



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

**EXPRESIÓN GÉNICA DE HSP40 Y HSP90 EN RESPUESTA AL
ESTRÉS TÉRMICO EN *HELICONIUS ERATO LATIVITTA*
(LEPIDÓPTERA: NYMPHALIDAE)**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ÁNGEL ANDRÉS OJEDA MONTESDEOCA

TUTOR: PhD. CAROLINE NICOLE BACQUET PÉREZ

Napo - Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Ángel Andrés Ojeda Montesdeoca con documento de identidad N°1500870108, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título 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, 26 de abril de 2023



Ángel Andrés Ojeda Montesdeoca

C.I: 1500870108

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, ÁNGEL ANDRÉS OJEDA MONTESDEOCA, con documento de identidad N° 1500870108, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en respuesta al estrés térmico en *Heliconius erato lativitta* (Lepidóptera: Nymphalidae)" de conformidad con el Art. 144 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Tena, 26 de abril de 2023



Ángel Andrés Ojeda Montesdeoca

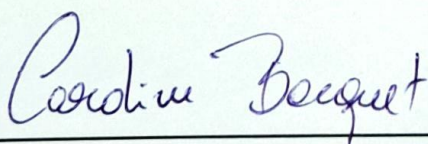
C.I: 1500870108

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: "Expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en respuesta al estrés térmico en *Heliconius erato lativitta* (Lepidoptera: Nymphalidae)", en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Ángel Andrés Ojeda Montesdeoca, 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, 26 de abril de 2023



Caroline Nicole Bacquet Pérez

C.I: 1756516041

DEDICATORIA

*A Ángel e Inés, mis amados padres,
Por apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por haberme permitido ser partícipe de su programa de estudios, aquí he tenido la oportunidad de compartir con profesores y compañeros excepcionales, han sembrado en mí, la ambición por el conocimiento y la investigación. Me llevo las mejores experiencias.

Quiero extender mis infinitos agradecimientos a la Dra. Caroline Bacquet, por su ilustre labor de acompañamiento en este proyecto de tesis. Lin, eres una tutora, docente, amiga y mentora extraordinaria, gracias por depositar tu confianza en mí, por ser ese aliento en los momentos difíciles y por ayudarme a crecer académica y profesionalmente, siempre de la mano de fortalecer el valor humano de ayuda, sin esperar nada a cambio. Me gustaría en un futuro inspirar y transmitir ese amor por la ciencia que desbordas. Tus enseñanzas y generosidad prevalecerán en mi corazón.

En el LBMB de Ikiam, tuve el placer de ser guiado por un equipo de profesionales de primera. A Nina Espinosa de los Monteros-Silva, quien estuvo encargada de llevar de la mano este proceso. Nina, gracias por tu paciencia y dedicación, has contagiado en mí, esa pasión que tienes por la biotecnología. Asimismo, a Giovanna Morán y Kathy Apunte, gracias por sus enseñanzas invaluable y supervisión en el laboratorio.

A mis amigos Leo, Pablito, Sam, y Anghe por haberse convertido en la familia que tenemos la posibilidad de elegir, han sido fundamentales en cada pequeño reto en este proceso de formación, gracias por su incondicionalidad. También quiero agradecer a mis colegas tesisistas de Lin: a Leny Tacuri, y a Andrei Flores de Valgas.

Al grupo de investigación de mariposas *Heliconius*, de Ikiam: a Patricio Salazar, por darme la oportunidad de trabajar en su investigación, a Michelle Guachamín, por su enseñanza en la recolección y crianza, a Gladis Rosero, por sus conocimientos de cuidado de mariposas, a Kimberly Gaviláñez, por brindarme bases de reconocimiento y preservación de mariposas, también a Shane Wright y a Lucie, quienes siempre estuvieron prestos a ayudar en todo lo que estuvo a su alcance.

Pero sobre todo a mis padres, quienes han sido mi modelo a seguir e inspiración desde mis primeros pasos en este mundo, toda una vida no será suficiente para expresarles mi gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y

RESPONSABILIDAD.....ii

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONALiii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR ..iv

DEDICATORIAv

AGRADECIMIENTOS.....vi

ÍNDICE DE TABLAS.....x

ÍNDICE DE FIGURASxi

ÍNDICE DE ANEXOSxii

RESUMENxiii

ABSTRACTxiv

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE
INVESTIGACIÓN1

1.1. Antecedentes1

1.1.1. *Calentamiento global y su afectación en ecosistemas tropicales*.....1

1.1.2. *Adaptación climática de insectos*1

1.1.3. *Modelo Heliconius*.....2

1.1.3.1. *Especie Heliconius erato*.....2

1.1.4. *Mecanismos de adaptación a la temperatura del género Heliconius*3

1.1.5. *Proteínas de resistencia al choque térmico*.....4

1.1.6. *Proteínas Hsp90*5

1.1.7. *Proteínas Hsp40*6

1.2. Planteamiento del Problema6

1.3. Justificación de la investigación7

1.4. Preguntas de investigación8

1.5. Hipótesis8

1.6.	Objetivos de la investigación.....	8
1.6.1.	<i>General</i>	8
1.6.2.	<i>Específicos</i>	9
2.	CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	10
2.1.	Área de estudio	10
2.2.	Colecta de muestras de <i>H. e. lativitta</i>	11
2.2.1.	<i>Recolección de especímenes</i>	11
2.2.2.	<i>Cuidado de especímenes salvajes</i>	11
2.2.3.	<i>Apareamiento y desove</i>	12
2.2.4.	<i>Recolección de huevos e incubación</i>	12
2.3.	Pruebas de estrés térmico	13
2.4.	Síntesis de una librería de ARN total	14
2.5.	Síntesis de una librería de ADN complementario (ADNc).....	15
2.6.	Selección, diseño y validación de primers de genes candidatos.	16
2.6.1.	<i>Búsqueda de genes candidatos en bases de datos</i>	16
2.6.2.	<i>Diseño de primers de PCR</i>	16
2.6.3.	<i>Estandarización de perfiles térmicos de primers</i>	16
2.7.	Cuantificación de la expresión génica	18
2.7.1.	<i>Extracción de ADN genómico de H. e. lativitta</i>	18
2.7.2.	<i>Validación de primers para PCR en tiempo real</i>	19
2.7.2.1.	<i>Curvas de calibración de primers</i>	19
2.7.2.2.	<i>Cálculo de eficiencias de amplificación de primers</i>	20
2.7.2.3.	<i>Curvas de melting</i>	20
2.7.3.	<i>PCR en tiempo real de genes diana y endógenos</i>	20
2.8.	Análisis de datos de PCR en tiempo real	21
2.8.1.	<i>Cuantificación de expresión génica absoluta</i>	21
2.8.2.	<i>Análisis de varianza del gen endógeno</i>	22
2.8.3.	<i>Cuantificación de expresión génica relativa</i>	22
2.8.4.	<i>Análisis de varianza de la expresión génica relativa</i>	23

3.	CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	24
3.1.	Genes seleccionados	24
3.2.	Primers de genes de interés	24
3.3.	Primers de genes de referencia.....	25
3.4.	Validación de GAPDH como gen de referencia	27
3.5.	Expresión génica absoluta.....	29
3.6.	Expresión génica relativa.....	30
3.7.	Variación en la expresión relativa de DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90	32
4.	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	34
4.1.	Estudios de expresión génica	34
4.1.1.	<i>Diseño experimental</i>	34
4.1.2.	<i>Extracción de la muestra</i>	34
4.1.3.	<i>Diseño del ensayo</i>	35
4.1.4.	<i>Validación del gen de referencia</i>	36
4.2.	Expresión génica relativa.....	37
4.2.1.	<i>Expresión génica entre tratamientos de temperatura</i>	38
4.2.2.	<i>Expresión génica entre sexos</i>	39
4.2.3.	<i>Expresión génica entre tagmas</i>	39
4.3.	Expresión de genes Hsp40 y Hsp90 en otros estudios	40
4.4.	Hsps y evolución	41
4.5.	Hsp90 en la medicina	42
4.6.	Investigaciones futuras.....	43
	CONCLUSIONES	44
	RECOMENDACIONES	46
	REFERENCIAS	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1.	Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR.....	17
Tabla No. 2.	Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR en tiempo real	21
Tabla No. 3.	Resultado de BLAST (Lepbase) de genes candidatos en <i>H. e. lativitta</i>	24
Tabla No. 4.	Lista de primers de genes de interés sintetizados y sometidos a estandarización de perfil térmico.	25
Tabla No. 5.	Lista de primers de genes de referencia sintetizados y estandarizado el perfil térmico	26
Tabla No. 6.	Resultados del análisis de varianza para el gen de referencia GAPDH.....	29
Tabla No. 7.	Significancia estadística del efecto de los factores en la expresión relativa de los genes DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90.....	33
Tabla No. 8.	Valores de probabilidad de la Prueba Levene y Shapiro Wilk de los genes DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1.	Mapa del área de estudio.....	10
Figura No. 2.	Sistema de crianza de <i>H. e. lativitta</i>	13
Figura No. 3.	Tratamientos de temperatura con individuos <i>H. e. lativitta</i>	14
Figura No. 4.	Curvas de calibración de los primers A. GAPDH, B. DnaJ-1 C. DnaJ-5 D. Hsp90	27
Figura No. 5.	Valor C _t del gen de referencia GAPDH con los factores Tagma, Sexo y Tratamiento.	28
Figura No. 6.	Expresión génica relativa (ERG) de los genes de interés. A y B: DnaJ-1: C y D: DnaJ-5; E y F: Hsp90.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Tabla de concentraciones de ARN total extraído
- Anexo B.** Ejemplo de estandarización de perfil térmico, primer **Hsp90 F1-R1**.
- Anexo C.** Curvas de PCR en tiempo real para validación de los primers: **1.** GAPDH, **2.** DnaJ-1, **3.** DnaJ-5 y **4.** Hsp90.
- Anexo D.** Gráfico Q-Q de normalidad de para los valores C_t del gen de referencia **GAPDH**.
- Anexo E.** Expresión génica relativa (EGA) del gen de referencia **GAPDH** con los factores tagma, sexo y tratamiento.
- Anexo F.** Gráfico Q-Q de normalidad de para el EGR de los genes de interés **DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90**.

RESUMEN

El incremento de la frecuencia e intensidad de eventos extremos de temperatura representa un reto para la adaptación de las especies. Los organismos ectotermos, como los insectos, dependen de fuentes externas para la regulación de su temperatura corporal. Dentro del orden Lepidóptera, *Heliconius erato lativitta* es una mariposa que habita los bosques del Neotrópico y ha sido estudiada por varios siglos, llegándose a evidenciar que el estrés térmico tiene una repercusión en su ciclo de vida. La inducción en la producción de proteínas de choque térmico (Hsp) mitiga la desnaturalización de proteínas y mantiene la homeostasis celular, sin embargo, los mecanismos epigenéticos en esta especie siguen sin resolverse. En este estudio se cuantificó la expresión génica de *Heat shock protein* 40 kDa (Hsp40) y *Heat shock protein* 90kDa (Hsp90) de *H. e. lativitta* usando RT-qPCR y el método de doble delta de Livak ($\Delta\Delta C_t$), en condiciones de estrés térmico, en tejidos de cabeza, tórax y abdomen, de individuos machos y hembras. En base a un alineamiento local se identificaron 2 genes de la familia Hsp40, los homólogos DnaJ-1 y DnaJ-5, y 1 gen de la familia Hsp90. Se mostró que DnaJ-1 y DnaJ-5 se infraexpresan a 40 °C y se sobreexpresan en condiciones de shock a 5 °C, por otro lado, Hsp90, presentó sobreexpresión a 40 °C. Los tejidos del abdomen y de la cabeza mostraron la mayor sobreexpresión de todas las tagmas, mientras que, el tórax, presentó infraexpresión en todos los tratamientos. El uso de modelos lineales generalizados mostró que la variabilidad génica fue causada en mayor medida por los tratamientos de temperatura, seguidos por los diferentes tejidos, no se encontraron diferencias significativas entre sexos. Este estudio provee información para comprender uno de los mecanismos epigenéticos de adaptación que tienen las mariposas tropicales ante el cambio climático.

Palabras claves: Hsp40, DnaJ-1, DnaJ-5, Hsp90, Proteínas de choque térmico, expresión génica, estrés térmico.

ABSTRACT

The increasing frequency and intensity of extreme temperature events represents a challenge for species adaptation. Ectothermic organisms, such as insects, depend on external sources for the regulation of their body temperature. Within the order Lepidoptera, *Heliconius erato lativitta* is a butterfly that inhabits the forests of the Neotropics and has been studied for several centuries, showing that heat stress has an impact on its life cycle. Induction of heat shock protein (Hsp) mitigates protein denaturation and maintains cellular homeostasis; however, epigenetic mechanisms in this species remain unresolved. In this study, gene expression of Heat shock protein 40 kDa (Hsp40) and Heat shock protein 90kDa (Hsp90) of *H. e. lativitta* was quantified using RT-qPCR and Livak's $\Delta\Delta CT$ method under heat stress conditions in head, thorax, and abdominal tissues from male and female individuals. Based on local alignment, 2 genes of the Hsp40 family, the homologs DnaJ-1 and DnaJ-5, and 1 gene of the Hsp90 family were identified. It was shown that DnaJ-1 and DnaJ-5 were underexpressed at 40 °C and overexpressed in shock conditions at 5 °C, on the other hand, Hsp90, presented overexpression at 40 °C. Abdomen and head tissues showed the highest overexpression of all tagmas, whereas, the thorax, showed underexpression in all treatments. The use of generalized linear models showed that gene variability was caused to a greater extent by the temperature treatments, followed by the different tissues, with no significant differences between sexes. This study provides information to understand one of the epigenetic mechanisms of adaptation of tropical butterflies to climate change.

Key words: Hsp40, DnaJ-1, DnaJ-5, Hsp90, Heat shock proteins, gene expression, heat stress.

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Calentamiento global y su afectación en ecosistemas tropicales*

El cambio climático y la actividad humana están amenazando a los ecosistemas tropicales megadiversos, reduciendo su extensión y fragmentándolos, lo que pone en riesgo la biodiversidad de estas regiones [1]. Las concentraciones de dióxido de carbono (CO₂) que han ido en aumento desde el siglo XIX están asociadas a cambios, tanto en la duración como en la temperatura media, de las estaciones húmedas y secas [2]. En las zonas tropicales de América Latina y el Caribe se ha registrado un aumento de temperatura de 0.5 °C a 3 °C entre los años de 1901 y 2012 [1,3] y se ha evidenciado el aumento en la frecuencia de sequías extremas en la Amazonía [2].

Estos cambios de temperatura pueden tener serios efectos en la adaptación y plasticidad de las especies tropicales que se caracterizan por tener poca capacidad de dispersión, especialización y baja tolerancia a los cambios ecológicos [4]. En general, la biodiversidad de estas zonas es especialmente susceptible a los cambios climáticos debido a que evolucionó en áreas con poca variación temporal, por lo que, la flora y fauna perteneciente al trópico tiene rangos de tolerancia térmica estrechos [4,5]. Esto, puede afectar directamente la viabilidad de las especies, dado que, una variación entre las complejas relaciones entre organismos y su entorno es suficiente para desencadenar una serie de alteraciones que pueden amenazar la biodiversidad [6,7]. Es importante tener en cuenta que la disminución de la diversidad biológica afecta directamente a la calidad del medio ambiente y la disponibilidad de recursos [8].

1.1.2. *Adaptación climática de insectos*

La temperatura se considera un factor de gran importancia, ya que los entornos térmicos variables son cada vez más comunes y plantean desafíos para la supervivencia, reproducción y crecimiento de animales e insectos [7,9]. Los insectos se encuentran con un mayor desafío con respecto a la adaptación a la temperatura debido a que pertenecen al grupo de seres vivos denominados ectotermos, es decir, no presentan un sistema de regulación de temperatura propia [7]. En consecuencia, la temperatura influye de manera directa en el desarrollo, distribución geográfica y abundancia de las especies [7,10,11]. Los

insectos muchas veces dependen de condiciones de temperatura específicas para llevar a cabo procesos determinantes dentro de sus ciclos de vida como: el cortejo, apareamiento, desove, metamorfosis. Inclusive el desarrollo de plantas hospederas podrían verse afectadas, por lo que, la capacidad de resistir al aumento de temperatura es de vital importancia para su supervivencia [12,13].

El orden Lepidóptera es un diversificado taxón constituido por mariposas y polillas, caracterizados por su amplia distribución en casi todos los tipos de ecosistemas [14,15]. El orden Lepidóptera cuenta con un aproximado de 180,000 especies descritas dentro de 126 familias y 46 superfamilias, representando alrededor del 10% de la totalidad de especies de organismos vivos [16–18]. Este orden comprende organismos que en su desarrollo pasan por un proceso de metamorfosis completa [15] y se ha comprobado una relación directa entre procesos como: la tasa de crecimiento, edad de inicio en el vuelo y eclosión de los huevos con las condiciones de temperatura [19–21].

1.1.3. Modelo *Heliconius*

El orden Lepidóptera engloba varios géneros, dentro de estos está *Heliconius*, una de las familias de mariposas más estudiadas, siendo el foco de investigaciones por cientos de años [22,23]. *Heliconius* pertenecen a la familia *Nymphalidae* e incluye 40 especies y más de 400 subespecies a lo largo del Neotrópico. Este grupo ha sido ampliamente usado como modelo para comprender los mecanismos detrás de procesos de especiación y adaptación [24–27]. Las mariposas *Heliconius* de la región neotropical son un ejemplo de mimetismo mülleriano, sus patrones de color marcados y llamativos advierten a sus depredadores de su sabor desagradable, además juegan un papel importante en los procesos de especiación [28–30]. Las especies de este género son ideales para ser usadas como modelos biológicos, debido principalmente a: i) su relativa abundancia en el campo y en colecciones naturales, ii) su capacidad de crecer o ser criados en insectarios, iii) su genoma moderadamente pequeño, iv) su relación con un sistema de mimetismo complejo [31–34] y v) presentan un ciclo de vida corto [22,35].

1.1.3.1. Especie *Heliconius erato*

H. erato, también conocida como mariposa carmesí de ala larga, es una especie perteneciente al género *Heliconius*, comúnmente encontrada a lo largo del Neotrópico, donde se ha adaptado a condiciones altitudinales que van desde el nivel del mar hasta los 1,600 m s.n.m. [36], habitando tanto bosques como zonas de transición [37]. Para

completar su ciclo de vida, *H. erato* requiere de plantas hospederas del género *Passiflora* sp., donde las hembras depositan sus huevos, y tras la eclosión, las larvas se alimentan de dicha planta [38–41]. La dieta de las larvas de *H. erato* les facilita absorber glucósidos cianogénicos, compuesto que es liberado como mecanismo de defensa en caso de que exista un daño tisular [36]. Esta especie de mariposas advierten a sus depredadores de su mal sabor usando su patrón de colores vívidos. Los patrones de color que posee *H. erato* se comparten con otras especies como *Heliconius melpomene*, constituyendo la principal característica del mimetismo mülleriano [33,42,43]. Los patrones de color varían en dependencia de la subespecie [44–46].

Han sido descritas alrededor de 20 subespecies, donde destacan *H. erato: phyllis*, *etylus*, *notabilis f.*, *notabilis ff.*, *mestiza* y *lativitta*, siendo esta última comúnmente encontrada en los bosques húmedos de América del Sur y Central [46–48]. *H. erato lativitta* es el organismo objetivo del presente estudio, considerando que no ha sido descrita en la lista roja de *The International Union for Conservation of Nature* (IUCN) y que su estado de conservación se ha catalogado dentro la clasificación de menor preocupación (LC, del inglés *Less Concern*) [49,50]. Pese a que *H. e. lativitta* es considerada un modelo biológico objeto de estudios genéticos y evolutivos, se conoce poco acerca de sus mecanismos de tolerancia al estrés térmico [51].

1.1.4. Mecanismos de adaptación a la temperatura del género *Heliconius*

Los organismos deben emplear mecanismos efectivos para asegurar su supervivencia en condiciones de estrés térmico [9]. Se prevé que las mariposas del género *Heliconius*, como insectos ectotermos han respondido a los cambios de temperatura con mecanismos para ajustar características fenotípicas a diferentes condiciones ambientales, incluidos mecanismos fisiológicos (i, ii, iii), conductuales (iv) y genéticos-moleculares (v), que se han visto ya en otros géneros [9]. Algunos de los mecanismos que se han desarrollado en función de la adaptación a la temperatura son: i) patrones de color: el tipo de pigmentos que presenten las alas puede influir en cambios del índice de refracción de la luz del sol [52–54], ii) formas y diseños de alas: estas características pueden presentarse de diferente manera dependiendo del área y forma en la que las alas se exponen a la radiación [53–56], iii) diferencia en el volumen de vellosidades en el cuerpo de la mariposa: a menor volumen de vellosidades se ve favorecido el intercambio de calor [57], iv) comportamientos específicos: como el volar con aleteos delicados en zonas sin exposición directa al sol; por otro lado, en zonas soleadas, descansar con las alas cerradas variando el ángulo de alineación con la fuente de radiación resultando en una área de incidencia lumínica mínima

[51,53,58–60], v) expresión genética de proteínas de resistencia a choque térmico, ayudando así a la homeostasis celular tras el estrés producido por el incremento de la temperatura [61,62].

