

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación y divergencia de los dominios proteicos de la familia Hsp
(Heat shock protein) en los genomas de *Drosophila mesophragmatica*,
Drosophila cashapamba y *Drosophila machachensis***

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

MARÍA JULIA CHACÓN PAZMIÑO

Quito, 2020

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. María Julia Chacón Pazmiño ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Doris Vela Peralta
Directora de la disertación
Quito, 04 de julio del 2020

A mi madre, tía y todos los seres queridos que hacen parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El mayor agradecimiento y gratitud para la Dra. Doris Vela y al Dr. Romain Guyot, quienes supieron transmitirme muchos de sus conocimientos con gran cariño, dedicación, paciencia y esfuerzo.

A La Facultad de Ingeniería y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, las cuales en conjunto facilitaron los equipos, programas e instalaciones necesarias para la realización de este trabajo de disertación.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que estuvieron siempre dispuestos a aclarar cualquier duda sobre sus materias.

A todas las personas que forman parte de mi vida.

A mi madre y tía por creer siempre en mí, apoyándome y dándome ánimo en momentos difíciles.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador quien financió a través del proyecto “Mecanismos de diversificación y adaptación en especies andinas del género *Drosophila* en el Ecuador”, llevado a cabo en el Laboratorio de Genética Evolutiva, a cargo de la Dra. Doris Vela; sin su apoyo, este trabajo no habría sido factible.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 OBJETIVOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 BASE DE DATOS DE GENES HSP EN GÉNERO <i>DROSOPHILA</i>	10
4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES HSP EN <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i>	10
4.3 BUSQUEDA MEGABLAST DE NUCLEOTIDO-NUCLEOTIDO ENTRE <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LA BASE DE DATOS DEL NCBI.....	11
4.4 ALINEAMIENTO Y COMPARACIÓN DE GENES HSP ENTRE <i>Drosophila</i> <i>mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Drosophila</i> OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI.....	12
4.5 TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS HSP EN <i>Drosophila</i> <i>mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Drosophila</i> OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI.....	12
4.6 CLASIFICACIÓN DE <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D.</i> <i>machachensis</i> , <i>D. arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> Y <i>D. serrata</i> EN LAS REGIONES GEOGRÁFICAS Y ALTITUDES EN LAS QUE HABITAN ESTAS ESPECIES.....	13
4.7 ANÁLISIS DE DIVERGENCIA DE LOS DOMINIOS PROTEICOS HSP EN FUNCIÓN A LA REGIÓN GEOGRÁFICA EN LA QUE HABITAN <i>Drosophila</i> <i>mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LAS ESPECIES SELECCIONADAS DEL NCBI.....	13
5. RESULTADOS.....	15
5.1 BASE DE DATOS DE LOS GENES <i>HSP</i> PRESENTES EN NCBI DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>Drosophila</i>	15
5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>HSP</i> EN <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> Y <i>D. machachensis</i>	16
5.3 BUSQUEDA MEGABLAST DE NUCLEOTIDO-NUCLEOTIDO ENTRE <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LA BASE DE DATOS DEL NCBI.....	18
5.4 TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS HSP EN <i>D. mesophragmatica</i> , <i>D.</i> <i>cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Drosophila</i> OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI.....	18
5.5 ANÁLISIS DE DIVERGENCIA DE LOS DOMINIOS PROTEICOS HSP EN FUNCIÓN A LA REGIÓN GEOGRÁFICA EN LA QUE HABITAN <i>Drosophila</i> <i>mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> , <i>D. machachensis</i> Y LAS ESPECIES SELECCIONADAS DEL NCBI.....	21

6. DISCUSIÓN	26
6.1 Relación de la divergencia de los small Hsp respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i> incluyendo en el análisis a <i>D. arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> y <i>D. serrata</i>	26
6.2 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 68 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i> incluyendo en el análisis a <i>D. arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> y <i>D. serrata</i>	34
6.3 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 70 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i> incluyendo en el análisis a <i>D. arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> y <i>D. serrata</i>	35
6.4 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 83 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan <i>D. mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i> incluyendo en el análisis a <i>D. arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> y <i>D. serrata</i>	36
6.5 Importancia de las proteínas Hsp en la adaptación a diferentes regiones geográficas en especies del género <i>Drosophila</i>	36
6.6 Importancia de las proteínas Hsp en la adaptación a diferentes altitudes en especies del género <i>Drosophila</i>	38
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS.....	42
9. ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 22 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	21
Figura 2. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 23 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	22
Figura 3. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 26 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	22
Figura 4. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 27 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	23
Figura 5. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico Hsp 68 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	23
Figura 7. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico Hsp 83 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	24
Figura 8. Registro de la distribución altitudinal de 10 especies del género <i>Drosophila</i>	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica obtenida de TaxoDros de las 10 especies en estudio	14
Tabla 2. Caracterización de los genes <i>Hsp 22</i> , <i>Hsp 23</i> , <i>Hsp 26</i> , <i>Hsp 27</i> , <i>Hsp 68</i> , <i>Hsp 70</i> y <i>Hsp 83</i> de <i>Drosophila arizonae</i> , <i>D. ficusphila</i> , <i>D. hydei</i> , <i>D. navojoa</i> , <i>D. novamexicana</i> , <i>D. serrata</i> presentes en el NCBI	15
Tabla 3. Caracterización de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los genes <i>Hsp</i> de <i>Drosophila mesophragmatica</i> , <i>D. cashapamba</i> y <i>D. machachensis</i>	17
Tabla 4. Descripción del tipo de dominio proteico encontrado en la traducción de las secuencias nucleotídicas <i>Hsp</i> en las 10 especies analizadas del género <i>Drosophila</i>	19

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema de dominios proteicos de la familia de proteínas Hsp.....	49
Anexo 2. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 22 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	50
Anexo 3. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 23 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	50
Anexo 4. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 26 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	51
Anexo 5. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 27 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	51
Anexo 6. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 68 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	52
Anexo 7. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 70 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	54
Anexo 8. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 83 en 10 especies del género <i>Drosophila</i>	56
Anexo 9. Relaciones taxonómicas de especies del género <i>Drosophila</i>	57

1. RESUMEN

El género *Drosophila* aparte de ser un conocido modelo de experimentación, también se caracteriza por tener una amplia distribución regional y altitudinal entre sus especies, así, éstas, se pueden distribuir desde el nivel del mar, hasta alrededor de los 5500 m s.n.m. Este amplio rango de distribución y las adaptaciones que sufren estas especies para poder sobrevivir a diferentes condiciones climáticas alrededor del mundo, son las que han convertido a estas especies en un foco de interés para comprender los mecanismos de defensa que permiten la adaptación a diferentes ambientes. En ellas, las proteínas de choque térmico Hsp parecen ser las mejores candidatas; estas, se encuentran en todos los organismos y su función es protegerlos ante eventos de estrés como: cambios de temperatura, déficit de agua, salinidad, radiación, exposición a metales pesados, tóxicos, entre otros factores estresantes. Por esta razón, el objetivo de este estudio es identificar y analizar la divergencia aminoacídica de siete dominios proteicos Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 27, Hsp 68, Hsp 70 y Hsp 83 presentes en el genoma de *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* y *Drosophila machachensis*, añadiendo al estudio a siete especies del género *Drosophila* presentes en el NCBI, indagando su posible adaptación con la altura y región geográfica en la que habitan estas especies. La identificación de las secuencias nucleotídicas de los genes *Hsp* en *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* se realizó mediante el programa Biolinix y la relación de divergencia se realizó mediante la creación de dendrogramas bajo el método de máxima verosimilitud. No se encontró una relación adaptativa entre la variación aminoacídica de los dominios Hsp y las regiones geográficas en las que se encuentran distribuidas las especies en estudio. Los dendrogramas mostraron una tendencia positiva respecto a las variaciones aminoacídicas de los dominios Hsp 22, Hsp 23, Hsp 27 y Hsp 70 en relación a la distribución altitudinal en la que habita cada especie estudiada, por lo que se sugiere realizar estudios a nivel poblacional y análisis estadísticos para corroborar dicha relación adaptativa.

Palabras clave: estrés térmico, Hsp, distribución altitudinal, regiones geográficas, adaptación

2. ABSTRACT

The *Drosophila* gender besides being a known experimental model, is also characterized for having a wide regional and altitudinal distribution between its species, thus, these can be distributed from sea level up to 5500 m s.n.m. This wide distribution range and the adaptations suffered by these species to be able to survive under different climatic conditions worldwide, are the ones that have turned these species on an interesting theme to understand the defense mechanisms to allow its adaptation to different environments. The heat shock proteins (Hsp) on them, seem to be the best candidates, these are found in every organism and its function is to protect them against stress, events such as: temperature changes, water deficit, salinity, radiation, toxic, heavy metals exposure among other stressors. For this reason, the objective of this study is to identify and analyze the amino acid divergence of 7 protein domains Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 27, Hsp 68, Hsp 70 and Hsp 83 inside the *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* and *Drosophila machachensis* genoma, adding 7 species of *Drosophila* gender found on the NCBI, inquiring its possible adaptation to altitude and geographical region where these species inhabit. The identification of the nucleotide sequences of the Hsp genes in *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* and *D. machachensis* was obtained from Biolinux program and the divergence relations was made through dendrograms creation under maximum likelihood method. No adaptative relationship was found between the amino acid variation of Hsp domains and the geographic regions where the studied species are distributed. The dendrograms showed a positive preference respecting to the amino acid variations of the Hsp 22, Hsp 23, Hsp 27 and Hsp 70 domains in relation to the altitudinal distribution in which each studied species lives for which it is suggested to incorporate population studies and statistic analysis that will confirm this adaptative relation.

Key words: heat shock, Hsp, altitudinal distribution, geographic regions, adaptation.

3. INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo, los organismos y células se enfrentan a diferentes condiciones de estrés a lo largo de su vida, como es el caso de cambios de temperatura drásticos (Bakthisaran, Tangirala y Rao, 2015); independientemente de si se trata de calor extremo o frío intenso, dichos animales deben poder sobrevivir ante dichas temperaturas, ya que no todos los animales tienen la capacidad de hibernar o migrar a lugares con climas favorables (Cruz et al., 2017).

Los animales incapacitados para migrar han desarrollado diferentes mecanismos o estrategias para tolerar estos climas, evitando así, que sus tejidos, citoplasma, células sean congelados en el caso de fríos intensos, o por el contrario, evitar que las células exploten debido al calor extremo (Storey y Storey, 2013). Aunque estos mecanismos varían en cada animal; existe una familia de genes denominados Hsp (Heat shock proteins) que codifican para las proteínas de choque térmico o también conocidas como proteínas anti-estrés (Hendrick y Hartl, 1993), las cuales se encuentran presentes en todos los organismos y como su nombre lo indica, tienen un papel fundamental ante eventos del estrés como: cambios de temperatura, déficit de agua, salinidad, radiación, exposición a metales pesados, tóxicos, entre otros factores estresantes (Feder y Hofmann, 1999; Simões, Rumjanek y Margis, 2003; Richter, Haslbeck y Buchner, 2010; Yer, Baloglu y Ayan, 2018).

Las proteínas Hsp son moléculas generalmente conservadas que se encuentran encargadas de la localización, plegamiento, acumulación y degradación de otras proteínas tanto en el reino animal como en el vegetal (Hendrick y Hartl, 1993). La sobreexpresión y acumulación de estas, al igual que la inducción de otras proteínas no constitutivas pertenecientes a la misma familia, es desencadenada cuando el organismo se encuentra bajo tensión; es decir, su sobre-expresión es “activada” ante estímulos, que pueden ser tanto internos como externos. Las proteínas Hsp, ante condiciones normales tienen una producción normal y continua, que se ve alterada ante condiciones estresantes que provocan el incremento de su expresión (Zhang et al., 2015). En otras palabras, las proteínas Hsp, actúan como

mecanismo de defensa cuando el organismo se ve afectado por algún tipo de estrés que provoca la desnaturalización de proteínas (Sharir, 2005; Morrow, Heikkila y Tanguay, 2006), por lo tanto, su función es amortiguar o disminuir el daño provocado por factores externos o internos, esto lo realizan, mediante el repliegamiento o degradación de otras proteínas; disminuyendo así, efectos tóxicos provocados por el o los factores estresantes, aumentando así, la esperanza de vida tanto en células animales como vegetales (Tower, 2011).

Las proteínas Hsp tuvieron su primer registro en 1974 después de observar que organismos del género *Drosophila* que fueron expuestos a estrés, tuvieron un gran incremento en la producción de las proteínas Hsp (Coronato, Girolamo, Salas, Spinelli y Laguens, 1999), especialmente cuando la diferencia de temperatura entre la ambiental y la experimental, varió alrededor de 5 °C. Diversos estudios demuestran que, el género *Drosophila* se ha convertido en un modelo ideal para el entendimiento de la función de las proteínas Hsp, los tipos de respuesta ante choque térmico e incluso el envejecimiento (Morrow y Tanguay, 2003; Morrow, Samson, Michaud y Tanguay, 2004; Matzkin, Watts y Markow, 2009; Tower, 2011; Štětina, Košťál, y Korbelová, 2015).

Después del primer registro, las proteínas Hsp han sido nombradas con el peso molecular de sus subunidades y por la homología de sus secuencias (Beaulieu, Arrigo y Tanguay, 1989; Bhole, Allikian y Tower, 2004; Zhang et al., 2015). Así, se clasifican en seis subfamilias que son: Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60, Hsp 40 y las sHsps que poseen tamaños de 12 a 42 kDa (Beaulieu et al., 1989; Morrow y Tanguay, 2015; Guerrero y Guerrero, 2018).

Las proteínas cuyo peso molecular está entre los 12 a 42 kDa, son conocidas como Small heat shock proteins, cuya abreviatura es sHsps, la función individual específica de los Hsp que conforman esta familia, es todavía bizarra, sin embargo, se conoce que según la intensidad del estrés, las proteínas sHsps 22, 23, 26 y 27, actúan y se acumulan en conjunto, para auxiliar y proteger a otras proteínas, de efectos provocados por factores estresantes, principalmente los relacionados con temperatura (Berger y Woodward, 1983; Beaulieu et al., 1989; Morrow y Tanguay, 2015).

Actualmente se han registrado 12 genes sHsps en *Drosophila*, de los cuales Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp67Ba, Hsp67Bb, Hsp67Bc y CG4461 se encuentran localizados en el brazo izquierdo del tercer cromosoma, en una sección de 12 kb de la región 67B; mientras que, los genes sHsps I (2) efl, CG14207, CG13133 y CG7409 se encuentran vinculados a distintas regiones cromosómicas (Morrow y Tanguay, 2015; Jagla, Dubinska, Poovathumkadavil, Daczewska y Jagla, 2018).

Los genes sHsps en *Drosophila*, se caracterizan por constar de una secuencia codante simple, desprovista de regiones intrónicas, a excepción de los sHsps I (2) efl, Hsp67Bb y CG14207. La localización de los genes sHsps generalmente es en un entorno de cromatina activa, lo cual, facilita la transcripción tanto dependiente como independiente del factor de choque térmico (HSF). Además, la activación transcripcional de los genes Hsp es facilitada gracias a la presencia de repeticiones de dinucleótidos GA presentes en todos los promotores Hsp en *Drosophila*, mismos que se unen a factores GAGA caracterizados por promover la configuración de cromatina abierta (Jagla et al., 2018).

En cuanto a las familias Hsp, son chaperonas moleculares, es decir, son proteínas que median el plegamiento correcto de otras proteínas que tienen fallas en el plegamiento o tienen aminoácidos errados, corrigiendo y facilitando así, su correcta función, cabe la pena recalcar, que estas proteínas no forman parte de las estructuras proteicas que han replegado. Además, al igual que las Small Heat shock protein (sHsps), estas proteínas, ayudan a la recuperación de otras proteínas que han sido desnaturalizadas por factores estresantes; esto es posible, debido a que las proteínas Hsp reconocen a las proteínas afectadas y se unen a ellas impidiendo la agregación durante el estrés (Chávez y Sáenz, 2009).

Los genes Hsp en *Drosophila*, al igual que los sHsps, se localizan en diferentes regiones del cromosoma tres; así, Hsp 68 se encuentra en la posición 95D, Hsp 70 en las posiciones 87A y 87C, y Hsp 83 en la posición 63BC. Del mismo modo, estos genes, se caracterizan por la ausencia de intrones, a excepción del gen Hsp 83, mismo que posee un intron de 1131 pb (Holmgren, Corces, Marimoto,

Blackman y Melseson, 1981; Telonis, Heerwaarden, Johnson, Hoffmann y Sgro, 2013; Xiao et al., 2019).

El control de calidad de proteínas celulares, está dada por la presencia de proteínas Hsp, donde las sHsps, se unen a las proteínas desnaturalizadas evitando su agregación irreversible, este proceso es logrado gracias a la actividad chaperona. Al momento no se conoce que regiones de las sHsps son necesarias para la función chaperona, sin embargo, se ha postulado que esta actividad está relacionada con diferentes regiones hidrófobas que incluyen los tres dominios proteicos presentes en las sHsps (Anexo 1). La particularidad de la actividad chaperona de las sHsps, radica en que estos complejos oligoméricos unen varias cadenas polipeptídicas no nativas. La interacción entre las proteínas denaturalizadas y las sHsps son estables, formando complejos sustrato-chaperona. La liberación y replegamiento de las proteínas no nativas requiere de la interacción de las Hsp 70, mismas que permiten la reactivación de las proteínas unidas a las sHsps, que su vez, tienen una asociación con las proteínas Hsp 40 a través del dominio J (Anexo 1) y en ocasiones también se requiere la interacción de las Hsp 100 (Sun y MacRae, 2005; Basha, O`Neill y Vierling, 2012; Xiao et al., 2019).

