrés térmico. Las mariposas, al adaptar su respuesta al estrés térmico y asegurar la integridad de sus proteínas, no solo garantizan su viabilidad, sino también su éxito reproductivo. En un contexto de cambio climático y eventos extremos en aumento, entender y estudiar la función y expresión de genes como *Hsc_71* y *Hsp70_A1* es esencial para predecir y comprender la supervivencia y adaptación de estas especies en el futuro.

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paaijmans KP, Heinig RL, Seliga RA, Blanford JI, Blanford S, Murdock CC, et al. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Glob Chang Biol.* 2013;19: 2373–2380. doi:10.1111/gcb.12240
2. Song H, Kemp DB, Tian L, Chu D, Song H, Dai X. Thresholds of temperature change for mass extinctions. *Nat Commun.* 2021;12: 4694. doi:10.1038/s41467-021-25019-2
3. Wilson, E. (1999). *The diversity of life.* Harvard University Press
4. Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol Ecol.* 2013;22: 925–946. doi:10.1111/mec.12152
5. Chown SL, Nicolson S. *Insect physiological ecology.* Oxford University Press; 2004.
6. Hoffmann AA, Sørensen JG, Loeschcke V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J Therm Biol.* 2003;28: 175–216. doi:10.1016/s0306-4565(02)00057-8
7. Colinet H, Lee SF, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*: Heat shock response to cold stress. *FEBS J.* 2010;277: 174–185. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07470.x
8. Camino, L (2022). Expresión del gen Hsp70 como respuesta al estrés térmico en la especie tropical *Heliconius erato*.
9. Ojeda, A (2023). Expresión génica de hsp40 y hsp90 en respuesta al estrés térmico en *Heliconius erato lativitta* (lepidóptera: nymphalidae)
10. Luo S, Chong Wong S, Xu C, Hanski I, Wang R, Lehtonen R. Phenotypic plasticity in thermal tolerance in the Glanville fritillary butterfly. *J Therm Biol.* 2014;42: 33–39. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.02.018
11. Luo S, Ahola V, Shu C, Xu C, Wang R. Heat shock protein 70 gene family in the Glanville fritillary butterfly and their response to thermal stress. *Gene.* 2015;556: 132–141. doi:10.1016/j.gene.2014.11.043
12. Bunch H. RNA polymerase II pausing and transcriptional regulation of the HSP70 expression. *Eur J Cell Biol.* 2017;96: 739–745. doi:10.1016/j.ejcb.2017.09.003
13. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61: 243–282. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243
14. Azuma M, Ogata T, Yamazoe K, Tanaka Y, Inoue YH. Heat shock cognate 70 genes contribute to *Drosophila* spermatocyte growth progression possibly through the insulin signaling pathway. *Dev Growth Differ.* 2021;63: 231–248. doi:10.1111/dgd.12734
15. Azad P, Zhou D, Russo E, Haddad GG. Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 2009;4: e5371. doi:10.1371/journal.pone.0005371
16. Nazir A, Saxena DK, Kar Chowdhuri D. Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2003;1621: 218–225. doi:10.1016/s0304-4165(03)00060-6
17. Ferguson LC, Maroja L, Jiggins CD. Convergent, modular expression of ebony and tan in the mimetic wing patterns of *Heliconius* butterflies. *Dev Genes Evol.* 2011;221: 297–308. doi:10.1007/s00427-011-0380-6