1.1.5. Proteínas de resistencia al choque término

La resiliencia y la adaptabilidad pueden mejorarse mediante la diversidad genética, que aprovecha la capacidad de las especies para adaptarse a través de la plasticidad, la selección o el flujo de genes [63]. Este es el caso de la expresión de proteínas de choque térmico (Hsp) que se da bajo condiciones de estrés al cambio de temperatura [64]. Las Hsps son chaperonas moleculares, es decir, representan grandes agregados macromoleculares [65], que se regulan en función del calor o el frío, evitando la desnaturalización de otras proteínas que no pueden permanecer activas bajo ciertas condiciones de temperatura [11,64]. De esta manera, los niveles de Hsp que sean encontrados en un organismo pueden ser usados como posibles indicadores útiles de estrés natural y condiciones anormales a las que se encuentran en un organismo [64].

En los insectos, como Lepidóptera, la expresión de Hsp dada ante el estrés protege al sistema nervioso de los aumentos de temperatura [11]. Sin embargo, una de las complejidades de su estudio es que, la expresión de las Hsp puede variar dentro de una misma especie, cambiando, en función de características como la edad y el sexo [66,67]. Las Hsp, identificadas a partir de varios organismos, cumplen un papel fundamental en la homeostasis celular, ya que funcionan como el chaperón que está encargado de percibir el medio ambiente y tener una respuesta potencial en la evolución del organismo [68]. Las Hsps se han conservado a lo largo de la evolución, estando presentes en la mayoría de organismos vivos y son importantes para la traducción, plegamiento, despliegue, translocación y degradación de proteínas, principalmente al estimular la actividad ATPasa [69,70].

Según el peso molecular, las Hsps se pueden clasificar en varias familias, incluidas Hsp90, Hsp80, Hsp70, Hsp60, Hsp40 (las llamadas Hsps grandes) y Hsp8, Hsp27, HspB2 llamadas Hsps pequeñas (sHsps) [71,72]. Se han registrado con anterioridad investigaciones sobre proteínas Hsp, en Lepidóptera, para las especies: *Bombyx mori*, Hsp19.9, Hsp20.1, Hsp-20.4, Hsp-20.8, Hsp-21.4, Hsp-23.7, Hsp70; *Grapholita molesta*, Hsp70, Hsp90; *Lycaena tityrus*, Hsp70; *Manduca sexta*, Hsp22, Hsp23, Hsp25, Hsp27, Hsp71, Hsp73, Hsp84; *Spodoptera exigua*, Hsp70, Hsp74, Hsp83, Hsp90; *Spodoptera frugiperda*, Hsp90; y *Chilo suppressalis*, Hsp19.8, Hsp21.7 [11].

De las familias Hsp clasificadas por diferentes pesos moleculares, Hsp70 y Hsp90 son las más estudiadas. Hsp40 es uno de los más importantes cofactores en el funcionamiento de Hsp70, por lo que constituye importancia similar a Hsp70 en cuanto a su estado de estudio. De estas familias, solo Hsp70 tiene investigaciones emergentes de genes inducibles de uno y varios exones en *H. erato* [61,62]. Tanto Hsp40, como Hsp90 son importantes para la respuesta celular al estrés térmico y son actores claves en el mantenimiento de la homeostasis celular [69,73].

1.1.6. Proteínas Hsp90

La familia de proteínas Hsp90, también llamada HtpG por su homólogo en bacterias, son proteínas de choque térmico de 90 kDa de peso molecular y son clasificadas como chaperonas moleculares de alta abundancia en el citosol que tienen como función principal el ser un regulador homeostático en la célula en situaciones de estrés térmico [73]. Juega un papel esencial en varios procesos biológicos como el control del ciclo celular, la supervivencia celular y las vías de señalización de hormonas, entre otros [73]. Hsp90 es una proteína fundamental en el correcto proceso de maduración y activación de proteínas celulares y complejos proteicos [74]. De manera secundaria es partícipe de etapas tardías de plegamiento de proteínas, mantenimiento estructural, y la transducción de señales [73,75].

Hsp90 ha sido estudiada en organismos del orden Lepidóptera destacando; *Bombyx mori* y *S. frugiperda*, donde se ha reportado que la expresión de esta proteína está controlada por un solo gen, contrastando con lo evidenciado en vertebrados [76]. Así mismo, en *Cydia pomonella*, se evidenció que Hsp90 es expresada por un gen del mismo nombre y es inducible ante condiciones de temperatura elevada y la expresión génica relativa del ARNm tiene una correlación positiva en los tratamientos expuestos a temperaturas superiores a 32 °C [77]. Por otra parte, en un análisis de la expresión génica relativa, usando larvas de *S. exigua* se demostró un nivel de expresión génica mayor en los tratamientos con calor entre 43 a 45 °C con respecto al tratamiento sometido a condiciones de temperatura ambiental [78]. Todos estos estudios convergen en subrayar la importancia del ARNm de Hsp90 en la tolerancia térmica y plasticidad [79].

1.1.7. Proteínas Hsp40

Las proteínas de la familia Hsp40, también llamadas DnaJ por su homólogo en *Escherichia coli*, son proteínas de choque térmico de 40kDa de peso molecular altamente conservadas evolutivamente [69,80]. Están involucradas en la traducción, plegamiento, despliegue, traslocación y degradación de proteínas. El mecanismo principal de acción se basa en el estímulo de la actividad ATPasa de las chaperonas Hsp70. Esto se debe a que la hidrólisis del ATP estimula al cambio conformacional de Hsp70 desde un estado “abierto” con altas tasas de asociación y disociación por sustratos específicos, a un estado “cerrado” con tasas bajas de intercambio [70,81]. DnaJ posee un núcleo hidrofóbico que le permite prevenir la agregación de proteínas, además que tiene la capacidad de unirse a péptidos que consisten en L- y D-aminoácidos, permitiéndole escanear las superficies hidrofóbicas de las proteínas y desencadenar el anclaje de Hsp70 con los parches hidrofóbicos [80,82].

Hsp40 presenta varios estudios en organismos del orden Lepidóptera de los cuáles podemos destacar: *Chilo supresalis*, donde se llegó a evidenciar que en condiciones de baja temperatura se activa la red de genes Hsp/co-chaperonas, siendo Hsp40 parte fundamental de este complejo [83]. Por otro lado, en *Glyphodes pyloalis* se realizó un análisis del transcriptoma en respuesta a condiciones de temperatura elevada demostrando que los genes de la familia Hsp40 analizados presentaban una sobreexpresión génica con respecto al tratamiento dentro del rango tolerable de temperatura del organismo [84]. Asimismo, en *B. mori*, se analizó la expresión génica de Hsp40 en huevos inducidos a diapausa, teniendo como resultados que la sobreexpresión de este gen coincidía con los resultados de Hsp70, corroborando la acción de Hsp40 como co-chaperona [85].

1.2. Planteamiento del Problema

El calentamiento global está representado una amenaza creciente para los organismos vivos tropicales debido a los cambios en las condiciones ambientales [7,86]. Dentro de los órdenes de insectos afectados por estos cambios están los Lepidóptera, los cuales presentan una alta sensibilidad a los cambios de temperatura debido a que son ectotermos [7,10,11]. Por ejemplo, Costa y colaboradores (2020) descubrieron que el cambio climático ha causado una disminución de en la abundancia y riqueza de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) [2]. Como resultado, la diversidad del orden Lepidóptera también podría verse amenazada si las especies de este grupo no son capaces a adaptarse a los cambios de temperatura.

En el orden Lepidóptera hay pocas investigaciones sobre el gen Hsp40 [83–85]. Para el género *Heliconius*, aún falta esclarecer los mecanismos genéticos involucrados en su expresión [11], y se desconoce el rol de los genes Hsp en la adaptación a diferentes temperaturas [52,87].

En los estudios referentes a mecanismos de adaptación es importante evidenciar las diferencias específicas entre los sexos de una misma especie [88]. Así, por ejemplo, se ha encontrado diferencias en los niveles de Hsp ligado al sexo en *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Muscoidea), donde las hembras adultas presentaron una mayor expresión de Hsp que los machos [66]. De igual manera, estudiar las diferentes secciones morfológicas de los insectos, conocidas como tagmas, nos podría brindar un entendimiento de cómo se distribuye la expresión de genes de proteínas de choque térmico a lo largo del cuerpo de las mariposas [89]. Considerando esta información, el estudio de los genes inducibles de estas dos familias de proteínas (Hsp40 y Hsp90) es un importante aporte para ampliar la información disponible y por ende, mejorar el entendimiento sobre los mecanismos genéticos que poseen las mariposas para enfrentarse a condiciones de estrés térmico.

1.3. Justificación de la investigación

La disminución en la diversidad de Lepidóptera afectaría directamente al rol que este grupo cumple en los ecosistemas tropicales y evidenciaría un deterioro en la salud del mismo [12,90,91]. En el ambiente tienen gran importancia, debido a que los organismos que forman parte de este orden están envueltos en procesos de polinización, siendo incluso elementos claves en procesos de coevolución y diversificación de plantas gimnospermas [92]. De igual manera, Lepidóptera representa una parte importante de las cadenas tróficas en relación a su biomasa, siendo alimento de otros insectos, aves, reptiles y mamíferos tanto de ecosistemas conservados como ambientes urbanos [93]. La pérdida de diversidad de especies podría disminuir si éstas fueran capaces de adaptarse al cambio de temperatura, experimentando cambios fenotípicos, morfológicos, fisiológicos o de comportamiento [6]. Por esta razón, es esencial realizar estudios con los cuales se pueda comprender los mecanismos moleculares que permiten a las especies adaptarse a los cambios ambientales [94]. Esto cobra mayor relevancia contextualizando que la especie de estudio de este trabajo, *H. e. lativitta*, habita los bosques de la Amazonía Ecuatoriana, un ecosistema muy diverso que está expuesto a una alta vulnerabilidad por los efectos del calentamiento global [29,42,95].

El género *Heliconius* es usado como organismos modelos y son de utilidad para el desarrollo de investigaciones emergentes y los genes homólogos de otros grupos de insectos pueden proporcionar información valiosa sobre su función en este género [96]. Entonces, entender y cuantificar las respuestas moleculares de los organismos ante el cambio de temperatura se vuelve fundamental para: *i*) tener una base, sobre la cual se pueda trabajar en la conservación de las especies; y, *ii*) desarrollar predicciones precisas sobre las respuestas biológicas para guiar a una protección efectiva frente al cambio climático [7,94].

Los estudios que ayudan en la cimentación de bases para modelos predictivos en biología proporcionan un medio para que se puedan proyectar en las especies. El análisis de varios factores, que apoyen a la creación de modelos predictivos multifactoriales, como el sexo de los individuos, tagma de la muestra e incluir una diversificación de genes ayuda a entender las complejidades involucradas en los cambios de mecanismos biológicos, por lo que el desarrollo de estudios como el propuesto en el presente documento como evidencia de las afectaciones del cambio climático en la biodiversidad e insumo para la toma de decisiones orientadas a la búsqueda de alternativas para la conservación de especies. [94]

1.4. Preguntas de investigación

¿Cómo varía la expresión de Hsp40 y Hsp90 en relación con el sexo, tagmas y frente al estrés térmico?

1.5. Hipótesis

El nivel de expresión de los genes Hsp40 y Hsp90 será mayor en todas las tagmas de individuos machos y hembras de *H. e. lativitta* sometidas a situaciones de estrés térmico, comparado con individuos expuestos a condiciones de temperatura ambiental.

1.6. Objetivos de la investigación

1.6.1. General

Identificar el efecto del sexo, tagma y estrés térmico sobre la expresión de genes inducibles Hsp90 y Hsp40 en *H. e. lativitta*

1.6.2. Específicos

- Medir la expresión de los genes inducibles de Hsp90 y Hsp40 en *H. e. lativitta* sometidos a tratamiento de estrés térmico de frío y calor.
- Comparar la expresión de Hsp90 y Hsp40 entre individuos machos y hembras de *H. e. lativitta* sometidos a estrés térmico.
- Comparar la expresión de Hsp90 y Hsp40 entre cabeza, tórax y abdomen de individuos de *H. e. lativitta* sometidos a estrés térmico.

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Área de estudio

La colecta se realizó en el cantón Tena, ubicado en la provincia de Napo, provincia amazónica del Ecuador. Tena en promedio posee una temperatura de 25 °C y una pluviosidad mayor a 4,000 mm al año [97]. Los tres sitios de colecta se encuentran aproximadamente a 650 m s.n.m. Los tres sitios de muestreo comprenden senderos de las áreas adyacentes a la Reserva Biológica Colonso Chalupas (Figura No. 1), abarcando un rango altitudinal comprendido entre 625 a 675 m s.n.m.

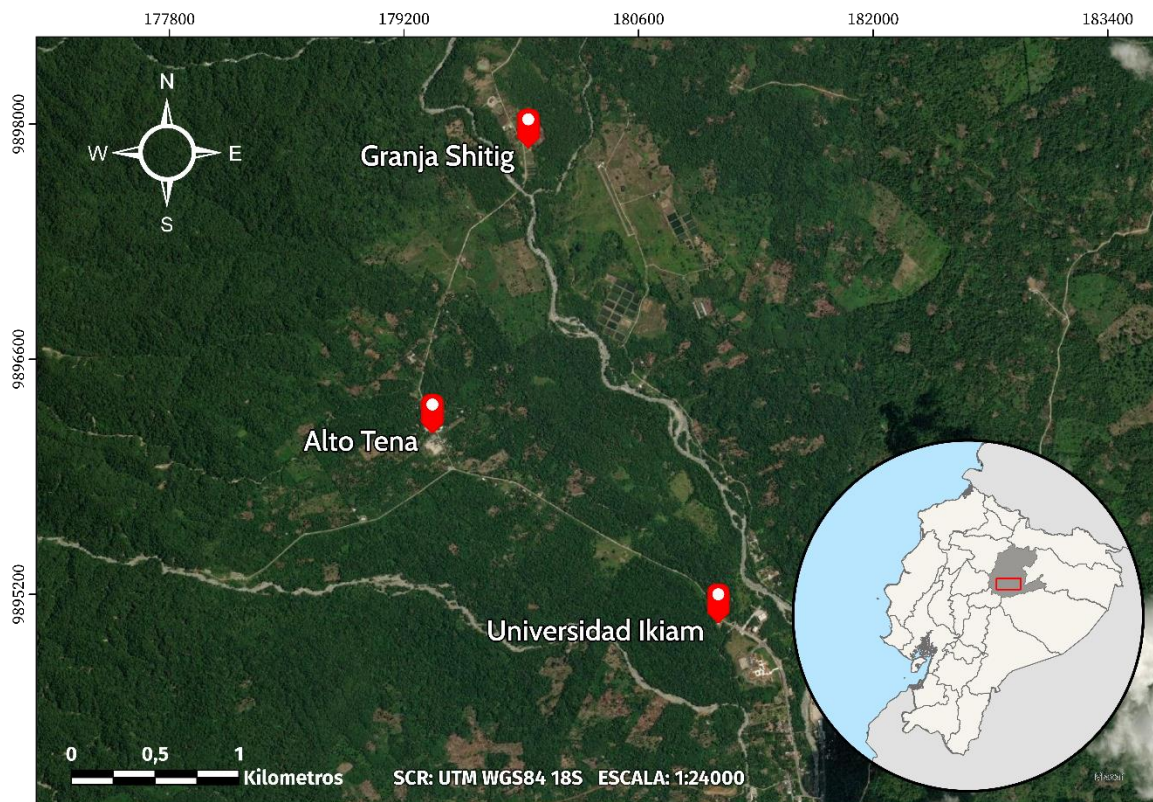


Figura No. 1. Mapa del área de estudio. Los indicadores muestran los tres sitios de recolección de especímenes salvajes de *H. e. Lativitta*.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. QGIS®

2.2. Colecta de muestras de *H. e. lativitta*

2.2.1. Recolección de especímenes

Para la recolección de ejemplares de *H. e. lativitta* se usó redes entomológicas aéreas de 30 centímetros de diámetro, capturando especímenes en estado salvaje. Se usó pinzas entomológicas para manipularlas tras la captura, sujetándolas con las alas cerradas y se las almacenó en sobres de papel encerado debidamente etiquetado, conjuntamente con una torunda de algodón húmeda para alivianar la presión del sobre y mantener condiciones de humedad adecuadas para la mariposa [98]. Todos los sobres fueron almacenados en un lugar fresco, seco y alejado de la incidencia directa del sol. Las mariposas colectadas fueron identificadas por comparación usando guías de identificación con lo que se descartó a los individuos de grupos morfológicamente similares como: *Heliconius aoedes*, *Heliconius xanthocles*, *Heliconius timaretta* y *H. melpómene*, entre otros [45]. Finalmente, los individuos fueron sexados visualmente por identificación de dimorfismos sexuales, registrados y etiquetados en la zona discal del ala derecha, luego fueron criados en cautiverio [99].

2.2.2. Cuidado de especímenes salvajes

El día en el que son capturadas, las mariposas recolectadas presentan altos niveles de estrés [100], por lo que se debe precautelar su integridad, alimentándolas y brindándoles un sitio confortable. Todos los individuos recolectados fueron alimentados con la ayuda de una pinza de punta fina para sostenerlos con las alas cerradas y, suministrándoles una a una, gotas de una solución de azúcar y polen en la probóscide enrollada, utilizando una pipeta Pasteur. Este proceso se repitió hasta que cada mariposa se muestre satisfecha [101]. Una vez alimentadas, las mariposas se colocaron en jaulas portátiles oscuras, con toallas de papel humedecidas en la pared superior, para así, inducir el estado de reposo logrando relajarlas y aumentando el índice de supervivencia en cautiverio. Los especímenes permanecieron en la jaula por uno o dos días bajo constante supervisión.

Una vez concluida la etapa de adaptación, los individuos fueron trasladados a jaulas en el insectario científico de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, donde se les adiestró para comer por sí solas de comederos hechos de recipientes de plástico y pajillas cortadas, este proceso se llevó a cabo sujetando a la mariposa y alimentándola cerca del comedero, para que relacione el color brillante del comedero con su alimento. Su alimentación consistió en una solución de azúcar y polen, misma que se renovó cada día para evitar su

fermentación, precautelando la integridad de los individuos. Para brindar un ambiente más confortable y complementar la alimentación de los especímenes se dispuso flores naturales de *Lantana camara* y *Stachytarpheta jamaicensis* dentro de cada jaula del insectario [102–104].

2.2.3. Apareamiento y desove

Para lograr el proceso de apareamiento, se dispuso en la misma jaula individuos en pareja (hembra y macho), considerando aquellos que exhibieron características saludables. Se colocó al interior, especímenes de *Passiflora punctata*, la misma que actuó como planta hospedera, donde las mariposas depositaron sus huevos [55,105,106]. Haciendo uso del código previamente otorgado se monitoreó diariamente a la hembra, se llevó registro del progreso de su desove [107,108].

2.2.4. Recolección de huevos e incubación

Los huevos encontrados en la planta hospedera fueron recolectados con la ayuda de pinzas entomológicas de punta fina con delicadeza dado la fragilidad que presentan [109]. Se colocaron los huevos en pequeños envases de plástico (Figura No. 2A) y fueron incubados en una habitación con temperatura luz y humedad controladas durante un promedio de cinco días [110]. Los huevos en los que se observó eclosión (etapa larvaria), se depositaron en vasos plástico-cerrados con tapas llenas de agujeros tales como se muestran en la Figura No. 2B. Finalmente, dentro de este vaso se colocó un recipiente plástico más pequeño lleno de agua, como soporte e hidratación de un brote de *P. punctata* que actuó como fuente de alimento de los individuos [111,112].