El género *Drosophila* aparte de ser un conocido modelo de experimentación por tener un ciclo de vida corto, gran número de descendencia y una genética altamente desarrollada (Tower, 2011), también se caracteriza por tener una amplia distribución altitudinal entre sus especies; así, éstas se pueden distribuir desde el nivel del mar, hasta alrededor de los 5500 m s.n.m (Céspedes y Rafael, 2013). Este amplio rango de distribución y las adaptaciones que sufren estas especies para poder sobrevivir en diferentes pisos altitudinales sin afectar la localización de comida, búsqueda de pareja, futura descendencia y vida útil, son las que han permitido la diversificación de estas especies a diferentes ambientes y condiciones, lo cual, ha llevado al género *Drosophila* a ser uno de los más diversos (Dillon y Frazier, 2006).

Las especies *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* y *Drosophila machachensis* son especies predominantemente andinas, que habitan en diferentes pisos altitudinales. Así, *D. mesophragmatica* se encuentra distribuida

desde los 3100 hasta los 3700 m s.n.m (Céspedes y Rafael, 2013), *Drosophila cashapamba* se ha registrado a los 1700 m s.n.m y 2200 m s.n.m, mientras que, a *Drosophila machachensis* se la ha registrado actualmente solo a los 2200 m s.n.m. Debido a que estas tres especies tienen una distribución altitudinal elevada, son buenos modelos para el estudio de adaptación térmica, ya que como es conocido, ante mayor altitud, menor temperatura y menor concentración de oxígeno, por lo tanto, *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*, para poder adaptarse a estos factores estresantes, tuvieron que sufrir modificaciones tanto a nivel morfológico, como molecular (Borda, 2018; Newman, Xiao y Robertson, 2005).

En este estudio, se separó a las especies del género *Drosophila* en 6 regiones geográficas. Donde la región neártica incluye el este de Canadá, este y oeste de Norteamérica y el norte de México; la región paleártica incluye a Europa, Asia al norte del Himalaya, África septentrional y parte norte y central de la península Arábiga. La región neotrópica, incluye América central y sur de América; la región etiópica, incluye el norte de África, África subhariana, Madagascar e islas del océano Índico occidental. La región oriental incluye el Indo malaya, Asia del sur y oeste, Afganistán, Pakistán y sudeste de Asia. La región Australiana incluye Australia, Melanesia, Nueva Zelanda (Díaz, Hernández, León, y Quintero, 2020).

Las regiones geográficas del mundo han sido divididas bajo diferentes parámetros como fronteras biogeográficas, geología, animales y plantas; no obstante, existen áreas separadas alrededor del mundo que tienen climas similares y por lo tanto, biomas similares. Estas áreas geográficas se caracterizan por tener una fisionomía única, resultado de la adaptación de las condiciones climáticas en estas zonas (Allca, 2017). Por lo tanto, no es extraño encontrar, que especies del género *Drosophila* se encuentren en regiones geográficas con condiciones climáticas completamente diferentes, debido a que dentro de estas regiones suelen existir áreas geográficas con biomas similares.

Cada bioma, cuenta con una gran variedad de microhabitats, que a su vez conllevan a diferentes microclimas, por ejemplo, los bosques lluviosos tienen diferentes estructuras desde el suelo hasta el dosel de los árboles, mismos que

representan variaciones en los microclimas y el género *Drosophila*, al ser tan diverso, puede explotar un sinnúmero de microhabitats, como suelos, charcos, cactus, troncos y diferentes alturas en los árboles (Diepenbrock y Burrack; Scheffers, Edwards, Diesmos, Williams y Evans, 2013).

El objetivo de este estudio es identificar la secuencia aminoacídica y analizar la divergencia de 7 dominios proteicos Hsp en *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* respecto a la posible relación adaptativa con la altitud y región geográfica en la habitan estas especies.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la divergencia aminoacídica de 7 proteínas miembros de la familia Hsp (Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 27, Hsp 68, Hsp 70 y Hsp 83) presentes en el genoma de *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* y *Drosophila machachensis* indagando su posible adaptación con la altura y región geográfica en la que habitan.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las secuencias nucleotídicas de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* en los genomas de *D. mesophragmatica*, *D. machachensis* y *D. cashapamba*.
- Traducir las secuencias nucleotídicas de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* en los genomas de *D. mesophragmatica*, *D. machachensis* y *D. cashapamba*, y encontrar el dominio proteico perteneciente a cada familia Hsp.
- Analizar la divergencia aminoacídica de los siete dominios proteicos Hsp en *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* y *Drosophila machachensis* añadiendo las secuencias de *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*, indagando su posible adaptación con la altura y la región en la que habitan.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 BASE DE DATOS DE GENES HSP EN GÉNERO *DROSOPHILA*

Se descargó en formato FASTA la secuencia nucleotídica de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* anotados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> y en Flybase de las especies *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*. Cada secuencia nucleotídica, fue clasificada por su respectiva familia Hsp para su posterior alineamiento y edición.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES HSP EN *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*

Para la identificación de las secuencias de los genes *Hsp* en las tres especies en estudio, se utilizó el programa informático BioLinux (Field et al., 2006) y se creó una base de datos con los genomas ensamblados. Una vez creada la base de datos con *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* se realizó un alineamiento entre los nucleótidos del genoma en estudio y el gen referencial. Cabe la pena recalcar, que todas las secuencias de genes *Hsp* utilizadas como referencia, fueron de *Drosophila melanogaster*.

Una vez obtenidos los alineamientos, se escogió el alineamiento con el menor valor e, es decir, el alineamiento con mayor coincidencia o similaridad entre el genoma y el gen estudiado.

Identificadas las secuencia de interés de los genes *Hsp* en los genomas de *Drosophila mesophragmatica*, *Drosophila cashapamba* y *Drosophila machachensis*, se procedió a la extracción de las mismas con el comando `seqret` presente en el programa Biolinux (Field et al., 2006).

Para la obtención de un gráfico que muestre el alineamiento del gen extraído con las similitudes de los genes *Hsp* de *D. melanogaster*, se utilizó el paquete dotter presente en Biolinux (Field *et al.*, 2006), este mostró en un plano cartesiano la posición del gen *Hsp* de *D. melanogaster* en el eje “x” y la posición del fragmento extraído del genoma de *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* o *D. machachensis*, en el eje “y”. Una vez determinadas las zonas de variación en el gráfico, se procedió a la anotación del código de identificación de estas regiones para la extracción de estas secuencias.

Con la utilización del software Artemis (Carver, Harris, Berriman, Parkhill, y McQuillan, 2011), se analizó y anotó la presencia o ausencia de Open Reading Frame (ORFs) de los genes *Hsp* de las especies estudiadas. El archivo final creado en Artemis (Carver *et al.*, 2011) con las regiones codificantes fueron guardadas en formato EMBL.

4.3 BUSQUEDA MEGABLAST DE NUCLEOTIDO-NUCLEOTIDO ENTRE *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LA BASE DE DATOS DEL NCBI

Las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el programa Biolinux (Field *et al.*, 2006) de *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*, fueron alineadas con todas las especies presentes en el NCBI, para esto se realizó un megablast, es decir, con alineamiento con alta similaridad.

Este procedimiento, se efectuó con el objetivo de confirmar que las secuencias obtenidas en Biolinux (Field *et al.*, 2006) correspondían a los respectivos genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* según la especie en estudio.

4.4 ALINEAMIENTO Y COMPARACIÓN DE GENES HSP ENTRE *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Drosophila* OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI

Cada gen *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* de *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* fueron alineados con los respectivos genes *Hsp* de las especies *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*.

El alineamiento múltiple se realizó con todas las especies y con cada una de las 4 familias de los genes *Hsp*, de modo individual, identificando así, las regiones con mayor similitud y cortando los extremos no útiles para el estudio. El programa utilizado para el alineamiento múltiple y la edición de las secuencias fueron realizadas con el programa Bioedit (Hall, 1999) de Windows.

4.5 TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS HSP EN *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Drosophila* OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI

Para facilitar el análisis de divergencia, se ingresó cada secuencia previamente editada en Bioedit (Hall, 1999) a la base de datos Pfam (El-Gebali et al., 2019) en línea con el siguiente URL: <http://pfam.xfam.org/>. Esta página web arrojó los dominios presentes en la secuencia analizada, se escogió y descargó el dominio relacionado con la función de choque térmico (*Hsp*).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante la herramienta accesoria *ClustalW* versión 1.4 (Thompson, Higgings y Gibson, 1994) presente en el programa Bioedit (Hall, 1999). En caso de ser necesario, las secuencias fueron editadas para facilitar el posterior análisis de divergencia.

4.6 CLASIFICACIÓN DE *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis*, *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* Y *D. serrata* EN LAS REGIONES GEOGRÁFICAS Y ALTITUDES EN LAS QUE HABITAN ESTAS ESPECIES.

Se utilizó las coordenadas GPS obtenidas en la base de datos TaxoDros, disponible en: <http://evolution.ibmc.up.pt/node/15>. Con las coordenadas de latitud y longitud, se procedió a encontrar la altura mediante el programa Google earth en línea.

Para la clasificación de regiones geográficas, se insertaron las coordenadas de latitud y longitud en Googlemaps en línea; este nos arroja la ubicación exacta de las coordenadas, con lo cual se procedió a clasificarlas según las regiones geográficas.

Cabe la pena recalcar que todas las coordenadas presentes en TaxoDros, son resultado de muestreos realizados alrededor del mundo.

4.7 ANÁLISIS DE DIVERGENCIA DE LOS DOMINIOS PROTEICOS HSP EN FUNCIÓN A LA REGIÓN GEOGRÁFICA EN LA QUE HABITAN *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LAS ESPECIES SELECCIONADAS DEL NCBI

Para analizar la presencia o ausencia de una relación entre las variaciones de los dominios proteicos Hsp y la región geográfica en la que habitan estas especies, se realizó un dendrograma por cada secuencia aminoacídica correspondiente a los dominios Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 68, Hsp 70 y Hsp 83.

El dendrograma se realizó con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar, Stecher, Li, Knyaz y Tamura, 2018), bajo el método estadístico de máxima verosimilitud (Maximum likelihood), debido a que este nos

permitiría obtener dendrogramas más precisos respecto a las secuencias estudiadas (Saitou y Nei, 1987).

El test de la filogenia utilizado, fue Bootstrap con 100 repeticiones con el modelo de sustitución WAG, este modelo es el ideal para el estudio de reemplazo de aminoácidos en aplicaciones que no son necesariamente de filogenética, como es el caso de este estudio, siendo así, utilizado mayormente en aplicaciones en las que se enfatiza la detección de homologías entre secuencias (Whelan y Goldman, 2016).

Para el análisis geográfico, los rangos de distribución de las especies en estudio, se caracterizaron en seis regiones (OR: Oriental; PA: Paleártica; NE: Neártica; NT: Neotrópica; AU: Australiana y ANT: Antártica); y sus respectivas combinaciones (NE+NT: Neártica y Neotrópica; AU+ET: Australiana y Etiópica; OR+PA: Oriental y Paleártica). Cada región geográfica y sus combinaciones, fueron representadas mediante diferentes esferas en las ramas de los dendrogramas. La distribución geográfica obtenida mediante TaxoDros, de las 10 especies en estudio, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución geográfica obtenida de TaxoDros de las 10 especies en estudio

Género	Subgénero	Grupo	Especie	Distribución
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>		<i>D. machachensis</i>	Neotrópica
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>mesophragmatica</i>	<i>D. mesophragmatica</i>	Neotrópica, Oriental
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>mesophragmatica</i>	<i>D. cashapamba</i>	Neotrópica
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>repleta</i>	<i>D. arizonae</i>	Etiópica, Neártica, Neotrópica
<i>Drosophila</i>	<i>Sophophora</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. ficusphila</i>	Australiana, Oriental, Paleártica
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>repleta</i>	<i>D. hydei</i>	Australiana, Etiópica, Neártica, Neotrópica, Oriental, Paleártica
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>repleta</i>	<i>D. navojoa</i>	Neártica, Neotrópica
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>virilis</i>	<i>D. novamexicana</i>	Neártica, Neotrópica
<i>Drosophila</i>	<i>Sophophora</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. serrata</i>	Antártica, Australiana, Etiópica, Neotrópica, Oriental
<i>Drosophila</i>	<i>Sophophora</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>	Cosmopolita

5. RESULTADOS

5.1 BASE DE DATOS DE LOS GENES *HSP* PRESENTES EN NCBI DE ESPECIES DEL GÉNERO *Drosophila*

La búsqueda de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* en el NCBI, resultó en la obtención de una base de datos de 10 especies del género *Drosophila*, donde *D. ficusphila*, *D. serrata* y *D. melanogaster*, pertenecen al subgénero *Sophophora*, mientras que, *D. hydei*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. arizonae* pertenecen al subgénero *Drosophila*.

Los códigos de identificación, peso molecular, localización y tamaño de los genes *Hsp* de cada especie, se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* de *Drosophila arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. navojoa*, *D. novamexicana*, *D. serrata* presentes en el NCBI

Especie	Hsp	Gene ID	Localización	Pares de bases	Anotación
<i>D. arizonae</i>	<i>Hsp22</i>	108613830	7012616..7013374	759	Genoma
<i>D. ficusphila</i>	<i>Hsp22</i>	108096308	1..802	802	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>Hsp22</i>	111595146	1..987	987	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp22</i>	108658122	1..1098	1098	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp22</i>	115770106	1..875	875	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp22</i>	110190604	1..1014	1014	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp22</i>	3772576	9372931..9374964	2033	Genoma
<i>D. arizonae</i>	<i>hsp23</i>	108614715	1..640	640	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp23</i>	108096307	1..1018	1018	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp23</i>	111603974	1..1164	1164	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp23</i>	108652529	1..675	675	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp23</i>	115770110	1..963	963	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp23</i>	110190537	1..1030	1030	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 23</i>	39077	9381882..9382765	884	Genoma
<i>D. arizonae</i>	<i>hsp26</i>	108613826	1..684	684	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp26</i>	108096304	1..1016	1016	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp26</i>	111595142	1..893	893	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp26</i>	108651792	1..808	808	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp26</i>	115770445	1..856	856	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp26</i>	110190595	1..1046	1046	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 26</i>	39075	9376418..9377427	1010	Genoma

<i>D. arizonae</i>	<i>hsp27</i>	108613827	1..967	967	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp27</i>	108096448	1..1131	1131	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp27</i>	111601696	1..908	908	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp27</i>	108652516	1..814	814	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp27</i>	115770426	1..1022	1022	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp27</i>	110190596	1..824	824	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 27</i>	39078	9384063..9385694	1632	Genoma
<i>D. arizonae</i>	<i>hsp68</i>	108612285	1..1938	1938	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp68</i>	108091996	192..2102	1910	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp68</i>	111604194	1..2646	2646	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp68</i>	108658722	1..1969	1969	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp68</i>	115764083	1..2258	2258	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp68</i>	110191071	1..2020	2020	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 68</i>	42852	24055080..24057310	2231	Genoma
<i>D. arizonae</i>	<i>hsp70</i>	108613909	1..1741	1741	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp70</i>	108086915	1..3229	3229	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp70</i>	111600965	1..2828	2828	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp70</i>	108651228	1..3236	3236	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp70</i>	115770077	1..2887	2887	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp70</i>	110189874	1..2851	2851	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 70</i>	48582	12505793..12508139	2347	Genoma
<i>D. arizonae</i>	<i>hsp83</i>	108613601	1..2498	2498	Predicho
<i>D. ficusphila</i>	<i>hsp83</i>	108099150	1..2719	2719	Predicho
<i>D. hydei</i>	<i>hsp83</i>	111598466	1..2541	2541	Predicho
<i>D. navojoa</i>	<i>hsp83</i>	108650751	1..2368	2368	Predicho
<i>D. novamexicana</i>	<i>hsp83</i>	115769351	1..2750	2750	Predicho
<i>D. serrata</i>	<i>hsp83</i>	110182799	1..2717	2717	Predicho
<i>D. melanogaster</i>	<i>Hsp 83</i>	38389	3192969..3197059	2960	Genoma

5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES HSP EN *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* Y *D. machachensis*

La exhaustiva búsqueda de los genes *Hsp* en los genomas completos de *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*, mediante la utilización de los genes *Hsp* de *D. melanogaster* como secuencias de referencia, resultó en la identificación de una sola secuencia nucleotídica por cada gen *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* en el caso de *D. mesophragmatica* (Tabla 3) y *D. cashapamba* (Tabla 3), mientras que, en *D. machachensis* (Tabla 3) se encontraron varias secuencias nucleotídicas cortas de los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26* y *Hsp 27* a lo largo del genoma.