18. 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: jeb220426. doi:10.1242/jeb.220426
19. Zatssepina OG, Nikitina EA, Shilova VY, Chuvakova LN, Sorokina S, Vorontsova JE, et al. Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones.* 2021;26: 575–594. doi:10.1007/s12192-021-01203-7
20. Chen M, Zhang N, Jiang H, Meng X, Qiang K, Wang J. Transcriptional regulation of heat shock protein 70 genes by class I histone deacetylases in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol.* 2020;29: 221–230. doi:10.1111/imb.12627
21. Karl I, Sørensen JG, Loeschcke V, Fischer K. HSP70 expression in the Copper butterfly *Lycaena tityrus* across altitudes and temperatures. *J Evol Biol.* 2009;22: 172–178. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01630.x
22. Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol.* 2004;Appendix 1: Appendix 1T. doi:10.1002/0471142735.ima01ts58
23. Karl I, Michalowsky C, Sørensen JG, Loeschcke V, Fischer K. Effects of rearing and induction temperature on the temporal dynamics of heat shock protein 70 expression in a butterfly. *Physiol Entomol.* 2012;37: 103–108. doi:10.1111/j.1365-3032.2011.00814.x
24. Higgins JK, MacLean HJ, Buckley LB, Kingsolver JG. Growth, developmental and stress responses of larvae of the clouded sulphur butterfly *Colias eriphyle* to repeated exposure to high, sub-lethal temperatures: Responses of *Colias* larvae to high temperatures. *Physiol Entomol.* 2015;40: 189–195. doi:10.1111/phen.12101
25. Dimri AP, Kumar P, Maharana P. On the global contrasting temperature-precipitation phase mechanisms in the last century. *J Clim Chang.* 2021;7: 9–21. doi:10.3233/jcc210015
26. Hill GM, Kawahara AY, Daniels JC, Bateman CC, Scheffers BR. Climate change effects on animal ecology: butterflies and moths as a case study. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2021;96: 2113–2126. doi:10.1111/brev.12746
27. Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1998;66: 4061–4067. doi:10.1128/IAI.66.9.4061-4067.1998
28. Miao B-G, Peng Y-Q, Yang D-R, Kubota Y, Economo EP, Liu C. Climate and land-use interactively shape butterfly diversity in tropical rainforest and savanna ecosystems of southwestern China. *Insect Sci.* 2021;28: 1109–1120. doi:10.1111/1744-7917.12824
29. Stork NE. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annu Rev Entomol.* 2018;63: 31–45. doi:10.1146/annurev-ento-020117-043348
30. de Jong MA, Saastamoinen M. Environmental and genetic control of cold tolerance in the Glanville fritillary butterfly. *J Evol Biol.* 2018;31: 636–645. doi:10.1111/jeb.13247
31. Krebs RA. A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *Drosophila* species. *Cell Stress Chaperones.* 1999;4: 243–249. doi:10.1379/1466-1268(1999)004<0243:acohea>2.3.co;2
32. Calabria G, Dolgova O, Rego C, Castañeda LE, Rezende EL, Balanyà J, et al. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis: Testing for thermal co-adaptation in *Drosophila*. *J Evol Biol.* 2012;25: 691–700. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02463.x
33. Bowler K, Terblanche JS. Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008;83: 339–355. doi:10.1111/j.1469-185x.2008.00046.x

34. Sala OE, Chapin FS 3rd, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, et al. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*. 2000;287: 1770–1774. doi:10.1126/science.287.5459.1770
35. Kuussaari M, Bommarco R, Heikkinen RK, Helm A, Krauss J, Lindborg R, et al. Extinction debt: a challenge for biodiversity conservation. *Trends Ecol Evol*. 2009;24: 564–571. doi:10.1016/j.tree.2009.04.011
36. Stork NE. How many species are there? *Biodivers Conserv*. 1993;2: 215–232. doi:10.1007/bf00056669
37. Rödder D, Schmitt T, Gros P, Ulrich W, Habel JC. Climate change drives mountain butterflies towards the summits. *Sci Rep*. 2021;11: 14382. doi:10.1038/s41598-021-93826-0
38. Jiggins CD, Lamas G. The ecology and evolution of *Heliconius* butterflies. Oxford University Press; 2016.
39. Arias CF, Giraldo N, McMillan WO, Lamas G, Jiggins CD, Salazar C. A new subspecies in a *Heliconius* butterfly adaptive radiation (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zool J Linn Soc*. 2017;180: 805–818. doi:10.1093/zoolinnean/zlw010
40. Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio 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
41. Challi RJ, Kumar S, Dasmahapatra KK, Jiggins CD, Blaxter M. Lepbase: the Lepidopteran genome database. *bioRxiv*. 2016. doi:10.1101/056994
42. FlyBase. FlyBase gene report: Dmel\TTLL1A. En: Flybase.org [Internet]. [citado el 23 de enero de 2023]. Recuperado: <https://flybase.org/reports/FBgn0030823>
43. FlyBase. FlyBase gene report: Dmel\TTLL4A. En: Flybase.org [Internet]. [citado el 23 de enero de 2023]. Recuperado: <https://flybase.org/reports/FBgn0026147>
44. Attrill H, Falls K, Goodman JL, Millburn GH, Antonazzo G, Rey AJ, et al. FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D786–92. doi:10.1093/nar/gkv1046
45. Geneious. En: Geneious [Internet]. el 31 de enero de 2019 [citado el 23 de enero de 2023]. Recuperado: <https://www.geneious.com/>
46. En: Nih.gov [Internet]. [citado el 23 de enero de 2023]. Recuperado: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
47. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4a ed. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
48. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010;50: S1–5. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005
49. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55: 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
50. Citizen scientist tagging reveals destinations of migrating monarch butterflies, *Danaus plexippus* (L.) from the Pacific Northwest.
51. Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2006;123: 273–280. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.014
52. Sivaganesan M, Haugland RA, Chern EC, Shanks OC. Improved strategies and optimization of calibration models for real-time PCR absolute quantification. *Water Res*. 2010;44: 4726–4735. doi:10.1016/j.watres.2010.07.066

