



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EL PAPEL DE LOS CARDENÓLIDOS EN LA
INTERACCIÓN *Pentalinon andrieuxii* Mull-
Syntomeida epilais Walker Y SU EFECTO EN LA
METILACIÓN DEL ADN DEL INSECTO COMO
ESTRATEGIA ECOLÓGICA DE CONSERVACIÓN**

Tesis que presenta

ISMAEL FERNANDO VILLEGAS ACOSTA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

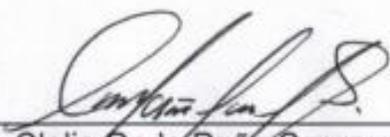
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Ismael Fernando Villegas Acosta** titulado El papel de los cardenólidos en la interacción *Pentalinon andrieuxii* Mull-Syntomeida *epilais* Walker y su efecto en la metilación del ADN del insecto como estrategia ecológica de conservación, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en el Laboratorio de Química Orgánica y en el Laboratorio de Epigenética y Cromatina de Plantas de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de febrero de 2019.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



ISMAEL FERNANDO VILLEGAS ACOSTA

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado El papel de los cardenólidos en la interacción *Pentalinon andrieuxii* Mull-Syntomeida *epilais* Walker y su efecto en la metilación del ADN del insecto como estrategia ecológica de conservación, en el que participé bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por la beca otorgada número 453923.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y a la Dra. Clelia De la Peña Seaman, por la asesoría y ayuda en la realización de la tesis.

A los técnicos Karlina García Sosa, Fabiola Escalante Erosa, Eduardo Castillo Castro y Matilde Margarita Ortiz García, por su valiosa ayuda en la realización de este proyecto de investigación, apoyo en mi desarrollo académico dentro de los diferentes laboratorios y en las técnicas de laboratorio realizadas.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica y Laboratorio de Epigenética y Cromatina de Plantas, por las aportaciones, ayuda y consejos.

DEDICATORIAS

A mi familia, que me ha brindado siempre su apoyo de todas las formas posibles para poder cumplir las metas que he establecido a lo largo de mi vida. En especial a las mujeres que forman parte de ella: mi mamá Nohemí, Carmen, Montserrat, Rosaura, Adelina, Chavelita.

Sin dejar de mencionar a mi papá Alfonso, Omar, Gustavo y Salvador, hombres que me han aportado consejos invaluable.

Finalmente, a mis amigos que a lo largo de las experiencias vividas se han formado lazos a los de una segunda familia Rosa, Javier, Mary José y Pedro.

Muchas gracias.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	12
CAPÍTULO II	13
2. CRÍA Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO DE <i>Syntomeida epilais</i>.....	13
2.1 INTRODUCCIÓN	13
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.3 RESULTADOS	16
2.4 DISCUSIÓN	20
CAPÍTULO III	23
3. BÚSQUEDA DE CARDENÓLIDOS EN <i>N. oleander</i>, <i>P. andrieuxii</i> Y <i>A. obesum</i> ..	23
3.1 INTRODUCCIÓN	23
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.3 RESULTADOS	28
3.4 DISCUSIÓN	35

CAPÍTULO IV	37
4. METILACIÓN DE 5-mC ASOCIADOS A LA ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO DE <i>S. epilaís</i>	37
4.1 INTRODUCCIÓN	37
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.3 RESULTADOS	38
4.4 DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO V	43
5. DISCUSIÓN GENERAL	43
CAPÍTULO VI	47
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	47
6.1 CONCLUSIONES	47
6.2 PERSPECTIVAS	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49
8. ANEXOS	57
CAPÍTULO 3	57
CAPÍTULO 4	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida holometábolo de <i>S. epilais</i> (a) Huevo (b) Larva (c) Pupa (d) Polilla.....	6
Figura 1.2 Estructuras de olenadrina, nerigosida y urechitoxina, así como los azúcares presentes en cada uno de los diferentes cardenólidos.....	8
Figura 1.3 Planta de <i>Pentalinon andrieuxii</i> cultivada en vivero.....	9
Figura 1.4 Estrategia experimental.....	12
Figura 2.1 Contenedores usados para la cría de <i>S. epilais</i> a) contenedor de plástico, b) contenedor de vidrio c) contenedor de vidrio con cartón de huevo.....	14
Figura 2.2 Enfermedades detectadas en larvas de <i>S. epilais</i> asociadas a la humedad en el contenedor y contacto con sus heces. a) larvas muertas de <i>S. epilais</i> , b) larva de <i>S. epilais</i> con hongo c) larvas de <i>S. epilais</i> enfermas sobre hojas de <i>N. oleander</i>	16
Figura 2.3 Porcentaje de pérdida de humedad en hojas de plantas usadas como alimento para larvas de <i>S. epilais</i>	17
Figura 2.4 Pupas de <i>S. epilais</i> y características morfológicas sexuales a) macho b) hembra.	18
Figura 2.5 Cópula de <i>S. epilais</i> en cautiverio a) Cópula de polillas en una relación de 3 machos y 1 hembra b) Hembra ovipositando en hojas de <i>P. andrieuxii</i> en condiciones de cautiverio.	19
Figura 2.6 Huevos de <i>S. epilais</i> , círculo negro: huevos no viables presentando características amorfas y círculo azul: huevos viables, presentando características óptimas para su desarrollo.....	19
Figura 3.1 Perfiles cromatográficos por CCD de extractos totales de plantas hospederas de <i>S. epilais</i> . PA) <i>P. andrieuxii</i> , AO) <i>A. obesum</i> , NO) <i>N oleander</i>	28
Figura 3.2 Perfiles cromatográficos de las fracciones semipurificadas de plantas	

hospederas de <i>S. epilais</i> ,(AO) <i>A. obesum</i> , (NO) <i>N. oleander</i> y (PA) <i>P. andrieuxii</i> . a) Polaridad baja, b) Polaridad media y c) Polaridad alta	29
Figura 3.3 Perfiles cromatográficos de las fracciones de plantas hospederas de <i>S. epilais</i> en CG-ES a) Polaridad baja, b) Polaridad media.	30
Figura 3.4 Perfiles cromatográficos por HPLC de oleandrina (negro t_R min 8.01 min y fracción de mediana polaridad de <i>N. oleander</i> enriquecida con oleandrina (azul).....	30
Figura 3.5 Perfiles de HPLC de la fracción de mediana polaridad del extracto metanólico de <i>S. epilais</i> y el estándar de oleandrina ($t_R = 8.01$ min).	32
Figura 3.6 Perfil cromatográfico en CCD de los productos asilados de la hidrólisis ácida de oleandrina.	32
Figura 3.7 Estructuras de cardenólidos a) oleandrina, b) oleandrogenina, c) gitoxigenina.	33
Figura 3.8 Perfiles cromatográficos por HPLC de los cardenólidos purificados	34
Figura 3.9 Perfiles cromatográficos del producto de hidrólisis de <i>P. andrieuxii</i> , <i>A. obesum</i> y <i>N. oleander</i> extractos totales.....	34
Figura 3.10 Perfiles cromatográficos de los productos de hidrólisis de las fracciones de mediana y alta polaridad de <i>P. andrieuxii</i> y <i>A. obesum</i>	35
Figura 4.1 Pesos de <i>S. epilais</i> durante su desarrollo holometábolo presentando diferentes dietas en la etapa larval.	39
Figura 4.2 Gel de agarosa con muestras de ADN de las diferentes etapas de vida de <i>S. epilais</i> , usadas en el análisis de metilación del ADN.....	40
Figura 4.3 Metilación global en el ciclo holometábolo de <i>S. epilais</i>	41
Figura 8.1 Espectroscopia de oleandrina de RMN 1H , ($CDCl_3$, 500 MHz)	57
Figura 8.2 Espectroscopia de oleandrina de RMN ^{13}C , ($CDCl_3$, 500 MHz)	57