Las secuencias nucleotídicas de los genes *Hsp* 68, *Hsp* 70 y *Hsp* 83 en *D. machachensis* fue de una sola por gen (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los genes *Hsp* de *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*

Especie	Hsp	Pares de bases	Sentido de la cadena nucleotídica respecto a <i>D. melanogaster</i>	Número de secuencias por gen Hsp
<i>D. mesophragmatica</i>	22	481		
<i>D. mesophragmatica</i>	23	519		
<i>D. mesophragmatica</i>	26	580	Inverso	
<i>D. mesophragmatica</i>	27	313	Inverso	
<i>D. mesophragmatica</i>	68	1812	Inverso	
<i>D. mesophragmatica</i>	70	1823	Inverso	
<i>D. mesophragmatica</i>	83	2163		
<i>D. cashapamba</i>	22	346		
<i>D. cashapamba</i>	23	560		
<i>D. cashapamba</i>	26	311	Inverso	
<i>D. cashapamba</i>	27	312	Inverso	
<i>D. cashapamba</i>	68	1817		
<i>D. cashapamba</i>	70	916		
<i>D. cashapamba</i>	83	2159		
<i>D. machachensis</i>	22	238	Inverso	1
<i>D. machachensis</i>	22	480		2
<i>D. machachensis</i>	22	439		3
<i>D. machachensis</i>	22	211		4
<i>D. machachensis</i>	23	323		1
<i>D. machachensis</i>	23	216		2
<i>D. machachensis</i>	23	327	Inverso	3
<i>D. machachensis</i>	23	293	Inverso	4
<i>D. machachensis</i>	23	554	Inverso	5
<i>D. machachensis</i>	23	340		6
<i>D. machachensis</i>	23	324		7
<i>D. machachensis</i>	26	263	Inverso	1
<i>D. machachensis</i>	26	245		2
<i>D. machachensis</i>	26	218		3
<i>D. machachensis</i>	26	312	Inverso	4
<i>D. machachensis</i>	26	210	Inverso	5
<i>D. machachensis</i>	26	742	Inverso	6
<i>D. machachensis</i>	26	315		7
<i>D. machachensis</i>	27	302	Inverso	1
<i>D. machachensis</i>	27	316	Inverso	2

<i>D. machachensis</i>	27	467	Inverso	3
<i>D. machachensis</i>	27	364	Inverso	4
<i>D. machachensis</i>	27	221	Inverso	5
<i>D. machachensis</i>	68	1830		
<i>D. machachensis</i>	70	1941	Inverso	
<i>D. machachensis</i>	83	2160		

5.3 BUSQUEDA MEGABLAST DE NUCLEOTIDO-NUCLEOTIDO ENTRE *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LA BASE DE DATOS DEL NCBI

El alineamiento de las secuencias de los genes *Hsp* de las tres especies en estudio, con la base de nucleótidos del NCBI, mostró alta similaridad con los respectivos pesos moleculares de los genes *Hsp* en *D. mesophragmatica* y *D. cashapamba*, por lo tanto, se confirmó, que las secuencias obtenidas mediante el programa Biolinix (Field *et al.*, 2006) corresponden a las secuencias nucleotídicas de los genes *Hsp* analizados respectivamente.

Drosophila machachensis, al tener varias secuencias nucleotídicas correspondientes a un mismo peso molecular de los genes *Hsp* y al ser estas de pocas pares de bases, se escogió para el análisis la secuencia que tuvo alta similaridad con su respectivo peso molecular, que en el caso de *Hsp* 22, fue la secuencia 2 con 480 pares de bases (Tabla 3), en *Hsp* 23, la secuencia 5 con 554 pares de bases (Tabla 3), en *Hsp* 26, la secuencia 6 con 742 pares de bases (Tabla 3) y en *Hsp* 27 la secuencia 3 con 467 pares de bases (Tabla 3).

5.4 TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS HSP EN *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Drosophila* OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI

Se obtuvo la región aminoacídica correspondiente al dominio proteico de choque térmico (*Hsp*) de cada gen y especie en estudio; los dominios encontrados se encuentran en la Tabla 4.

Las secuencias aminoacídicas y el alineamiento múltiple de las proteínas codificadas por los genes *Hsp 22*, *Hsp 23*, *Hsp 26*, *Hsp 27*, *Hsp 68*, *Hsp 70* y *Hsp 83* se encuentran en los Anexos 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

Tabla 4. Descripción del tipo de dominio proteico encontrado en la traducción de las secuencias nucleotídicas Hsp en las 10 especies analizadas del género *Drosophila*

HSP	Family	Description	Entry Type	Clan	Envelope	
					Start	End
Hsp 22 <i>D. machachensis</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	59	158
Hsp 22 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	59	157
Hsp 22 <i>D. cashapamba</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	17	114
Hsp 22 <i>D. arizonae</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	92	190
Hsp 22 <i>D. ficusphila</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	99	196
Hsp 22 <i>D. hydei</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	171	269
Hsp 22 <i>D. navojoa</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	99	197
Hsp 22 <i>D. novamexicana</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	139	237
Hsp 22 <i>D. serrata</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	129	226
Hsp 22 <i>D. melanogaster</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	497	594
Hsp 23 <i>D. machachensis</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	63	161
Hsp 23 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	76	172
Hsp 23 <i>D. cashapamba</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	385	483
Hsp 23 <i>D. arizonae</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	72	170
Hsp 23 <i>D. ficusphila</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	143	241
Hsp 23 <i>D. hydei</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	96	194
Hsp 23 <i>D. navojoa</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	75	173
Hsp 23 <i>D. novamexicana</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	128	226
Hsp 23 <i>D. serrata</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	147	245
Hsp 23 <i>D. melanogaster</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	101	199
Hsp 26 <i>D. machachensis</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	84	181
Hsp 26 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	87	184
Hsp 26 <i>D. cashapamba</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	1	96
Hsp 26 <i>D. arizonae</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	88	185
Hsp 26 <i>D. ficusphila</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	149	247
Hsp 26 <i>D. hydei</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	116	213
Hsp 26 <i>D. navojoa</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	92	189
Hsp 26 <i>D. novamexicana</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	123	220
Hsp 26 <i>D. serrata</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	162	259
Hsp 26 <i>D. melanogaster</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	160	258
Hsp 27 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	1	96
Hsp 27 <i>D. machachensis</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	CI0190	24	121

Hsp 27 <i>D. cashapamba</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	1	96
Hsp 27 <i>D. arizonae</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	186	286
Hsp 27 <i>D. ficusphila</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	125	222
Hsp 27 <i>D. hydei</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	110	205
Hsp 27 <i>D. navojoa</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	116	213
Hsp 27 <i>D. novamexicana</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	112	209
Hsp 27 <i>D. serrata</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	107	207
Hsp 27 <i>D. melanogaster</i>	Hsp20	Hsp20/alpha crystallin family	Domain	ClO190	124	221
Hsp 68 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	5	603
Hsp 68 <i>D. machachensis</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	4	609
Hsp 68 <i>D. cashapamba</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	1	605
Hsp 68 <i>D. arizonae</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	3	608
Hsp 68 <i>D. ficusphila</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	3	608
Hsp 68 <i>D. hydei</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	235	840
Hsp 68 <i>D. navojoa</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	11	616
Hsp 68 <i>D. novamexicana</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	70	675
Hsp 68 <i>D. serrata</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	10	615
Hsp 68 <i>D. melanogaster</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	71	676
Hsp 70 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	6	607
Hsp 70 <i>D. machachensis</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	6	612
Hsp 70 <i>D. cashapamba</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	1	304
Hsp 70 <i>D. arizonae</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	44	459
Hsp 70 <i>D. ficusphila</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	83	768
Hsp 70 <i>D. hydei</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	109	765
Hsp 70 <i>D. navojoa</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	89	776
Hsp 70 <i>D. novamexicana</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	14	671
Hsp 70 <i>D. serrata</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	85	740
Hsp 70 <i>D. melanogaster</i>	Hsp70	Hsp 70 protein	Domain	ClO108	83	689
Hsp 83 <i>D. mesophragmatica</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		189	715
Hsp 83 <i>D. machachensis</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		185	710
Hsp 83 <i>D. cashapamba</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		184	710
Hsp 83 <i>D. arizonae</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		189	715
Hsp 83 <i>D. ficusphila</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		238	765
Hsp 83 <i>D. hydei</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		236	762
Hsp 83 <i>D. navojoa</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		184	709
Hsp 83 <i>D. novamexicana</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		233	757
Hsp 83 <i>D. serrata</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		243	768
Hsp 83 <i>D. melanogaster</i>	Hsp 90	Hsp 90 protein	Domain		694	1220

5.5 ANÁLISIS DE DIVERGENCIA DE LOS DOMINIOS PROTEICOS HSP EN FUNCIÓN A LA REGIÓN GEOGRÁFICA EN LA QUE HABITAN *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis* Y LAS ESPECIES SELECCIONADAS DEL NCBI

Se obtuvo un dendrograma por secuencia aminoacídica de Hsp estudiada, estos se encuentran en las Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, alado del nodo se encuentra el valor de bootstrap. Aunque el valor idóneo ha sido de gran discusión, se ha estandarizado que un buen valor de bootstrap para confiar en la robustez de una reconstrucción filogenética, es del 70% al 100% especialmente en los estudios en los que se busca encontrar un ancestro a partir de taxones terminales; sin embargo, cuando el objetivo es la detección de homología entre secuencias, se acepta como confiable un valor mayor al 50% (Hillis y Bull, 1993).

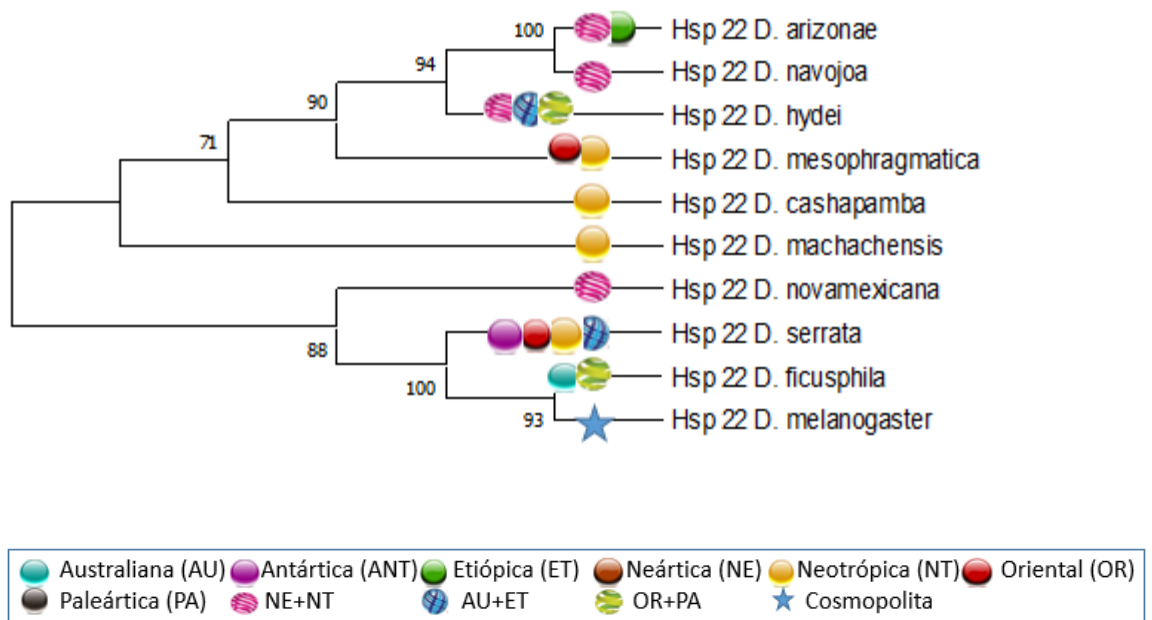


Figura 1. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 22 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

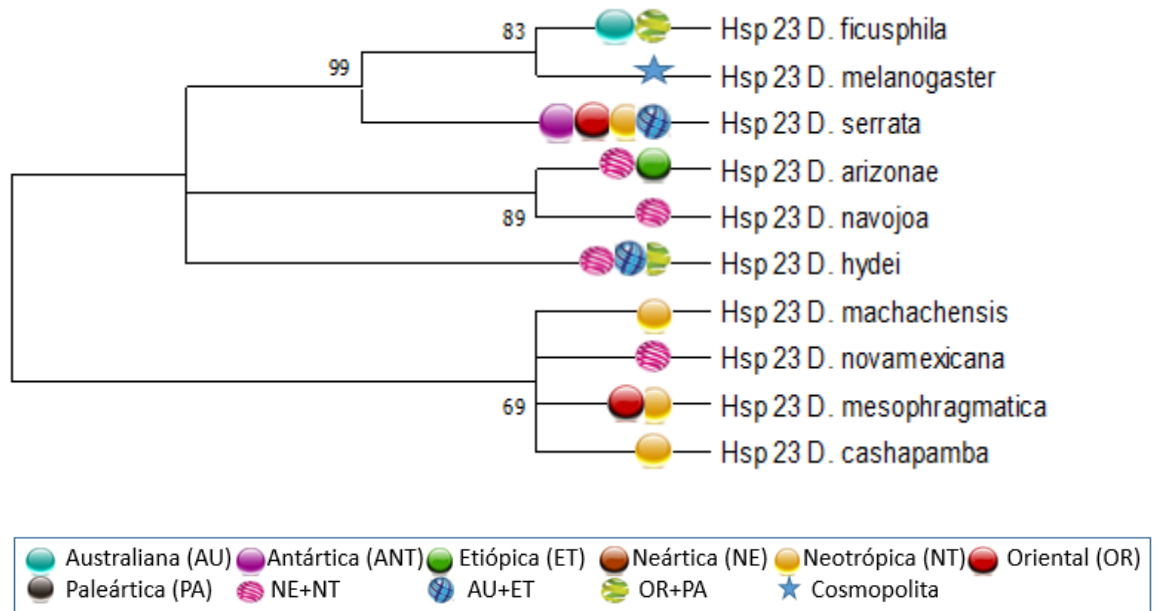


Figura 2. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 23 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

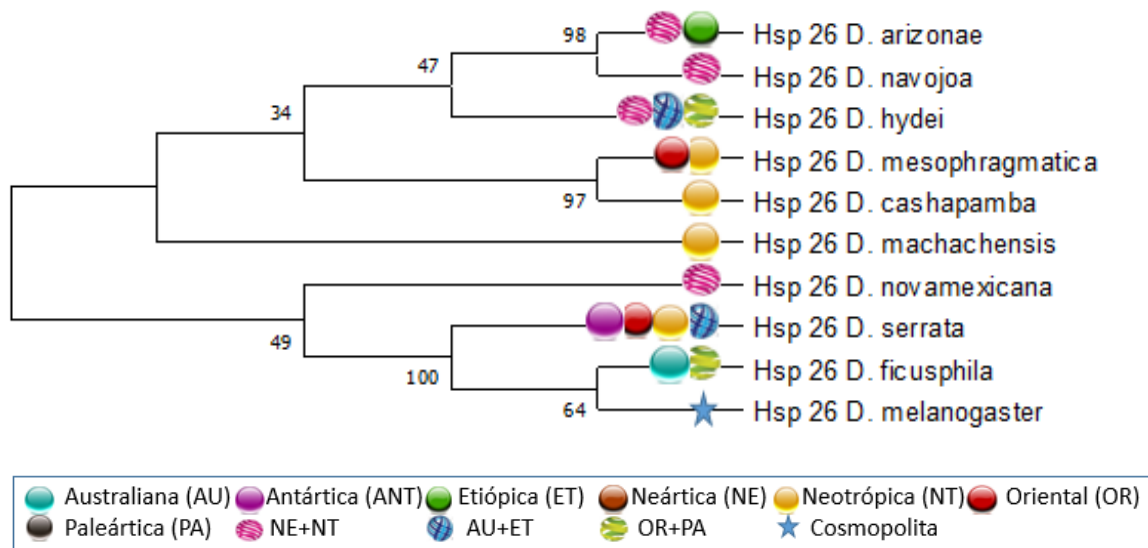


Figura 3. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 26 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

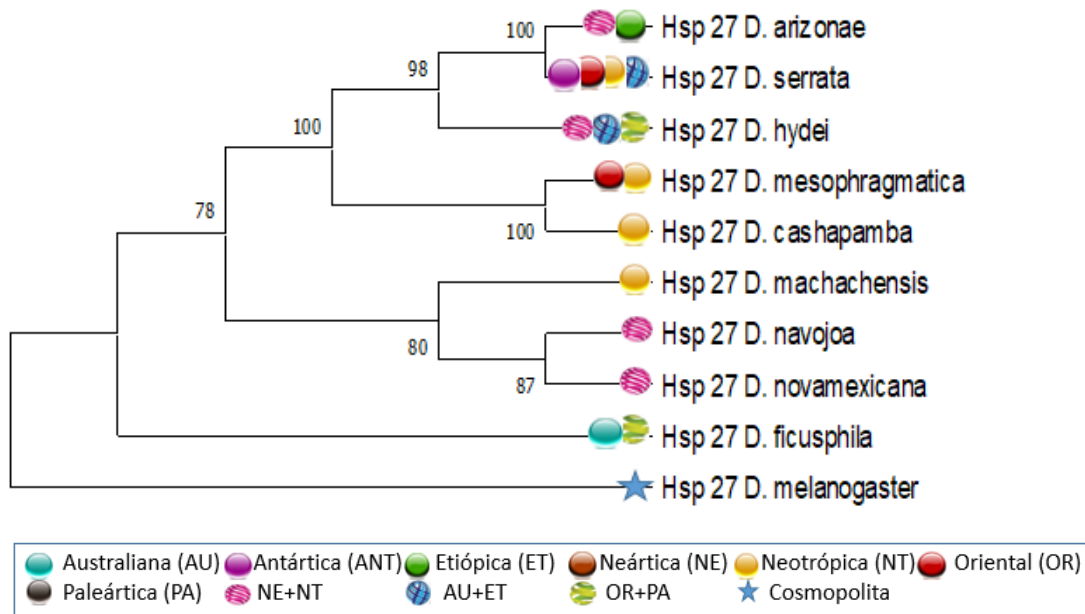


Figura 4. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico sHsp 27 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