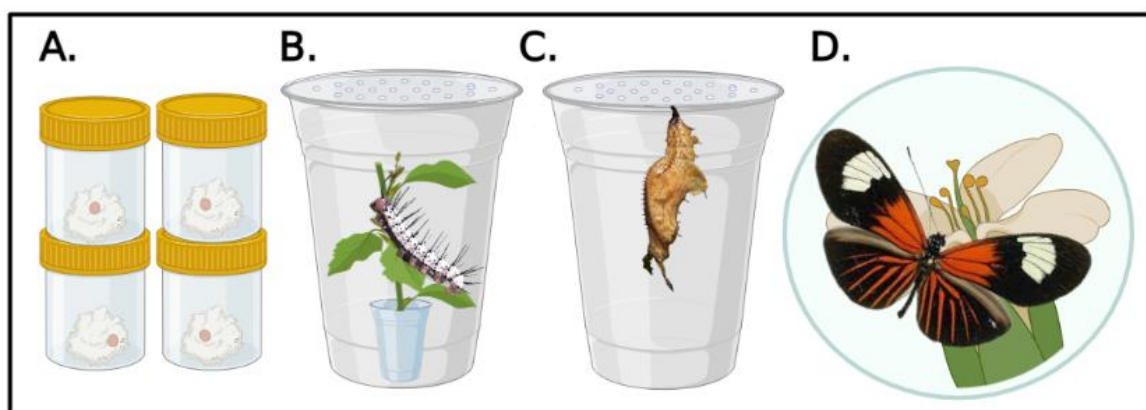


Figura No. 2. Sistema de crianza de *H. e. lativitta*. **A.** Incubación de huevos. **B.** Alimentación de larvas con brotes de *P. punctata*. **C.** Crianza de pupas. **D.** *H. e. lativitta* adulta.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. BioRender®.

Las orugas fueron monitoreadas diariamente hasta observar el cumplimiento del proceso de metamorfosis, en un promedio de 28 días, pasando del estadio larvario, pupa, y finalmente la mariposa adulta (Figura No. 2C y 2D) [101], se identificó el sexo, y fueron codificadas en la zona discal del ala derecha. Luego de esto, se realizaron cuidados durante dos semanas con alimentación a base de néctar hecho con azúcar y polen [113].

2.3. Pruebas de estrés térmico

Se emplearon diferentes condiciones de temperatura buscando variar la expresión génica de los genes inducibles Hsp40 y Hsp90, en función de la cantidad de ARNm [66,76,85,114]. Se seleccionaron un total de 18 mariposas, constituidas por 9 hembras y 9 machos, con la finalidad de realizar las pruebas de estrés térmico con tres organismos por cada combinación de tratamiento de temperatura y sexo. Como se muestra en la Figura No. 3, las pruebas de estrés térmico: i) temperatura alta de 40 °C que ha demostrado que induce un choque térmico al cabo de varios minutos de exposición. ii) una temperatura de control a 25 °C, simulando las condiciones de temperatura promedio de su hábitat neotropical y iii) una temperatura baja a 4 °C, que imita ecosistemas de pie de páramo, habiendo ensayos donde se demuestra que se induce shock térmico a dicha temperatura [77,78,85].

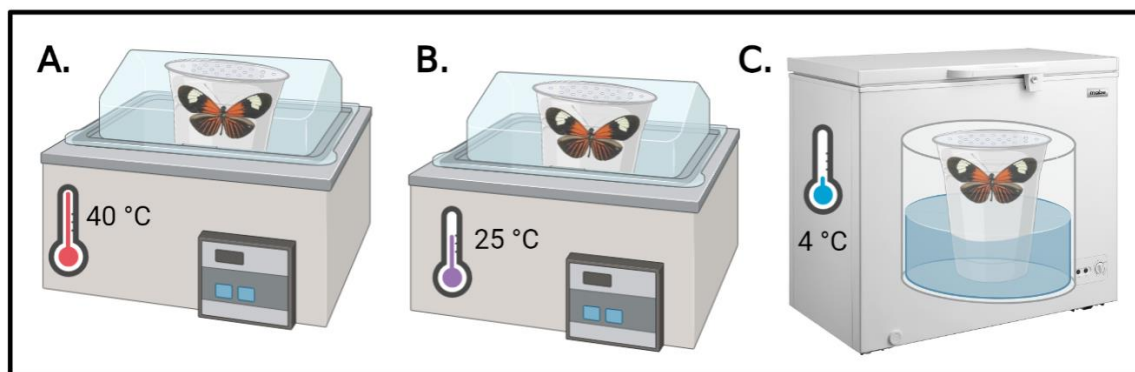


Figura No. 3. Tratamientos de temperatura con individuos *H. e. lativitta*. **A.** Temperatura alta usando un baño maría a 40 °C. **B.** Temperatura control usando un baño maría a 25 °C. **C.** Temperatura baja usando un congelador a 4 °C.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. BioRender®.

Como podemos ver en la Figura No. 3A y 3B, los ensayos de temperaturas alta y de control (40 y 25 °C) se realizaron utilizando un baño maría WB10 (PoliScience®), colocando uno a uno los individuos, con la ayuda de un contenedor plástico. Por otra parte en la Figura No. 3C se tiene el ensayo usado para las temperaturas bajas (4 °C) se utilizó un recipiente con agua dentro de una nevera horizontal AlaskaH200B2 (MABE), donde se colocaron los recipientes plásticos que contienen a los individuos. 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 shock térmico en los tratamientos con frío y calor [114,115]. Concluido el ensayo, los individuos fueron sacrificados y almacenados sin alas en ARN Later (Invitrogen®) de forma que este cubra completamente el cuerpo del individuo, para preservar los tejidos en los procesos posteriores de extracción de ARN.

2.4. Síntesis de una librería de ARN total

Se extrajo ARN total de las 18 mariposas almacenadas en RNA Later (Invitrogen®). El proceso se llevó a cabo usando el Kit de extracción SV Total Isolation System (Promega®). Se separó cada individuo en tagmas: cabeza, tórax y abdomen. Cada tagma se pesó en un microtubo de 2 mL y se le añadió cierto volumen de tampón de lisis dependiendo de su peso (<30mg: 175 µL; >30mg: 1 ml). El tejido fue homogenizado a temperatura ambiente mediante vórtex. Para ambos casos 175 µL del lisado fueron transferidos a un nuevo microtubo debidamente etiquetado, 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. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo debidamente etiquetado, 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 vació el tubo colector, se añadieron 600 µL de solución de lavado y se centrifugó a 13,000 g por 1 minuto. Después de esto se realizó un paso de digestión de ADN genómico, usando una combinación de 40 µL de Yellow Core Buffer, 5 µL de 0.09M MgCl₂ y 5 µL de enzima DNasa I mezclada gentilmente 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 DNase 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.

2.5. Síntesis de una librería de ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN total, se sintetizó una librería de ADNc usando el kit de transcripción reversa GoScript® (Promega™). Como primer paso se realizó una mezcla de 2.5 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de ARN total y 0.5 µL de cebadores Oligo dT. Para evidenciar posible contaminación con ADN genómico, 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, seguido de 4 °C por un tiempo indefinido.

Seguido a esto, 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 fue cuantificado aplicando 2 µL de cada muestra en el espectrofotómetro de micro volúmenes Nanodrop™ ND-ONEC-W (Thermo Scientific™), 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.

2.6. Selección, diseño y validación de primers de genes candidatos.

2.6.1. Búsqueda de genes candidatos en bases de datos

A partir del genoma referencial de *B. mori* (Lepidóptera: Bombycidae) se seleccionaron genes de la familia Hsp40 (DnaJ) y Hsp90. Estos genes preliminares se usaron como punto de partida para identificar los genes en *H. e. lativitta*, debido a que el genoma de este organismo no se encuentra anotado. Se creó una base de datos con las secuencias obtenidas usando la herramienta de búsqueda *Nucleotide* del *National Center of Biotechnology information* (NCBI). Se empleó el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) y se sometió a cada una de las secuencias anteriores una búsqueda de coincidencias en el organismo *H. e. lativitta* disponible en *The Lepidopteran Genome database* (LepBase) [116], con esta información se estableció nueva base de datos de secuencias codificantes (CDS) de genes candidatos.

2.6.2. Diseño de primers de PCR

Se utilizó el software Geneious Prime (Dotmatics®) y, partiendo de las CDS que se obtuvieron en el paso anterior, se diseñaron primers de PCR en tiempo real tomando en cuenta los parámetros recomendados: longitud 18 a 30 pares de bases, tamaño de producto entre 80 a 130 pares de bases, temperatura de *melting* (T_m) entre 55 y 60 °C, una diferencia de T_m de 2 °C entre cadenas, de uno a tres nucleótidos C o G en las cinco bases de la cola 3', contenido de CG entre 40 a 60 % con un óptimo de 50 % [117–119]. Finalmente se utilizó la herramienta Primer-BLAST para identificar y descartar amplificación de regiones intrónicas o de ADN genómico.

2.6.3. Estandarización de perfiles térmicos de primers

Para la estandarización de la amplificación de los genes de interés de este estudio, se usó Kit de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™). Las reacciones tuvieron un volumen final de 10 µL, como material genético se usó un *pool* de ADNc de *H. e. lativitta* las cantidades y concentraciones de los reactivos que se utilizaron se muestran en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1. Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR

Componente	Concentración inicial	Volumen 1Rxn (μL)	Concentración final en 10 μL
Agua libre de nucleasas	-	4.6	-
Buffer	10 X	1	1 X
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	1.5 nM
ADN polimerasa <i>Taq</i>	200U	0.1	2 U
Platinum™			
Templado de ADN	-	2	<500ng
Total	-	10	-

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023.

Se establecieron las temperaturas de *annealing* experimentales a partir de un ensayo comprendido en dos fases, en la primera fase se usaron varias temperaturas con 2 °C de diferencia y, en dependencia del resultado, una segunda fase, utilizando un gradiente de temperatura de 0.5 °C de diferencia dentro del rango de temperaturas que presentó mejores bandas en el gel de electroforesis de la primera fase.

Con ayuda del termociclador Proflex PCR Systems (Applied Biosystems™) para la primera fase se sometió la reacción a una temperatura inicial de 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de PCR, constituidos por: una temperatura de 95 °C por 30 segundos, un gradiente de temperaturas de *annealing* de 52, 54, 56, 58, 60 y 62 °C por 30 segundos. seguidos por 72 °C por 45 segundos. Culminados los 35 ciclos, se aplicó una temperatura final de 72 °C por 5 minutos. Para la segunda fase se realizó una nueva PCR con los mismos ciclos de termociclado exceptuando la temperatura de annealing, la cual fue variando cada 0.5 °C considerando como rango las temperaturas e las que se observó las mejores bandas mediante electroforesis en la primera fase (Ej. 57, 57.5, 58, 58.5 59, 59.5 °C)

Todos los amplicones fueron visualizados por electroforesis horizontal. Se utilizaron cámaras de electroforesis Owl™ EasyCast™ B1 (Thermo Scientific™) para elaborar geles

de agarosa al 2% y posteriormente cargar en cada pocillo 3 μ L de tampón de carga BlueJuice™ (Thermofisher™) en concentración 2X, con 4 μ L de amplicones previamente mezclado por pipeteo sobre Parafilm. En un pocillo se cargaron 4 μ L de estándar de peso molecular 100-1500 pb DNA Ladder (Promega™), mezclada con tampón de carga Orange Loading Dye 6X (Promega™) en proporción 1:4 respectivamente. Se estableció condiciones de la cámara de electroforesis de 400 mA y 100V por un lapso de 45 minutos. El gel fue teñido utilizando una bandeja recubierta de aluminio donde se colocó el gel conjuntamente con 70 mL de TBE 1X en combinación con 7 μ L de tinte de ácidos nucleicos Diamond™ dye (Promega™). Se usó un agitador orbital Orbit LS (Labnet™) para someter a la bandeja a agitación de 80 rpm durante 40 minutos. Por último, se usó el fotodocumentador Enduro™ GDS touch 1302 (Labnet™) para revelar los resultados del gel.

2.7. Cuantificación de la expresión génica

2.7.1. Extracción de ADN genómico de *H. e. lativitta*.

Utilizando individuos salvajes de *H. e. lativitta* se extrajo ADN genómico (ADNg) siguiendo el protocolo del kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN™). Se seccionó el tórax de la mariposa en 3 partes, cada una fue cortada finamente y macerada en un tubo Eppendorf de 2 mL debidamente etiquetado, conjuntamente con 270 μ L de tampón de lisis de tejidos ATL y 30 μ L de proteinasa K, utilizando un pistilo para tubos de microcentrífuga, seguidamente se incubó por 3 horas a 56 °C en el baño maría WB10 (PoliScience®) agitándolas cada 15 minutos con la ayuda de un vórtex. Se continuó con la incubación durante toda la noche a 37 °C y 60 rpm usando la incubadora con agitación SHKA4000 (Termo Scientific®).

Finalizada la incubación, se centrifugó las muestras a 14,000 rpm por 10 minutos, se tomó $\frac{3}{4}$ del sobrenadante (Aprox. 500 μ L) en un nuevo tubo de microcentrífuga etiquetado. El $\frac{1}{4}$ restante se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos para retirar el sobrante, se descartó el tubo con el sólido restante. Se adicionaron 300 μ L de tampón de lisis AL y se mezclará por agitación. Se transfirió la mitad de la mezcla previa a una columna de microcentrífuga y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, se descartó el fluido resultante conjuntamente con el tubo de recolección, y se repitió el proceso con el volumen restante de mezcla.

Se colocó la columna de centrifuga en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón de lavado AW1, se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto y se descartó el fluido junto con el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón de lavado AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos para descartar el fluido junto con el tubo colector. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga etiquetado y se eluyó el ADN añadiendo 200 µL de tampón de elusión AE en la columna, se dejó en incubación por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8 000 rpm por un minuto.

La calidad y cantidad del ADNg se determinó usando el espectrómetro Nanodrop ND-ONEC-W (Thermo Scientific™), y finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C.

2.7.2. Validación de primers para PCR en tiempo real

2.7.2.1. Curvas de calibración de primers

Para construir las curvas de calibración se utilizaron diluciones seriadas de ADNg a razones de 1:1, 1:3, 1:9, 1:27 y 1:81 partiendo de una concentración inicial de 30 ng/µL, continuando con 10, 3.33, 1.11 y 0.37 ng/µL respectivamente. Las reacciones de cada concentración se realizaron por triplicado. Se utilizó un volumen final de reacción de 10 µL, usando 5 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix (Termo Fisher™), 1.5 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL de primer forward y 0.5 µL de primer reverse a una concentración 6 µM, a dicha mezcla se adicionaron 2.5 µL de ADNg en sus respectivas concentraciones.

Se utilizó el termociclador en tiempo real CFX96 Touch (BIO-RAD™) 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 2.6.3), 72 °C por 1 minuto y finalmente se estableció una lectura de la fluorescencia de las reacciones. Usando el programa R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022) se graficaron los valores de ciclo de umbral (C_t) resultantes, en relación con el logaritmo de la concentración. Para cada primer se determinó una línea de tendencia, ecuación de la recta y valor de R^2 .

2.7.2.2. Cálculo de eficiencias de amplificación de primers

El valor de eficiencia de amplificación de cada primer se calculó en base a la pendiente (m) de las ecuaciones de la recta obtenidas en las curvas estándar de la sección 2.7.2, usando como base en la siguiente fórmula:

$$E = (10^{\frac{-1}{m}} - 1) * 100 \quad [120]$$

Donde E es la eficiencia medida en porcentaje y m es la pendiente de la recta medida en $Ct/\log(\text{concentración } \frac{ng}{\mu L})$.

2.7.2.3. Curvas de melting

Se elaboraron curvas de *melting* para documentar la dinámica de interacción de los primers para PCR en tiempo real. Se usó como punto de partida la amplificación realizada en la sección 2.7.2.1, sometiendo a la reacción a un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C con un incremento de 0.5 °C cada minuto, seguido de una lectura de la fluorescencia de la placa.

2.7.3. PCR en tiempo real de genes diana y endógenos

Partiendo de la librería de ADNc, se llevó a cabo una PCR en tiempo real con reacciones en triplicado de volumen final de 10 μ L (Tabla No. 2). La reacción se llevará a cabo en placas de 96 pocillos MicroAmp™ (AppliedBiosystems™) 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™).

Tabla No. 2. Cantidades y concentraciones de los reactivos para PCR en tiempo real

Componente	Concentración inicial	Volúmen 1Rxn (μL)	Concentración final en 10 μL
Agua libre de nucleasas	-	2.5	-
SYBR™ Green PCR Master Mix	2 X	5	1 X
Primer forward	6 μM	0.5	0.3 μM
Primer reverse	6 μM	0.5	0.3 μM
Templado de ADNc	20 ng/μL	1.5	30 ng
Total	-	10	-

Realizado por: Ojeda, Angel, 2023.

2.8. Análisis de datos de PCR en tiempo real

Los datos requirieron un primer tratamiento en donde, se promedió los valores en triplicado de C_t por cada muestra, así como sus desviaciones estándar por muestra.

2.8.1. Cuantificación de expresión génica absoluta

A partir de las ecuaciones que se obtuvieron de las curvas estándar (Sección 2.7.2.1) se determinó la cantidad en gramos de la sección del gen amplificado, por cada primer seleccionado. Se usará la siguiente fórmula:

$$x = 10^{\frac{C_t - b}{-m}} \quad [121]$$

Donde x es la cantidad de amplicón medido en gramos, C_t es el ciclo de umbral (del inglés *threshold line*), b es la intersección de la recta con el eje Y y m es la pendiente de la recta medida en $C_t/\log(\text{concentración } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}})$.

Seguidamente, se usaron los valores obtenidos de la cantidad de amplicón para calcular el número de copias de ADN por μL

$$\text{Copias de ADN} / \mu\text{L} = \frac{L \times x}{TA \times PB} \quad [121]$$

Donde L es la constante de Avogadro siendo igual a: $6.022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{copias de ADN}}{\text{mol}} \right)$, x es la cantidad del amplicón medida en gramos, TA es el tamaño de amplicón medido en pares de bases y PB es el peso molecular promedio de un par de bases, que es igual a $\left(\frac{660 \text{ g/mol}}{pb} \right)$.

2.8.2. Análisis de varianza del gen endógeno

Con los datos de expresión génica absoluta, apoyados en el software R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022) y usando las librerías readxl (versión 1.4.1), rstatix (versión 0.7.2), ggplot2 (versión 3.4.0) y ggpubr (versión 0.5.0), se procedió a analizar la normalidad de los datos usando una prueba de Shapiro Wilk. Se evaluó la igualdad de las varianzas a partir de una prueba de Levene. Se comparó las distribuciones de probabilidad mediante un trazado de sus cuantiles uno contra el otro en una gráfica Q-Q. Finalmente, para efectuar un análisis de varianza se usó un análisis de varianza de ANOVA factorial.

2.8.3. Cuantificación de expresión génica relativa

Se usó el método de doble delta de Livak para encontrar los valores de expresión génica relativa [122]. Se comenzó obteniendo la resta de los ciclos de umbral de los genes de interés (DnaJ-1 y DnaJ-5) y del gen de referencia (GAPDH).

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Gen de interés})} - C_{T(\text{Gen referencial})} \quad [122].$$

Se promedió los ΔC_T del gen de referencia, seguidamente, se restó el valor de ΔC_T de los tratamientos sometidos a estrés térmico con calor y frío de los ΔC_T de los tratamientos control que se promediaron.

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T(\text{estrés térmico})} - \Delta C_{T(\text{control})} \quad [122].$$

Finalmente, se cuantificó la expresión génica relativa *EGR* mediante la ecuación:

$$EGR = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad [122].$$

Se graficó los resultados obtenidos a partir del software R Studio® (R Project™) haciendo uso de la librería ggplot2.

2.8.4. Análisis de varianza de la expresión génica relativa

Con la ayuda del software R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022) y usando las librerías readxl (versión 1.4.1), rstatix (versión 0.7.2), ggplot2 (versión 3.4.0) y ggpubr (versión 0.5.0), se emplearon modelos lineales generalizados (GLMs del inglés *Generalized Lineal Models*) para relacionar los valores de expresión génica relativa de cada gen objetivo con los factores y covariables mediante una función de enlace. Se realizó una prueba de normalidad de datos con Shapiro Wilk, se compararon las distribuciones de probabilidades con un gráfico Q-Q y se analizó la varianza de la expresión génica relativa mediante modelos lineales generalizados.

3. CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Genes seleccionados

La búsqueda de genes candidatos en el genoma de *H. e. lativitta* obtuvo en total 20 secuencias de genes candidatos 19 de las cuales pertenecían a la familia DnaJ (Hsp40), comprendiendo homólogos del 1 al 19, y 1 secuencia de la familia Hsp90. Tras analizar las secuencias mediante BLAST (Tabla No. 3), se encontraron coincidencias significativas en 3 secuencias de *H. e. lativitta*, DnaJ (Hsp40) Homólogo 1 (DnaJ-1), DnaJ (Hsp40) Homólogo 5 (DnaJ-5) y Hsp90.