Figura 8.3 Espectroscopia de oleandrina de RMN, espectro de HMBC.....	58
Figura 8.4 Espectroscopia de oleandrina de RMN, espectro de HSQC.....	58
Figura 8.5 Espectroscopia de oleandrogenina de RMN ^1H , (CDCl_3 , 600 MHz).....	59
Figura 8.6 Espectroscopia de oleandrogenina de RMN ^{13}C , (CDCl_3 , 600 MHz)	59
Figura 8.7 Espectroscopia de gitoxigenina de RMN ^1H , (Acetona-D6, 600 MHz)	61
Figura 8.8 Espectroscopia de gitoxigenina de RMN ^{13}C , (Acetona-D6, 600 MHz)	61
Figura 8.9 Curva de calibración con estándares de 5-mC.....	63

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Plantas hospederas de <i>S. epilais</i> y cardenóidos asociados al secuestro de defensa contra depredadores.	7
Tabla 2.1 Resultados de pruebas de alimentación para <i>S. epilais</i>	17
Tabla 2.2 Ciclo de vida de <i>S. epilais</i> establecido en condiciones de cautiverio.....	18
Tabla 3.1 Datos de colecta de plantas y No. de ejemplar del Herbario.	24
Tabla 3.2 Rendimientos de extractos de plantas hospederas de <i>S. epilais</i> y plantas control.....	25
Tabla 3.3 Rendimientos de particiones de los extractos metanólicos de hojas de <i>N. oleander</i> , <i>A. obesum</i> y <i>P. andrieuxii</i>	25
Tabla 3.4 Datos espectroscópicos de RMN de oleandrina aislada de hojas de <i>N. oleander</i>	31
Tabla 8.1 Datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente de oleandrigenina comparados con oleandrina.....	60
Tabla 8.2 Datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente de gitoxigenina comparados con los reportados en la literatura (¹³ C) y experimentalmente de oleandrigenina	62
Tabla 8.3 Pesos de insectos muestreados (mg)	63
Tabla 8.4 Porcentaje de metilación de 5mC	63
Tabla 8.5 Resultados de extracción de ADN	64

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
CG-ES	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CCD	Cromatografía de capa delgada
CCDP	Cromatografía de capa delgada preparativa
VLC	Cromatografía líquida con vacío
Hx	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DNMT	Metiltransferasa
CDs	Cardenólidos
5-mC	5-Metilcitosina

RESUMEN

En la relación interespecífica entre plantas e insectos, se ha observado que plantas de la familia Apocynaceae producen cardenólidos como mecanismo de defensa; estos metabolitos pueden ser almacenados y utilizados por algunos insectos como protección contra sus depredadores. Se ha reportado que la polilla *Syntomeida epilais* utiliza la oleandrina, el principal cardenólido de *Nerium oleander*, como parte de sus mecanismos de defensa. Recientemente se observó que *S. epilais*, además de alimentarse de *N. oleander*, consume también *Adenium obesum* y *Pentalinon andrieuxii*, dos especies pertenecientes a la familia Apocynaceae. Dado que, hasta ahora no se ha reportado la presencia de oleandrina en *A. obesum* o *P. andrieuxii*, como parte de los objetivos de este trabajo se decidió investigar la posible producción de este metabolito en los extractos de hoja de ambas especies, con el fin de establecer su papel en la interacción planta-insecto. Adicionalmente, y dado que se ha reportado que los mecanismos epigenéticos están asociados al crecimiento, desarrollo, adaptación, determinación del sexo y fenotipo de diferentes insectos, otro de los objetivos de este trabajo fue investigar los cambios en los niveles de metilación del ADN en los insectos, como parte de su proceso de adaptación a este tipo de defensa.

El estudio fitoquímico de las tres plantas hospederas de *S. epilais* mostró que *N. oleander* es la única productora de oleandrina; sin embargo, los perfiles cromatográficos por HPLC de los productos de hidrólisis de las fracciones de mediana y alta polaridad de *P. andrieuxii* y *A. obesum* mostraron la presencia de oleandrigenina y gitoxigenina, sugiriendo la posible presencia de cardenólidos estructuralmente relacionados con oleandrigenina en los extractos crudos de hoja correspondientes. La futura purificación e identificación de los cardenólidos presentes en *P. andrieuxii* y *A. obesum* permitirá establecer su función en la interacción de *S. epilais* con cada una de las plantas.

Por otra parte, el estudio epigenético mostró que no existen variaciones significativas en el porcentaje de metilación global del ADN en 5-metilcitosina durante la metamorfosis del insecto y en la dieta proporcionada, sugiriendo que la metilación del ADN no juega un papel importante durante estos procesos para *S. epilais*. Estudios futuros de los diferentes mecanismos epigenéticos permitirán establecer el papel que juegan en el proceso de adaptación del insecto a su planta hospedera y durante la metamorfosis.

ABSTRACT

It has been observed, in the interspecific relationship between plants and insects, that plants of Apocynaceae family produce cardenolides as a defense mechanism. These metabolites can be stored and used by some insects as protection against their predators. It has been reported that the moth *Syntomeida epilais* uses oleandrine, the main cardenolide of *Nerium oleander*, as part of its defense mechanisms. It was recently observed that *S. epilais*, besides feeding on *N. oleander*, also consumes *Adenium obesum* and *Pentalinon andrieuxii*, two species belonging to the family Apocynaceae. Given that until now the presence of oleandrin in *A. obesum* or *P. andrieuxii* has not been reported yet, as part of the objectives of this work it was decided to investigate the possible production of this metabolite in the leaf extracts of both species, in order to establish their role in the plant-insect interaction. Additionally, and given that it has been reported that epigenetic mechanisms are associated with the growth, development, adaptation, determination of sex and phenotype of different insects, another objective of this work was to investigate the changes in DNA methylation levels in the insects, as part of their process of adaptation to this type of defense.

The phytochemical study of the three host plants of *S. epilais* showed that *N. oleander* is the only oleandrin producer; however, the chromatographic profiles by HPLC of the hydrolysis products of the fractions of medium and high polarity of *P. andrieuxii* and *A. obesum* showed the presence of oleandrigenin and gitoxigenin, suggesting the possible presence of cardenolides structurally related to oleandrigenin in the extracts corresponding leaf crudes. The future purification and identification of the cardenolides present in *P. andrieuxii* and *A. obesum* will allow to establish their function in the interaction of *S. epilais* with each of the plants.

On the other hand, the epigenetic study showed that there are no significant variations in the overall DNA methylation percentage of 5-methylcytosine during the metamorphosis of the insect and in the provided diet. This suggests that DNA methylation does not play an important role during these processes for *S. epilais*. Future studies of the different epigenetic mechanisms will allow to establish the role they play in the adaptation process of the insect to its host plant and during the metamorphosis.