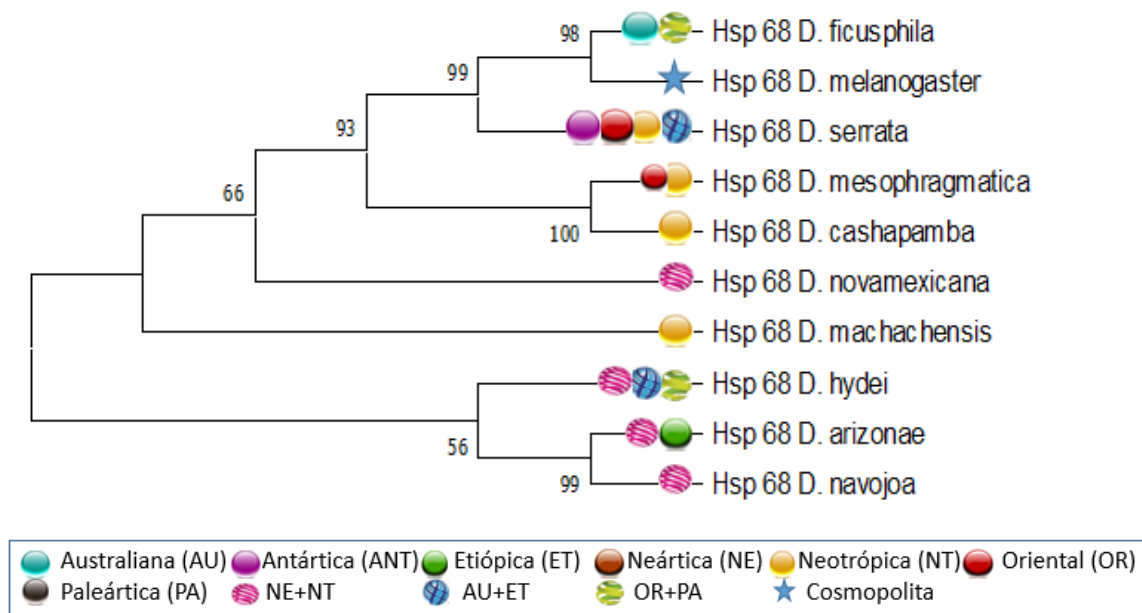


Figura 5. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico Hsp 68 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

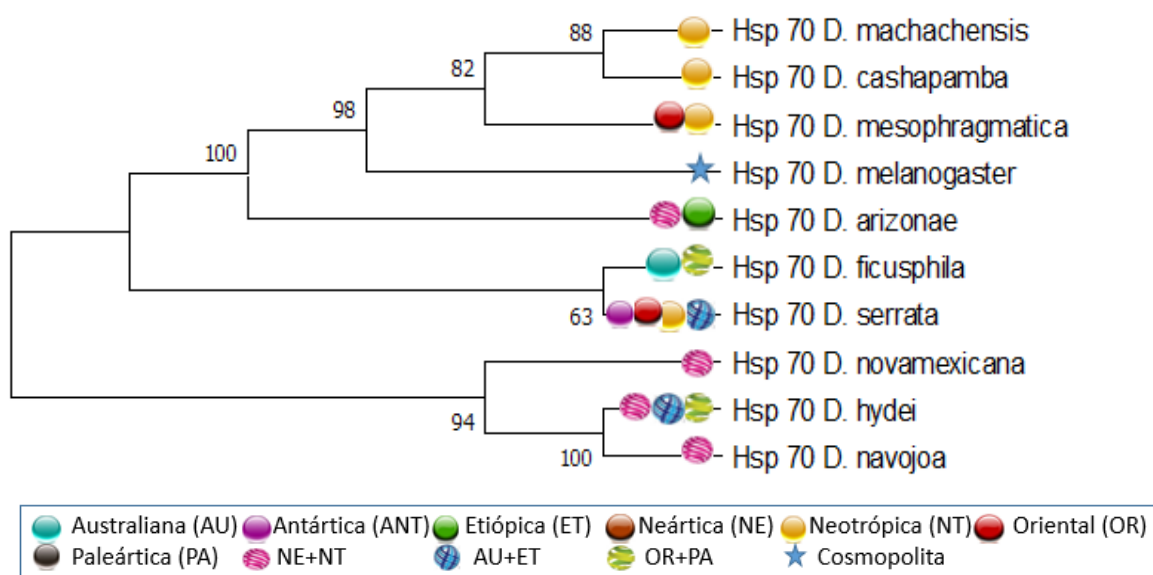


Figura 6. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico Hsp 70 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).

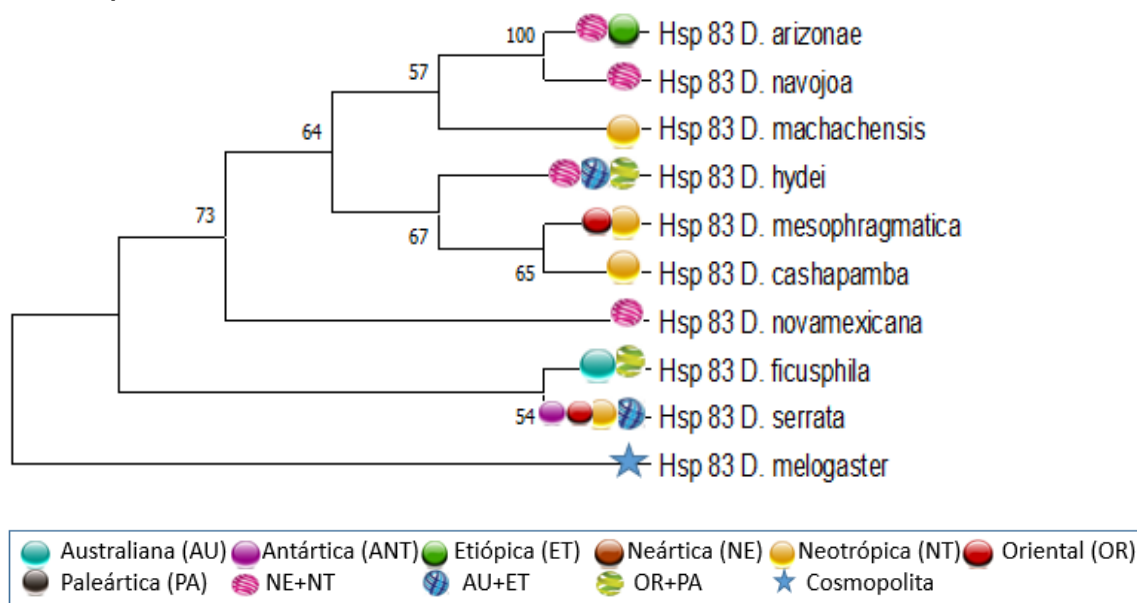
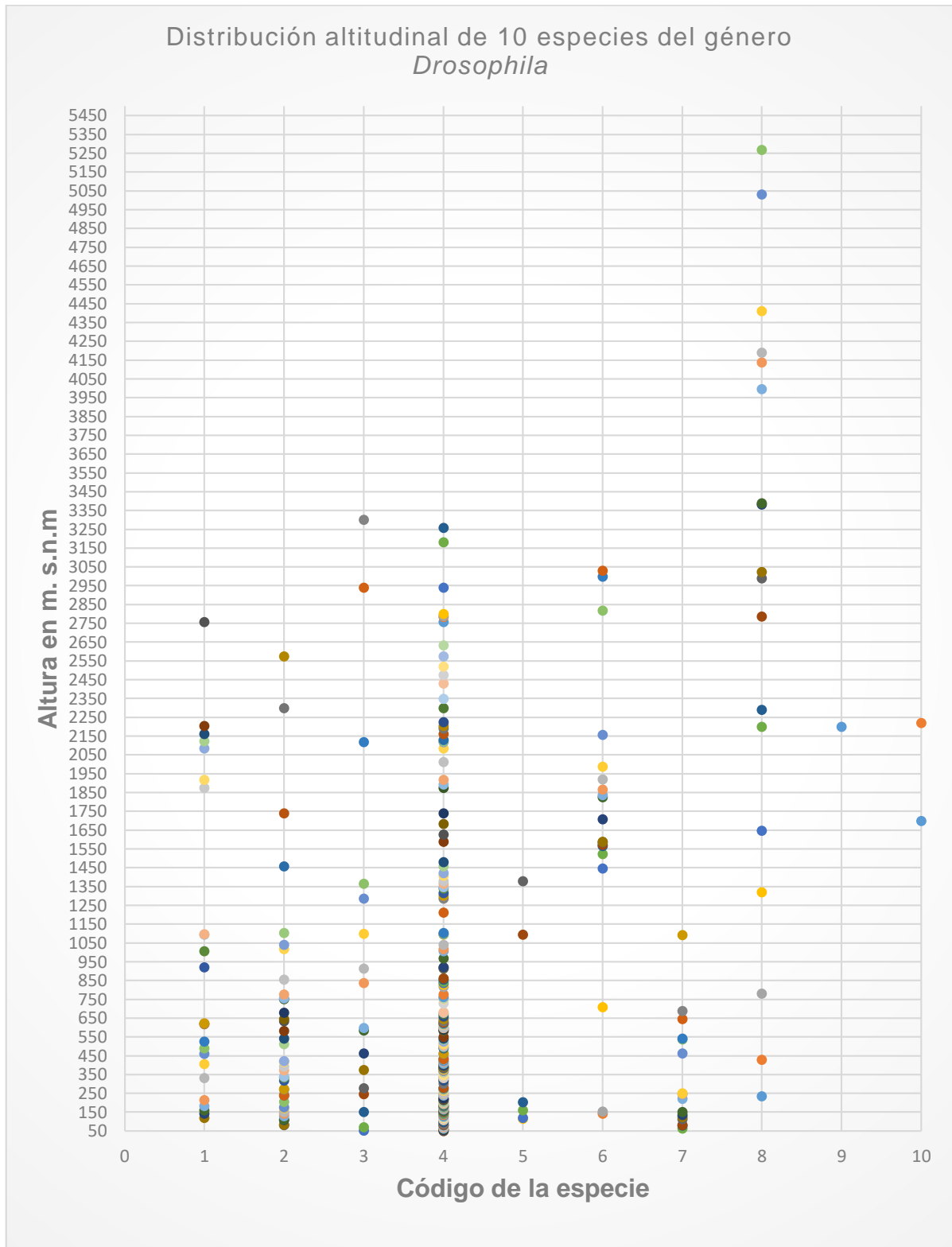


Figura 7. Dendrograma de máxima verosimilitud del dominio proteico Hsp 83 en 10 especies del género *Drosophila*. El dendrograma se generó con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución WAG. Los números presentes en los nodos indican los valores de soporte medidos por la probabilidad posterior. Las esferas presentes en las ramas, representan la distribución geográfica de cada especie (Tabla 1).



1 = <i>D. arizonae</i>	2 = <i>D. ficusphila</i>	3 = <i>D. hydei</i>	4 = <i>D. melanogaster</i>
5 = <i>D. navoja</i>	6 = <i>D. novamexicana</i>	7 = <i>D. serrata</i>	8 = <i>D. mesophragmatica</i>
9 = <i>D. machachensis</i>	10 = <i>D. cashapamba</i>		

Figura 8. Registro de la distribución altitudinal de 10 especies del género *Drosophila*.

6. DISCUSIÓN

Para desentrañar la posible relación de divergencia de los dominios proteicos Hsp respecto a la altitud y la región geográfica en la que habitan estas especies, se analizó cada variable de modo individual.

6.1 Relación de la divergencia de los small Hsp respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* incluyendo en el análisis a *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*

La Figura 1 muestra un dendrograma de máxima verosimilitud creado con los dominios proteicos de Hsp 22 en 10 especies del género *Drosophila*; bajo este esquema, *D. arizonae* y *D. navojoa* se agrupan cercanamente, lo que permite inferir que la similitud en la variación aminoacídica entre sus secuencias es alta, por lo tanto, bajo la hipótesis de este estudio, se esperaría que estas dos especies compartan o se encuentren en gradientes altitudinales similares. Dicha hipótesis se cumple entre estas 2 especies, donde, *D. arizonae* ha sido muestreada desde los 0 a 2758 m s.n.m y *D. navojoa*, desde los 5 a los 1378 m s.n.m, por lo tanto, ambas especies comparten una distribución en altitudes bajas, sin embargo, *D. arizonae* se puede distribuir en altitudes mayores que *D. navojoa*. Dicha diferencia en la altitud alcanzada por *D. arizonae*, es mayor a 1000 m en comparación a *D. navojoa*, lo cual, implicaría variaciones en las condiciones climáticas. Puesto que, se espera que por cada incremento de 100m de altitud, exista un descenso de temperatura de 1 °C y de ~0,6 °C cuando existe condensación de aire (Allca, 2017).

Bajo este conocimiento, se esperaría que los especímenes de *D. navojoa* que habitan en mayor altitud respecto a *D. arizonae*, hayan tenido que sufrir una mayor variación en las proteínas Hsp para adaptarse a altitudes mayores, debido a que se ha informado en experimentaciones con *D. melanogaster*, que la

sobreexpresión de estas proteínas, se ven influenciadas visiblemente cuando la temperatura varía alrededor de 5°C (Coronato et al., 1999).

A pesar de que las small heat shock protein están estrechamente relacionados con la resistencia a cambios de temperatura, cada proteína perteneciente a esta familia, tiene una “función específica”. La presencia de Hsp 22, está estrechamente relacionada con la vida útil (Morrow et al., 2004), y se ha comprobado experimentalmente que la sobreexpresión de esta, incrementa la esperanza de vida hasta en un 30% cuando las células son sometidas a factores estresantes, por lo tanto, actúa como un efecto protector ante lesiones oxidativas, ambientales y el envejecimiento (Štětina et al., 2015; Zhao, 2005). Lo cual también podría tener una influencia en la adaptación a climas más o menos cálidos, debido a que el envejecimiento está dado por acumulación de proteínas alteradas y tanto el estrés térmico como oxidativo provocan la alteración de proteínas, lo que deriva en la disminución en la esperanza de vida.

La sobreexpresión de las proteínas Hsp 22 va aumentando la resistencia contra el estrés térmico, disminuyendo así la sensibilidad de las células contra estos factores estresantes (Zhao, 2005) dando como resultado, mayor tolerancia a los cambios térmicos y una respuesta más rápida ante choque térmico (Štětina et al., 2015; Jagla, Dubińska-Magiera, Poovathumkadavil, Daczewska, y Jagla, 2018). Por esta razón, este estudio contrastó la posibilidad de que las variaciones aminoacídicas encontradas en los dominios proteicos Hsp se puedan deber a una adaptación generada en las células de estas especies para poder encontrarse en estos gradientes altitudinales debido a que en los ecosistemas de montaña en los que habitan generalmente la familia Drosophilidae, tienen una característica llamativa, y es que a distancias relativamente cortas, estos ecosistemas sufren cambios ambientales robustos provocados generalmente por los diferentes gradientes de altitud en la montaña (Körner, 2007). Por lo cual, cada piso altitudinal implicarían diferentes factores estresantes, en los cuales, las proteicas Hsp podrían ser la respuesta adaptativa frente al estrés climático en *Drosophila* (Allca, 2017).

El dendrograma presente en la Figura 1 también incluye en el mismo grupo de *D. arizonae* y *D. navojoa* a *D. hydei*, *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*, cuya distribución altitudinal detallada se encuentra en la Figura 8.

Aunque los rangos altitudinales entre estas especies varían entre sí, existen pisos altitudinales en común, es decir, *D. hydei* se puede distribuir desde los 0 a los 3300 m. s.n.m, mientras que *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* se distribuyen desde los 234-5269, 1700-2220 y a los 2220 m s.n.m respectivamente, por lo tanto, estas 4 especies podrían compartir temperaturas similares, a pesar de que sus rangos por especies puedan ser menores o mayores respecto a las otras especies, lo cual explicaría su agrupación cercana en la Figura 1.

Las únicas dos especies que no compartirían rangos altitudinales, serían *D. cashapamba* y *D. machachensis*, debido a que el piso altitudinal tope de *D. cashapamba*, coincide con el inicio de la distribución altitudinal de *D. machachensis*, no obstante, tanto *D. cashapamba* como *D. machachensis*, son especies poco estudiadas hasta el momento, por ende, existen pocos muestreos de las mismas, razón por la cual, se podría esperar que se encuentren distribuidas en otros pisos altitudinales en los que todavía no se ha estudiado a estas especies.

La distribución altitudinal de *D. mesophragmatica* es muy llamativa, ya que se distribuye en casi todos los pisos altitudinales, lo cual implica grandes cambios tanto en el clima como en el tipo de vegetación; las proteínas Hsp 22 al ser protectoras ante choques térmicos y estar relacionadas con la vida útil (Štětina et al., 2015; Zhao, 2005; Jagla et al., 2018), nos permitirían inferir que fueron esenciales en la adaptación climática que tuvo que sufrir esta especie para adaptarse a todos los pisos altitudinales y cambios en la temperatura, debido a que la regulación de las proteínas Hsp 22 de modo natural, son reguladas ante diferentes tensiones tanto internas como externas, y cada vez que la especie es expuesta a un factor estresante, aumenta la resistencia celular ante dicho factor (Zhao, 2005; Jagla et al., 2018).

En la Figura 1, se evidencia una segunda agrupación, donde se puede notar que *D. ficusphila* y *D. melanogaster*, se encuentran agrupadas cercanamente, esto se puede deber a que las alturas en las que habitan estas especies son muy similares, donde *D. ficusphila* se encuentra desde los 9 hasta los 2575 m s.n.m y *D. melanogaster* se ha encontrado desde los 3 hasta los 3258 m s.n.m, por lo tanto, estas dos especies, no solo compartirían la altitud en la que habitan, si no, también las condiciones y tensiones climáticas que implican estos rangos altitudinales (Allca, 2017).

En la misma agrupación en la que se encuentra *D. ficusphila* y *D. melanogaster*, se incluye a *D. serrata* y *D. novamexicana*, cuyos rangos altitudinales, van desde los 2 hasta los 1091 m s.n.m en el caso de *D. serrata* y desde los 19 hasta los 3031 m s.n.m en *D. novamexicana*.