Tabla No. 3. Resultado de BLAST (Lepbase) de genes candidatos en *H. e. lativitta*

Gen	Puntuación	Valor-E	Similitudes	Longitud (pb)	LepBase ID
DnaJ-1	902.971 (1000)	0	936/1227 (76.28%)	1215	HEL_003067-RA
DnaJ-5	856.083 (948)	0	825/1059 (77.90%)	1056	HEL_006641-RA
Hsp90	695.583 (770)	0	604/751 (80.43%)	1170	HEL_005376-RA

Realizado por: Ojeda, Angel, 2023.

Los resultados del BLAST mostraron un solo *hit* como respuesta, valores de E iguales a cero, y un porcentaje de similitud superior al 76%. El gen DnaJ-1 anotado en Lepbase bajo el código HEL_003067-RA, se ubica en el cromosoma 1, posee 2 exones que componen un transcripto de 1215 pb de longitud y derivan en 404 residuos. DnaJ-5 anotado en Lepbase como HEL_005376-RA, está ubicado en el cromosoma 10, está compuesto de 2 exones, un transcripto de 1056 pb, y una traducción de 351 residuos. Hsp90 está anotado en Lepbase bajo el identificador HEL_005376-RA, está alojado en el cromosoma 18, posee 2 exones, su transcrita tiene 1170 pb y 389 residuos de longitud de traducción.

3.2. Primers de genes de interés

Se sintetizaron tres pares de primers de qPCR para cada uno de los genes de interés (DnaJ-1 DnaJ-5 y Hsp90). A continuación, se muestran los primers que fueron sometidos al proceso de estandarización de perfil térmico (Tabla No. 4). Los primers fueron diseñados con una longitud de 20 pares de bases, una temperatura de *melting* teórica de 60 °C, un porcentaje de citocinas – guaninas entre 50 a 55 %, un tamaño de amplicón de entre 86 a

129 pares de bases y finalmente, temperaturas de *annealing* experimentales que van entre 58 a 61.5 °C. Los geles de agarosa al 2% de las dos fases de estandarización y un ejemplo de obtención de dichas temperaturas de annealing se muestran en el Anexo B.

Tabla No. 4. Lista de primers de genes de interés sintetizados y sometidos a estandarización de perfil térmico.

Primer	Dirección	Secuencia 5' - 3'	Long (pb)	Tm (°C)	CG (%)	TaE (°C)	TA (pb)
F1 DnaJ-1	Forward	CCGGACAAAAATCCAGCAGC	20	60	55	58.0	129
R1 DnaJ-1	Reverse	TTGCCACCCCTCTTGTAAAGC	20	60	55		
F2 DnaJ-1	Forward	TCTGACGACTTGTGGCCA	20	60	50	61.5	86
R2 DnaJ-1	Reverse	TCTTCACCTCTTGCCTGTGCG	20	60	55		
F1 DnaJ-5	Forward	AATCCGCTGGTGCTGAAGAA	20	60	50	61.0	125
R1 DnaJ-5	Reverse	TCCCATTCCACCCTTCAAGC	20	60	55		
F1 Hsp90	Forward	ATCAAAGCTCGACAGTGGCA	20	60	50	58.0	112
R1 Hsp90	Reverse	AACCAAGTCGGCCTTTGTCA	20	60	50		

Long: Longitud del primer, **Tm:** Temperatura de *melting* teórica, **CG:** Proporción Citocinas-Guaninas, **TaE:** Temperatura de *annealing* experimental, **TA:** Tamaño del amplicón.

Realizado por: Ojeda, Angel, 2023.

3.3. Primers de genes de referencia

Adicionalmente fueron sintetizados primers de genes referenciales (Tabla No. 5), mismos que fueron tomados de estudios donde se usaron como base para ensayos de qPCR. Estos fueron: GAPDH o gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa [61], RPL3 o proteína ribosomal L3 [123] y S3A o proteína ribosomal S3A [123]. Los primers presentaron una longitud de entre 20 a 24 pares de bases, temperatura de *melting* de entre 55 a 60 °C, temperatura de *annealing* experimental de entre 57.5 a 61 °C y un tamaño de amplicón de 95 a 102 pares de bases. En el caso de los primers referenciales de RPL3 y S3A, fueron sometidos a estandarización de perfil térmico. Con respecto a GAPDH, se tenía disponibilidad de la temperatura de *annealing* experimental bajo condiciones similares para la reacción de PCR [61].

Tabla No. 5. Lista de primers de genes de referencia sintetizados y estandarizado el perfil térmico

Primer	Dirección	Secuencia 5' - 3'	Long (pb)	Tm (°C)	CG (%)	TaE (°C)	TA (pb)
F2 GAPDH	Forward	CCCGTAGCCAATGTGTCAGT	20	55	60	58.0	102
R2 GAPDH	Reverse	TGGTCCATTTCAGCTTCCT	20	50	59.9		
F1 RPL3	Forward	GGGTTGTTGTATGGGACCTAAG	22	58	50	57.5	95
R1 RPL3	Reverse	TCAGATTGATCTTCTCAAGAGCTG	24	58	41.7		
F1 S3A	Forward	ATGCTGAGAGGTCTTTCCGC	20	60	55	61	132
R1 S3A	Reverse	GCGTCTGCCATTTCTTGACC	20	60	55		

Long: Longitud del primer, **Tm:** Temperatura de *melting* teórica, **CG:** Proporción Citocinas-Guaninas, **TaE:** Temperatura de *annealing* experimental, **TA:** Tamaño del amplicón.

Realizado por: Ojeda, Angel, 2023.

Para la validación de los primers para su uso en qPCR se usó el perfil térmico previamente estandarizado para realizar tanto, una curva de calibración para cada primer (Figura No. 4) como una curva de *melting* de los productos de amplificación (Anexo C). Los primers que presentaron resultados propicios (GAPDH, DnaJ-1, DnaJ-5, Hsp90) se presentan en la Figura No. 4. De las curvas de calibración se puede destacar la obtención de valores de R² mayores a 0.95, eficiencias de amplificación de entre 97.16 a 101.60 %.

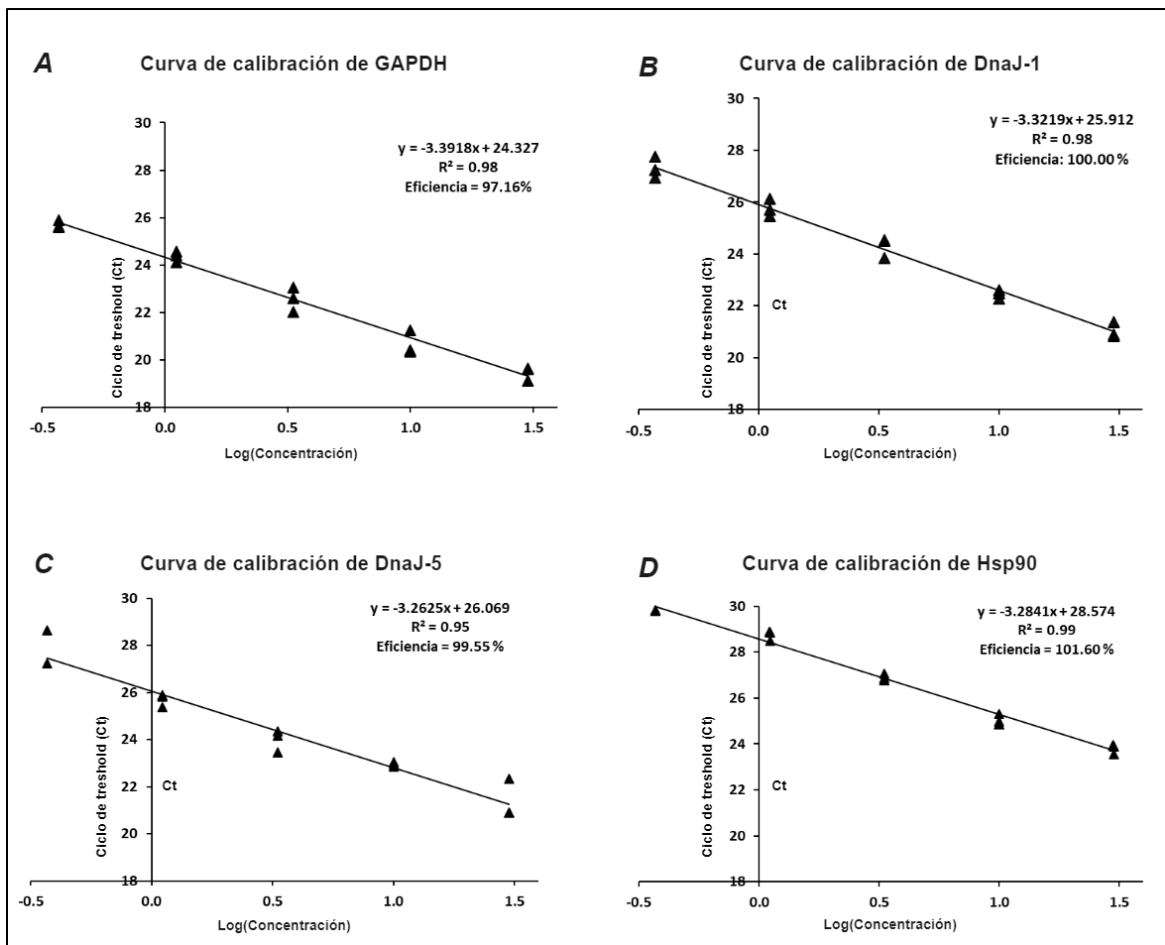


Figura No. 4. Curvas de calibración de los primers **A.** GAPDH, **B.** DnaJ-1 **C.** DnaJ-5 **D.** Hsp90
Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. R Project.

Finalmente, los productos de amplificación, usados para la elaboración de las curvas de calibración, fueron sometidos a un gradiente de temperaturas para obtener una curva de *melting* para cada uno de los genes utilizados. Se obtuvieron curvas de *melting* con las condiciones idóneas (un único pico) para los primers GAPDH, DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90 (Anexo C).

3.4. Validación de GAPDH como gen de referencia

Con los valores de C_t del gen referencial se procedió a realizar un ANOVA de tres vías (Tagma, Sexo y Tratamiento) para validar al GAPDH como gen de referencia para este estudio. Como se puede observar en la Figura No. 5, el C_t para cada uno de los factores son aparentemente los mismos debido a que el promedio y sus barras de error coinciden entre los rangos de valores.

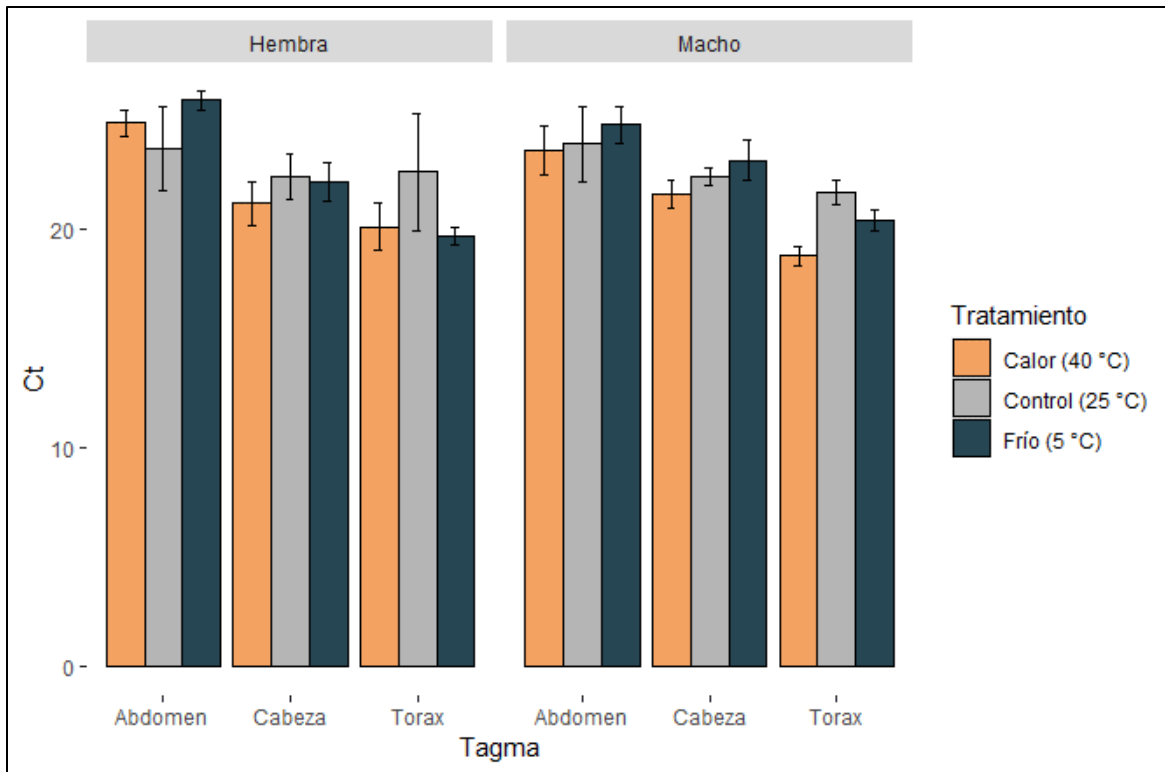


Figura No. 5. Valor C_t del gen de referencia GAPDH con los factores Tagma, Sexo y Tratamiento.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. R Project.

La prueba de Shapiro – Wilk con un $p = 0.426$ y el test Levene con $p = 0.885$ indican que se cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad que requiere el ANOVA. Al aplicar esta técnica de tres vías, se establece que existe una variabilidad en el valor C_t debido al factor tratamiento y tagma, así como su combinación: tratamiento – tagma. En el primer caso, se tuvo una significancia del 5% ($p < 0.05$), mientras que en el segundo y tercero del 1% ($p < 0.01$) (Tabla No. 6). Al hacer un ANOVA de dos vías con los factores: Tratamiento y Sexo, por su parte, no existe variabilidad en los datos, lo que se sugiere que el gen GAPDH puede ser utilizado como referencia si es que no se considera el factor tagma en el análisis. Para el primer ANOVA, no se tuvo que recurrir a una transformación en los datos. Mientras que en el segundo ANOVA sí, puesto que se aplicó el logaritmo al valor C_t . La prueba de Shapiro – Wilk resultó en un $p = 0.0616$ y el test Levene tuvo un $p = 0.229$.

Tabla No. 6. Resultados del análisis de varianza para el gen de referencia GAPDH

Factor	GL	SumC	MediaC	F	Pr(F)	Significancia
<i>ANOVA de tres vías en relación con sus tres factores de estudio: tratamiento, sexo y tagma.</i>						
Tratamiento	2	13.07	6.53	5.192	0.01044	*
Sexo	1	0.84	0.84	0.67	0.41828	NS
Tagma	2	139.34	69.67	55.367	1.04E-11	***
Tratamiento:Sexo	2	1.89	0.94	0.75	0.47956	NS
Tratamiento:Tagma	4	23.98	5.99	4.764	0.00345	**
Sexo:Tagma	2	3.64	1.82	1.445	0.24913	NS
Tratamiento:Sexo:Tagma	4	4.41	1.1	0.876	0.4881	NS
<i>ANOVA dos vías en relación con sus dos factores de estudio: tratamiento y sexo</i>						
Tratamiento	2	0.0283	0.014132	1.622	0.208	NS
Sexo	1	0.0014	0.001361	0.156	0.694	NS
Tratamiento:Sexo	2	0.0283	0.014132	1.622	0.208	NS

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

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023.

3.5. Expresión génica absoluta

En el Anexo E se encuentra la cuantificación absoluta (EGA) del gen GAPDH, la misma que evidencia el número de copias de ADN (NC) del mismo gen. En dicha gráfica se ratifican los resultados del análisis de varianza del gen de referencia, donde los tratamientos y el sexo presentan un comportamiento de estabilidad entre los factores. Sin embargo, cuando se compara los resultados entre las diferentes tagmas, se puede observar diferencias marcadas, en específico, el tórax, tiene valores de EGA superiores a los factores de cabeza y abdomen.

3.6. Expresión génica relativa

La expresión génica relativa (ERG) de los genes de interés se encuentran distribuidos en la Figura No. 6. Se puede subrayar que tanto los genes DnaJ-1 y DnaJ-5 presentan sobreexpresión en el tratamiento frío, de hasta 4 y 30 en comparación con el control, mientras que Hsp90 presentó sobreexpresión superior en el tratamiento de calor de hasta 14 veces más que el control, la expresión en el tratamiento de frío también fue superior al control con hasta 5 veces más expresión. Al analizar los valores entre las distintas tagmas, en los tres genes de interés se pueden observar valores en el tórax inferiores a los tagmas abdomen y cabeza.

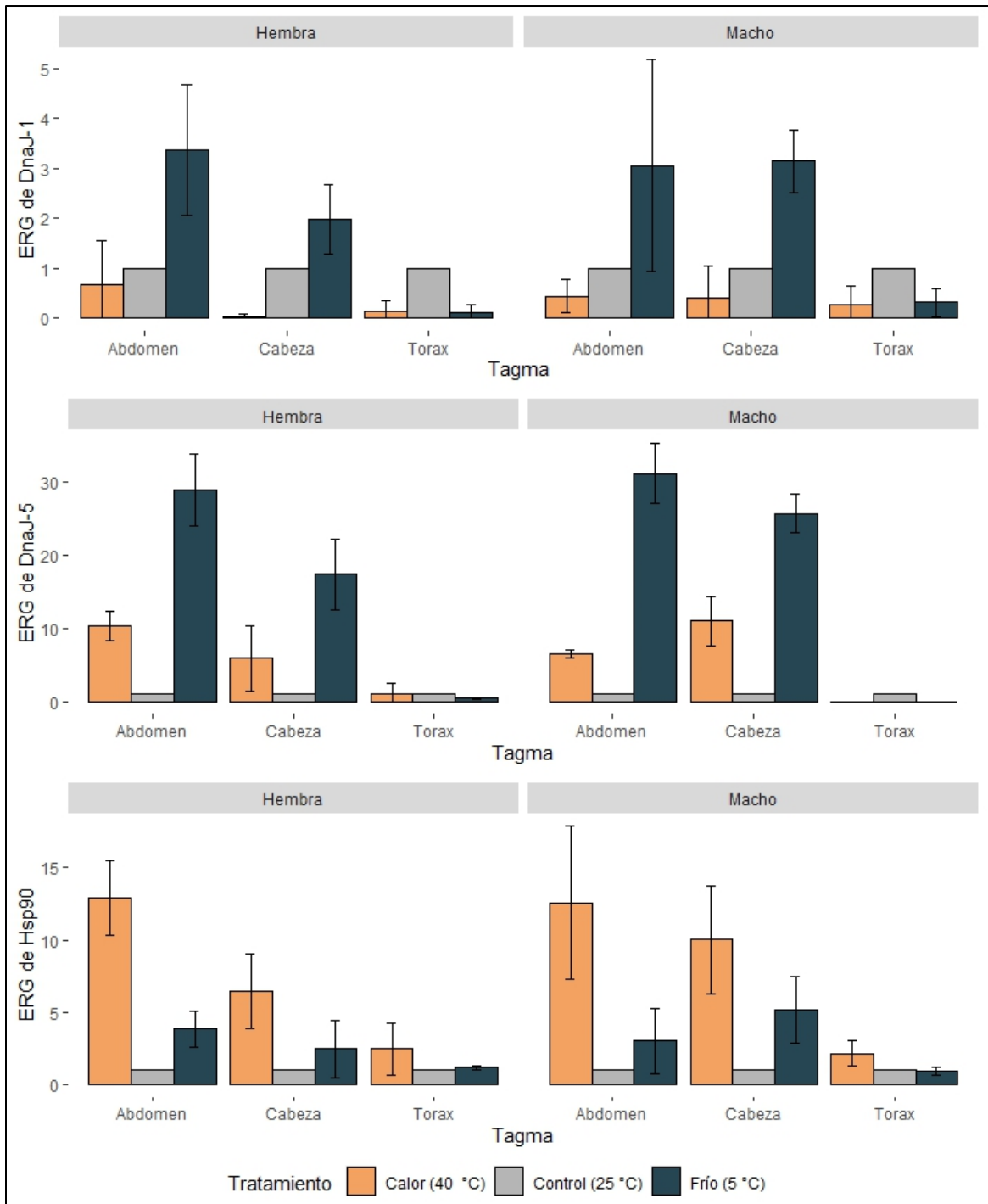


Figura No. 6. Expresión génica relativa (ERG) de los genes de interés comparado con GAPDH.

A y B: DnaJ-1; C y D: DnaJ-5; E y F: Hsp90.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023. R Project.