INTRODUCCIÓN

La ecología estudia la distribución, abundancia de organismos y las interacciones que determinan la distribución y abundancia de estos organismos (Begon *et al.*, 2009). A partir de esto, las interacciones se pueden clasificar en intraespecífica o interespecífica. Dentro de las interespecíficas destacan la relación que existe entre organismos de diferentes especies y las formas en las que la evolución ha permitido esta interacción. Para poder explicar cómo ocurren estas relaciones, es necesario considerar múltiples disciplinas, entre las que destacan la química y la epigenética.

La epigenética se basa en el estudio de los factores no genéticos a nivel molecular, que regulan la expresión de genes que se ven afectados por cualquier organismo (Krause *et al.*, 2009; Quintero, 2011). La relación entre la ecología y la epigenética se ha estudiado para conocer las variaciones fenotípicas que presentan ciertos organismos para su adaptación como resultado de sus interacciones sociales y ambientales (Kilvitis *et al.*, 2014). Una de las modificaciones químicas más estudiadas por la epigenética es la metilación del ADN, dada su importancia en la expresión o represión de la expresión de genes (De-la-Peña *et al.*, 2015).

Los cambios en los niveles de metilación del ADN en insectos se han relacionado con procesos de adaptación asociados a las etapas de desarrollo, reproducción y adaptación a los ecosistemas. Se ha reportado que los porcentajes de metilación global de ADN son menores del 5% en insectos de los órdenes Díptera y Lepidóptera y mayores del 10% en los órdenes Hemiptera y Blattodea (Bewick *et al.*, 2017).

Por otra parte, hasta ahora no se conoce él o los procesos involucrados en el desarrollo, adaptación y evolución de los mecanismos de defensa usados por insectos para evitar a sus depredadores (Higginson y Ruxton, 2010; Evans, 1990; Endler y Mappes, 2004; Weiss, 2006). Uno de los mecanismos de defensa utilizado por los insectos que ha sido ampliamente estudiado, es el uso de defensas químicas; éstas pueden ser sintetizadas de *novo*, a partir de productos del metabolismo, o adquiridas como parte de su dieta (Rojas

et al., 2012). El estudio de este último mecanismo de defensa, forma parte de lo que se conoce como Ecología Química.

La ecología química estudia el papel de los metabolitos secundarios en las interacciones intraespecíficas e interespecíficas. Derivado de estos estudios se ha generado el término “semioquímicos” para designar a los metabolitos secundarios que están involucrados en interacciones ecológicas (J H Law y Regnier, 1971; Ehrlich y Raven, 1964).

Una de las características más interesantes en la interacción planta-insecto es el alto grado de especialización en la alimentación de los insectos herbívoros, que se han clasificado como especialistas o generalistas. Los insectos especialistas se dividen en monófagos y olífagos. Los monófagos (lepidópteros, hemípteros y coleópteros) se caracterizan por alimentarse de una sola o un número limitado de especies de plantas estrechamente relacionadas.

La alimentación especializada, en muchos casos, está dada por la influencia o beneficios que les pueden aportar las plantas hospedadoras a los insectos; uno de los beneficios es la asimilación de metabolitos secundarios como parte de una estrategia de defensa contra potenciales depredadores. Los metabolitos secundarios pueden utilizarse una vez modificados por un proceso de asimilación o pueden guardarse sin ser modificados, lo que se conoce como secuestro (Rojas *et al.*, 2012). Entre los metabolitos que se han reportado como secuestrados en la dieta de insectos, se encuentran los alcaloides y los terpenoides (Nishida, 2014). Dentro de los terpenoides se puede mencionar a los cardenólidos como uno de los grupos de metabolitos más comúnmente secuestrado por insectos (Cammack *et al.*, 2011; Agrawal *et al.*, 2012). El interés por el estudio de estos metabolitos está dado por su diversidad estructural (incluyendo su presencia como glicósidos o agliconas), modo de uso (mecanismo de defensa) y adaptación para su uso. De igual forma, establecer el papel de la metilación del ADN en la adaptación para el uso de este tipo de defensas por parte de insectos.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 Interacción planta-insectos especialistas

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden funcionar como defensa contra depredadores, enfermedades o plantas competidoras, por lo que son importantes para la supervivencia de la planta. Durante su estudio, las filogenias de plantas, mostraron que la distribución de los metabolitos secundarios parece ser exclusivo de ciertas familias, lo que implica un fuerte componente filogenético y ecológico (Wink, 2003).

Para el caso de las familias Liliaceae, Scrophulariaceae, Ranunculaceae, Asclepiadaceae y Apocynaceae se ha observado que se han especializado en la producción de ciertos metabolitos secundarios para la adaptación a sus ambientes hostiles; produciendo cardenólidos como parte de su metabolismo secundario (Opitz y Müller, 2009; Wen *et al.*, 2016; Agrawal *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, aprovechando la producción de este tipo de metabolitos, se ha identificado la presencia de insectos especialistas pertenecientes a los órdenes hemíptera, coleóptera y lepidóptera, los cuales se alimentan de las plantas de estas familias con el fin de secuestrar metabolitos secundarios y usarlos como mecanismo de defensa contra depredadores (Holzinger y Wink, 1996).

Para el orden lepidóptera se han reportado aproximadamente 119,000 especies, entre mariposas y polillas, siendo todas herbívoras son múltiples los ejemplos del secuestro de cardenólidos y alcaloides de sus plantas hospederas, *Euchaetes egle*, *Abrostola asclepiadis*, *Danaus gilippus*, *Danaus plexippus* alimentándose de *Asclepias* spp. y la polilla *Syntomeida epilais* son ejemplos de insectos que usan defensas químicas como mecanismo de defensa (Martin y Lynch, 1988; Hristov y Conner, 2005; Opitz y Müller, 2009; Leimu *et al.*, 2005; Moranz y Brower, 1998).

1.2 Epigenética en insectos

La tolerancia y el uso de metabolitos tóxicos por parte de un organismo, puede ser consecuencia de mutaciones específicas en los genes que codifican a enzimas; estas mutaciones en los sitios de acción de los productos tóxicos confieren la resistencia requerida para tolerar su presencia (Holzinger y Wink, 1996).

La epigenética estudia la influencia de los factores medioambientales en los mecanismos de expresión de genes y su regulación, sin afectar la estructura primaria de ácidos nucleicos; por esta razón, los mecanismos epigenéticos son heredables y reversibles a nivel celular (Beckerman *et al.*, 2014). Los principales mecanismos epigenéticos que se han estudiado para explicar el efecto del medio en la activación o represión de genes de un organismo son la modificación en las histonas, la organización de la cromatina, el micro ARN y la metilación del ADN.