D. novamexicana comparte altitudes con todas las especies en las que se encuentra agrupada en la Figura 1; mientras que *D. serrata*, *D. ficusphila* y *D. melanogaster*, aparte de compartir altitudes entre sí, su agrupación las ubica de modo jerárquico en cuanto a las altitudes en las que pueden ser encontradas, ya que *D. serrata* alcanza hasta los 1091 m s.n.m, seguido por *D. ficusphila* que alcanza los 2575 m s.n.m y por *D. melanogaster* que puede llegar hasta los 3258 m s.n.m, lo cual indicaría que entre cada especie hay una diferencia en altitud de 1000 m. Esto nos permitiría inferir que la agrupación dada en el dendrograma, se debe a una posible adaptación de las secuencias aminoacídicas respecto a las altitudes en las que habita cada especie, agrupándolas así de manera más cercana cuando estas comparten rangos altitudinales y la diferencia entre el inicio y fin del rango altitudinal, no es grande.

En cuanto a las regiones geográficas, en la Figura 1, se puede notar dos agrupaciones; en la primera se encuentra *D. arizonae*, *D. navojoa*, *D. hydei*, *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis*. Todas estas especies en la primera agrupación tienen en común la región neotropical, caracterizada por la presencia de bosques húmedos tropicales, subtropicales, praderas, desiertos, bosque temperado de coníferas, chaparral, sabana, bosque deciduo tropical y bosques secos tropical y subtropical (Cayuela y Granzow, 2012). A pesar de que

se podría aludir que la agrupación de estas especies este dada por la región neotropical, hay especies en este grupo que se encuentran distribuidas en otras zonas geográficas, así, tanto *Drosophila arizonae* y *D. hydei*, pese a que pertenecen al grupo *repleta* conocido por tener un origen neotropical (Betancourt, 2012), los eventos migratorios y la presencia del hombre, han permitido la dispersión de estas especies a otras regiones con características climáticas similares. Lo cual ha permitido su colonización en la región etiópica, misma que cuenta con bosque y matorral mediterráneo, chaparral, praderas, sabanas, sabanas inundadas, desiertos, bosques húmedos y secos tropicales y subtropicales (Allca, 2017); por lo tanto, a pesar de que se encuentran localizados en regiones geográficas diferentes, la agrupación presente en el dendrograma de la Figura 1, se podría deber a que en ambas regiones tienen los mismos tipos de bosques (biomas). Como son el bosque húmedo tropical y subtropical, bosque seco tropical y subtropical, chaparral, sabanas, desiertos y matorral montano, el tipo de bosque en el que habitan estas especies están directamente relacionados con el tipo de clima existente en estas zonas; además, se ha comprobado que las condiciones estresantes pueden conducir a una adaptación local y a diferenciación genética (Carmel, Rashkovetsky, Nevo y Korol, 2011), donde se comprobó que la variación climática local en *D. buzzatti*, mantiene una variación geográfica mínima (Bubliy y Loeschcke, 2004), por lo tanto, las proteínas Hsp podrían tener un papel importante en la adaptación de estas especies a estos biomas, debido a que los biomas son productos de condiciones ambientales; donde el clima es el mayor influyente y está dado por dos factores primordiales, que son la temperatura y la precipitación (Allca, 2017), y a su vez, estos dependen de la latitud, la posición relativa respecto a masas de aire, montaña, tierra y de la altura.

Drosophila hydei, que se encuentra en la primera agrupación, ha sido muestreada también en la región neártica, paleártica, oriental y australiana (Tabla 1), donde la región neártica cuenta con bosque boreal, temperado, taiga, tundra, chaparral y praderas temperadas, la región paleártica, cuenta con pradera y matorral montano, bosque temperado de coníferas, bosque boreal, taiga, bosque temperado, praderas y tundra, la región oriental, tiene bosque húmedo y seco tropical, y bosque deciduo tropical y la región australiana se caracteriza por tener bosque y matorral mediterráneo, bosque temperado, praderas temperadas, sabana

y desierto (Allca, 2017). Por lo tanto, *D. hydei* tendría en sus diferentes regiones geográficas todos los tipos de biomas presentes en las especies con las que se agrupa en la Figura 1, en cuanto a *D. mesophragmatica*, *D. machachensis* y *D. cashapamba*, solo han sido registradas en la región neotropical, consistente con los estudios que las han determinado predominantemente como especies, Andina (Figuero, 2017; Mason, Hall y Gausz, 1984), no obstante, *D. mesophragmatica* también ha sido encontrada en la región Oriental, lo que es coherente si se examinan los tipos de biomas presentes en ambas regiones.

La segunda agrupación incluye a *D. novamexicana*, *D. serrata*, *D. ficusphila* y *D. melanogaster*, a pesar de que se esperaría que estas especies compartan la mayoría de regiones geográficas, esto no ocurre en esta agrupación, sin embargo, *D. serrata* se encuentra en casi todas las regiones geográficas, y como es bien conocido, *D. melanogaster* es una especie cosmopolita, por lo que se podría aludir esta agrupación a la amplia distribución geográfica de estas especies, no obstante, la agrupación de *D. serrata*, *D. ficusphila* y *D. melanogaster* se podría deber a que estas tres especies pertenecen al grupo *melanogaster* dentro de *Drosophila* (Anexo 9), razón por la cual, existiría mayor similitud entre sus secuencias debido a su taxonomía, explicando así su agrupación en la Figura 1.

El aumento en la esperanza de vida en *Drosophila*, también se encuentra relacionada con la expresión de los genes *Hsp 23*, al igual que su presencia ante choque térmico por calor (Qin, Neal, Robertson, Westwood y Walker, 2005; Štětina et al., 2015; Arrigo y Ahmad, 1981), además la ausencia de estas proteínas indujo a una recuperación lenta de coma por frío (Štětina et al., 2015), por lo tanto, se espera que exista una agrupación entre especies que poseen el mismo rango altitudinal y/o región geográfica. En la Figura 2, se observan dos agrupaciones, en la primera se encuentra *D. ficusphila*, *D. melanogaster*, *D. serrata*, *D. arizonae*, *D. navojoa* y *D. hydei*; se puede notar, que todas estas especies, comparten los límites inferiores de altitud Figura 8 pero no límites superiores, donde cada especie difiere de la otra con alrededor de 1000m. La variación aminoacídica de los dominios proteicos de *Hsp 23* no parecen mostrar una relación respecto a las regiones geográficas en las que habitan estas especies, debido, a que como se puede observar en la Tabla 1, cada una de estas especies habitan en regiones diferentes,

por lo que no se podría aludir que la agrupación presente se deba a una similitud aminoacídica respecto a las regiones en las que se pueden encontrar estas especies, de hecho, la agrupación dada en el dendrograma de Hsp 23, se ajusta fuertemente a la taxonomía de las especies estudiadas (Anexo 9); la falta de relación entre la variación aminoacídica, genera una expectativa interesante en realizar estudios de expresión génica, que nos permitan comparar la actividad transcripcional de cada gen *Hsp*.

En la segunda agrupación de la Figura 2, no se encuentra relación entre las alturas en la que habitan estas especies y la agrupación dada por los dominios proteicos, debido a que estas cuatro especies, no poseen los mismos límites inferiores ni superiores de altitud; no obstante, esta agrupación muestra algo interesante respecto a las regiones geográficas, debido a que *D. machachensis*, *D. novamexicana*, *D. mesophragmatica*, y *D. cashapamba* son especies que habitan en la región neotropical, por lo tanto, pueden habitar en los bosques antes mencionados de esta región, por lo que es posible aludir que las proteínas Hsp 23 pudieron haber sufrido modificaciones para adaptarse a los climas presentes en los bosques de esta región, lo cual podría analizarse detalladamente si se realizaran estudios de expresión génica como se mencionó anteriormente.

A pesar de que *D. novamexicana* ha sido registrada también en la región neártica y *D. mesophragmatica* en la región oriental, ambas regiones comparten los mismos tipos de bosques que la región neotropical, por lo que la agrupación de estas especies si pueden ser resultado de una adaptación de las proteínas Hsp 23 con las regiones geográficas en las que habitan y por ende a los climas y factores estresantes que presentan las mismas (Allca, 2017).

En la actualidad, no se conoce a profundidad cual es la función específica de las proteínas Hsp 26, sin embargo, ha sido confirmada su participación ante estrés térmico en varias experimentaciones (Marin, Valet y Tanguay, 1993; Dura, 1981); la Figura 3, muestra dos agrupaciones dominantes, donde la primera agrupación, no parece deberse a los límites altitudinales de las especies (Fig 8); a pesar de que en la primera agrupación, todas las especies se encuentran en la región neotropical, no se puede aludir dicha agrupación por la región geográfica en

común en la que habitan estas especies, debido a que el dendrograma se ajusta con relaciones taxonómicas, donde *D. arizonae*, *D. navojoa* y *D. hydei* pertenecen al grupo *repleta* y *D. mesophragmatica* y *D. cashapamba* pertenecen al grupo *mesophragmatica*, concordante con la filogenia realizada por diversos autores (Figuro, 2017), (Mason, Hall y Gausz, 1984). La segunda agrupación, también se encuentra fuertemente relacionada con la taxonomía de las especies, como se mencionó y detallo al grupo al que pertenecen las especies presentes en la Figura 3.

Las proteínas de choque térmico Hsp 27 son una de las proteínas más estudiadas. Se ha comprobado que participan en la protección y resistencia celular tanto ante estrés térmico como oxidativo (Arrigo y Ahmad, 1981; Bruey et al., 2000; Jagla et al., 2018). En un estudio, se observó que el silenciamiento de los genes Hsp 23, Hsp 26 y Hsp 27 desembocó en letalidad, por lo que se ha sugerido que las proteínas respectivas tienen funciones vitales en el desarrollo (Jagla et al., 2018)

Hsp 27 es de gran importancia, debido a que se ha demostrado su presencia en células foliculares somáticas, que rodean quistes en la línea germinal en el germario y vitelio, por lo que se ha sugerido que Hsp 27 podría tener un papel importante en el control de división celular y/o diferenciación de células germinales en el crecimiento del organismo, además, ayudaría a proteger la integridad ovárica ante estrés ambiental (Jagla et al., 2018), razón por la cual, estas proteínas podrían haber sufrido variaciones en función de adaptar a los organismos a diferentes temperaturas o ambientes. Además un estudio determinó que la presencia de Hsp 27 de *Drosophila*, es suficiente para conferir resistencia térmica en células de hámster chino, lo cual indica que la función de resistencia de los small Hsp se conserva a través de la evolución, no obstante, el modo en el que actúan los sHsps para convertir las células en termotolerantes es desconocida al momento (Rollet, Lavoie, Landry y Tanguay, 1992; Simões, Rumjanek y Margis, 2003; Basha, O'Neill y Vierling, 2012). Los antecedentes antes mencionados, nos permiten proponer la existencia de una relación entre la altura y las regiones geográficas respecto a la agrupación dada de los dominios Hsp 27 en la Figura 4, la primera agrupación donde se encuentra *D. arizonae*, *D. serrata* y *D. hydei*, comparten rangos de altitud bajo (Fig. 8), por lo que se presume que se encontrarían expuestas a temperaturas

similares. En cuanto a las regiones geográficas, estas tres especies tienen en común la región neotropical y etiópica, mismas que tienen bosque húmedo y seco tropical y subtropical, chaparral y sabana, por lo tanto, al compartir estas especies los mismos rangos de altitud y región geográfica, se podría aludir su cercanía en la Figura 4, a una posible adaptación de la secuencia aminoacídica respecto a los factores a los que están expuestas estas especies. De modo cercano se encuentra *D. mesophragmatica* y *D. cashapamba* cuya relación taxonómica y regiones geográficas fueron descritas anteriormente.

La agrupación cercana de *D. navjoa* y *D. novamexicana* en la Figura 4, parece responder a las regiones geográficas en las que habitan, donde ambas especies han sido muestreadas en la región neotropical y neártica, además comparten rangos altitudinales inferiores. Estos datos presentados en la Figura 4, nos permiten inferir la posibilidad de una relación entre la variación aminoacídica de los dominios Hsp 27 y la región geográfica en la que habitan estas especies.

6.2 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 68 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* incluyendo en el análisis a *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navjoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*

La Figura 5 muestra el dendrograma de los dominios proteicos Hsp 68, esta proteína ha sido poco estudiada, y lo único que se conoce es que no existió producción de la misma después de exponer a embriones de *Drosophila* a choque térmico (Dura, 1981; Hoffmann, Sørensen y Loeschcke, 2003). Razón por la que no se espera que exista una adaptación de los dominios proteicos a la altura y región geográfica. Los resultados arrojados confirman esta hipótesis, debido a que las especies se encuentran agrupadas según el grupo taxonómico de *Drosophila*.

6.3 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 70 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan *Drosophila mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* incluyendo en el análisis a *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*

La familia de proteínas Hsp 70 sin duda alguna es la proteína principal de choque térmico, por lo que es, una de las más conocidas y estudiadas actualmente. La importancia de estas proteínas en esta investigación radica en que su expresión está estrechamente relacionada con la exposición y aclimatación al frío (Štětina et al., 2015) y como se mencionó anteriormente, ante mayor altitud, menor temperatura (Allca, 2017), razón por la cual se presume que las proteínas Hsp 70, probablemente tienen un rol importante en la adaptación climática de las especies que habitan en altitudes mayores como es el caso de *D. mesophragmatica*, no obstante, los Hsp 70 no solo brindan protección ante temperaturas bajas, sino también en temperaturas elevadas, esto fue comprobado con *D. arizonae*, una especie que está siendo analizada en este estudio, misma que al ser expuesta a temperaturas mayores 40 °C, tuvo mayor producción de proteínas Hsp 70, lo que indico su rol importante en la termoprotección (Newman et al., 2005; Ravagnan et al., 2001). Otro dato importante presentado no únicamente en las proteínas de choque térmico Hsp 70, es el aumento en los niveles de producción de proteínas Hsp en especies que habitan en zonas cálidas respecto a las especies que habitan en climas templados o fríos (Puig, Santos y García, 2020). Además, la producción de Hsp 70 es esencial para la sobrevivencia del organismo ante un choque térmico severo (Gong, 2005). Con estos antecedentes, se esperaría encontrar una agrupación de especies que se encuentren en regiones más cálidas, respecto a especies que se encuentran en regiones templadas o frías. En la Figura 6, existen dos agrupaciones marcadas, en la primera, todas las especies comparten los límites inferiores de altitud a excepción de *D. machachensis* y *D. cashapamba* cuyos rangos altitudinales se encuentran en la Figura 8. En cuanto a las regiones geográficas, esta se encuentra dada mayormente por su taxonomía, donde *D. hydei* y *D. navojoa*, pertenecen al grupo *repleta*, *D. ficusphila* y *D. serrata* pertenecen al grupo *melanogaster* y *D. machachensis* y *D. cashapamba*, a pesar de no pertenecer

al mismo grupo de *Drosophila*, su agrupación se podría justificar debido a que son especies predominantemente Andinas, además han sido poco estudiadas, por lo que no se conocen con precisión otras regiones en las que podrían habitar.

A pesar de que se ha comprobado que Hsp 70, juega un papel importante en la termoprotección, no parece existir una relación adaptativa entre la variación de sus secuencias aminoacídicas y las regiones geográficas en las que habitan.

6.4 Relación de la divergencia del dominio proteico Hsp 83 respecto a la altura y las regiones geográficas en las que habitan *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba* y *D. machachensis* incluyendo en el análisis a *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navoja*, *D. novamexicana* y *D. serrata*

La función de la familia de proteínas Hsp 83 no ha sido dilucidada en su totalidad hasta el momento, sin embargo su sensibilidad ante el choque térmico es lo que la convirtió en objeto de este estudio (Hoffmann et al., 2003; Carmel, et al., 2011). Sin embargo, no se encontró relación entre la agrupación dada en el dendrograma de la Figura 7 y la región geográfica en la que habitan, debido a que el tipo de agrupación está dada por su taxonomía.

6.5 Importancia de las proteínas Hsp en la adaptación a diferentes regiones geográficas en especies del género *Drosophila*

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de choque térmico Hsp tienen funciones muy importantes, principalmente cuando el organismo se encuentra expuesto a temperaturas extremas. Donde los small Hsp son los más influyentes; la importancia de estas proteínas radica en que se encuentran presentes en los testículos y ovarios. Las proteínas Hsp 23, Hsp 26 y Hsp 27 se encuentran presentes en testículos, mientras que en los ovarios se han encontrado a las proteínas Hsp 26 y Hsp 27 (Jagla et al., 2018), por lo tanto, estas proteínas se encuentran en todas las etapas de desarrollo, de hecho se ha comprobado que la omisión de los mismos, desencadena en letalidad en la F1, confirmando así, un

papel esencial en el desarrollo de *Drosophila* (Jagla et al., 2018). Además, se confirmó que la carga materna de *Hsp 23* tiene un papel importante en la tolerancia térmica, ya que al inducir la sobreexpresión de estas proteínas en los ovocitos (Jagla et al., 2018), condujo a un aumento significativo en la tolerancia térmica en embriones y en el rendimiento larval; además, autores han sugerido que los genes de *Hsp* podrían tener un rol importante en la adaptación microclimática (Carmel et al., 2011), donde se ha demostrado que estos, estabilizan y reducen la temperatura local, lo cual disminuye el impacto ante temperaturas extremas a los que están expuestos organismos que habitan en estos microhabitats (Scheffers et al., 2013).

Hoffman y sus colaboradores describieron a las proteínas de choque térmico como factores importantes para la adaptación de temperaturas extremas (Hoffmann, Sørensen y Loeschcke, 2003), también se ha postulado que las condiciones locales son las que determinarían los patrones de termotolerancia en las especies (Carmel et al., 2011; Allca, 2017) por lo tanto, no es absurdo pensar que estas proteínas tengan un papel importante en la adaptación a factores climáticos presentes en biomas de diferentes regiones geográficas.