3.7. Variación en la expresión relativa de DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90

Luego de hacer el respectivo cálculo de los valores de expresión relativa de los genes DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90 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. Los GLMs permitieron incorporar factores categóricos como el tagma y el tratamiento, así como controlar los posibles efectos de confusión como 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. 7, para los tres casos, el factor tratamiento y tagma influyen en el valor ERG con una significancia estadística del 99%. La variable tagma de Hsp90 presentó un $p = 4.86 \times 10^{-9}$, mientras que el tratamiento tuvo un valor de 9.48×10^{-5} . En el caso del gen DnaJ-5 y DnaJ-1, los valores de p en tagma son: 1.46×10^{-9} y 6.74×10^{-7} , mientras que para los tratamientos fueron: 5.1×10^{-7} y 4.4×10^{-4} ; respectivamente. Para este último gen, se aplicó una transformación de raíz cuadrada para que se cumpla el supuesto de normalidad. La comprobación de los supuestos de distribución de Gauss y homogeneidad se pueden verificar en la Tabla No. 8, donde todas las probabilidades son mayores a la significancia estadística de 0.05. Todos estos resultados se pueden observar gráficamente en la Figura No. 6, donde el tratamiento calor y frío, así como tagma abdomen y cabeza difieren con el control.

Tabla No. 7. Significancia estadística del efecto de los factores en la expresión relativa de los genes DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90

Gen	Factor	GL	F	Pr(F):	Significancia
DnaJ-1	Tagma	2	19.387	6.74×10^{-7}	***
	Sexo	1	0.707	0.404	NS
	Tratamiento	2	9.117	4.4×10^{-4}	***
DnaJ-5	Tagma	2	32.030	1.46×10^{-9}	***
	Sexo	1	0.465	0.498	NS
	Tratamiento	2	19.891	5.1×10^{-7}	***
Hsp90	Tagma	2	29.284	4.86×10^{-9}	***
	Sexo	1	0.454	0.504	NS
	Tratamiento	2	11.305	9.48×10^{-5}	***

P < 0.01: **, P < 0.001: ***, P < 0.0001: ****, **GL:** grados de libertad, **F:** estadística F, **Pr(F):** valor de p asociado con la estadística F, **NS:** no significativo.

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023.

Tabla No. 8. Valores de probabilidad de la Prueba Levene y Shapiro Wilk de los genes DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90

Gen	Transformación	Test	Estadístico	P – Value
DnaJ-1	Raíz Cuadrada	Levene	0.84	0.636
		Shapiro – Wilk	0.98	0.465
DnaJ-5	NA	Levene	1.20	0.315
		Shapiro – Wilk	0.97	0.148
Hsp90	NA	Levene	1.45	0.171
		Shapiro – Wilk	0.97	0.155

Realizado por: Ojeda, Angel, 2023.

4. CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Estudios de expresión génica

Los estudios de cuantificación de la expresión génica utilizan la técnica de transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR) que hoy en día es considerada como estándar de precisión, sensibilidad y rapidez [124]. Hellemans *et al.* (2008) recomienda que, para hacer un uso correcto de la técnica es indispensable considerar los siguientes parámetros: *i)* el diseño experimental, mismo que debe permitir una evaluación cuidadosa de la cantidad de muestras biológicas necesarias para obtener resultados congruentes y estadísticamente significativos; *ii)* la extracción de la muestra y análisis de calidad, que se centra en la necesidad de ácidos nucleicos de alta calidad, adicionalmente, contar con muestras de ARN libres de ADN genómico; *iii)* el diseño del ensayo, que recaen en la especificidad de los primers; y, por último, *vi)* la validación del gen de referencia para normalización de los datos. [124,125]

4.1.1. *Diseño experimental*

Se diseñó un experimento con triplicados biológicos, utilizando tres mariposas para cada combinación de sexo y tratamiento, resultando en un total de 18 mariposas. Esta elección de tamaño de muestra está en línea con las recomendaciones de Shakeel *et al.* (2017) quienes sugieren reducir el número de variables que puedan influir en la dispersión de los datos, como las condiciones ambientales, el fotoperiodo, la edad y la variabilidad genética de los organismos. Además, una mayor cantidad de individuos podría ser beneficiosa para reducir el error de medición de manera significativa [126].

4.1.2. *Extracción de la muestra*

El paso crucial para obtener el material de partida fue la extracción del ARN, necesario para posteriormente sintetizar ADN complementario al ARN mensajero para así amplificar y cuantificar el nivel de expresión de los genes que producen las proteínas objeto de estudio. La extracción de ARN se realizó exitosamente obteniéndose una librería de 54 muestras, en diferentes combinaciones de tratamiento térmico, sexo y tagma, que luego se usó para sintetizar ADN complementario. El ensayo de calidad del material sintetizado a partir de la reacción de transcripción inversa, omitiendo el uso de la enzima RT, reveló por PCR convencional, la ausencia de contaminación con ADN genómico [127].

Los pasos de extracción de ácidos nucleicos fueron seguidos por una cuantificación de la concentración y calidad del material, haciendo uso de los índices de absorbancia. Los valores ideales de absorbancia para ARN en 260/230 son generalmente entre 1.8 y 2.2, lo que indica que las muestras están libres de contaminación por proteínas. Para la absorbancia a 260/280 los valores ideales se encuentran típicamente entre 2.0 y 2.2, lo que indica que la muestra está libre de contaminación por compuestos orgánicos.

La pureza obtenida de las muestras de ARN está en el rango de 1.8 para la absorbancia de 260/230 lo que indica una cantidad aceptable de contaminación orgánica, en el caso de que los valores sean menores a 1.6, puede indicar una contaminación significativa con dicho compuesto. En cuanto a la absorbancia 260/280 se obtuvo un rango entre 2.1, indicando una alta pureza de ARN, conteniendo poco o ningún contaminante proteico (Anexo A). Es importante tener en cuenta que estos valores son solo una guía y que la interpretación correcta de los valores de absorbancia depende del tipo de muestra y del método de extracción utilizado. Además, es recomendable analizar la calidad del ARN utilizando otras técnicas, por lo que se complementó este paso con una PCR, para obtener una evaluación más completa de la pureza del ARN, donde se obtuvieron en bandas únicas y bien definidas [128]

4.1.3. Diseño del ensayo

Dentro del diseño del ensayo, un paso crucial es el diseño de primers puesto que conlleva a la selección de regiones específicas de los genes de interés que serán utilizados en la reacción de qPCR [119]. Varios autores concuerdan que, en los primers reside la mayor responsabilidad de éxito en los ensayos de qPCR. Realizar ensayos de validación es el paso esencial para asegurar que los resultados sean precisos, sensibles y comparables [119,123,126]. Como primera instancia, se debe estandarizar los primers por PCR convencional para después someterlos a una validación en qPCR [120].

La validación de primers por PCR convencional se basa en la optimización de los parámetros de temperatura y concentraciones de reactivos con el fin de obtener un amplicón de calidad [129]. Se puede observar en el Anexo B el diseño de estandariza la estandarización de la temperatura de *annealing* experimental de 6 pares de primers, donde todos los geles de electroforesis presentan una única banda correspondiente al tamaño de amplicón esperado (No hay coincidencia con regiones inespecíficas dentro del material genético de *H e. lativitta*). Dicha estandarización se realizó en dos etapas para aumentar

la precisión de los resultados. La primera etapa contempló un rango de temperatura con pasos de 2 °C, y la segunda etapa, dentro del rango óptimo del paso anterior, en pasos de 0.5 °C.

Una vez se ha encontrado la temperatura de annealing experimental, el siguiente paso contempla la validación de primers por qPCR, mediante una curva estándar, seguido por un paso final de curva de *melting* [129]. La curva de estándar es utilizada para crear una regresión lineal entre un gradiente de concentraciones de ADN, y el C_t resultante, con el fin de calcular la concentración de una muestra de interés a partir de su C_t [120]. A partir de las curvas estándar, se obtuvieron eficiencias de amplificación entre un rango de 97.16 a 101.60% coincidiendo con las recomendaciones que se halla en bibliografía, estableciendo los valores óptimos en un rango de 95 al 105% [129,130].

Por último, la curva de *melting*, se aplica como un paso final a la amplificación por qPCR, donde se aplica un gradiente de temperatura a los amplicones que tienen incorporados un fluoróforo, logrando construir un perfil de emisión de fluorescencia en dependencia de la temperatura. En base al análisis de las curvas de *melting* o el pico de *melting* (gráfica obtenida obteniendo la derivada de la curva de *melting*) se puede llegar a discernir primers que tengan defectos de amplificación, ya sea el que los primers formen estructuras secundarias, o inespecificidad hacia regiones del genoma [119]. La técnica de análisis mediante curvas de *melting* es ampliamente usada por su sensibilidad, al punto de lograr reconocer mutaciones en un solo nucleótido, y así reconocer por ejemplo variantes de SARS-CoV-2 [131].

4.1.4. Validación del gen de referencia

La selección de un gen de referencia es imprescindible para la normalización de los datos de qPCR, sin embargo, no existe un gen de referencia universal, al contrario, la estabilidad de estos genes varía en dependencia de la especie, tejido analizado, etapas de desarrollo, tipo de estrés inducido, fotoperiodo, entre otros factores [126]. Es imperativo optar por genes de referencia en dependencia del tipo de diseño experimental y tratamientos propuestos con el fin de garantizar la calidad y la consistencia de las muestras y las reacciones. Esto asegura que los resultados sean veraces, comparables, precisos y reproducibles.

El uso de un gen de referencia permite normalizar las concentraciones de los genes objetivo (Hsp40 y Hsp90) para corregir posibles variaciones en la cantidad de ARN total entre muestras. Esto asegura que los resultados sean comparables entre muestras y experimentos, además que permite evaluar la calidad y la consistencia de las muestras y las reacciones qPCR. Si los niveles de un gen de referencia se mantienen constantes, se puede asumir que la calidad de la muestra y la reacción son adecuadas [132].

El gen GAPDH es uno de los más usados en diferentes estudios de expresión genética ya que ha presentado estabilidad en una amplia gama de ensayos, siendo utilizado en casi el 90% de las publicaciones en revistas de alto factor de impacto [133]. En relación con estudios de expresión génica en insectos, se ha evidenciado que GAPDH, es un gen con una expresión regular en ensayos de alteración de temperatura en *Spodoptera litura* [134].

En el presente estudio, se utilizó GAPDH como gen de referencia para la normalización de datos, este gen presentó diferencias significativas entre los C_t provenientes de diferentes tagmas $F(2, 34) = 55.367$, $p = 1.04E-11$, $\eta^2 = 0.765$, esto indica que hay una diferencia significativa entre los grupos definidos por el factor tagma en relación a dicho gen. El valor de η^2 sugiere que el 76.5% de la variación total en los datos se debe a las diferencias entre los grupos definidos por el factor tagma. Esto se debe a que GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) es un gen mitocondrial, que da origen a una enzima del mismo nombre, que es de gran importancia en el metabolismo energético y la producción de ATP y piruvato, aprovechándose de la glucólisis en el citoplasma [135]. La relación que existe entre este gen y la demanda energética de los distintos tejidos es una de las razones por las que se explica este nivel de diferencias.

La utilización de un ANOVA multifactorial de dos vías para el gen de referencia GAPDH denotó que excluyendo el factor tagma, se evidenciaba estabilidad entre los factores de tratamiento y sexo previa a la utilización de una transformación de datos ($\log(C_t)$).

4.2. Expresión génica relativa

La cuantificación de la EGR busca analizar cambios en la expresión génica de una muestra objetivo, en relación con una muestra control [129] En este sentido, los resultados nos darán una idea de cuántas veces más, o cuántas veces menos se estarán expresando los genes de interés (DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90) en relación a la medida en la que se exprese el gen de referencia (GAPDH), para así comparar los tratamientos que han sido sometidos a estrés térmico, con los criados en temperatura ambiental que cumplen el rol de control.

Estos resultados serán analizados posteriormente con la ayuda de GLMs para estimar los efectos de distintos factores sobre la EGR. El análisis de estas proteínas de choque térmico en *H. e. lativitta*, es importante debido a que son mariposas que viven en ambientes con temperaturas variables, como montañas y bosques amazónicos, en estos ambientes las temperaturas pueden subir y bajar drásticamente. Las proteínas de choque térmico pueden ayudar a las células de la mariposa a sobrellevar las consecuencias del estrés térmico, tanto en su etapa adulta, como en sus diferentes etapas de desarrollo [136].

4.2.1. Expresión génica entre tratamientos de temperatura

En el presente estudio las mariposas fueron estresadas térmicamente a temperaturas conocidas a las cuáles las mariposas sufren estrés térmico y entran en un estado de “desmayo” también llamado *Knock down*. Mientras dure este estado, los mecanismos celulares de mitigación de los efectos del estrés térmico, se encuentran activos [137]. Las mariposas fueron sometidas a un periodo de estrés de 1 hora, por lo que los resultados reflejan los efectos a corto plazo que tiene el estrés térmico sobre *H. e. lativitta*. Se sugiere que la exposición a largo plazo de mariposas a condiciones de estrés térmico podría fomentar la plasticidad genotípica, haciendo que una vez la mariposa se haya aclimatado a las nuevas condiciones, sus niveles de expresión de Hsps se normalicen, además confiriéndole cierta resistencia a este tipo de eventos [138].

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 $p = 4.4 \times 10^{-4}$, 5.1×10^{-7} y 9.48×10^{-5} para DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90, respectivamente, todos con valores de p altamente significativos ($p < 0.001$).

Los valores de EGR de los genes DnaJ-1 y DnaJ-5 (Hsp40) resultaron ser en promedio mayor en condiciones de estrés a 4 °C, comparado con el tratamiento frío y el control. Tales resultados son acordes al ensayo de estrés térmico en *Drosophila melanogaster*, donde se evidenció aumento de la expresión génica en estos tratamientos [115]. Un estudio en *Lymnaea stagnalis* expone que existe un pico de expresión de Hsp40, el mismo que ocurre al cabo de 60 minutos tras haber comenzado el evento de estrés, pasado este tiempo, la sobre expresión comienza a decaer hasta llegar alrededor de las 8 horas donde se revierte el efecto hasta niveles basales de expresión génica [139]. Este pico de expresión evidencia expresión de proteínas Hsp40, con resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

El gen Hsp90 presentó niveles marcados de expresión en las situaciones de estrés a 40 °C. y un poco más sutiles ante estrés a 4°C. Estos resultados son comparables con el estudio de Zhai en 2010, donde se evidenció sobreexpresión de Hsp90 en los diferentes estadíos larvarios de *Spodoptera exigua* (Lepidóptera: Noctuidae), que habían sido sometidos a temperaturas correspondientes a 43 y 45 °C [140]. Una investigación similar en *Cydia pomonella* (Lepidóptera: Tortricidae) probó la susceptibilidad de las larvas a altas temperaturas (32-44 °C por 5, 10, 30, 60, 120 y 180 minutos), encontrando niveles de expresión superiores a aquellas criadas en condiciones ambientales, en particular, el mayor pico de expresión génica sucedió a en el tratamiento a 35 °C por una duración de 3 horas. Además, se concluyó la susceptibilidad que tienen las larvas al estrés térmico, ya que, en temperaturas superiores a 45 °C, existió una mortalidad de la totalidad de especímenes de larvas de instares 1-4 [141].

4.2.2. Expresión génica entre sexos

El factor sexo no tuvo un efecto significativo en la expresión relativa de los tres genes acorde al análisis con GLMs, con valores de p de 0.0404, 0.498 y 0.504 para DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90, respectivamente.

La expresión génica de proteínas de choque térmico comparada entre mariposas hembras y machos resultó no tener diferencias significativas, se puede teorizar que es debido a que ambos géneros comparten similares desafíos y estresores ambientales. Las mariposas, tanto hembras como machos están expuestas a cambios bruscos en la temperatura, especialmente durante la metamorfosis, y en diferentes ambientes. La expresión génica de proteínas de choque térmico puede ser regulada por diferentes factores ambientales y fisiológicos, como la edad, las condiciones ambientales, y otros factores que pueden ser una constante en ambos géneros [57,142]

4.2.3. Expresión génica entre tagmas

Los resultados de GLMs muestran que el factor tagma tuvo la mayor influencia en la variabilidad de la expresión relativa de los tres genes, con $p = 6.74 \times 10^{-7}$, 1.46×10^{-9} y 4.86×10^{-9} para DnaJ-1, DnaJ-5 y Hsp90, respectivamente, representando una significancia alta ($p < 0.001$).

La expresión génica entre tagmas presentó un patrón marcado, donde el abdomen tuvo la mayor expresión génica en todos los genes, seguido por la cabeza, y finalmente el tórax, mismo que presentó en la mayoría de los casos infrarregulación. El abdomen de las mariposas es la zona más expuesta a cambios bruscos de temperatura en relación con las demás partes del cuerpo, adicionalmente, almacenan en su interior los órganos vitales esenciales para la digestión, además del aparato reproductivo, por lo que pueden ser especialmente vulnerables al estrés térmico [143]. Por lo tanto, es posible que las mariposas tropicales hayan evolucionado para tener un mayor nivel de expresión génica de proteínas de choque térmico en el abdomen, priorizando la protección de sus órganos internos manteniendo su funcionamiento en condiciones ambientales extremas. En cuanto la expresión de los genes en estudio en la cabeza, la mayor producción de estas proteínas podría estar causado por una adaptación evolutiva que permite a la mariposa proteger los órganos sensoriales, tales como los ojos, órganos olfatorios, antenas y cerebro [144,145]. El estrés térmico en el tejido de la cabeza podría tener consecuencias en las actividades diarias como el vuelo y la alimentación.

La menor expresión de Hsps en el tórax de la mariposa puede darse debido a que es un tejido que no está directamente expuesto al calor como otros tejidos, están protegidos por las alas y las patas, y en el caso de otros Lepidópteros, suelen estar protegidos por pequeñas velocidades que permiten el intercambio de temperatura con el ambiente [143,145,146]. Otra posibilidad es que las mariposas tienen otros mecanismos de protección contra el estrés térmico en el tejido del tórax, Por ejemplo, el ajustar la posición de sus alas para controlar la cantidad de luz solar que reciben, lo que puede ayudar a mantener su temperatura corporal en niveles seguros [145]. Si la mariposa posee otros mecanismos de protección contra el estrés térmico en el tejido del tórax, y es posible que no necesite sobreexpresar las Hsps.

4.3. Expresión de genes Hsp40 y Hsp90 en otros estudios

Las Hsps tienen un papel crucial en el mantenimiento de la integridad celular y en la respuesta celular al estrés. Actúan como proteínas chaperonas y protegen la estructura correcta de otras proteínas evitando su agregación o desaturación. También pueden reparar proteínas dañadas y prevenir su degradación, contribuyendo así a la protección celular [147,148]. Las Hsps ayudan a proteger la integridad celular evitando la acumulación de proteínas dañadas y regulando la activación de las respuestas celulares al estrés. Además, pueden regular la respuesta inmunológica para proteger al organismo contra infecciones y lesiones. Las Hsps también tienen un papel en la regulación de la apoptosis,

protegiendo las células contra la muerte celular prematura y regulando el crecimiento y la división celular [72].

Los insectos presentan una tolerancia al estrés térmico limitada, por lo que las Hsps se comportan como un mecanismo de última línea para preservar al organismo. Las Hsps pueden ser expresadas en un menor o mayor grado dependiendo de la especie. El análisis transcripcional realizado en *S. frugiperda* muestra que la inducción del gen hsp90 solo ocurre 14°C por encima de las condiciones fisiológicas de crecimiento (42°C) [76,85].

En *D. melanogaster* se realizó un ensayo donde se estresaron con temperaturas bajas hasta inducir un coma, lo que resultó en la expresión de varios miembros de la familia Hsps, dentro de ellos Hsp40 [115], dichos resultados coinciden con aquellos obtenidos en esta investigación, donde se evidenció sobreexpresión en condiciones de estrés a 4 °C para los dos homólogos de Hsp40 (DnaJ-1 y DnaJ-5). En el mismo organismo, se efectuó una investigación donde se encontró que DnaJ-1 está infrarregulado en eventos de infección parasitaria con *Spiroplasma poulsonii* [149]. Por otra parte, en una investigación donde el objetivo fue analizar el ADNc de DnaJ-5 reveló una mayor expresión génica en huevos de *B. mori* a los cuáles se les indujo una diapausa (estado fisiológico de inactividad), que coincidían con los datos de expresión génica de Hsp70 [85].

4.4. Hsps y evolución

La familia de chaperonas Hsp son una familia de proteínas altamente conservada, incluso con procesos complejos de evolución y especiación. Estas proteínas mantienen su funcionalidad intacta incluso tras mutaciones aleatorias, siguen cumpliendo una función similar dentro de las diferentes ramificaciones [65,75]. Al analizar organismos de la familia Lepidóptera, se puede homologar la función de dichas proteínas en los demás órdenes de insectos, así marcando una línea de tendencia del comportamiento de adaptación mediante mecanismos genéticos. [150]

Las Hsps son proteínas que están presentes en todos los organismos y que desempeñan un papel crucial en la respuesta celular al estrés térmico. Las Hsps se activan cuando la temperatura corporal tiende a ser extrema, y suponen situaciones estresantes como infecciones, lesiones, radiación y otros tipos de estrés ambiental [151]. La evolución de las Hsps ha sido importante para la supervivencia de los organismos. Se ha demostrado que las Hsps han evolucionado para proteger las células y los organismos ante situaciones estresantes, lo que les permite sobrevivir y adaptarse a cambios ambientales. Por ejemplo,

algunas especies de peces y anfibios que viven en ambientes con temperaturas extremas han desarrollado Hsps específicas que les permiten adaptarse a estas condiciones adversas [152].