La metilación del ADN es una marca epigenética que implica la adición de un grupo metilo en la posición 5 de las citosinas. Los sitios donde ocurre la metilación son llamados CpG (-C-fosfato-G-) y las secciones de la cadena del ADN con una alta densidad de CpG son designadas "islas CpG"; en estas últimas es donde, generalmente, se localizan las regiones promotoras de genes (Dolomatov *et al.*, 2018). La metilación del ADN se lleva a cabo mediante varias enzimas conservadas evolutivamente conocidas como ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales se clasifican en de *novo* y mantenimiento. Las metiltransferasas de *novo* son responsables de establecer nuevos patrones de metilación dentro del genoma de un organismo (Kato *et al.*, 2007) mientras que las metiltransferasas de constitutivas conservan los patrones de metilación establecidos a través de las generaciones, metilando sustratos de ADN hemimetilado (Chen *et al.*, 2003). Generalmente, la presencia de una o más copias de DNMTs se considera necesaria para un sistema funcional de metilación del ADN (Goll y Bestor, 2005). La metilación del ADN juega un papel importante en el ecosistema y en la interacción entre diferentes especies, ejemplo. algas, plantas, peces e invertebrados, ya que se han asociado cambios epigenéticos tanto en plantas como en insectos, como consecuencia de diferentes tipos de estrés en su ambiente, incluyendo falta de agua, luz, temperatura, desarrollo social y, en especial, alimentación (Vandeghechuchte y Janssen, 2014).

El estudio y conocimiento de la regulación epigenética en insectos es limitado (Glastad *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha reportado que la metilación del ADN es indispensable para la sobrevivencia de algunas especies como la *Musca domestica* donde la metilación del ADN está involucrada en la diferenciación sexual, detectándose niveles de metilación globales diferentes en hembras y machos (Schutt y Nothiger, 2000; Dubendorfer *et al.*, 2003), para el caso del escarabajo *Tribolium castaneum* la metilación del ADN está

asociada al cambio de estadios durante su desarrollo fisiológico, observándose altos porcentajes de metilación del ADN en embriones, comparados con los niveles en larvas, pupas y adultos, y disminuyendo el porcentaje global de metilación del ADN en la etapa de metamorfosis (Felicciello *et al.*, 2013), por otra parte, los cambios fisiológicos que presenta la polilla *Ephaestia kuehniella* al exponerse a altas temperaturas, se han asociado a cambios epigenéticos que resultan en un fenotipo diferente en las poblaciones de esta especie (Pavelka y Koudelová, 2001). El porcentaje de metilación del ADN también se ha relacionado con la alimentación de los insectos, como en el caso de *Apis mellifera* donde la alimentación de las larvas de los huevos fecundados definirá la casta social a la que pertenecerá la abeja. La abeja reina se alimentará de jalea real propiciando niveles altos de metilación del ADN que darán lugar a ese fenotipo, en tanto que la alimentación de las obreras se basará principalmente de miel (Weiner y Toth, 2012).

Actualmente, los métodos para la determinación de niveles de metilación en el ADN se dividen en al menos seis grupos: metilación global del ADN, metilación del ADN por regiones, análisis de todo el genoma, análisis de metilación del ADN por secuenciación, detección de patrones de metilación específicos y análisis CpG individuales (De-la-Peña *et al.*, 2015), los cuales han sido usados en plantas y animales.

1.3 *Syntomeida epilais*

Syntomeida epilais, perteneciente a la superfamilia Noctuoidea, familia Arctiinae, subfamilia Ctenuchidae (Sanderford y Conner, 1995), se localiza en climas cálidos y su distribución se extiende en gran parte del continente Americano.

El ciclo de vida de *S. epilais* es holometábolo, con cuatro etapas de vida: huevo, larva, pupa y polilla. En la primera etapa la hembra coloca huevos (racimos de 12-75 huevos) por debajo de las hojas de su planta hospedera (Figura 1.1 a); una vez eclosionados, los huevos se convierten en larvas. El primer alimento de las larvas es el corión de su huevo rico en carbohidratos (Montero, 2007), y posteriormente se alimentan de las hojas de la planta hospedera. La etapa de larva se subdivide en seis estadios y durante esta etapa las larvas se caracterizan por ser folívoras y presentar una coloración anaranjada con setas negras, relacionadas con colores aposemáticos (Figura 1.1 b). Una vez concluidos los seis estadios, el siguiente proceso es el de pupa (Figura 1.1 c), seguido de la etapa de adulto (polilla) donde *S. epilais* presenta alas de color azul o verde incandescente con

lunares de color blanco, abdomen de color rojo o naranja relacionados con colores aposemáticos (Figura 1.1 d).

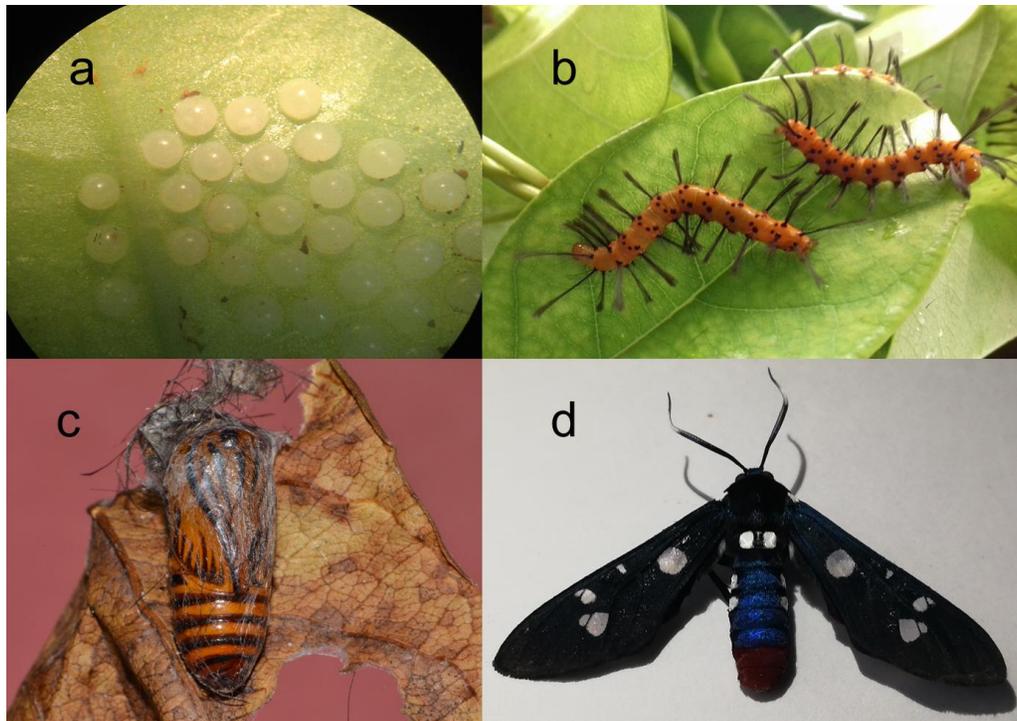


Figura 1.1 Ciclo de vida holometábolo de *S. epilais* (a) Huevo (b) Larva (c) Pupa (d) Polilla.

Un estudio realizado con diferentes plantas, algunas reconocidas por su contenido de cardenólidos (*Helleborus viridis*, *Digitalis purpurea*, *Euonymus europaea*), reveló que la selección de plantas utilizadas como alimento en estado inmaduro (larval) es muy importante, pues *S. epilais* presenta poca tolerancia a varias de las especies y problemas para alcanzar su desarrollo al consumir otras plantas. Por esta razón, y dado que inicialmente la única planta que permitió un desarrollo y crecimiento normales de la polilla después de ingerirla fue *Nerium oleander*, *S. epilais* fue clasificada como monófaga (Wink y Schneider, 1990).