53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
54. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3: 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
55. Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas AVL. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*: HOST-PLANT DEPENDENT WING SHAPE IN *HELICONIUS*. *Biol J Linn Soc Lond*. 2011;102: 765–774. doi:10.1111/j.1095-8312.2010.01610.x
56. Kerpel SM, Moreira GRP. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *J Insect Behav*. 2005;18: 433–452. doi:10.1007/s10905-005-3701-7
57. George B. Catalogue of the hostplants of the neotropical butterflies. 2008.
58. Jjmr M. Manual para el manejo de mariposarios. INBio; 2007.
59. Rodrigues D, Moreira G. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. 2000.
60. Gilbert LE. Pollen feeding and reproductive biology of heliconius butterflies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69: 1403–1407. doi:10.1073/pnas.69.6.1403
61. LepBase - Lepidoptera genome browser: *Heliconius erato lativitta* - Summary - Gene: HEL_010335. En: Lepbase.org [Internet]. [citado el 14 de julio de 2023]. Recuperado: http://ensembl.lepbase.org/Heliconius_erato_lativitta_v1/Gene/Summary?db=core;g=HEL_010335;r=Hel_
62. LepBase - Lepidoptera genome browser: *Heliconius erato lativitta* - Summary - Gene: HEL_012373. En: Lepbase.org [Internet]. [citado el 14 de julio de 2023]. Recuperado: http://ensembl.lepbase.org/Heliconius_erato_lativitta_v1/Gene/Summary?db=core;g=HEL_012373;r=Hel_
63. Primer designing tool. En: Nih.gov [Internet]. [citado el 14 de julio de 2023]. Recuperado: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
64. Ruiz J. Evaluación de genes de referencia para estudios de expresión génica en la mariposa tropical *heliconius erato lativitta* (lepidóptera: nymphalidae). Universidad Regional Amazonica Ikiam.
65. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13: 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
66. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4a ed. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
67. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010;50: 227–230. doi:10.1016/j.ymeth.2009.11.001
68. Lü J, Yang C, Zhang Y, Pan H. Selection of reference genes for the normalization of RT-qPCR data in gene expression studies in insects: A systematic review. *Front Physiol*. 2018;9: 1560. doi:10.3389/fphys.2018.01560
69. Zheng Y-T, Li H-B, Lu M-X, Du Y-Z. Evaluation and validation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *PLoS One*. 2014;9: e111369. doi:10.1371/journal.pone.0111369
70. Frequently Asked Questions — BLASTHelp documentation. En: Nih.gov [Internet]. [citado el 14 de julio de 2023]. Recuperado: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ

71. Fang S-M, Zhang Q, Zhang Y-L, Zhang G-Z, Zhang Z, Yu Q-Y. Heat shock protein 70 family in response to multiple abiotic stresses in the silkworm. *Insects*. 2021;12. doi:10.3390/insects12100928
72. Jurado JM, Alcázar A, Muñoz-Valencia R, Ceballos-Magaña SG, Raposo F. Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach. *Talanta*. 2017;172: 221–229. doi:10.1016/j.talanta.2017.05.049
73. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3: 9–16. doi:10.1016/j.bdq.2015.01.005
74. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3: 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
75. Leith NT, Fowler-Finn KD, Moore MP. Evolutionary interactions between thermal ecology and sexual selection. *Ecol Lett*. 2022;25: 1919–1936. doi:10.1111/ele.14072
76. Bodlah MA, Iqbal J, Ashiq A, Bodlah I, Jiang S, Mudassir MA, et al., editores. Restricción del comportamiento de insectos y estrategias de adaptación bajo estrés por calor: una revisión inclusiva. *Revista de la Sociedad Saudita de Ciencias Agrícola.*; 2023.