Se ha demostrado que las Hsps también juegan un papel importante en la evolución de los seres vivos. Algunos estudios han sugerido que las Hsps han evolucionado para proteger las células de los daños causados por la mutación y la recombinación génica, lo que les permite adaptarse a nuevos ambientes y sobrevivir. Las Hsps poseen un mecanismo para enmascarar mutaciones, cuando se sintetiza una proteína no funcional debido a una mutación por cambios en aminoácidos, las Hsps pueden brindar funcionalidad a esta proteína gracias a un plegamiento correcto [150]. Esto provoca un almacenamiento de mutaciones que no llegan a derivar en un fenotipo alterado. Sin embargo, cuando el organismo está sometido a condiciones de estrés, la función de las Hsps cambia y ya no se encargan de manera primaria a dar estructura tridimensional a proteínas sintetizadas *de novo*, sino que, ahora se encargan de volver a plegar proteínas que han sufrido daños a consecuencia del estrés térmico [115]. El cambio de prioridad de acción de las Hsps puede ocasionar la expresión fenotípica de mutaciones, así se demostró en algunos estudios en *Drosophila melanogaster*, donde las moscas que fueron criadas en condiciones de estrés térmico presentaron alteración en su conformación morfológica, además que estas mutaciones prevalecían transgeneracionalmente [153–155].

4.5. Hsp90 en la medicina

Hsp90 está implicado en procesos de señalización de células cancerígenas, estos estudios indican que estas chaperonas mantienen la homeostasis en ambientes de células cancerígenas. Varias proteínas oncogénicas responsables de la transformación de células a su forma cancerosa son clientes de la proteína Hsp90. El poner como objetivo a Hsp90 con inhibidores químicos debería degradar las proteínas oncogénicas, y entonces servir como un agente anticancerígeno útil [156]. Por otro lado, también se ha planteado que un desbalance entre la chaperona Hsp90 y sus co-chaperonas, podría ser responsable del plegamiento irregular de proteínas en neuronas, por lo que se plantea que en enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Huntington y adenopatías, el atacar a los factores que desbalancean la función de Hsp90 podrían ser terapias prometedoras [157,158] .

4.6. Investigaciones futuras

Las proteínas chaperonas DnaK (Hsp70), DnaJ (Hsp40), y GrpE (Hsp24) conforman un complejo que interactúa con los péptidos alfa-hélice (en proteínas representan las estructuras secundarias más frecuentes) conformando una parte importante en procesos de plegamiento de proteínas adicionalmente a la renaturalización proteica tras los efectos del estrés. No existen estudios donde se haya probado Hsp24 ante el estrés térmico, por lo que, enfocar los futuros estudios en GrpE, para conocer el comportamiento de su expresión génica como mecanismo de adaptación a condiciones de estrés, es de suma importancia para conocer el funcionamiento de la totalidad del complejo de chaperonas en *H. e. lativitta* [159].

CONCLUSIONES

La termotolerancia y la presencia de Hsp forman un papel fundamental en la supervivencia de los insectos. En el caso de *H. e. lativitta* se observó que los objetos de estudio generaron mayor cantidad de Hsps90 en condiciones de temperaturas bajas mientras que en condiciones de calor se generan mayoritariamente DnaJ-1 y DnaJ-5, lo que nos permite decir que estos insectos podrían adaptarse a cambios bruscos de temperatura en especial las hembras pues han presentado mayor expresión de los diferentes genes en tagmas.

La investigación de la expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en mariposas tiene una importancia ecológica significativa ya que estas proteínas están involucradas en la respuesta al estrés térmico, que es un factor clave para la supervivencia y distribución de las especies en un mundo en constante cambio climático. La capacidad de las mariposas para regular su respuesta al estrés térmico y mantener la integridad de sus proteínas es fundamental para su supervivencia y éxito reproductivo. La investigación de la expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en mariposas puede proporcionar información importante sobre la adaptación y plasticidad térmica de estas especies, lo que es esencial para predecir y comprender cómo las mariposas pueden responder a los cambios climáticos a largo plazo.

En conclusión, la investigación de la expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en respuesta al estrés térmico en *H. e. lativitta* ha proporcionado información valiosa sobre la capacidad de estas mariposas para regular su respuesta al estrés térmico y mantener la integridad de sus proteínas. Los resultados indican que la expresión de ambos genes aumenta en respuesta al estrés térmico, lo que sugiere que son proteínas clave en la respuesta de las mariposas al estrés. Además, se encontró que la expresión de Hsp90 fue más sensible al aumento de temperatura en comparación con Hsp40, lo que indica que puede jugar un papel más importante en la protección de las células y la supervivencia en condiciones de estrés térmico extremo, como las oleadas de calor que son cada vez más frecuentes. Por otro lado, los valores de EGA superiores de Hsp40 en condiciones de temperatura baja podría ser un factor evolutivo para la adaptación a ambientes de Amazonía alta y pie de páramo, que son parte del hábitat de *H. e. lativitta*.

Estos hallazgos son importantes porque proporcionan información sobre la capacidad de las mariposas para adaptarse a los cambios ambientales, especialmente en el contexto del cambio climático. El conocimiento de cómo las mariposas regulan su respuesta al estrés térmico puede ser utilizado para desarrollar estrategias de conservación efectivas para

estas especies y ayudar a predecir cómo responderán a los cambios ambientales en el futuro. Además, esta investigación también tiene implicaciones más amplias en la comprensión de los mecanismos de respuesta al estrés térmico en otros organismos y puede ayudar a informar la investigación sobre la adaptación y la plasticidad térmica en una amplia gama de especies.

RECOMENDACIONES

Sin duda resulta recomendable realizar estudios y ensayos con otras especies de insectos con objetivo de estudiar diferentes proteínas térmicas que pueden encontrarse en ellos. Asimismo, se podrían establecer estudios que determinen la supervivencia de la especie luego de someterles a condiciones extremas de temperatura. Con base en los hallazgos de la investigación de la expresión génica de Hsp40 y Hsp90 en respuesta al estrés térmico en *H. e. lativitta*, se pueden hacer algunas recomendaciones para investigaciones futuras. En primer lugar, sería beneficioso investigar cómo la expresión de estos genes varía en diferentes etapas del desarrollo de las mariposas, ya que esto podría proporcionar información sobre cómo se desarrolla la capacidad de las mariposas para responder al estrés térmico. Además, sería importante estudiar cómo la expresión de estos genes varía en diferentes poblaciones de mariposas, especialmente aquellas que se encuentran en ambientes con diferentes temperaturas.

Otra recomendación es investigar cómo otros factores ambientales, además de la temperatura, afectan la expresión de Hsp40 y Hsp90 en *H. e. lativitta*. Por ejemplo, se podría investigar cómo la exposición a la luz solar intensa, la falta de agua y la presencia de otros estresores ambientales afectan la expresión de estos genes. Esto podría proporcionar información valiosa sobre cómo las mariposas integran múltiples factores ambientales en su respuesta al estrés.

Por último, sería beneficioso investigar cómo la expresión de estos genes afecta la capacidad de las mariposas para tolerar y adaptarse a condiciones de estrés térmico a largo plazo. Para ello, se podrían realizar estudios de seguimiento de la sobrevivencia y reproducción de las mariposas expuestas a diferentes temperaturas, así como estudios de su capacidad para migrar a ambientes más adecuados en respuesta al cambio climático. En general, estas recomendaciones podrían ayudar a mejorar la comprensión de los mecanismos de respuesta al estrés térmico en *H. e. lativitta* y otras especies similares, y tener implicaciones importantes en la conservación de las especies y la adaptación al cambio climático.

REFERENCIAS

1. Barlow J, França F, Gardner TA, Hicks CC, Lennox GD, Berenguer E, et al. The future of hyperdiverse tropical ecosystems. *Nature* 2018 559:7715. 2018;559: 517–526. doi:10.1038/s41586-018-0301-1
2. Regina Capellotto Costa F, Alfredo Sampaio Zuanon J, Beggiato Baccaro F, Schietti de Almeida J, da Silva Menger J, Luiz Pereira Souza J, et al. EFFECTS OF CLIMATE CHANGE ON CENTRAL AMAZONIAN FORESTS: A TWO DECADES SYNTHESIS OF MONITORING TROPICAL BIODIVERSITY. *Oecologia Australis*. 2020;24: 317–335. doi:10.4257/oeco.2020.2402.07
3. Magrin GO. Adaptación al Cambio Climático en América Latina y el Caribe. *Cepal*. 2015;15: 80.
4. Sheldon KS. Climate Change in the Tropics: Ecological and Evolutionary Responses at Low Latitudes. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-025005>. 2019;50: 303–333. doi:10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110218-025005
5. Brodie J, Post E, Laurance WF. Climate change and tropical biodiversity: a new focus. *Trends Ecol Evol*. 2012;27: 145–150. doi:10.1016/J.TREE.2011.09.008
6. Radchuk V, Reed T, Teplitsky C, van de Pol M, Charmantier A, Hassall C, et al. Adaptive responses of animals to climate change are most likely insufficient. *Nature Communications* 2019 10:1. 2019;10: 1–14. doi:10.1038/s41467-019-10924-4
7. Bowler K, Terblanche JS. Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biological Reviews*. 2008;83: 339–355. doi:10.1111/J.1469-185X.2008.00046.X
8. Halleux V. Preparing the post-2020 biodiversity framework. Available: <http://www.eprs.ep.parl.union.eu>
9. Fischer K, Dierks A, Franke K, Geister TL, Liszka M, Winter S, et al. Environmental Effects on Temperature Stress Resistance in the Tropical Butterfly *Bicyclus Anynana*. *PLoS One*. 2010;5: e15284. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0015284
10. Parmesan C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys37091305110100>. 2006;37: 637–669. doi:10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.37.091305.110100
11. González-Tokman D, Córdoba-Aguilar A, Dáttilo W, Lira-Noriega A, Sánchez-Guillén RA, Villalobos F. Insect responses to heat: physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews*. 2020;95: 802–821. doi:10.1111/BRV.12588
12. Romo H, García-Barros E, Márquez AL, Moreno JC, Real R. Effects of climate change on the distribution of ecologically interacting species: butterflies and their main food

- plants in Spain. *Ecography*. 2014;37: 1063–1072. doi:10.1111/ECOG.00706
13. Navarro-Cano JA, Karlsson B, Posledovich D, Toftegaard T, Wiklund C, Ehrlén J, et al. Climate change, phenology, and butterfly host plant utilization. *Ambio*. 2015;44: 78–88. doi:10.1007/S13280-014-0602-Z/FIGURES/6
 14. Graça MB, Solis MA. Order Lepidoptera. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. 2018; 325–338. doi:10.1016/B978-0-12-804223-6.00011-1
 15. Pyle RM. Conservation of Lepidoptera in the United States. *Biol Conserv*. 1976;9: 55–75. doi:10.1016/0006-3207(76)90074-4
 16. Kaur N, Singh D. Studies on DNA barcoding of some Indian species of hawk moths (Lepidoptera: Sphingidae). *Journal of Entomological Research*. 2021;45: 39–46. doi:10.5958/0974-4576.2021.00006.2
 17. Engel MS, Kristensen NP. A history of entomological classification. *Annu Rev Entomol*. 2013;58: 585–607. doi:10.1146/ANNUREV-ENTO-120811-153536
 18. Capinera JL. *Encyclopedia of Entomology* (Google eBook). 2008; 4346. Available: <http://books.google.com/books?id=i9ITMiiohVQC&pgis=1>
 19. Parmesan C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37091305110100>. 2006;37: 637–669. doi:10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.37.091305.110100
 20. Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. The impact of climatic change on wild animals and plants: a meta-analysis. *Observed impacts of climate change*. 2002; 1115–1118.
 21. Romo H, García-Barros E, Márquez AL, Moreno JC, Real R. Effects of climate change on the distribution of ecologically interacting species: butterflies and their main food plants in Spain. *Ecography*. 2014;37: 1063–1072. doi:10.1111/ECOG.00706
 22. Brown KS. The Biology of *Heliconius* and Related Genera. *Annu Rev Entomol*. 1981;26: 427–457. doi:10.1146/annurev.en.26.010181.002235
 23. Montejo-Kovacevich G, Prof S, Jiggins C. Adaptation to altitude in *Heliconius* butterflies. 2021.
 24. Nadeau NJ, Pardo-Diaz C, Whibley A, Supple MA, Saenko S V., Wallbank RWR, et al. The gene cortex controls mimicry and crypsis in butterflies and moths. *Nature*. 2016;534: 106–110. doi:10.1038/NATURE17961
 25. Mérot C. La spéciation chez les papillons *Heliconius*: Importance relative du mimétisme et de la divergence écologique. <http://www.theses.fr>. 2014.
 26. 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
 27. van Zandt Brower A. Phylogeny of *Heliconius* Butterflies Inferred from Mitochondrial

- DNA Sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mol Phylogenet Evol.* 1994;3: 159–174. doi:10.1006/MPEV.1994.1018
28. Brower AVZ. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 6491–6495. doi:10.1073/PNAS.91.14.6491
 29. Counterman BA, Araujo-Perez F, Hines HM, Baxter SW, Morrison CM, Lindstrom DP, et al. Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in *Heliconius erato*. *PLoS Genet.* 2010;6: e1000796. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1000796
 30. Speci D. Genome-Wide Association Analyses Based on Broadly. 2017;206: 1791–1806. doi:10.1534/genetics.117.202259/-/DC1.1
 31. González-Rojas MF. Intra and inter-specific communication in *Heliconius*. 2021.
 32. Mallet J, Joron M. Evolution of diversity in warning color and mimicry: Polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annu Rev Ecol Syst.* 1999;30: 201–233. doi:10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.30.1.201
 33. Benson WW. Natural Selection for Müllerian Mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science* (1979). 1972;176: 936–939. doi:10.1126/SCIENCE.176.4037.936
 34. Nadeau NJ, Pardo-Diaz C, Whibley A, Supple MA, Saenko S v., Wallbank RWR, et al. The gene cortex controls mimicry and crypsis in butterflies and moths. *Nature.* 2016;534: 106–110. doi:10.1038/NATURE17961
 35. 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: 1817–1828. doi:10.1101/gr.159426.113
 36. Hay-Roe MM, Nation J. Spectrum of cyanide toxicity and allocation in *Heliconius erato* and *Passiflora* host plants. *J Chem Ecol.* 2007;33: 319–329. doi:10.1007/S10886-006-9234-5
 37. Londoño C. Fauna del Tolima presente en las cuencas hidrográficas de los ríos Coello, Totare, Recio, Lagunilla, Amoyá, Anamichú, Mendarco, Prado y quebrada Guanábano. [cited 20 Jul 2022]. doi:10.15472/ZVOSSV
 38. Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas AVL. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society.* 2011;102: 765–774. doi:10.1111/J.1095-8312.2010.01610.X
 39. Beccaloni George. Catalogue of the hostplants of the neotropical butterflies = Catálogo de las plantas huésped de las mariposas neotropicales. Monografías 3er cer Milenio. 2008.
 40. Menna-barreto Y, Aldo M. Evidence for Host Plant Preferences in *Heliconius*.

1986;24: 41–46.

41. Estrada C, Gilbert LE. Host plants and immatures as mate-searching cues in *Heliconius* butterflies. *Anim Behav.* 2010;80: 231–239. doi:10.1016/J.ANBEHAV.2010.04.023
42. Counterman BA, Araujo-Perez F, Hines HM, Baxter SW, Morrison CM, Lindstrom DP, et al. Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in *Heliconius erato*. *PLoS Genet.* 2010;6: e1000796. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1000796
43. Baxter SW, Nadeau NJ, Maroja LS, Wilkinson P, Counterman BA, Dawson A, et al. Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in the *Heliconius melpomene* Clade. *PLoS Genet.* 2010;6: e1000794. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1000794
44. Joron M, Jiggins CD, Papanicolaou A, McMillan WO. *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* 2006 97:3. 2006;97: 157–167. doi:10.1038/sj.hdy.6800873
45. Chris D. Jiggins. *The Ecology and Evolution of Heliconius Butterflies*. United Kingdom: Oxford University Press ; 2017. Available: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=rD_DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=criss+jiggins+heliconius+butterflies&ots=mAXP08tYUM&sig=2Fka5exAEjHPOjqQZRhyZ2VxIso#v=onepage&q=criss%20jiggins%20heliconius%20butterflies&f=false
46. Jiggins CD, McMillan WO, Neukirchen W, Mallet J. What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society.* 1996;59: 221–242. doi:10.1006/BIJL.1996.0063
47. Holzinger H, Holzinger R. *Heliconius and Related Genera: Lepidoptera Nymphalidae: the Genera Eueides, Neruda and Heliconius*. *Sciences nat*; 1994.
48. Supple MA, Papa R, Hines HM, McMillan WO, Counterman BA. Divergence with gene flow across a speciation continuum of *Heliconius* butterflies. *BMC Evol Biol.* 2015;15. doi:10.1186/S12862-015-0486-Y
49. Hygiene AC of MEAS of TM and. *Arthropod Containment Guidelines, Version 3.2. Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 2019;19: 152. doi:10.1089/VBZ.2018.2431
50. IUCN. Red List of Threatened Species. In: Versión 2021-3 [Internet]. 2021 [cited 17 Jul 2022]. Available: <https://www.iucnredlist.org/about/citationinfo>
51. Montejo-Kovacevich G, Martin SH, Meier JI, Bacquet CN, Monllor M, Jiggins CD, et al. Microclimate buffering and thermal tolerance across elevations in a tropical butterfly. *Journal of Experimental Biology.* 2020;223. doi:10.1242/jeb.220426

52. Nadeau NJ. Genes controlling mimetic colour pattern variation in butterflies. *Curr Opin Insect Sci.* 2016;17: 24–31. doi:10.1016/J.COIS.2016.05.013
53. Clench HK. Behavioral Thermoregulation in Butterflies. *Ecology.* 1966;47: 1021–1034. doi:10.2307/1935649
54. Watt WB. Adaptive Significance of Pigment Polymorphisms in *Colias* Butterflies. I. Variation of Melanin Pigment in Relation to Thermoregulation. *Evolution (N Y).* 1968;22: 437. doi:10.2307/2406873
55. Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas AVL. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society.* 2011;102: 765–774. doi:10.1111/J.1095-8312.2010.01610.X
56. Montejo-Kovacevich G, Salazar PA, Smith SH, Gavilanes K, Bacquet CN, Chan YF, et al. Genomics of altitude-associated wing shape in two tropical butterflies. *Molecular Ecology.* 2021. pp. 6387–6402. doi:10.1111/mec.16067
57. Kevan P, Arctic JS-, 1970 undefined. Behavioural thermoregulation by high arctic butterflies. JSTOR. [cited 26 Jul 2022]. Available: <https://www.jstor.org/stable/40507780>
58. Mena S, Kozak KM, Cárdenas RE, Checa MF. Forest stratification shapes allometry and flight morphology of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2020;287: 20201071. doi:10.1098/RSPB.2020.1071
59. Tsai CC, Childers RA, Nan Shi N, Ren C, Pelaez JN, Bernard GD, et al. Physical and behavioral adaptations to prevent overheating of the living wings of butterflies. *Nature Communications* 2020 11:1. 2020;11: 1–14. doi:10.1038/s41467-020-14408-8
60. Heinrich B. Thoracic Temperature Stabilization by Blood Circulation in a Free-Flying Moth. *Science (1979).* 1970;168: 580–582. doi:10.1126/SCIENCE.168.3931.580
61. Camino L. Expresión de los genes Hsp70 de un único exón como respuesta al estrés térmico en la mariposa tropical *Heliconius erato*. Universidad Regional Amazónica Ikiám. 2022.
62. Galárraga HG. Expresión de los genes de Hsp70 de varios exones como respuesta al estrés térmico en *Heliconius erato*. Universidad Regional Amazónica Ikiám. 2022.
63. Simonson WD, Miller E, Jones A, García-Rangel S, Thornton H, McOwen C. Enhancing climate change resilience of ecological restoration — A framework for action. *Perspect Ecol Conserv.* 2021;19: 300–310. doi:10.1016/J.PECON.2021.05.002
64. Dong Y wei, Zhang S. Ecological relevance of energy metabolism: transcriptional responses in energy sensing and expenditure to thermal and osmotic stresses in an intertidal limpet. *Funct Ecol.* 2016;30: 1539–1548. doi:10.1111/1365-2435.12625