1.4 Plantas hospederas de *S. epilais*

Aun cuando *N. oleander* es considerada como la principal planta hospedera (Abe y Yamauchi, 1992), de *S. epilais*, se ha reportado que, durante su etapa larval, la polilla puede alimentarse de diferentes plantas (Tabla 1.1). Recientemente se observó la

presencia de larvas e individuos adultos de *S. epilais* en plantas de *Pentalinum andrieuxii*, sugiriendo la probable presencia de cardenólidos en las hojas de esta planta.

Tabla 1.1 Plantas hospederas de *S. epilais* y cardenólidos asociados al secuestro de defensa contra depredadores.

Planta	Familia	Cardenólidos reportados en plantas	Distribución	Fuente
<i>Adenium multiflorum</i>	Apocynaceae	N/I	Sudáfrica	(Black, 1976)
<i>Adenium obesum</i>	Apocynaceae	oleandrogenina gitoxigenina digitoxigenina	“W. Trop”. África a Arabia Pensilvania y Tanzania	(Quinn, 2008; Versiani <i>et al.</i> , 2014)
<i>Angadenia berterii</i>	Apocynaceae	N/I	Florida al caribe	(Black, 1976)
<i>Bougainvillea</i> sp.	Nyctaginaceae	N/R	España y América	(Quinn, 2008)
<i>Carissa grandiflora</i>	Apocynaceae	N/I	México, España, EU, África y Australia	(Quinn, 2008)
<i>Echites umbellatus</i>	Apocynaceae	N/I	Florida a honduras	(Quinn, 2008; Black, 1976)
<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	oleandrina, nerigósida, gitoxigenina	Europa, Asia y América	(Black, 1976; Abe y Yamauchi, 1992; Quinn, 2008)
<i>Urechites lutea</i>	Apocynaceae	urechitoxina y oleandrina	Florida al caribe	(Black, 1976; Hassall, 1951)

N/R= no reportados, N/I no identificado

El estudio fitoquímico de *N. oleander* como planta hospedera de *S. epilais*, demostró el secuestro de cardenólidos, identificado a oleandrina y nerigosida (Figura 1.2) como los presentes en mayor concentración en la polilla (Wink y Schneider, 1990). Sin embargo *N. oleander*, produce más de 20 cardenólidos incluyendo a oleandrina, 8-hidroxi-oleandrogenin-3-O-β-D-diginósida, 5α-oleásida A, 14-carbonil-neriásida, 16-hidroxi-oleásida A, 21-hidroxi-neriásida y 3β-O-(β-D-diginosil)-14β-hidroxi-5β, 14β-card-8, 16,20(22)-dienólida (Cao *et al.*, 2018), por otra parte, 50 son los cardenólidos identificados en *A. obesum*, siendo el mayor grupo de metabolitos producidos por la planta. Ejemplo de

esto son la somalina, ongelina, obésida C y D (Versiani *et al.*, 2014). Finalmente, aunque en *P. andrieuxii* no se ha reportado la presencia de cardenólidos existe evidencia de la producción de urechitoxina y oleandrina, cardenólidos encontrados en *Pentalinun lutea* (Hassall, 1951) demostrando así, que aunque aún no se han encontrado cardenólidos en todas las plantas que se han reportado como fuente de alimento para *S. epilais*. En las que se tienen estudios fitoquímicos, se reportan estructuras químicas similares.

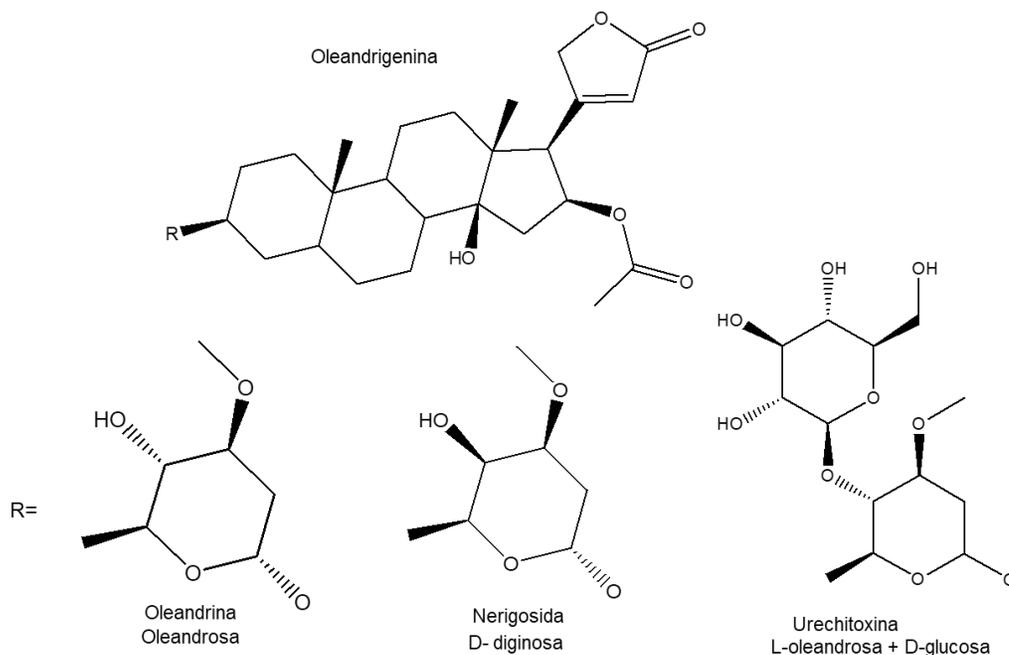


Figura 1.2 Estructuras de olenadrina, nerigosida y urechitoxina, así como los azúcares presentes en cada uno de los diferentes cardenólidos.

1.5 *Pentalinon andrieuxii*

Pentalinon andrieuxii es una enredadera de la familia Apocynaceae, tribu Echites, conocida como *bejuco guaco*, *cantibteac* o *contrayerba* (Figura 1.3). Se distribuye en la península de Yucatán, del sur de México hasta Nicaragua; se caracteriza por ser una planta trepadora con látex lechoso, flores amarillas, fruto de dos folículos, angostamente terete, de 18–28 cm de largo y 4–7 mm de ancho, con semillas apicalmente comosas (Herbario CICY, 2010).

Pentalinon andrieuxii es conocida por su uso en la medicina tradicional maya, para curar las lesiones de leishmaniosis (*úlceras del chiclero*), como antiinflamatorio y antidepresivo.

Como resultado de la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por esta especie (Chan-Bacab y Pena-Rodriguez, 2001), se identificaron trinorsesquiterpenos (Urechitol A y B) (Yam-Puc *et al.*, 2009), triterpenos (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010), derivados esteroides (Yam-Puc *et al.*, 2012) y esteroides (Pan *et al.*, 2012)



Figura 1.3 Planta de *Pentalinon andrieuxii* cultivada en vivero.

JUSTIFICACIÓN

La selección del alimento de *S. epilaís* en estado larval, asociada a la producción de cardenólidos en sus plantas hospederas, le ha conferido ventajas para su proliferación. La adaptación desarrollada por la polilla para secuestrar estos metabolitos puede ser consecuencia de la expresión de genes relacionados con la tolerancia y/o resistencia a la toxicidad de los mismos; esta expresión puede estar relacionada con factores no genéticos como la metilación del ADN dado que se ha demostrado que los niveles de metilación del ADN pueden influir en los procesos elementales del ciclo de vida de algunos insectos.