CAPITULO VII: ANEXOS

Cuantificación de concentraciones de ARN

Anexo A. Tabla de concentraciones de ARN total extraído

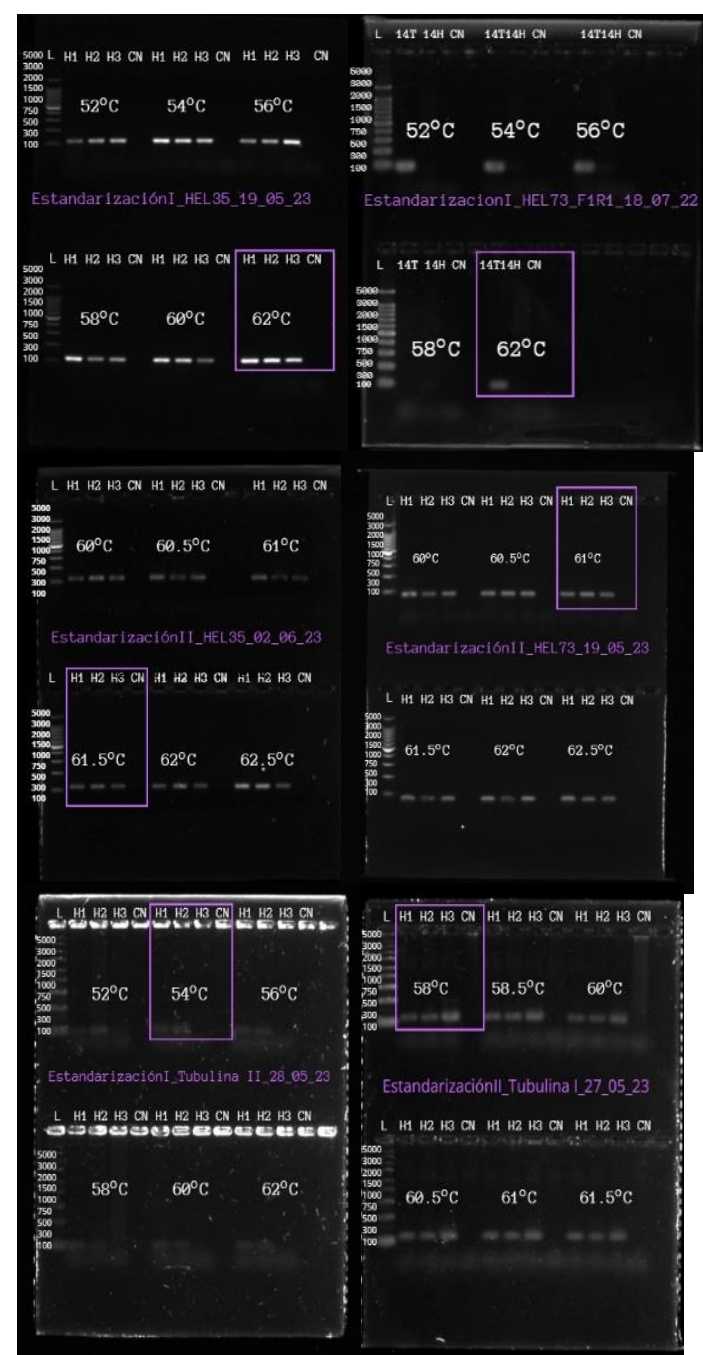
Muestra	ID individuo	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con(ng/ul)	A260/280	A260/230
1	01.H	H	Frio	Hembras	273.7	2.04	1.8
2	01.T	T	Frio	Hembras	338.7	2.14	1.78
3	01.A	A	Frio	Hembras	256.9	2.04	1.82
4	02.H	H	Frio	Hembras	323.1	2.03	1.76
5	02.T	T	Frio	Hembras	506.5	2.21	1.77
6	02.A	A	Frio	Hembras	209	1.22	1.45
7	03.H	H	Frio	Hembras	534.9	2.01	1.66
8	03.T	T	Frio	Hembras	101.1	2.12	1.83
9	03.A	A	Frio	Hembras	167.8	1.78	1.82
10	04.H	H	Control	Hembras	37.3	1.93	1.17
11	04.T	T	Control	Hembras	161.9	2.17	2.02
12	04.A	A	Control	Hembras	313	1.99	1.64
13	05.H	H	Control	Hembras	65.7	1.99	1.87
14	05.T	T	Control	Hembras	85.5	2.11	1.75
15	05.A	A	Control	Hembras	419.5	2.15	1.81
16	06.H	H	Control	Hembras	81.7	1.95	0.87
17	06.T	T	Control	Hembras	22.1	1.92	1.88
18	06.A	A	Control	Hembras	146.6	1.92	1.87
19	07.H	H	Control	Hembras	200.5	2.02	1.48
20	07.T	T	Control	Hembras	331	2.2	2.15
21	08.H	H	Frio	Macho	252.8	1.92	2.1
22	08.T	T	Frio	Macho	190.6	2.19	1.98
23	08.A	A	Frio	Macho	93.3	2.08	1.55
24	09.H	H	Frio	Macho	412.5	2.09	1.76
25	09.T	T	Frio	Macho	325.6	2.21	2.24
26	09.A	A	Frio	Macho	366.2	2.11	2.17
27	10.H	H	Frio	Macho	84.9	1.97	1.72
28	10.T	T	Frio	Macho	85.6	2.06	1.87
29	10.A	A	Frio	Macho	122.6	1.98	1.78
30	11.T	T	Control	Hembras	330.4	2.23	2.08
31	11.A	A	Control	Hembras	360.4	2.16	2.23
32	12.H	H	Control	Macho	306.1	2.08	1.99
33	12.T	T	Control	Macho	689.1	2.21	1.91
34	12.A	A	Control	Macho	142.6	1.59	1.61
35	13.H	H	Control	Macho	518.9	2.11	1.88
36	13.T	T	Control	Macho	476.9	2.25	1.97
37	13.A	A	Control	Macho	251	2.13	1.65
38	14.H	H	Control	Macho	510.5	2.03	2.08
39	14.T	T	Control	Macho	335.1	2.24	1.85
40	14.A	A	Control	Macho	743.4	2.19	2.01
41	15.H	H	Calor	Macho	36.3	2.23	1.81
42	15.T	T	Calor	Macho	60.1	2.25	1.59
43	15.A	A	Calor	Macho	108.8	2.13	1.95
44	16.H	H	Calor	Macho	121.7	2.18	1.91
45	16.T	T	Calor	Macho	83.5	2.2	1.8
46	16.A	A	Calor	Macho	109	2.21	1.91