65. Llorca O, Carrascosa J, Valpuesta J. Las chaperoninas: Máquinas plegadoras de proteínas. *Ciencia al Día internacional Ciencias Biológicas Biología celular*. 2001.
66. Bauerfeind SS, Sørensen JG, Loeschcke V, Berger D, Broder ED, Geiger M, et al. Geographic variation in responses of European yellow dung flies to thermal stress. *J Therm Biol*. 2018;73: 41–49. doi:10.1016/J.JTHERBIO.2018.01.002
67. Zhao L, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Expression of aeaHsp26 and aeaHsp83 in *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and pupae in response to heat shock stress. *J Med Entomol*. 2010;47: 367–375. doi:10.1603/ME09232
68. Maleki F, Khosravi A, Nasser A, Taghinejad H, Azizian M. Bacterial Heat Shock Protein Activity. *J Clin Diagn Res*. 2016;10: BE01. doi:10.7860/JCDR/2016/14568.7444
69. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8: 309. doi:10.1379/1466-1268(2003)008<0309:mfrohf>2.0.co;2
70. Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2006 63:22. 2006;63: 2560–2570. doi:10.1007/S00018-006-6192-6
71. Huang LH, Wang HS, Kang L. Different evolutionary lineages of large and small heat shock proteins in eukaryotes. *Cell Research* 2008 18:10. 2008;18: 1074–1076. doi:10.1038/cr.2008.283
72. Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2015;1854: 291–319. doi:10.1016/J.BBAPAP.2014.12.019
73. Jackson SE. Hsp90: Structure and Function. 2012; 155–240. doi:10.1007/128_2012_356
74. Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823: 698–706. doi:10.1016/J.BBAMCR.2011.11.007
75. Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2004;3: 1530–1536. doi:10.4161/CC.3.12.1277
76. Landais I, Pommet JM, Mita K, Nohata J, Gimenez S, Fournier P, et al. Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the *Lepidoptera Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene*. 2001;271: 223–231. doi:10.1016/S0378-1119(01)00523-6
77. Shen J, Li M, Chen N, Wang J, Wan F, others. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of Hsp90 gene in the codling moth, *Cydia pomonella*

- (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*. 2011;54: 1236–1248.
78. Zhai H, Jiang X, Luo L, others. Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*. 2010;53: 20–28.
 79. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:7. 2010;11: 515–528. doi:10.1038/nrm2918
 80. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8: 309. doi:10.1379/1466-1268(2003)008<0309:mfrohf>2.0.co;2
 81. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998;92: 351–366. doi:10.1016/S0092-8674(00)80928-9
 82. Rüdiger S, Schneider-Mergener J, Bukau B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J*. 2001;20: 1042–1050. doi:10.1093/EMBOJ/20.5.1042
 83. Jiang F, Chang G, Li Z, Abouzaid M, Du X, Hull JJ, et al. The HSP/co-chaperone network in environmental cold adaptation of *Chilo suppressalis*. *Int J Biol Macromol*. 2021;187: 780–788. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.113
 84. Liu Y, Su H, Li R, Li X, Xu Y, Dai X, et al. Comparative transcriptome analysis of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reveals novel insights into heat stress tolerance in insects. *BMC Genomics*. 2017;18: 1–13. doi:10.1186/s12864-017-4355-5
 85. Sirigineedi S, Vijayagowri E, Murthy GN, Rao G, Ponnuvel KM. Molecular characterization of DnaJ 5 homologs in silkworm *Bombyx mori* and its expression during egg diapause. *Insect Sci*. 2014;21: 677–686. doi:10.1111/1744-7917.12048
 86. Lyra A, Imbach P, Rodriguez D, Chou SC, Georgiou S, Garofolo L. Projections of climate change impacts on central America tropical rainforest. *Clim Change*. 2017;141: 93–105. doi:10.1007/s10584-016-1790-2
 87. Montejo Kovacevich MG. Adaptation to altitude in *Heliconius* butterflies. 2021 [cited 5 Apr 2023]. doi:10.17863/CAM.68209
 88. Boersma N, Boardman L, Gilbert M, Terblanche JS. Sex-dependent thermal history influences cold tolerance, longevity and fecundity in false codling moth *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Agric For Entomol*. 2018;20: 41–50. doi:10.1111/AFE.12227
 89. Entomology JC-E, 1991 undefined. Heat transfer and body temperature in honey bee (Hymenoptera: Apidae) drones and workers. *academic.oup.com*. 1991;20: 1627–1635. Available: <https://academic.oup.com/ee/article-abstract/20/6/1627/2394365>

90. Chen IC, Hill JK, Ohlemüller R, Roy DB, Thomas CD. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science* (1979). 2011;333: 1024–1026. doi:10.1126/SCIENCE.1206432/SUPPL_FILE/CHEN.SOM.PDF
91. Hamer KC, Hill JK, Benedick S, Mustaffa N, Sherratt TN, Maryati M, et al. Ecology of butterflies in natural and selectively logged forests of northern Borneo: The importance of habitat heterogeneity. *Journal of Applied Ecology*. 2003;40: 150–162. doi:10.1046/J.1365-2664.2003.00783.X
92. Pellmyr O. Evolution of insect pollination and angiosperm diversification. *Trends Ecol Evol*. 1992;7: 46–49. doi:10.1016/0169-5347(92)90105-K
93. Beteta Hernández CI. Redes de interacciones entre mariposas y plantas en un gradiente de urbanización en el área metropolitana de Pachuca, Hidalgo, México. 2018.
94. Urban MC, Bocedi G, Hendry AP, Mihoub JB, Pe'er G, Singer A, et al. Improving the forecast for biodiversity under climate change. *Science* (1979). 2016;353. doi:10.1126/SCIENCE.AAD8466/SUPPL_FILE/URBAN.SM.PDF
95. Morán-Tejeda E, Bazo J, López-Moreno JI, Aguilar E, Azorín-Molina C, Sanchez-Lorenzo A, et al. Climate trends and variability in Ecuador (1966–2011). *International Journal of Climatology*. 2016;36: 3839–3855. doi:10.1002/JOC.4597
96. Celerander MC, Goldstone J v., Denslow ND, Iguchi T, Kille P, Meyerhoff RD, et al. Species extrapolation for the 21st century. *Environ Toxicol Chem*. 2011;30: 52–63. doi:10.1002/ETC.382
97. Ikiam Meteorological service. Meteorological and hydrological network. In: Meteoviewer. Tena: Universidad Regional Amazónica Ikiam; 2020.
98. Luna JM. Técnicas de colecta y preservación de insectos. 2005;37.
99. James DG, James TS, Seymour L, Kappen L, Russell T, Harryman B, et al. Citizen Scientist Tagging Reveals Destinations of Migrating Monarch Butterflies, *Danaus plexippus* (L.) from the Pacific Northwest. *J Lepid Soc*. 2018;72: 127–144. doi:10.18473/lepi.v72i2.a5
100. Checa MF, Donoso DA, Rodriguez J, Levy E, Warren A, Willmott K. Combining sampling techniques aids monitoring of tropical butterflies. *Insect Conserv Divers*. 2019;12: 362–372. doi:10.1111/ICAD.12328
101. Montero JJMR. Manual para el manejo de mariposarios. Editorial INBio; 2007.
102. Andersson S, Dobson HEM. Behavioral Foraging Responses by the Butterfly *Heliconius melpomene* to Lantana camara Floral Scent. *Journal of Chemical Ecology* 2003 29:10. 2003;29: 2303–2318. doi:10.1023/A:1026226514968
103. Barbola IDF, Laroca S, De Almeida MC, Do Nascimento EA. Floral biology of *Stachytarpheta maximiliani* Scham. (Verbenaceae) and its floral visitors. *Rev Bras*

Entomol. 2006;50: 498–504. doi:10.1590/S0085-56262006000400010

104. Loew E. Wing color and mating preferences of *Heliconius sara*. Tropical Ecology and Conservation [Monteverde Institute]. 2007 [cited 5 Apr 2023]. Available: https://digitalcommons.usf.edu/tropical_ecology/541
105. Kerpel SM, Moreira GRP. Absence of Learning and Local Specialization on Host Plant Selection by *Heliconius erato*. Journal of Insect Behavior 2005 18:3. 2005;18: 433–452. doi:10.1007/S10905-005-3701-7
106. Beccaloni George. Catalogue of the hostplants of the neotropical butterflies = Catálogo de las plantas huésped de las mariposas neotropicales. Monografías 3er Milenio. 2008.
107. Rodrigues D, Moreira GRP. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. J Lepid Soc. 2000;53: 108–113.
108. Gilbert LE. Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1972;69: 1403–1407. doi:10.1073/PNAS.69.6.1403
109. Kerpel SM, Moreira GRP. Absence of Learning and Local Specialization on Host Plant Selection by *Heliconius erato*. Journal of Insect Behavior 2005 18:3. 2005;18: 433–452. doi:10.1007/S10905-005-3701-7
110. Rodrigues D, Moreira GRP. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. J Lepid Soc. 2000;53: 108–113.
111. Rodrigues D, Moreira GRP. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. Brazilian Journal of Biology. 2002;62: 321–332. doi:10.1590/S1519-69842002000200016
112. Carolina Millán J, Patricia Chacón C, Corredor G. Desarrollo, longevidad y oviposición de *Heliconius charithonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) en dos especies de Passiflora. Rev Colomb Entomol. 2010;36: 158–164.
113. Gilbert LE. Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1972;69: 1403–1407. doi:10.1073/PNAS.69.6.1403
114. Montejo-Kovacevich G, Martin SH, Meier JI, Bacquet CN, Monllor M, Jiggins CD, et al. Microclimate buffering and thermal tolerance across elevations in a tropical butterfly. Journal of Experimental Biology. 2020;223. doi:10.1242/jeb.220426
115. Colinet H, Lee SF, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. FEBS J.

2010;277: 174–185. doi:10.1111/J.1742-4658.2009.07470.X

116. Challis RJ, Kumar S, Dasmahapatra KKK, Jiggins CD, Blaxter M. Lepbase: the Lepidopteran genome database. *bioRxiv*. 2016; 056994. doi:10.1101/056994
117. Joseph Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth edition. Green M, editor. Cold Spring Harbor: CSHL press; 2012.
118. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010;50: S1–S5. doi:10.1016/J.YMETH.2010.01.005
119. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*. 2017;14: 19–28. doi:10.1016/J.BDQ.2017.11.001
120. 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
121. 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
122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25: 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262
123. Piron Prunier F, Chouteau M, Whibley A, Joron M, Llaurens V. Selection of Valid Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Analysis in *Heliconius numata* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Science*. 2016;16. doi:10.1093/JISESA/IEW034
124. 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
125. Hellemans J, Mortier G, de Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2008;8: 1–14. doi:10.1186/GB-2007-8-2-R19/COMMENTS
126. Shakeel M, Rodriguez A, Tahir U bin, Jin F. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects. *Biotechnol Lett*. 2018;40: 227–236. doi:10.1007/S10529-017-2465-4/METRICS
127. Aminisarteshnizi M. Comparison between two different DNA extraction methods to obtain high DNA quality from *Astacus leptodactylus*. *Egypt J Aquat Biol Fish*. 2022;26: 489–494. doi:10.21608/EJABF.2022.231706
128. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition.

Argentine J, Irwin N, editors. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; 4.35. Available: https://books.google.com/books/about/Molecular_Cloning.html?hl=es&id=Bosc5JVxNpkC

129. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989.
130. Bar T, Kubista M, Tichopad A. Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2012;40: 1395–1406. doi:10.1093/NAR/GKR778
131. Sarkar SL, Alam ASMRU, Das PK, Pramanik MHA, Al-Emran HM, Jahid IK, et al. Development and validation of cost-effective one-step multiplex RT-PCR assay for detecting the SARS-CoV-2 infection using SYBR Green melting curve analysis. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022;12: 1–13. doi:10.1038/s41598-022-10413-7
132. He P, Zhang YF, Hong DY, Wang J, Wang XL, Zuo LH, et al. A reference gene set for sex pheromone biosynthesis and degradation genes from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, based on genome and transcriptome digital gene expression analyses. *BMC Genomics.* 2017;18. doi:10.1186/S12864-017-3592-Y
133. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 2000;29: 332–337. doi:10.2144/00292RV02
134. 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/BIBTEX
135. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39: 674–679. doi:10.1111/J.1440-1681.2011.05599.X
136. Montejo-Kovacevich G, Salazar PA, Smith SH, Gavilanes K, Bacquet CN, Chan YF, et al. Genomics of altitude-associated wing shape in two tropical butterflies. *Mol Ecol.* 2021;30: 6387–6402. doi:10.1111/MEC.16067
137. Karl I, Janowitz SA, Fischer K. Altitudinal life-history variation and thermal adaptation in the copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Oikos.* 2008;117: 778–788. doi:10.1111/J.0030-1299.2008.16522.X
138. 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
139. Foster NL, Lukowiak K, Henry TB. Time-related expression profiles for heat shock protein gene transcripts (HSP40, HSP70) in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* exposed to thermal stress. <http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=kcib20&page=instructions>. 2015;8. doi:10.1080/19420889.2015.1040954

140. HuiFang Z, XingFu J, LiZhi L. Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*. 2010;53: 20–28.
141. JianRu S, MingFu L, NaiZhong C, JinJun W, FangHao W. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of Hsp90 gene in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*. 2011;54: 1236–1248.
142. Gidalevitz T, Prahlad V, Morimoto RI, Morimoto R, Selkoe D, Kelly J. The Stress of Protein Misfolding: From Single Cells to Multicellular Organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3: a009704. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A009704
143. Casey TM. Thermoregulation and Heat Exchange. *Adv In Insect Phys*. 1988;20: 119–146. doi:10.1016/S0065-2806(08)60024-7
144. Guertin MJ, Petesch SJ, Zobeck KL, Min IM, Lis JT. *Drosophila* heat shock system as a general model to investigate transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75: 1–9. doi:10.1101/SQB.2010.75.039
145. Tsai CC, Childers RA, Nan Shi N, Ren C, Pelaez JN, Bernard GD, et al. Physical and behavioral adaptations to prevent overheating of the living wings of butterflies. *Nature Communications* 2020 11:1. 2020;11: 1–14. doi:10.1038/s41467-020-14408-8
146. Cuthill IC, Allen WL, Arbuckle K, Caspers B, Chaplin G, Hauber ME, et al. The biology of color. *Science* (1979). 2017;357: eaan0221. doi:10.1126/science.aan0221
147. Mel'nikov EE, Rotanova T V. Molecular chaperones. *A Rev Biochem*. 1991;60: 321–347. doi:10.1146/annurev.bi.60.070191.001541
148. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 1994 371:6498. 1994;371: 578–586. doi:10.1038/371578a0
149. Alvear VMH, Mateos M, Cortez D, Tamborindéguy C, Martinez-Romero E. Differential gene expression in a tripartite interaction: *Drosophila*, *Spiroplasma* and parasitic wasps. *PeerJ*. 2021;9: e11020. doi:10.7717/PEERJ.11020/SUPP-14
150. Yahara I. The role of HSP90 in evolution. *Genes to Cells*. 1999;4: 375–379. doi:10.1046/J.1365-2443.1999.00271.X
151. Colinet H, Lee SF, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J*. 2010;277: 174–185. doi:10.1111/J.1742-4658.2009.07470.X
152. Iwama GK, Afonso LOB, Todgham A, Ackerman P, Nakano K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*. 2004;207: 15–19. doi:10.1242/JEB.00707
153. Kasinathan B, Ahmad K, Malik HS. Waddington Redux: De Novo Mutations Underlie

the Genetic Assimilation of Stress-Induced Phenocopies in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2017;207: 49–51. doi:10.1534/GENETICS.117.205039

154. The development of the bristles in normal and some mutant types of *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1942;131: 87–110. doi:10.1098/RSPB.1942.0019
155. Pigliucci M. Epigenetics is back! Hsp90 and phenotypic variation. *Cell Cycle*. 2003;2: 34–35. doi:10.4161/CC.2.1.274
156. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *British Journal of Cancer* 2009 100:10. 2009;100: 1523–1529. doi:10.1038/sj.bjc.6605066
157. Koren J, Blagg BSJ. The Right Tool for the Job: An Overview of Hsp90 Inhibitors. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1243: 135–146. doi:10.1007/978-3-030-40204-4_9/COVER
158. Bohush A, Bieganski P, Filipek A. Hsp90 and Its Co-Chaperones in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 4976. 2019;20: 4976. doi:10.3390/IJMS20204976
159. Bischofberger P, Han W, Feifel B, Schönfeld HJ, Christen P. D-Peptides as inhibitors of the DnaK/DnaJ/GrpE chaperone system. *J Biol Chem*. 2003;278: 19044–19047. doi:10.1074/JBC.M300922200

ANEXOS

Cuantificación de concentraciones de ARN

Anexo A. Tabla de concentraciones de ARN total extraído

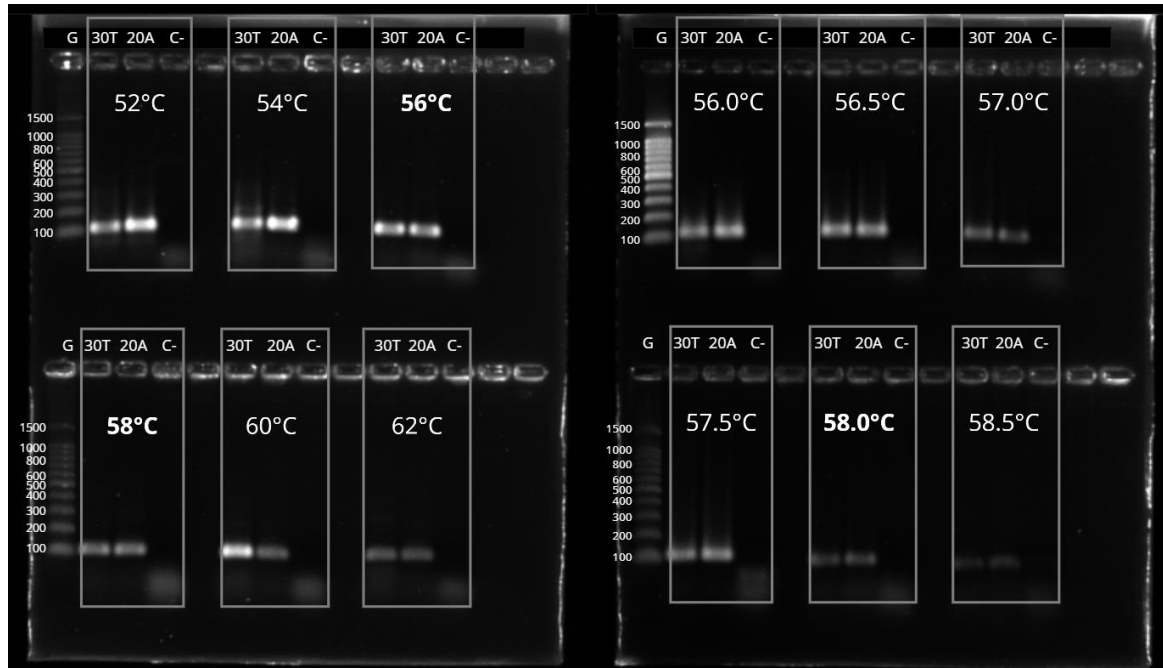
Muestra	ID	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con (ng/ul)	A260/280	A260/230
1	01.H	Cabeza	Frío	Hembra	273.7	2.04	1.8
2	01.T	Tórax	Frío	Hembra	338.7	2.14	1.78
3	01.A	Abdomen	Frío	Hembra	256.9	2.04	1.82
4	02.H	Cabeza	Frío	Hembra	323.1	2.03	1.76
5	02.T	Tórax	Frío	Hembra	506.5	2.21	1.77
6	02.A	Abdomen	Frío	Hembra	209	1.22	1.45
7	03.H	Cabeza	Frío	Hembra	534.9	2.01	1.66
8	03.T	Tórax	Frío	Hembra	101.1	2.12	1.83
9	03.A	Abdomen	Frío	Hembra	167.8	1.78	1.82
10	04.H	Cabeza	Control	Hembra	37.3	1.93	1.17
11	04.T	Tórax	Control	Hembra	161.9	2.17	2.02
12	04.A	Abdomen	Control	Hembra	313	1.99	1.64
13	05.H	Cabeza	Control	Hembra	65.7	1.99	1.87
14	05.T	Tórax	Control	Hembra	85.5	2.11	1.75
15	05.A	Abdomen	Control	Hembra	419.5	2.15	1.81
16	06.H	Cabeza	Control	Hembra	81.7	1.95	0.87
17	06.T	Tórax	Control	Hembra	22.1	1.92	1.88
18	06.A	Abdomen	Control	Hembra	146.6	1.92	1.87
19	08.H	Cabeza	Frío	Macho	252.8	1.92	2.1
20	08.T	Tórax	Frío	Macho	190.6	2.19	1.98
21	08.A	Abdomen	Frío	Macho	93.3	2.08	1.55
22	09.H	Cabeza	Frío	Macho	412.5	2.09	1.76
23	09.T	Tórax	Frío	Macho	325.6	2.21	2.24
24	09.A	Abdomen	Frío	Macho	366.2	2.11	2.17
25	10.H	Cabeza	Frío	Macho	84.9	1.97	1.72
26	10.T	Tórax	Frío	Macho	85.6	2.06	1.87
27	10.A	Abdomen	Frío	Macho	122.6	1.98	1.78

Muestra	ID	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con (ng/ul)	A260/280	A260/230
28	12.H	Cabeza	Control	Macho	306.1	2.08	1.99
29	12.T	Tórax	Control	Macho	689.1	2.21	1.91
30	12.A	Abdomen	Control	Macho	142.6	1.59	1.61
31	13.H	Cabeza	Control	Macho	518.9	2.11	1.88
32	13.T	Tórax	Control	Macho	476.9	2.25	1.97
33	13.A	Abdomen	Control	Macho	251	2.13	1.65
34	14.H	Cabeza	Control	Macho	510.5	2.03	2.08
35	14.T	Tórax	Control	Macho	335.1	2.24	1.85
36	14.A	Abdomen	Control	Macho	743.4	2.19	2.01
37	17.H	Cabeza	Calor	Hembra	437.4	2.13	1.89
38	17.T	Tórax	Calor	Hembra	240.7	2.23	2.06
39	17.A	Abdomen	Calor	Hembra	235.2	2.12	2.21
40	18.H	Cabeza	Calor	Hembra	263.2	2.09	1.72
41	18.T	Tórax	Calor	Hembra	254.8	2.21	1.88
42	18.A	Abdomen	Calor	Hembra	506.1	2.05	2.22
43	19.H	Cabeza	Calor	Hembra	104	2.2	1.19
44	19.T	Tórax	Calor	Hembra	67.6	2.18	1.88
45	19.A	Abdomen	Calor	Hembra	371.9	2.19	1.69
46	23.H	Cabeza	Calor	Macho	143.1	2.19	2.28
47	23.T	Tórax	Calor	Macho	145.4	2.23	1.87
48	23.A	Abdomen	Calor	Macho	120.5	2.18	1.26
49	24.H	Cabeza	Calor	Macho	472	2.13	1.77
50	24.T	Tórax	Calor	Macho	301.6	2.22	2.01
51	24.A	Abdomen	Calor	Macho	1003.8	2.15	2.26
52	25.H	Cabeza	Calor	Macho	253.6	2.15	1.96
53	25.T	Tórax	Calor	Macho	517.4	2.24	1.83
54	25.A	Abdomen	Calor	Macho	678.9	2.16	1.73

Realizado por: Ojeda, Ángel, 2023.