Por otra parte, tomando en cuenta que cardenólidos como la oleandrina y nerigosida, presentes en las hojas de *N. oleander*, son secuestrados por las larvas de *S. epilaís* para asegurar su protección hasta el estado adulto, el estudio fitoquímico de otras plantas hospederas del insecto permitirá establecer la importancia de los cardenólidos en la selección de las mismas para su alimentación. Finalmente, los resultados obtenidos contribuirán al conocimiento fitoquímico, en general, y a la identificación de cardenólidos, en particular de *P. andrieuxii* y *A. obesum*.

HIPÓTESIS

Dado que *N. oleander* y *P. andrieuxii* pertenecen a la familia Apocynaceae y ambas especies son reconocidas como hospederas de *S. epilais*, es posible que, al igual que en *N. oleander*, las hojas de *P. andrieuxii* contengan cardenólidos que son secuestrados por *S. epilais* para su desarrollo y/o defensa y que esta dieta induzca cambios epigenéticos en el insecto.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* y evaluar el efecto de estos metabolitos en la metilación del ADN en *Syntomeida epilais*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la presencia de cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* utilizando técnicas cromatográficas de separación y espectroscópicas de identificación.
2. Investigar la presencia de los cardenólidos de *P. andrieuxii* en *Syntomeida epilais*.
3. Establecer una metodología para la cría de *S. epilais* en condiciones de cautiverio
4. Determinar el papel fisiológico de los cardenólidos en el desarrollo de *S. epilais* mediante la metilación de ADN.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

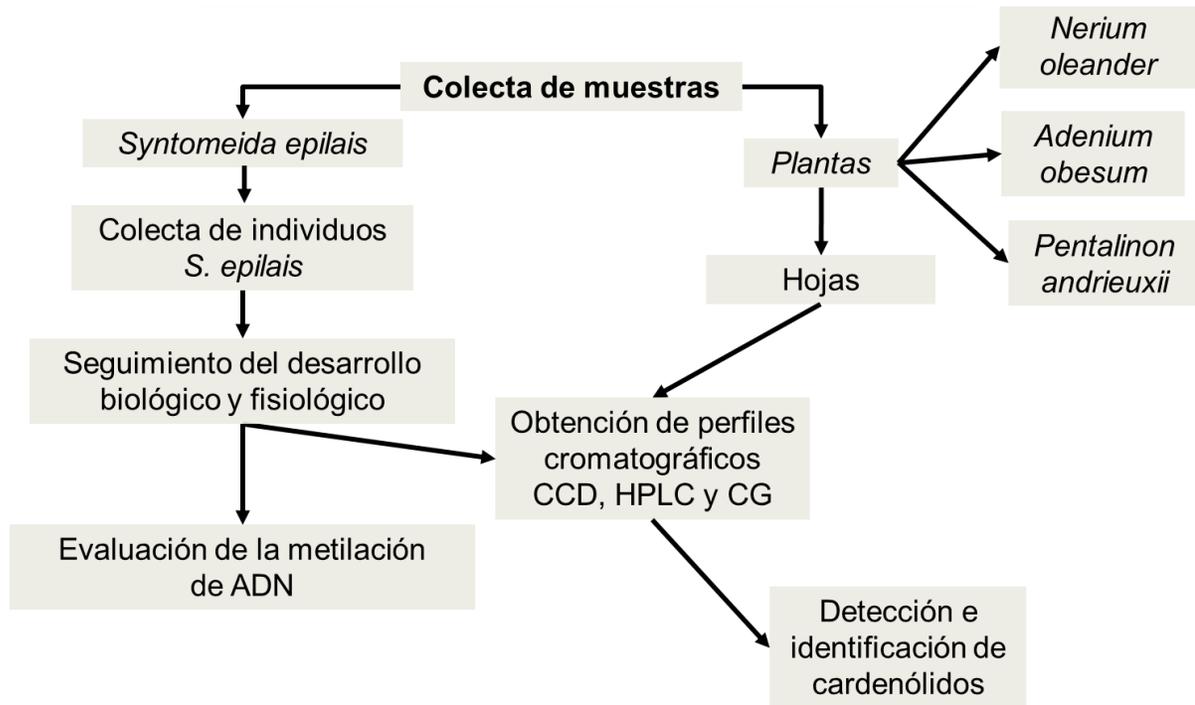


Figura 1.4 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

2. CRÍA Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO DE *Syntomeida epilais*

2.1 INTRODUCCIÓN

Syntomeida epilais ha sido considerada una plaga en plantas ornamentales pertenecientes a la familia Apocynaceae. La especie se distribuye desde Honduras, México y Florida. Aunque, las poblaciones en Florida muestran diferencias morfológicas con las presentes en México y Centro América por lo que se ha propuesto que estas pertenecen a la subespecie *S. epilais juncundissima* (Dyar, 1907).

La principal fuente de alimento reportada para *S. epilais* es *Nerium oleander* (Wink y Schneider, 1990; Black, 1976), una especie introducida al continente americano. Sin embargo, hasta ahora no hay registros que asocien a alguna de las 385 especies de la familia Apocynaceae que se distribuyen en México como plantas hospederas de esta polilla (González-Rocha y Cerros-Tlatilpa, 2015).

Los colores aposemáticos (Mcauslane, 2008), al igual que el comportamiento sexual (Sanderford y Conner, 1995) y su capacidad para secuestrar metabolitos secundarios tóxicos (cardenólidos) (Bowers, 2009) han generado el interés necesario para estudiar esta especie. El estudio del secuestro de cardenólidos por parte de *S. epilais*, que ocurre únicamente durante su etapa folívora y es aprovechado durante todo su ciclo de vida, ha permitido conocer las estrategias de defensa de esta polilla y entender el mecanismo de adaptación que asegura su éxito reproductivo. Sin embargo, el problema principal para el estudio adecuado de *S. epilais* es la generación y mantenimiento de una población de insectos que permita el suministro de individuos en cada una de las etapas de su vida.

Actualmente, la información sobre el comportamiento sexual de *S. epilais* se limita al conocimiento de sus hormonas sexuales (Matsuoka *et al.*, 2008) y a los sonidos acústicos de machos y hembras (Weller *et al.*, 2000). De igual forma, no existe información relevante sobre la madurez sexual del insecto, la duración de la cópula y la relación sexual operacional que garantice el éxito del apareamiento. El conocimiento de estas variables es de particular importancia para asegurar el apareamiento y la sobrevivencia de una colonia en el laboratorio (Barradas-Juanz *et al.*, 2016).