Todos los antecedentes antes mencionados permitieron plantear la hipótesis de que las variaciones presentes en las proteínas *Hsp* podrían tener una relación con la adaptación de especies del género *Drosophila* en diferentes regiones, y por ende a los diferentes factores estresantes existentes en estas zonas. Los resultados mostraron que no existe una asociación directa entre los dominios analizados con las áreas geográficas. Únicamente los dominios proteicos *Hsp 27* mostraron una asociación con la distribución geográfica, lo cual, podría dar un indicio de un evento adaptativo; no obstante, estos resultados no descartan la posibilidad de que las proteínas *Hsp* tengan influencia en la adaptación a cada región geográfica.

Las variaciones mostradas en los dendrogramas, podrían deberse a diferentes motivos, tales como:

El tamaño; los organismos pequeños requieren de menos recursos para su sobrevivencia, ocupando áreas reducidas, por lo que ocupan mayor diversidad de

hábitats, razón por la cual tienen mayor diversidad (Allca, 2017), lo cual es característico en el género *Drosophila*. La mayoría de especies analizadas, se encuentran en la región neotropical, misma que cuenta con diferentes microecosistemas y microclimas, los cuales generan diferentes condiciones geográficas y por lo tanto, condiciones adaptativas. Esta amplia diversidad de hábitats es una de las posibles causas que pudo complicar una agrupación en los dendrogramas, debido a que, la mayoría de especies se distribuyen en varias regiones geográficas, que se caracterizan por tener diferentes ambientes, lo cual dificultó la clasificación entre zonas cálidas y zonas templadas.

Las proteínas de choque térmico se caracterizan porque sus secuencias son altamente conservadas (Carmel et al., 2011); razón por la cual, los dendrogramas de dominios proteicos Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 68, Hsp 70 y Hsp 83 reflejaron una relación taxonómica y no geográfica.

A pesar de que las proteínas de choque térmico son las más conocidas para protección ante factores estresantes; la adaptación térmica no depende únicamente de estas, debido a que existen otros sistemas como la modificación de enzimas y membrana celular, la protección contra el estrés osmótico (Carmel et al., 2011) reservas energéticas (Hoffmann et al., 2003), la presencia de genes como el Fst, Dca y el hromeaga. Por lo tanto, encontrar una relación directa entre la adaptación de las proteínas Hsp y la resistencia a los diferentes factores estresantes que influyen en regiones geográficas, es compleja, debido a que los mecanismos de protección actúan a nivel celular, de tejidos, órganos, organismos e incluso especies, por lo que se requiere incorporar estudios genéticos, de expresión, ecológicos y fisiológicos.

6.6 Importancia de las proteínas Hsp en la adaptación a diferentes altitudes en especies del género *Drosophila*

En este estudio se tomó en cuenta los rangos altitudinales inferiores y superiores en las especies del género *Drosophila*, en función de estimar la disminución o aumento de temperaturas según la altitud alcanzada por las

especies. Debido a que se espera que especies que habitan en altitudes mayores estén expuestas a temperaturas menores, mientras que especies que viven en altitudes bajas habitan en temperaturas más cálidas (Allca, 2017). No obstante, la temperatura no es el único factor relacionado con la altitud; (Körner, 2007), informo que el incremento de altitud está relacionado con cuatro cambios atmosféricos principales que son el descenso de oxígeno y CO₂, aumento de los rayos V, incremento en la radiación solar y la reducción de temperatura que desemboca en cambios en la humedad ambiental (Allca, 2017). Por lo tanto, la diferencia de altitud debería tener influencia en las proteínas Hsp, debido a que los cambios atmosféricos relacionados con el incremento de altitud, condicionan a las especies a factores estresantes a los que deben enfrentarse y adaptarse para su sobrevivencia.

Los dendrogramas de los dominios Hsp, tuvieron agrupaciones de altitudes similares en Hsp 22, Hsp 23, Hsp 27 y Hsp 70, donde todas las especies agrupadas comparten rangos inferiores de altitud, lo cual, permite inferir que se pueden encontrar a temperaturas y factores estresantes similares, por lo tanto, la resistencia térmica podría ser parecida en estas especies. Esto se basa en que las especies que habitan en zonas con temperaturas bajas, tienen una resistencia mayor cuando son expuestas a choque térmico frío, en comparación con especies que habitan en zonas con temperaturas cálidas (Hoffmann et al., 2003), lo mismo ocurrió con *D. buzzatii*, donde se demostró que las poblaciones que se encuentran en tierras bajas tienen mayor resistencia al calor que las poblaciones que se encuentran en tierras altas (Sorensen, Dahlggaard y Loeschcke, 2001). Esto indica que las especies que se encuentran en las mismas altitudes, están expuestas a factores estresantes similares, y por lo tanto, la respuesta de protección de las proteínas Hsp parece ser muy similar; además, como se mencionó anteriormente, las exposiciones de tiempo prolongado ante factores estresantes hacen que las proteínas Hsp incrementen la resistencia a las células de los organismos expuestos a dichos factores de estrés (Štětina et al., 2015; Jagla et al., 2018).; la resistencia adquirida suele ser heredada, lo cual, a largo plazo podría desembocar en una adaptación a estas condiciones climáticas (Hoffmann, Sørensen y Loeschcke, 2003).

Estos resultados arrojan una relación respecto a la variación aminoacídica de los dominios proteicos Hsp 22, Hsp 23, Hsp 27 y Hsp 70 y la distribución altitudinal de cada especie, sin embargo, se sugiere realizar análisis a nivel poblacional e incorporar análisis estadísticos que respalden esta posible relación adaptativa.

7. CONCLUSIONES

1. La variación aminoacídica de los dominios proteicos Hsp 22, Hsp 23, Hsp 26, Hsp 68, Hsp 70 y Hsp 83 no está asociada a las distribuciones geográficas de las especies analizadas: *D. mesophragmatica*, *D. cashapamba*, *D. machachensis*, *D. arizonae*, *D. ficusphila*, *D. hydei*, *D. melanogaster*, *D. navojoa*, *D. novamexicana* y *D. serrata*, por lo tanto, en este estudio no se ha detectado una asociación adaptativa entre el dominio proteico y las regiones geográficas.
2. No se observó una relación entre los dominios proteicos y la distribución altitudinal de las especies, sin embargo, el dominio Hsp 27 está conservado en las especies analizadas, por lo tanto, es de interés para futuros estudios de expresión de la familia Hsp
3. Se evidencia que las proteínas de choque térmico pueden ser factores que influyan en la adaptación térmica, sin embargo, es necesario la inclusión de otros genes que actúen en la termoprotección. Además, es importante complementar con estudios de expresión génica.

8. REFERENCIAS

- Allca, A. (2017). ECOLOGÍA ALTITUDINAL DE DROSOPHILIDAE (INSECTA - DIPTERA) EN BOSQUE NUBLADO DEL SANTUARIO HISTÓRICO DE MACHUPICCHU (Disertación de licenciatura). Foz do Iguaçu, Brasil.
- Arrigo, A. y Ahmad, C. (1981). Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *MGG Molecular & General Genetics*, 184(1), 73–79. Recuperado de doi: 10.1007/BF00271198
- Bakthisaran, R., Tangirala, R. y Rao, C. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291–319. Recuperado de doi:10.1016/j.bbapap.2014.12.019
- Basha, E., O'Neill, H. y Vierling, E. (2012). Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 106–117. Recuperado de doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.005
- Beaulieu, J., Arrigo, A. y Tanguay, R. (1989). Interaction of *Drosophila* 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus of heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *Journal of cell science*, 92, 29-36. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2777913/>
- Berger, E. y Woodward, M. (1983). Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Experimental Cell Research*, 147(2), 437–442. Recuperado de doi:10.1016/0014-4827
- Betancourt, K. (2012). Cromosomas politénicos de *Drosophila* sp. nov. ¿Especie primitiva del grupo de *Drosophila repleta*?. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1-2), 129-137. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/revista/26028/V/33>
- Bhole, D., Allikian, M. y Tower, J. (2004). Doxycycline-regulated over-expression of hsp22 has negative effects on stress resistance and life span in adult *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(9), 651–663. Recuperado de doi:10.1016/j.mad.2004.08.010

- Borda, M. (2018). QTL para termotolerancia en el ambiente térmico natural, y resistencia al estrés térmico en el modelo *Drosophila* (Disertación doctoral). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Bruey, J., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin., Diaz, C. y Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*, 2(9), 645–652. Recuperado de doi: 10.1038/35023595
- Bublly, A. y Loeschcke, V. (2004). Variation of life-history and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *Drosophila simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary island. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(1), 119–136. Recuperado de doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00419.x
- Carmel, J., Rashkovetsky, E., Nevo, E. y Korol, A. (2011). Differential Expression of Small Heat Shock Protein Genes Hsp23 and Hsp40, and heat shock gene Hsr-omega in Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) along a Microclimatic Gradient. *Journal of Heredity*, 102(5), 593–603. Recuperado de doi: 10.1093/jhered/esr027
- Carver, T., Harris, S., Berriman, M., Parkhill, J., y McQuillan, J. (2011). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464–469. Recuperado de doi: 10.1093/bioinformatics/btr703
- Cayuela, L. y Granzow-de la Cerda, I. (2012). Biodiversidad y conservación de bosques neotropicales. *Ecosistemas*, 21(1-2), 1-5
- Céspedes, D. y Rafael V. (2013). Diversidad del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en la quebrada de Cruz Loma, Pichincha. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34 (1 y 2), 215-221. Recuperado de <http://investigaciones.puce.edu.ec/handle/23000/484>
- Chávez, A. y Sáenz, H. (2009). Implicaciones de las proteínas de choque térmico pequeñas (sHsp/HSPB) en el desarrollo de enfermedades degenerativas. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 29-40. Recuperado de doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.idlp
- Coronato, S., Girolamo, W., Salas, M., Spinelli, O. y Laguens, G. (1999). Biología de las proteínas del Shock térmico. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 59,

- 477-486. Recuperado de http://medicinabuenaosaires.com/revistas/vol59-99/5/v59_n5_1_477_486.pdf
- Cruz, V., Schneider, E., Mastrotto, M., Merriman, D., Sviatoslav, N. y Gracheva, E. (2017). Molecular prerequisites for diminished cold sensitivity in ground squirrels and hamsters. *Cells reports*, 21(12), 3329-3337. Recuperado de [10.1016/j.celrep.2017.11.083](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.083)
 - Díaz, C., Hernández, L., León, D. y Quintero, J. (2020). División Biogeográfica del Mundo. Universidad el Bosque, Colombia.
 - Diepenbrock, L. y Burrack, H. (2016). Variation of within-crop microhabitat use by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blackberry. *Journal of Applied Entomology*, 141(1-2), 1-7. Recuperado de doi: 10.1111/jen.12335
 - Dillon, M. y Frazier, M. (2006). *Drosophila melanogaster* locomotion in cold thin air. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 364–371. Recuperado de doi:10.1242/jeb.01999
 - Dura, J. (1981). Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *MGG Molecular & General Genetics*. 184(3), 381–385. Recuperado de doi:10.1007/bf00352509
 - Feder, M. y Hofmann, G. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Physiology*, 61, 243–283. Recuperado de 10.1146/annurev.physiol.61.1.243
 - Field, D., Tiwari, B., Booth, T., Houten, S., Swan, D., Bertrand, N. y Thurston, M. (2006). Open software for biologists: from famine to feast. *Nature Biotechnology*, 24 (7), 801-803. Recuperado de doi: 10.1038/nbt0706-801
 - Figuero, M. (2017). Filogenia molecular de especies ecuatorianas del grupo *Drosophila mesophragmatica* (Diptera, Drosophilidae). (Disertación de masterado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
 - Gong, W. (2005). Loss of Hsp70 in *Drosophila* Is Pleiotropic, With Effects on Thermotolerance, Recovery From Heat Shock and Neurodegeneration. *Genetics*, 172(1), 275–286. Recuperado de doi: 10.1534/genetics.105.048793
 - Guerrero, R. y Guerrero, C. (2018). Mecanismos moleculares de las proteínas de choque térmico (HSPs) implicados en el desarrollo neoplásico. *Salud Uninorte*, 34 (2), 455-474. Recuperado de doi: <http://dx.doi.org/10.14482/sun.34.2.616.98>

- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41. 95-98.
- Hendrick, J. y Hartl, F. (1993). Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *Annual Biochemistry*, 62 (1), 349–384. Recuperado de doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002025
- Hillis, D. y Bull, J. (1993). AN EMPIRICAL TEST OF BOOTSTRAPPING AS A METHOD FOR ASSESSING CONFIDENCE IN PHYLOGENETIC ANALYSIS. *Systematic Biology*, 42 (2), 182–192. Recuperado de doi: 10.1093/sysbio/42.2.182
- Holmgren, R., Corces, V., Morimoto, R., Blackman, R. y Meselson, M. (1981). Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat-shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3775–3778. Recuperado de doi: 10.1073/pnas.78.6.3775
- Jagla, T., Dubinska, M., Poovathumkadavil, P., Daczewska, M. y Jagla, K. (2018). Developmental Expression and Functions of the Small Heat Shock Proteins in *Drosophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1-12. Recuperado de doi: 10.3390/ijms19113441
- Körner, C. (2007). The use of “altitude” in ecological research. *Ecology and Evolution*, 22(11), 569–574. Recuperado de doi:10.1016/j.tree.2007.09.006
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C y Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. Recuperado de doi: 10.1093/molbev/msy096
- Marin, R., Valet, J y Tanguay, R. (1993). Hsp23 and hsp26 exhibit distinct spatial and temporal patterns of constitutive expression in *Drosophila* adults. *Developmental Genetics*, 14(1), 69-77. Recuperado de 10.1002/dvg.1020140109
- Matzkin, L., Watts, T. y Markow, T. (2009). Evolution of stress resistance in *Drosophila* : interspecific variation in tolerance to desiccation and starvation. *Functional Ecology*, 23(3), 521-527. Recuperado de doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01533.x

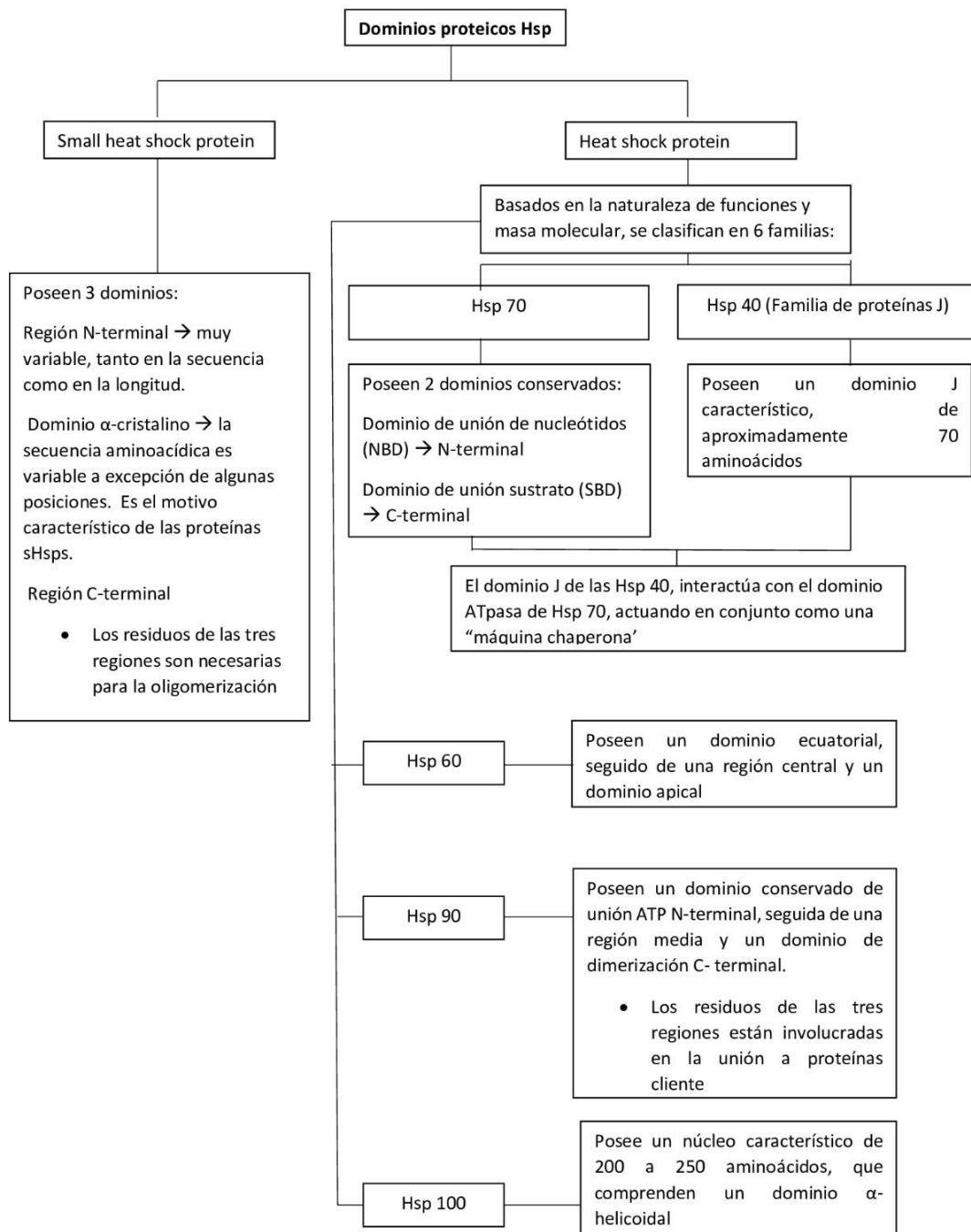
- Morrow, G y Tanguay, R. (2015). *Drosophila* Small Heat Shock Proteins: An Update on Their Features and Functions. *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*, 8, 579-606.
- Morrow, G. y Tanguay, R. (2003). Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(5), 291–299. Recuperado de 10.1016/j.semcd.2003.09.023.
- Morrow, G., Heikkila, J. y Tanguay, R. (2006). Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*. *Cell stress & chaperones*, 11(1), 51-60. Recuperado de doi: 10.1379/csc-166.1
- Morrow, G., Samson, M., Michaud, S. y Tanguay, R. (2004). Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *The FASEB Journal*, 18(3), 598-599. Recuperado de doi: 10.1096/fj.03-0860fje
- Newman, A., Xiao, C. y Robertson, R. (2005). Synaptic thermoprotection in a desert-dwelling *Drosophila* species. *Journal of Neurobiology*, 64(2), 170–180. Recuperado de doi. 10.1002/neu.20132
- Puig, M., Santos, M. y García, M. (2020). Basal hsp70 expression levels do not explain adaptive variation of the warm- and cold-climate O3 + 4 + 7 and OST gene arrangements of *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 1-19. Recuperado de doi:10.1186/s12862-020
- Qin, W., Neal, S., Robertson, R, Westwood, J. y Walker, V. (2005). Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 14(6), 607–613. Recuperado de doi: 10.1111/j.1365-2583.2005.00589.x
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J., Garrido, C y Kroemer, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology*, 3(9), 839–843. Recuperado de doi:10.1038/ncb0901-839
- Richter, K., Haslbeck, M. y Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2), 253–266. Recuperado de doi:10.1016/j.molcel.2010.10.006