Muestra	ID individuo	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con(ng/ul)	A260/280	A260/230
47	17.H	H	Calor	Hembras	437.4	2.13	1.89
48	17.T	T	Calor	Hembras	240.7	2.23	2.06
49	17.A	A	Calor	Hembras	235.2	2.12	2.21
50	18.H	H	Calor	Hembras	263.2	2.09	1.72
51	18.T	T	Calor	Hembras	254.8	2.21	1.88
52	18.A	A	Calor	Hembras	506.1	2.05	2.22
53	19.H	H	Calor	Hembras	104	2.2	1.19
54	19.T	T	Calor	Hembras	67.6	2.18	1.88
55	19.A	A	Calor	Hembras	371.9	2.19	1.69
56	20.H	H	Calor	Hembras	699.8	2.1	1.78
57	20.T	T	Calor	Hembras	573.9	2.03	2.14
58	21.H	H	Calor	Macho	132.9	2.15	1.85
59	21.T	T	Calor	Macho	64	2.18	1.84
60	21.A	A	Calor	Macho	256	2.19	1.97
61	22.H	H	Calor	Hembras	125	2.18	1.43
62	22.T	T	Calor	Hembras	102.9	2.24	1.27
63	22.A	A	Calor	Hembras	212.4	2.14	1.63
64	23.H	H	Calor	Macho	143.1	2.19	2.28
65	23.T	T	Calor	Macho	145.4	2.23	1.87
66	23.A	A	Calor	Macho	120.5	2.18	1.26
67	24.H	H	Calor	Macho	472	2.13	1.77
68	24.T	T	Calor	Macho	301.6	2.22	2.01
69	24.A	A	Calor	Macho	1003.8	2.15	2.26
70	25.H	H	Calor	Macho	253.6	2.15	1.96
71	25.T	T	Calor	Macho	517.4	2.24	1.83
72	25.A	A	Calor	Macho	678.9	2.16	1.73
73	26.H	H	Calor	Macho	456	2.13	1.99
74	26.T	T	Calor	Macho	454.1	2.23	2.06
75	26.A	A	Calor	Macho	417.8	2.15	2.16
76	27.H	H	Calor	Hembras	683.2	2.06	1.72
77	27.T	T	Calor	Hembras	532.4	2.2	1.71
78	27.A	A	Calor	Hembras	456.6	2.18	1.78
79	28.H	H	Calor	Hembras	213.4	2.08	1.7
80	28.T	T	Calor	Hembras	700.3	2.24	2.13
81	28.A	A	Calor	Hembras	269.5	2.02	1.9
82	29.H	H	Calor	Macho	459.1	2.09	1.9
83	29.T	T	Calor	Macho	519.1	2.2	2.38
84	29.A	A	Calor	Macho	447.3	1.9	2.13
85	30.H	H	Calor	Hembras	283.5	2.07	1.58
86	30.T	T	Calor	Hembras	557.4	2.22	2.49
87	30.A	A	Calor	Hembras	284.4	2.09	2.25
88	31.H	H	Calor	Hembras	521.9	2.08	1.67
89	31.T	T	Calor	Hembras	762.5	2.21	2.11
90	31.A	A	Calor	Hembras	247.9	2.12	2.1
91	32.H	H	Calor	Macho	708.8	2.07	1.66
92	32.T	T	Calor	Macho	802.7	2.22	2.09
93	32.A	A	Calor	Macho	397.5	2.15	2.27
Promedio					324.24	2.11	1.86
SD					212.05	0.14	0.27

Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

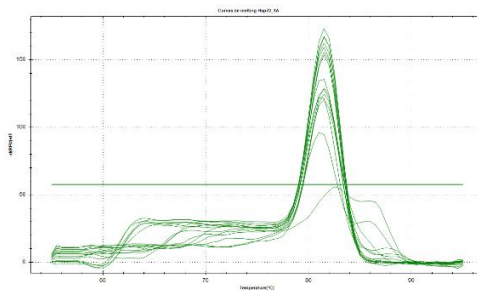
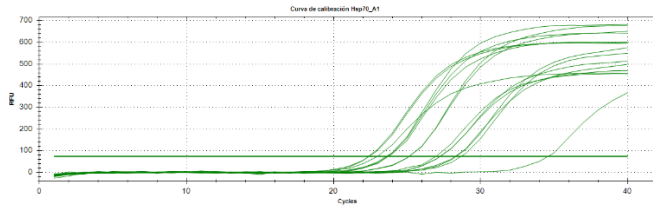
Estandarización de temperaturas de annealing de primers

Anexo B. Estandarización de perfil térmico, primer Hsc_71, Hsp70_A1. Electroforesis con gel de agarosa de 2%. ADNc de *H. e. lativitta*. Tamaño de amplicón esperado: 112 pares de bases.



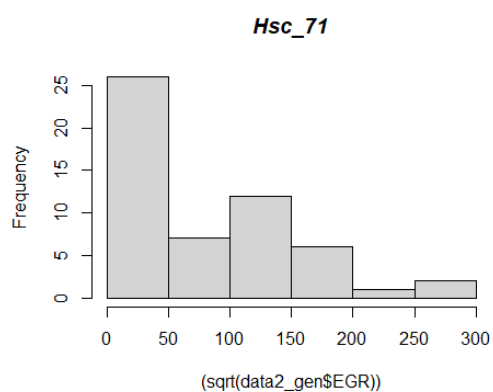
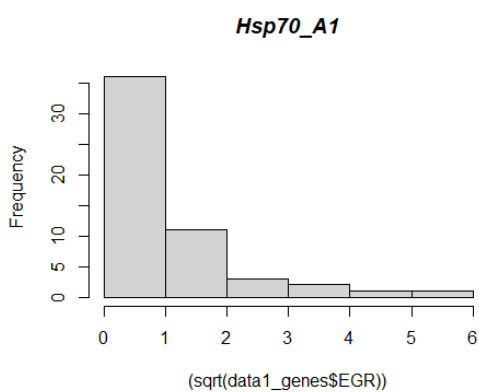
Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

Anexo C. Curvas de calibración y de melting de los *primers*.



Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.

Anexo D. Histograma de la distribución de los datos ajustados de *Hsp70_A1* y *Hsc_71*.



Realizado por: Galárraga, Hillary, 2023.