Hasta ahora, y a pesar de su importancia ecológica y evolutiva, no existe un método simple para criar *S. epilais* en condiciones controladas de laboratorio; los estudios existentes sobre el ciclo de vida de *S. epilais* se han realizado con larvas desarrolladas en condiciones silvestres. En estos casos, el número de individuos depende de factores como la abundancia de la planta huésped, los depredadores y la estacionalidad (Chacón y Montero, 2007; Allen *et al.*, 2005). Aun cuando no existen reportes de la cría en cautiverio de *S. epilais* u otros Ctenuchidos, para algunos miembros de la superfamilia Noctuoidea como *Spodoptera exigua* y *S. frugiperda* se han desarrollado metodologías para su crianza y estudio (Elvira *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, uno de los objetivos de este estudio fue el establecer un protocolo que permitiera el establecimiento de una colonia de *S. epilais* que permitiera conocer o confirmar sus plantas hospederas y registrar su comportamiento durante el apareamiento para garantizar el éxito reproductivo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Establecimiento de crianza en condiciones controladas de larvas de *S. epilais*

Durante la etapa larval, y para asegurar la sobrevivencia de *S. epilais* en condiciones controladas, se probaron tres diferentes contenedores: de vidrio (22.0 cm de Ø X 10.5 cm), de vidrio con cartón de huevo (22.0 cm de Ø X 10.5 cm) (ambos cubiertos con plástico transparente perforado) y de plástico (11.0 cm de Ø X 13.5 cm), cubiertos con tela de malla (Figura 2.1). Las larvas fueron alimentadas con hojas frescas de *N. oleander* y mantenidas bajo condiciones de fotoperiodo 12:12 a temperatura ambiente (34 °C). Se registró la aceptación del alimento proporcionado en cada uno de los diferentes contenedores y midiendo la pérdida de humedad.



Figura 2.1 Contenedores usados para la cría de *S. epilais* a) contenedor de plástico, b)

contenedor de vidrio c) contenedor de vidrio con cartón de huevo.

Para la prueba de pérdida de humedad del diferente material vegetal de los diferentes contenedores usados para la crianza de *S. epilais* se pesaron 16 g de hojas de *N. oleander* y se pusieron en cada recipiente por triplicado. Los pesos de las hojas se registraron a las 24 y 48 horas.

2.2.2 Prueba de alimentación

Se realizó una prueba de alimentación usando hojas frescas de *N. oleander*, *A. obesum*, *Bougainvillea* sp. *P. andrieuxii* y *Lactuca* sp. como control negativo. Se usaron 30 larvas por planta proporcionada como alimento, que se colocaron en contenedores de vidrio con cartón de huevo. Se evaluó la aceptación de la dieta y la formación de pupa.

2.2.3 Actividad de apareamiento

Las pupas fueron sexadas utilizando un estereoscopio. Los individuos se separaron en un cartón de huevo, en jaulas de tela de malla de 30 x 30 x 30 cm, una para cada sexo, y una vez eclosionadas fueron colocadas en otra jaula de tela de malla (30 X 30 X 80 cm), con flujo de aire directo y constante, para su reproducción. Las polillas fueron alimentadas con sacarosa al 10% en un algodón colocado en la parte superior de la jaula de reproducción.

Para el apareamiento se evaluaron cuatro diferentes proporciones: 1♀:1♂ 1♀:2♂ 1♀:3♂ 1♀:4♂. Cada proporción fue realizada por triplicado, realizándose observaciones durante dos noches.

2.2.4 Plantas usadas como alimento

Las plantas (*N. oleander*, *A. obesum*, *P. andrieuxii*, *Bougainvillea* sp. y *Lactuca* sp.) utilizadas como alimento para las larvas de *S. epilais* se recolectaron en Mérida, Yucatán y para el caso de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* se depositaron ejemplares de herbario en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. con el número de registro 68854 (*N. oleander*), 68853 (*A. obesum*), y, 68850 (*P. andrieuxii*). Las hojas de *Lactuca* sp. se adquirieron en un supermercado local.

2.3 RESULTADOS

Como primer acercamiento a la crianza de *S. epilais* en cautiverio, se estandarizó el contenedor usado para la fase larval, probando tres diferentes contenedores. Los resultados obtenidos mostraron que el contenedor de vidrio con cartón de huevo es el más adecuado debido a que este ofrece una mayor superficie para el movimiento de las larvas en el contenedor y evita el contacto de las heces con la comida (Figura 2.2). Adicionalmente, el vidrio facilita la limpieza del contenedor y disminuye la pérdida de humedad en las hojas de las plantas (Figura 2.3), reduciendo al mismo tiempo el estrés y el desarrollo de enfermedades en las larvas.



Figura 2.2 Enfermedades detectadas en larvas de *S. epilais* asociadas a la humedad en el contenedor y contacto con sus heces. a) larvas muertas de *S. epilais*, b) larva de *S. epilais* con hongo c) larvas de *S. epilais* enfermas sobre hojas de *N. oleander*.

Posteriormente se evaluó el porcentaje de pérdida de humedad del material vegetal en cada recipiente. (Figura 2.3). Los recipientes que mostraron una menor pérdida de humedad fueron los contenedores de vidrio y de vidrio con cartón de huevo, ya que ambos podían mantener la humedad de las hojas hasta por 48 horas, con pérdidas menores al 15%.

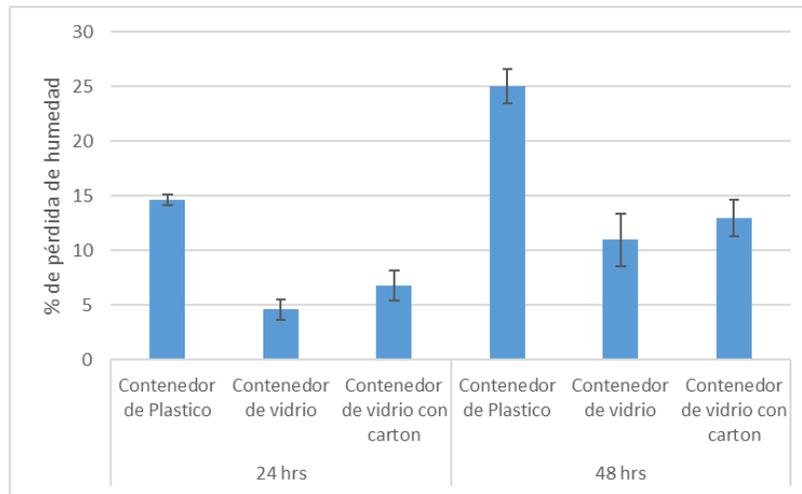


Figura 2.3 Porcentaje de pérdida de humedad en hojas de plantas usadas como alimento para larvas de *S. epilais*.

Una vez identificado el mejor contenedor para la cría de larvas de *S. epilais* en condiciones de laboratorio, se realizaron pruebas de alimentación con hojas frescas de *N. oleander*, *A. obesum*, *P. andrieuxii*, *Bougainvillea* sp. y *Lactuca* sp., encontrándose que las larvas de la polilla solo pueden alimentarse y desarrollarse hasta pupa teniendo como fuente de alimento las tres especies pertenecientes a la familia Apocynaceae (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Resultados de pruebas de alimentación para *S. epilais*.

Alimentación	Observaciones
<i>Pentalinon andrieuxii</i> (Apocynaceae)	Se desarrollaron hasta pupa
<i>Adenium obesum</i> (Apocynaceae)	Se desarrollaron hasta pupa
<i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae)	Se desarrollaron hasta pupa
<i>Bougainvillea</i> sp. (Nyctaginaceae)	Sin crecimiento
<i>Lactuca</i> sp. (Asteraceae)	Muerte de insectos

Establecida la forma óptima de crianza de las larvas de *S. epilais*, las larvas de *S. epilais* fueron criadas con una dieta mixta de hojas de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* en las condiciones establecidas anteriormente, obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia del 72% hasta su última etapa larval (prepupa).