- Rollet, E., Lavoie, J., Landry, J. y Tanguay, R. (1992). Expression of drosophila's 27 kDa heat shock protein into rodent cells confers thermal resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185(1), 116–120. Recuperado de doi: 10.1016/S0006-291X(05)80963-5
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular. Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. Recuperado de doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Scheffers, B., Edwards, D., Diesmos, A., Williams. y Evans, T. (2013). Microhabitats reduce animal's exposure to climate extremes. *Global Change Biology*, 20, 495–503. Recuperado de doi: 10.1111/gcb.12439
- Simões, J., Rumjanek, N. y Margis, M. (2003). Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15(1), 33–41. Recuperado de doi:10.1590/s1677-04202003000100005
- Sorensen, J., Dahlgard, J. y Loeschcke, V. (2001). Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional Ecology*, 15(3), 289–296. Recuperado de 10.1046/j.1365-2435.2001.00525.x
- Štětina, T., Košťál, V. y Korbellová, J. (2015). The Role of Inducible Hsp70, and Other Heat Shock Proteins, in Adaptive Complex of Cold Tolerance of the Fruit Fly (*Drosophila melanogaster*). *PLOS ONE*, 10(6), 1-22. Recuperado de doi:10.1371/journal.pone.0128976
- Storey, K. y Storey, J. (2013). Molecular Biology of Freezing Tolerance. *Comprehensive Physiology*, 3, 1283-1308. Recuperado de doi:10.1002/cphy.c130007
- Sun, Y. y MacRae, T. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(21), 2460–2476. Recuperado de doi: 10.1007/s00018-005-5190-4
- Telonis, M., Heerwaarden, B., Johnson, T., Hoffmann, A. y Sgro, C. (2013). New Levels of Transcriptome Complexity at Upper Thermal Limits in Wild *Drosophila* Revealed by Exon Expression Analysis. *Genetics*, 195, 809-830. Recuperado de doi: 10.1534/genetics.113.156224

- Thompson, J., Higgins, D. y Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice, 22(22), 4673-4680. Recuperado de doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Tower, J. (2011). Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Experimental Gerontology*, 46(5), 355–362. Recuperado de doi:10.1016/j.exger.2010.09.002
- Whelan, S. y Goldman, S. (2016). A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 691–699. Recuperado de doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003851>
- Xiao, C., Hull, D., Qiu, S., Yeung, J., Zheng, J., Barwell, T. y Seroude, L. (2019). Expression of Heat Shock Protein 70 Is Insufficient To Extend *Drosophila melanogaster* Longevity. *Genes/Genomes/Genetics*, 9, 4197-4207. Recuperado de doi: 10.1534/g3.119.400782
- Yer, E., Baloglu, M. y Ayan, S. (2018). Identification and expression profiling of all Hsp family member genes under salinity stress in different poplar clones. *Gene*, 618, 324-336. Recuperado de doi:10.1016/j.gene.2018.08.049
- Zhang, J., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Wang, Y., Zheng, H. y Chen, J. (2015). Hsf and Hsp gene families in *Populus*: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics*, 16(1), 181-200. Recuperado de doi:10.1186/s12864-015-1398-3
- Zhao, Y. (2005). Lifespan extension and elevated hsp gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Experimental Biology*, 208(4), 697–705. Recuperado de doi:10.1242/jeb.01439

9. ANEXOS

Anexo 1. Esquema de dominios proteicos de la familia de proteínas Hsp



Anexo 2. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 22 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

```

      10      20      30      40      50      60
Hsp 22 D. machachensis  KQGYQVCLDV SDYKPNELTV KTVNNSLV-I EGKCE-EDED VHGGGY---S SRHFLRRFAL
Hsp 22 D. mesophragmatica  .....F.....V.-...S.-QE..AQ..YHS---.....
Hsp 22 D. cashapamba      Q.....F.....V.-...S.-QQ..EQ..YH----.....
Hsp 22 D. arizonae        .N...S...EF.....V.-...S.-QE..AQ..Y----...T.
Hsp 22 D. ficusphila      .D..KLT...K.--S..K..VLDE.V.LV...S.-QEDG DQ.SYS----...V.
Hsp 22 D. hydei           .....EF.....V.-...S.-QE..AQ.SYH----...T.
Hsp 22 D. navojoa         .N...S...EF.....V.-...S.-QE..AQ..Y----...T.
Hsp 22 D. novamexicana    .....E.....V.-...S.-QQ..DQ..YS----.....
Hsp 22 D. serrata         .D..K.T...K..G--.N..VLDE.V.LV...S.-QQ.G E...YS----...V.
Hsp 22 D. melanogaster    .D..KLT...K.--S..K..VLDE.V.LV...S.-QQ.A EQ..YSS----...V.

      70      80      90      100
Hsp 22 D. machachensis  PEGYEADNTT STLSSDGLLT INVPNPPAVE QALKERWPEI
Hsp 22 D. mesophragmatica  .....K...S...V..S.....A.....
Hsp 22 D. cashapamba      .AD...R...S...V.....A.....
Hsp 22 D. arizonae        .....EK...S...V..S.....A..Q..I...
Hsp 22 D. ficusphila      .....KVK.S...V..S...T.Q ES.....
Hsp 22 D. hydei           .....K...S...V..S.....A..Q..I...
Hsp 22 D. navojoa         .....EK...S...V..S.....A..Q..I...
Hsp 22 D. novamexicana    .....K...S...I.....Q E.....
Hsp 22 D. serrata         .....KV...S...V.....Q E.....
Hsp 22 D. melanogaster    .....KV.....V..S...G.Q ET...E.T.

```

Anexo 3. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 23 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

```

      10      20      30      40      50      60
Hsp 23 D. machachensis  VGRDGFQVCM DVAQFKPSEL NVKVVDNSIV VEGKHE-ERE DDHGYYIT---RHFVRRYAL
Hsp 23 D. mesophragmatica  .....C.....F.....
Hsp 23 D. cashapamba      .....S..I I.....A...F.....
Hsp 23 D. arizonae        I.....VI.....F.....
Hsp 23 D. ficusphila      I.....SH.....T..Q..VL...T.....F.....I...
Hsp 23 D. hydei           I.....N.....F.....
Hsp 23 D. navojoa         I.....Q.....V.....F.....
Hsp 23 D. novamexicana    .....I.....F.....
Hsp 23 D. serrata         I.....SH.....V..Q..VL...H.....
Hsp 23 D. melanogaster    I.....SH.....V..Q..VL...N.....F.....

      70      80      90
Hsp 23 D. machachensis  PEGYESDKVA STLSSDGLLT VVVPKPAAIE EKTGARV
Hsp 23 D. mesophragmatica  .....A.....N.....D.GSP..
Hsp 23 D. cashapamba      .....AE.....N...L...GSP..
Hsp 23 D. arizonae        .D...A..T.....S.....D.SNP..
Hsp 23 D. ficusphila      .....A...E.....P..L...GNE..I
Hsp 23 D. hydei           .D...A.....S.....GNP..
Hsp 23 D. navojoa         .D...A..T.....S.....D.SNP..
Hsp 23 D. novamexicana    .Q...A.....S.....D.GSE.T
Hsp 23 D. serrata         .....DA.....S...P...D.GTE..
Hsp 23 D. melanogaster    .P...A.....I...P...D.GNE..I

```

Anexo 4. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 26 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

	10	20	30	40	50	60
Hsp 26 <i>D. machachensis</i>	GKDGLQVCM	VAQFNPSELS	VKVVDNSIVV	EGNHE-ERED	DHGYIS----	RHFVRRYALP
Hsp 26 <i>D. mesophragmatica</i>F.....	..T..T.R..NI..	..K..-...G.
Hsp 26 <i>D. cashapamba</i>F.....	..T..T..NM.	..K..-...G.
Hsp 26 <i>D. arizonae</i>F.....	..T..T..NCV..	..K..-...G.
Hsp 26 <i>D. ficusphila</i>F.....K...ND..L	..K..-..Q.	..H.M----KV.
Hsp 26 <i>D. hydei</i>F.....	..T..T..NF.I.	..K..-...F.L.....
Hsp 26 <i>D. navojoa</i>F.....	..T..T.N..CV..	..K..-...G.
Hsp 26 <i>D. novamexicana</i>F.....	..T..T..NK..-...G.
Hsp 26 <i>D. serrata</i>F.....K...NL.	..K..-..Q.	..H.M----KV.
Hsp 26 <i>D. melanogaster</i>F.....K...ND..L	..K..-..Q.	..H.M----KV.

	70	80	90	100
Hsp 26 <i>D. machachensis</i>	KGYESDRVIS	SLSSDGLTV	SVEKPOPIED	KSKERWQIQ
Hsp 26 <i>D. mesophragmatica</i>	..DG.....V..N..R.I..
Hsp 26 <i>D. cashapamba</i>	..DG.....V..N..D.I..
Hsp 26 <i>D. arizonae</i>	..DG..V..V..N..I..I..
Hsp 26 <i>D. ficusphila</i>	E..KA.Q.V.	Q.....V..I..A.Q.I..
Hsp 26 <i>D. hydei</i>	Q..DG..V..V..N..L..T..I..I..
Hsp 26 <i>D. navojoa</i>	..DG..V..V..N..I..I..
Hsp 26 <i>D. novamexicana</i>	Q..A..V..V..N..I..I..
Hsp 26 <i>D. serrata</i>	E..KPEQ.V.	Q.....V..I..A..T..I..I..
Hsp 26 <i>D. melanogaster</i>	D..KPEQ.V.	Q.....V..I..AV..I..I..

Anexo 5. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos sHsp 27 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

	10	20	30	40	50	60
Hsp 27 <i>D. machachensis</i>	GKDGFQVCM	VAQFKPSELT	VKVLDKTVIV	EGKHE-ERED	G-HGMIQ---	-RHFVRKYTL
Hsp 27 <i>D. mesophragmatica</i>T..T.R..N	..V.NSI..Y.S---R.A.
Hsp 27 <i>D. cashapamba</i>T..T..N	..V.NSIM.Y.S---R.A.
Hsp 27 <i>D. arizonae</i>	DEK..RIDI.	..R..R.H.IV	..TN.DYI..	..N.N-K.SE	AN.YVE---L.
Hsp 27 <i>D. ficusphila</i>S..N..S	..V..V..
Hsp 27 <i>D. hydei</i>EANV.	..HL..Y.I.	..TTGD..V.	..A...-K.R.	-DSFVG---	..I.KRFV.
Hsp 27 <i>D. navojoa</i>S	..Q..I..
Hsp 27 <i>D. novamexicana</i>S	..V..I..
Hsp 27 <i>D. serrata</i>	DEK..RIDI.	..R..H.H.IV	..TN.DYI..	Q.N.N-R.NE	SN..VE---L.
Hsp 27 <i>D. melanogaster</i>S...N...	..V.N..V.

	70	80	90	100
Hsp 27 <i>D. machachensis</i>	PKDYDGNV	STVSSDGVLT	LKAPPPPT-K	EQANKERIVQ
Hsp 27 <i>D. mesophragmatica</i>	..G...DK.I	..SL.....	VNV.K.RP-I	..DKS...VI.
Hsp 27 <i>D. cashapamba</i>	..G...DK.I	..SL.....	VSV.K.QP-I	..DKS...VI.
Hsp 27 <i>D. arizonae</i>	..RC.NA.E.I	..DI....I..	I.....PS.	YYTPS..L.R
Hsp 27 <i>D. ficusphila</i>	..F.P.....N-	..KS.....
Hsp 27 <i>D. hydei</i>	..RC.YP...R	..EL....I..	VRC..YLS-NS-
Hsp 27 <i>D. navojoa</i>S-...K.....
Hsp 27 <i>D. novamexicana</i>S-.....
Hsp 27 <i>D. serrata</i>	..RC.NA.E.I	..DI....I..	I.....PA.	YYXPC..L.R
Hsp 27 <i>D. melanogaster</i>	..CF.P.E..S-...KS.....

Anexo 6. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 68 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

	10	20	30	40	50	60	70
Hsp 68 D. machachensis	GIDLGTTYSC	VGVFQHGKVE	LIANDQGNRT	TPSYVAPTDS	ERLIGDAAKN	QVAMNEVNSV	FDAKRLIGR
Hsp 68 D. mesophragmaticaY.....K.T.
Hsp 68 D. cashapambaETTQTI
Hsp 68 D. arizonaeX.S.T.
Hsp 68 D. ficusphilaK.
Hsp 68 D. hydeiR.
Hsp 68 D. navojoaS.T.
Hsp 68 D. novamexicanaK.
Hsp 68 D. serrataK.
Hsp 68 D. melanogasterY.....K.

	110	120	130	140	150	160	170
Hsp 68 D. machachensis	FKGEEKRFAP	EEISSMVLVK	MKETAEAYLG	TNIRDAVITV	PAYFNDSQRQ	ATKDAGAIAG	LNVLRIINE
Hsp 68 D. mesophragmaticaQ.....R.....QS.T.H.
Hsp 68 D. cashapamba	Y.D.K.T.F.T.KIVTN.T.
Hsp 68 D. arizonaeT.
Hsp 68 D. ficusphilaT.F.TVK.
Hsp 68 D. hydeiQ.C.S.
Hsp 68 D. navojoaQ.T.K.
Hsp 68 D. novamexicanaT.
Hsp 68 D. serrataT.F.S.
Hsp 68 D. melanogasterAN.C.S.T.TVK.I.

	210	220	230	240	250	260	270
Hsp 68 D. machachensis	VSILTIDEGS	LFEVRATAGD	THLGGEDFDN	RLVNHLADEP	KRKFKKDLRS	NPRALRRRLRT	AAERAKRTL
Hsp 68 D. mesophragmaticaT.E.Y.M.G
Hsp 68 D. cashapambaS.D.-	I.KS.T.FVQ.H.TTK.C.
Hsp 68 D. arizonaeX.M.
Hsp 68 D. ficusphilaS.E.Y.
Hsp 68 D. hydei
Hsp 68 D. navojoa
Hsp 68 D. novamexicanaS.F.
Hsp 68 D. serrataS.F.E.T
Hsp 68 D. melanogasterS.F.E.Y.

	310	320	330	340	350	360	370
Hsp 68 D. machachensis	EELCADLFRN	TLDPVEKALN	DAKMDKSLIH	DIVLVGGSTR	IFKVQNLQ	FFSGKSLNLS	INPDEAVAY
Hsp 68 D. mesophragmaticaA.S.QC.
Hsp 68 D. cashapambaN.S.M.R.L.A.R.D.L.N.E.K.
Hsp 68 D. arizonaeG.Q.S.
Hsp 68 D. ficusphilaG.Q.A.GQ.S.G.T.
Hsp 68 D. hydeiG.Q.S.
Hsp 68 D. navojoaG.Q.S.N.
Hsp 68 D. novamexicanaG.S.Q.Q.NS.
Hsp 68 D. serrataG.Q.GQ.S.N.
Hsp 68 D. melanogasterG.E.K.Q.S.G.T.

	410	420	430	440	450	460	470
Hsp 68 D. machachensis	IETAGGVMTK	LIERNRIPC	KQSKTFTTYA	DNQPAVTQV	FEGERAMTKD	NNVLGNFNLT	GIPPAPRGV
Hsp 68 D. mesophragmaticaT.S.SG.SI.L.Q.A.T.D.S
Hsp 68 D. cashapambaSV.K.TT.TTQ.SG.LI.Y.L.K.E.S
Hsp 68 D. arizonaeI.T.
Hsp 68 D. ficusphilaI.L.T.
Hsp 68 D. hydeiT.
Hsp 68 D. navojoaI.T.
Hsp 68 D. novamexicanaT.
Hsp 68 D. serrataI.L.T.
Hsp 68 D. melanogasterI.L.T.D.V.