Geles de electroforesis

Estandarización de temperaturas de annealing de primers



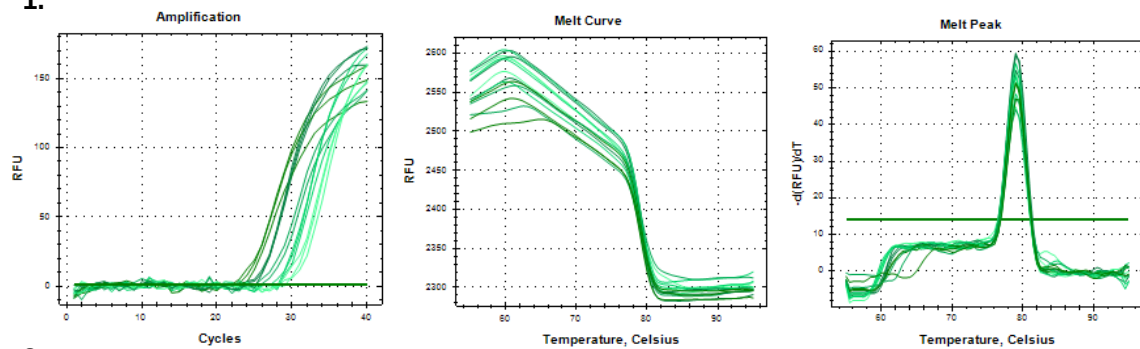
Anexo B. Ejemplo de estandarización de perfil térmico, primer **Hsp90 F1-R1**. Electroforesis con gel de agarosa de 2%. *ADNc de H. e. lativitta*. Tamaño de amplicón esperado: 112 pb. Temperatura de *annealing* experimental obtenida: 58 °C.

Elaborado por: Ojeda, Ángel. 2023.

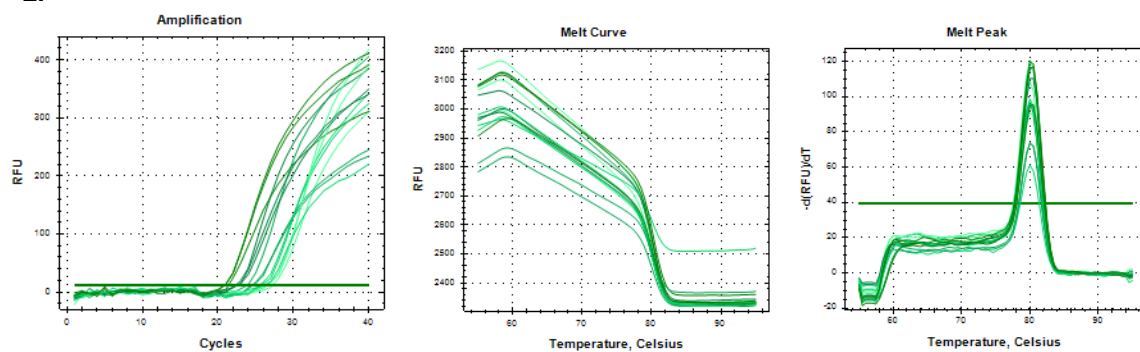
Validación de primers para PCR en tiempo real

Curvas de *melting* de primers

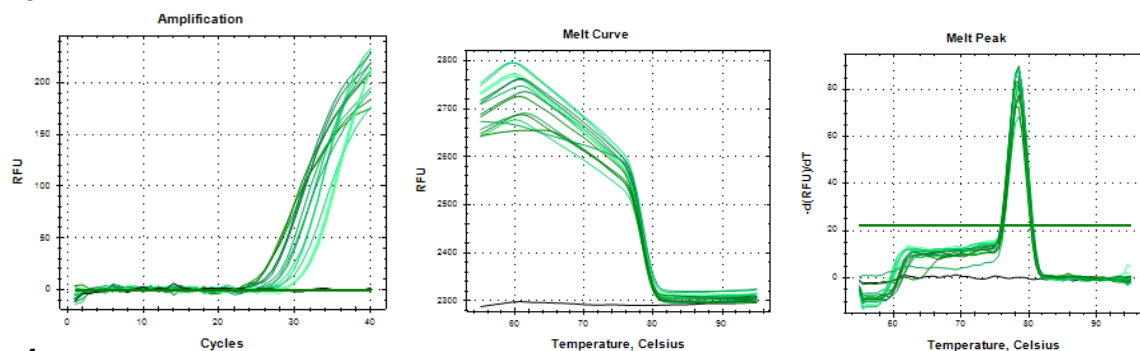
1.



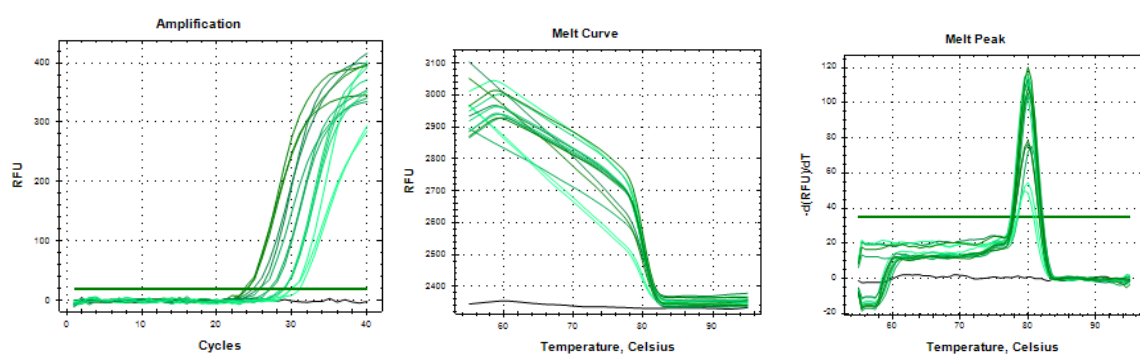
2.



3.



4.

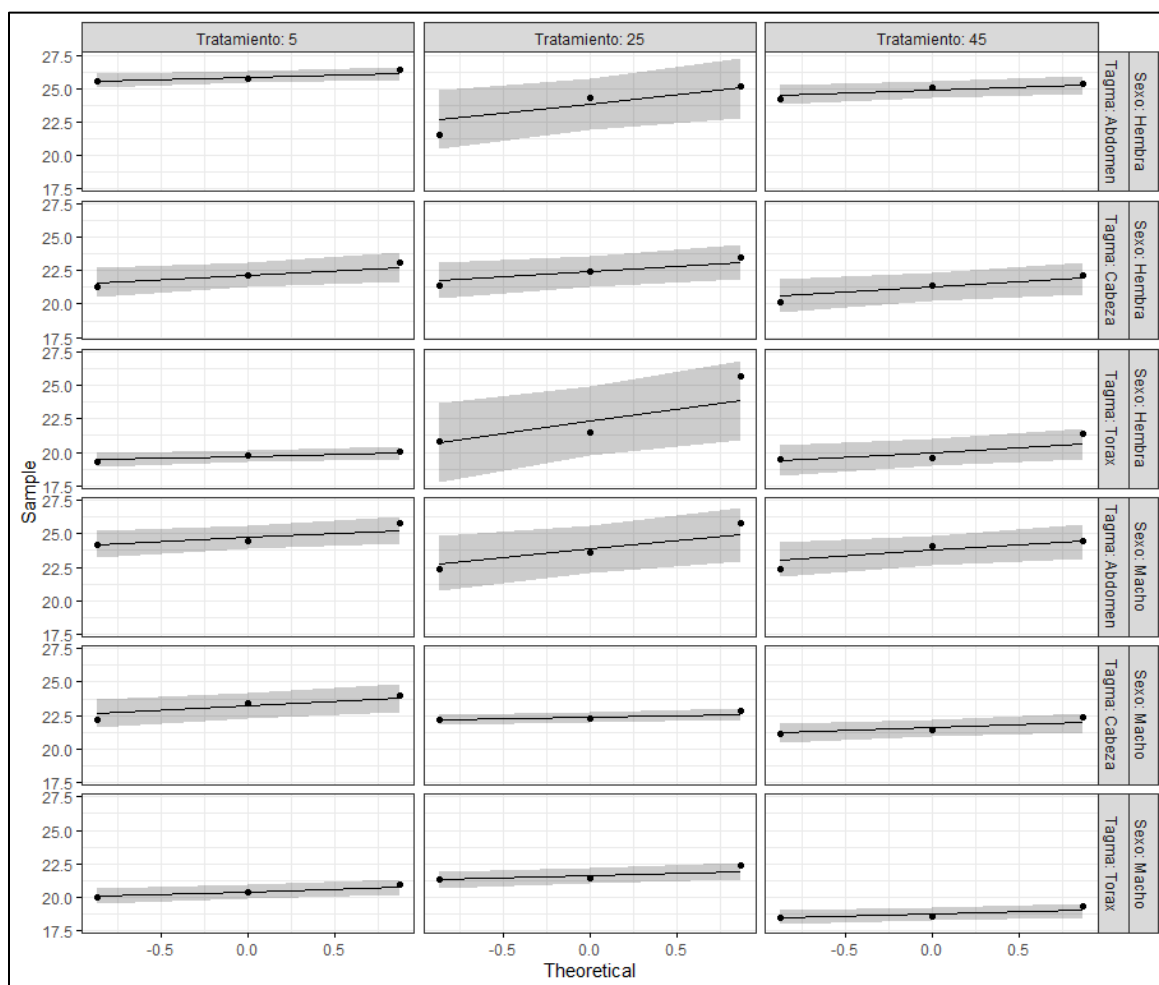


Anexo C.

Curvas de PCR en tiempo real para validación de los primers: **1.** GAPDH, **2.** DnaJ-1, **3.** DnaJ-5 y **4.** Hsp90. Elaborado con diluciones seriadas de ADNg de *H. e. lativitta* (degradado verde), control negativo (negro). Izquierda: Curva de amplificación. Centro: Curva de *melting*. Derecha: Pico de *melting*.

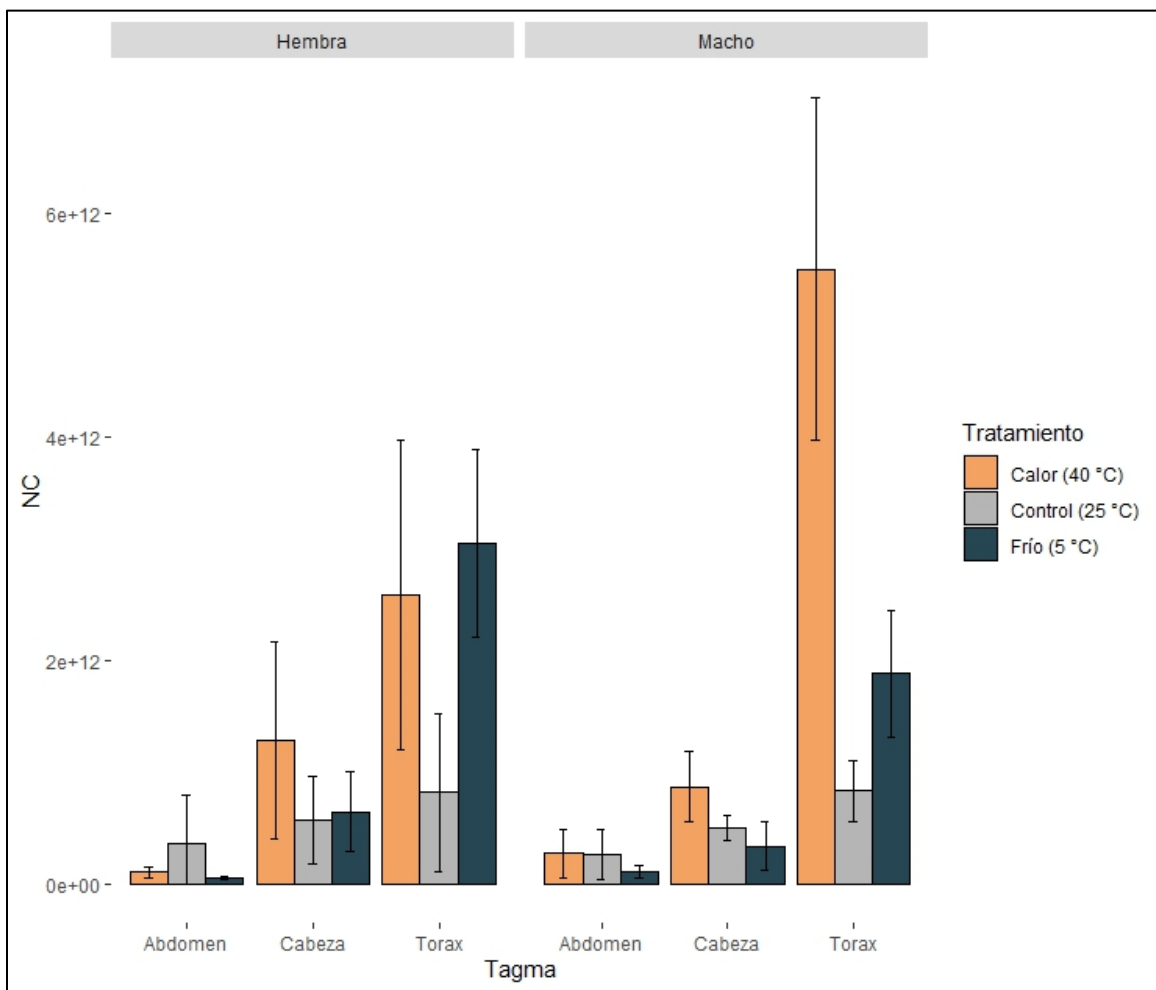
Elaborado por: Ojeda, Angel. 2023. CFX Maestro.

Análisis de normalidad el gen de referencia



Anexo D. Gráfico Q-Q de normalidad de para los valores C_t del gen de referencia **GAPDH**.
Elaborado por: Ojeda, Ángel. 2023. R Project.

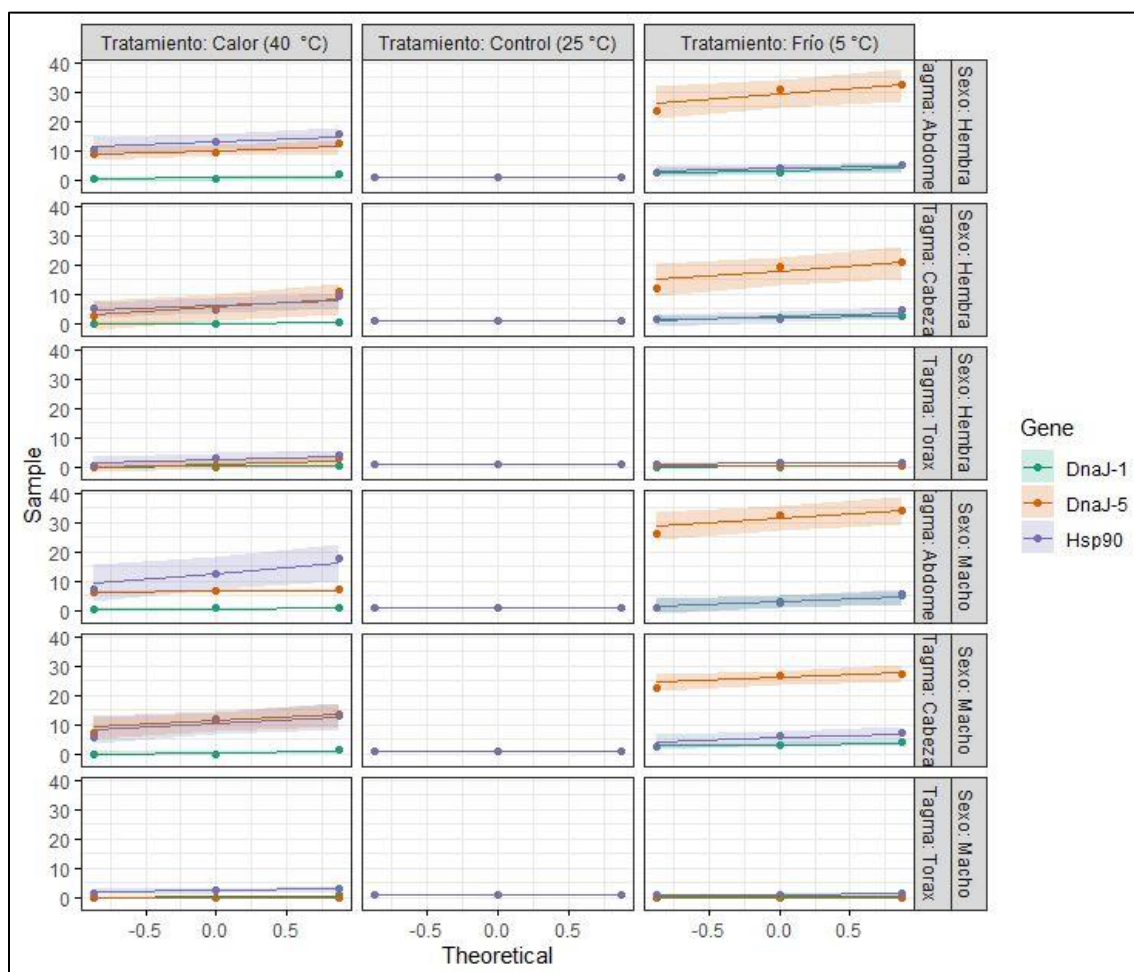
Cuantificación génica absoluta



Anexo E. Expresión génica relativa (EGA) del gen de referencia **GAPDH** con los factores tagma, sexo y tratamiento.

Elaborado por: Ojeda, Ángel. 2023. R Project.

Análisis de normalidad de la expresión génica relativa



Anexo F. Gráfico Q-Q de normalidad de para el EGR de los genes de interés **DnaJ-1**, **DnaJ-5** y **Hsp90**.

Elaborado por: Ojeda, Angel. 2023. R Project.