	510	520	530	540	550	560	570
Hsp 68 D. machachensis	IKNDKGRLSQ	SDIDRMVGEA	EQYAEDEKHI	RQRIAARNQL	ESYVFGVKEA	VEKAG--DKI	PQSERSSVL
Hsp 68 D. mesophragmaticaA.N.R.D.QS.S.G.Q.

```

Hsp 68 D. cashapamba      .T.....K E..E...N... .K.RN..D.Q KET.S.K.G. ...C.NM.AT LDEDNLKS.. AD.D.TTIM
Hsp 68 D. arizonae        .....A.....S.....I.....A.N.K---S.....T..
Hsp 68 D. ficusphila      .....A...LN...K.....R.....A.QG.--.R. SAADK....
Hsp 68 D. hydei           .....A.....N.....I.....A..A---S...H....
Hsp 68 D. navojoa         .....A.....S.....A.N.K---S.....T..
Hsp 68 D. novamexicana    .....AE.....N.....I.....A.N.---...D..R..
Hsp 68 D. serrata         .....A...LS...K.....Q.....A.QG.--.R. SEADK....
Hsp 68 D. melanogaster    .....A...LS...K.....R.....T.L.....A.NG.--.R. SAADK..IV

```

610

```

.....|.....|
Hsp 68 D. machachensis    ICSPVMTKMH
Hsp 68 D. mesophragmatica Y.-----
Hsp 68 D. cashapamba     V.N.II..LY
Hsp 68 D. arizonae       V.....
Hsp 68 D. ficusphila     F...I....
Hsp 68 D. hydei          V.....L.
Hsp 68 D. navojoa        V.....
Hsp 68 D. novamexicana   F.....
Hsp 68 D. serrata        F...I....
Hsp 68 D. melanogaster   F...I....

```

Anexo 7. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 70 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

```

      10      20      30      40      50      60
Hsp 70 D. machachensis  IGIDLGTTFS CVGVYQH-GK VEIIANQGN RTTPSYVAFT -DSERLIGDA AKNQVAMNPK NTVFDARRL
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....Y. ....
Hsp 70 D. cashapamba
Hsp 70 D. arizonae  F..KV.NSTL .IAYVKAD.. A.V...K..D .VSQA CLLWN G.T.TEC.LT ..QKM.TR.. QA.AHSFQ.
Hsp 70 D. ficusphila  ...F.NEGC Y.AAARS-G I.TL...YSL .A...F...D -GKK.I..V. ...QVT.M. ...GGF...
Hsp 70 D. hydei  ...F.NEGC Y.AAARS-G I.TL...YSL .A...F...D -GKK.I..V. ...QVT.M. ...GGF...
Hsp 70 D. navojoa  ...F.NEGC Y.AAARS-G I.TL...YSL .A...F...D -GKK.I..V. ...QVT.M. ...GGF...
Hsp 70 D. novamexicana  ...F.NEGC Y.AAARS-G I.TL...YSL .A...V...D -GKK.I..V. ...QVT.M. ...GGF...
Hsp 70 D. serrata  ...F.NEGC Y.AAARS-G I.TL...YSL .A...F...D -GKK.I..V. ...QVT.M. ...GGF...
Hsp 70 D. melanogaster  .....Y. .... P ..... R .....

```

```

      110      120      130      140      150      160      1
Hsp 70 D. machachensis  KVVSD-GGKP KIGVEFKGEQ KRFAPKEISS MVLVVKMKEA EAYLQGSIT- DAVITVPAYF NDSQRQATR
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....R...
Hsp 70 D. cashapamba
Hsp 70 D. arizonae  RMEHTVPADR DDQEDTIVTK EMS.F.VTVE LLRAELELAR QYHTDTEHEP I..LSI.S.Y PAKSIKMLS
Hsp 70 D. ficusphila  R.EERSD.SI G.K.NYL.D QH.G..QLTA .LFT.L...S A.AMQTQVN-.C..AC.VF. TNAE.R.LL
Hsp 70 D. hydei  R.E.RND.SI G.K.NYLN.D QH.S..QLTA .LFT.L...S A.AMQTQVN-.C..C.VF. TNAE...LL
Hsp 70 D. navojoa  R.EPRSD.SI G.K.NYLN.D QH.S..QLTA .LFT.L...S A.AMQTQVN-.C..C.IF. TNAE...LL
Hsp 70 D. novamexicana  R.EARND.SI GFK.NYLQ.D QH.T..QLTA .LFT.L...S A.AMQTQVN-.C..AC.VF. TNAE.R.LL
Hsp 70 D. serrata  R.EARGD.SI G.K.NYL.D .H.G..QLTA .LFT.L...S A.AMQTQVN-.C..AC.VF. TNAE.R.LL
Hsp 70 D. melanogaster  .....Y...S .....T..... E.....

```

```

      210      220      230      240      250      260      2
Hsp 70 D. machachensis  LKGE--RNV LIFDLGGGTF DVSILTIDEG SLFEVRSTAG DTHLGGEDFD NRLVTHLAAE FKRKYKQDM
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....A.....
Hsp 70 D. cashapamba
Hsp 70 D. arizonae  E.QQEAR.H .TIKC..LYS NFALYAVQN. -Y.IELA.Y. PFPI..RQ.T DA..QFIC.. ....L.P
Hsp 70 D. ficusphila  DLF.DKP... IFV.F.HSSL QA.ACAFTK. -KLKMLASTW .Q-I..R.I. LA.GDYF.K. .QDR..INA
Hsp 70 D. hydei  DLF.EKP... IFV.F.HSAL Q..ACVFTK. -KLKMLASSW .Q-I..R.I. LA.ADYFTT. .LER..INA
Hsp 70 D. navojoa  DLF.DKP... IFV.F.HSAL Q..ACAFTK. -KLKMLASSW .Q-I..R.I. LA.AE.FTK. .LER..INA
Hsp 70 D. novamexicana  DLF.DKP... IFV.F.HSAL Q..ACVFTK. -KLKMLASSW .Q-I..R.I. LA.AEFPTK. .LER..INA
Hsp 70 D. serrata  DLF.DKP... IFV.F.HSSL Q..AC.FTK. -KLKMLASTW .Q-I..R.I. LA.ADYFSK. .QER..INS
Hsp 70 D. melanogaster  .....

```

```

      310      320      330      340      350      360      3
Hsp 70 D. machachensis  EVDALFE-GH DFYTKVSRAR FEELCGDLFR NTLAPVEKAL NDAKMDK-- HMTHDIVLVG GSTRIPKVQ
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....A.....
Hsp 70 D. cashapamba  .....A.....
Hsp 70 D. arizonae  YI.S.MD-V YNAQM.... .S.IQPVIN GLIQQLSECV ER.QQTHPEL KR.D...L. ATMQ...L.
Hsp 70 D. ficusphila  NIECFLD-DV .VSSSMQ..E M...AP. K RVEQTFKRL. AES.LQL--- DD..SVEI...S...A.R
Hsp 70 D. hydei  NIECFLD-DV .VSSSMQ..SQ M...APVLQ RVEQTFK.L. VES.LSL--- DD..SVEI...S...S.R
Hsp 70 D. navojoa  NIECFLD-DI .VSSSMQ..SQ M...APILQ RVEQTFK.L. VES.LSL--- DD..SVEI...S...A.R
Hsp 70 D. novamexicana  NIECFLD-DV .VSSSMQ..SQ M...APVLQ RVEQTFK.L. VES.LSL--- DE..SVEI...S...SIR
Hsp 70 D. serrata  NIECFLD-DI .VSSSMQ..SQ M...APV.Q RVEQTFKRL. AES.LQL--- DD..SVEI...S...A.R
Hsp 70 D. melanogaster  .I.....-Q .....A..... Q..... GQ.....

```

```

      410      420      430      440      450      460      4
Hsp 70 D. machachensis  ILSGDQSGKI QDVLLVDVAP ----LSLGIE TAGGVMTKLI ERNCRIPCKQ TKTFSTYADN QPGVAIQVY
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....S.....
Hsp 70 D. cashapamba
Hsp 70 D. arizonae  F.....
Hsp 70 D. ficusphila  .M.--PAVRV REFGVT.LQN --YAVKVLWD SE.NAAPGE. .IFPQFHSP FSRLI.INRK G.-FNVSIV
Hsp 70 D. hydei  .M.--PAVRV REFGVT.IQN --YAVKVLW. GD.TSSNGEV .IFPQFHSP FSRLV.I.RK S.-FVASIV
Hsp 70 D. navojoa  .M.--PAVRV REFGVT.IQN --YAVKVLW. GD.TSSNGEV .IFPQFHSP FSRLV.I.RK S.-FVASIV
Hsp 70 D. novamexicana  .M.--PAVRV REFGVT.IQN --YAVKVLWD GD.SSSNGEV .IFPQFHSP FSRLV.I.RK G.-FNASIV
Hsp 70 D. serrata  .M.--PAVRV REFGVT.IQN --YAVKVLWD GE.SAAPGE. .IFPQFHSP FSRLI.INRK G.-FNVSIV
Hsp 70 D. melanogaster  .....S..... S.....

```

```

      510      520      530      540      550      560      5
Hsp 70 D. machachensis  IEVTFDMDAN GILNVTAKEM S-----
Hsp 70 D. mesophragmatica  .....S.....

```

```

Hsp 70 D. cashapamba -----
Hsp 70 D. arizonae -----
Hsp 70 D. ficusphila VKLKVRINN. .VLISSATL VEKKEAEEAA AAEEQAAAE --KPGEQA-- NNSSEPMDG QQEAYY
Hsp 70 D. hydei VKLKVRINQ. .VLISSAVL VDRKEQEEAA AASEQAAADD -KNAGEQAGP --NASEQAEA QPE---
Hsp 70 D. navojoa VKLKVRINL. .VLISSAVL VDRKEQEEAA AANEMATDEK -AAGGEQAG- --TAGEQAEA QPEAYF
Hsp 70 D. novamexicana VKLKVRINQ. .VLISSATL VDRKEQEEAA AAGEQAAAAE EKSAGEQAAP --NAAESADG QPE---
Hsp 70 D. serrata VKLKVRINN. .VLISSATL VEKKEAEEAA AA-EQAASEE --KLAEQAGG ANAAGEPTDG QPE---
Hsp 70 D. melanogaster .....L.....S.....

```

```

                                     610      620      630      640      650      660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Hsp 70 D. machachensis ---TGKAKNI TINNDKGRLS QAEIDRMVNE AERYADEDEK QRQRISARNS LEGYVFGVKQ AVEQAS
Hsp 70 D. mesophragmatica ---.....K.....D.....
Hsp 70 D. cashapamba -----
Hsp 70 D. arizonae -----
Hsp 70 D. ficusphila KKKAS..TEL PLECSTHGF. PVDLGNFTQQ EAKMIGN.Q. ETE..D.K.A ..EF.YDMRN KLQGGP
Hsp 70 D. hydei KKK.K.DIEL PMEPIHGF E PTVLTSYAQQ EAKMIGN.Q. ETE..D.K.A ..EF.YDMRN KLQGGP
Hsp 70 D. navojoa KKKIK.DIEL PMEPIHGF E P.VLSGYAQQ EAKMIGN.Q. ETE..D.K.A ..EF.YDMRN KLQGGP
Hsp 70 D. novamexicana KKK.T..IEL PMEVAHGFN P.DLSNFTQQ ETKMISN.Q. ETE..D.K.A ..EF.YDMRN KLQGGQ
Hsp 70 D. serrata KKKAS..TEL PLECTHGF. PIDLGNFTQQ ESKMIGN.Q. ETE..D.K.A ..EF.YDMRN KLQDGP
Hsp 70 D. melanogaster ---.....K.....K.....H....TS..A ..S...N... S...P

```

```

                                     710
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Hsp 70 D. machachensis EFEFKLELT QHCS
Hsp 70 D. mesophragmatica ...Y.....Y..
Hsp 70 D. cashapamba -----
Hsp 70 D. arizonae -----
Hsp 70 D. ficusphila TYTSR.QS.H .RTD
Hsp 70 D. hydei TYTNR.TA.L .KTD
Hsp 70 D. navojoa TYTSR.TA.L .KTD
Hsp 70 D. novamexicana TYTNR.TA.Q KQTD
Hsp 70 D. serrata TYTSR.QA.H .KTD
Hsp 70 D. melanogaster ..DH.ME... R...

```

Anexo 8. Alineamiento múltiple de los dominios proteicos Hsp 83 en 10 especies del género *Drosophila*. Los puntos (.) indican conservación aminoacídica entre las especies analizadas y las barras medias (-) indican ausencia del aminoácido

	10	20	30	40	50	60	70
Hsp 83 D. machachensis	DYLEESKIKE	IVNKHSPQIG	YPIKLLVKE	REKEVSDDEA	DDETKEG-DA	KKEMDTDEPK	IEDVGEDED
Hsp 83 D. mesophragmaticaK.....E
Hsp 83 D. cashapambaDK.....E
Hsp 83 D. arizonaeA.....K.....ED.....
Hsp 83 D. ficusphilaDR.....K.....DEE
Hsp 83 D. hydeiK.....E
Hsp 83 D. navojoaA.....K.....E
Hsp 83 D. novamexicanaK.....EE
Hsp 83 D. serrataK.....ED
Hsp 83 D. melogasterK.....EE.....

	110	120	130	140	150	160	170
Hsp 83 D. machachensis	TRNPDDISQE	EYGEFYKSLT	NDWEEHLAVK	HFSVEGQLEF	RALLFIPRRT	PFDLFEN--Q	KKRNNIKLY
Hsp 83 D. mesophragmaticaD.....
Hsp 83 D. cashapambaD.....
Hsp 83 D. arizonaeD.....
Hsp 83 D. ficusphilaD.....
Hsp 83 D. hydeiD.....
Hsp 83 D. navojoaD.....
Hsp 83 D. novamexicanaD.....
Hsp 83 D. serrataD.....
Hsp 83 D. melogasterD.....

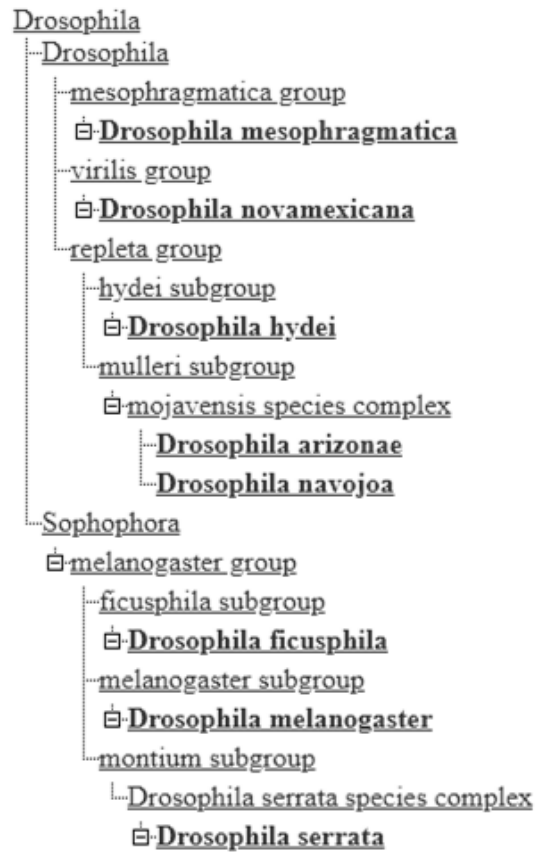
	210	220	230	240	250	260	270
Hsp 83 D. machachensis	LNISRREMLQQ	NKVLKVIKRN	LVKKTMLIE	ELTEDKENYK	KFYDQFSKNL	KLGVHEDSNN	RAKLADFMR
Hsp 83 D. mesophragmaticaL.....
Hsp 83 D. cashapambaE.....L.....
Hsp 83 D. arizonaeL.....
Hsp 83 D. ficusphilaL.....
Hsp 83 D. hydeiL.....
Hsp 83 D. navojoaL.....
Hsp 83 D. novamexicanaL.....
Hsp 83 D. serrataL.....
Hsp 83 D. melogasterL.....

	310	320	330	340	350	360	370
Hsp 83 D. machachensis	GESKDQVSNS	AFVERVKVRG	FEVVMTEPI	DEYVIQHLKE	YKQKQLVSVT	KEGLELPED	EEKKKREED
Hsp 83 D. mesophragmaticaA.....A.....
Hsp 83 D. cashapambaA.....A.....
Hsp 83 D. arizonaeA.....A.....
Hsp 83 D. ficusphilaA.....T.....
Hsp 83 D. hydeiA.....A.....
Hsp 83 D. navojoaA.....A.....
Hsp 83 D. novamexicanaV.....A.....T.....
Hsp 83 D. serrataA.....D.....
Hsp 83 D. melogasterA.....S.....

	410	420	430	440	450	460	470
Hsp 83 D. machachensis	PCCIVTSQFG	WSANMERIMK	AQALRDTSTM	GYMAGKKHLE	INPDHPIVET	LRQKADADKN	DKAVKDLVI
Hsp 83 D. mesophragmaticaD.....
Hsp 83 D. cashapambaA.....
Hsp 83 D. arizonaeE.....
Hsp 83 D. ficusphilaA.....Q.....
Hsp 83 D. hydei
Hsp 83 D. navojoaE.....
Hsp 83 D. novamexicana
Hsp 83 D. serrataA.....Q.....
Hsp 83 D. melogasterA.....Q.....

	510
Hsp 83 D. machachensis	LGIDEDEPMT TEDAQSA
Hsp 83 D. mesophragmatica
Hsp 83 D. cashapamba
Hsp 83 D. arizonae
Hsp 83 D. ficusphila
Hsp 83 D. hydei
Hsp 83 D. navojoa
Hsp 83 D. novamexicana
Hsp 83 D. serrata
Hsp 83 D. melogasterD.....

Anexo 9. Relaciones taxonómicas de especies del género *Drosophila*



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>