Una vez formadas las pupas, estas fueron sexuadas tomando en cuenta sus características fisiológicas (Figura 2.4) y colocadas en diferentes recipientes uno para machos y otro para hembras, hasta su eclosión.

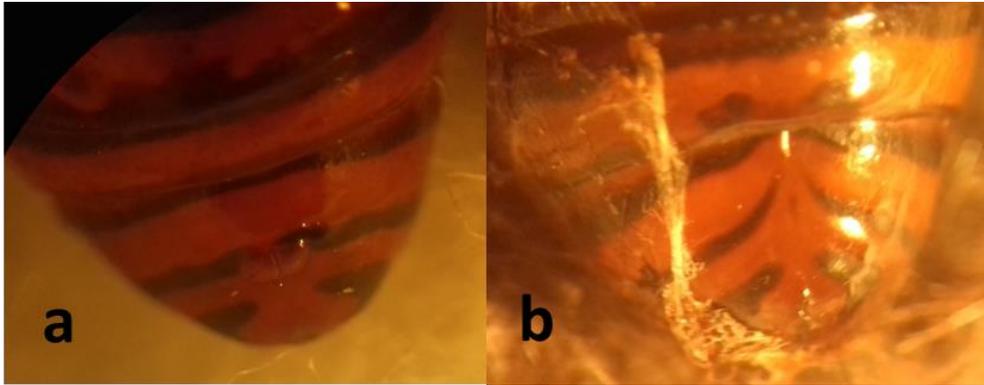


Figura 2.4 Pupas de *S. epilais* y características morfológicas sexuales a) macho b) hembra.

Los adultos (polillas) de *S. epilais* fueron colocados en jaulas para su reproducción, logrando identificar que la proporción sexual 1♀: 3♂ fue la única donde se observó cópula a las 24 h ($n=20$) (Figura 2.5 a), en todas las ocasiones se registró entre las 6-8 am, con una duración de 4-6 horas.

Después de la cópula, a las 48 horas las hembras ovipositaron en hojas de *P. andrieuxii* en racimos de entre 3 a 90 huevos (Figura 2.5 b). Al observar los huevos recién ovipositados se identificaron huevos infértiles o inviables que presentaban una forma ovalada, aparentemente no turgente y colapsada (Figura 2.6), sin emergencia comparado con un 100% de eclosión en huevos turgentes. Con las proporciones sexuales 1♀:1♂, 1♀:2♂, 1♀:4♂, no hubo registro de cópula después de 48 horas.

Finalmente, durante el proceso de seguimiento del ciclo de vida de *S. epilais* se estableció el tiempo de duración de cada uno de sus diferentes estadios de la polilla (Tabla 2.2) logrados en condiciones controladas de laboratorio.

Tabla 2.2 Ciclo de vida de *S. epilais* establecido en condiciones de cautiverio.

Etapa de vida de <i>S. epilais</i>	Días
Huevo	4-6
Larva	26-46
Pre-pupa	1
Pupa	12-19
Polilla	6-20



Figura 2.5 Cópula de *S. epilais* en cautiverio a) Cópula de polillas en una relación de 3 machos y 1 hembra b) Hembra ovipositando en hojas de *P. andrieuxii* en condiciones de cautiverio.

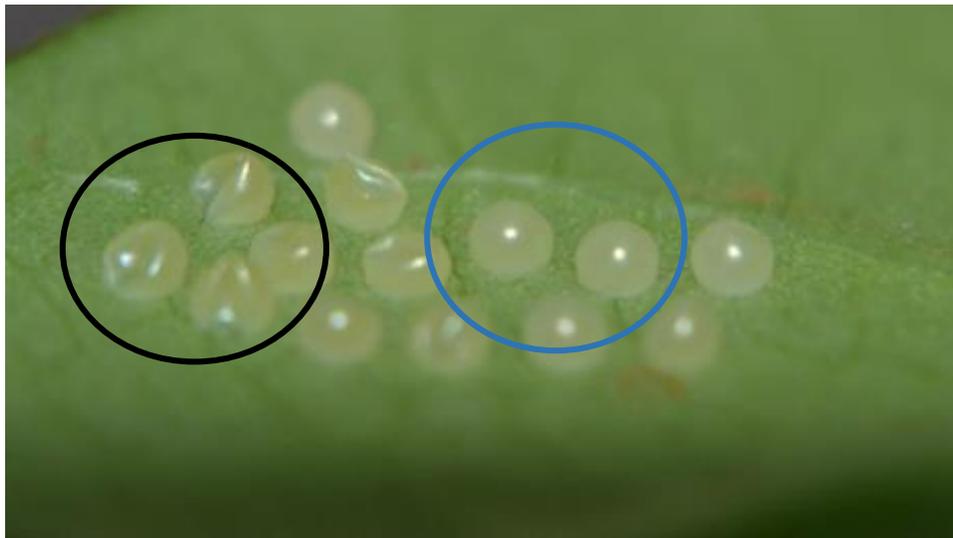


Figura 2.6 Huevos de *S. epilais*, círculo negro: huevos no viables presentando características amorfas y círculo azul: huevos viables, presentando características óptimas para su desarrollo.

2.4 DISCUSIÓN

Para la crianza de larvas de lepidópteros se han usado múltiples contenedores destacando el uso de plástico como material (Castro *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2001; Elvira *et al.*, 2010). Sin embargo, en este trabajo se observó que, en las condiciones usadas para la crianza de larvas, el uso de plástico dificultaba la limpieza y causaba una mayor pérdida de humedad. El contenedor de vidrio permitió mayor superficie de movimiento a las larvas, y evitó el contacto de las excretas con la comida, además de presentar una buena retención de la humedad después de 48 h. En los contenedores que no tenía el cartón para aislar las excretas del alimento presentó una rápida pérdida de humedad en el hospedero, por lo que las larvas perdieron el interés debido a la posible falta de palatabilidad. De igual manera, las larvas se mantuvieron alejadas de sus excretas y hojas viejas debido a la posible proliferación de patógenos (Figura 2.2). Las principales causas de mortalidad en los Lepidópteros son los factores bióticos como virus, hongos, bacterias y depredadores así como también los factores abióticos; como la intensidad de luz, la temperatura y la tasa de humedad (Vílchez y Rocha, 2004).

El ciclo de vida holometábolo de lepidópteros es un parámetro variable de acuerdo con la especie y a las condiciones medioambientales (Chacón y Montero, 2007; Allen *et al.*, 2005). Para el caso de *S. epilais* se observó que en condiciones de cautiverio existe una gran variación en la duración de cada una de sus fases. Independientemente de las condiciones controladas de temperatura, luz y alimentación. En vida silvestre solo el 5% del total de huevos ovipositados por las hembras sobreviven en el medio natural y se transforman en adultos reproductivos (Gómez, 2006). Al comparar los datos obtenidos en vida silvestre de *S. epilais*, las larvas tienen una duración en esta etapa de entre 18 a 59 días dependiendo de la estación del año en la cual se desarrolle, lo cual se encuentra dentro del rango obtenido en este trabajo para esa etapa de vida de la polilla (Bratley, 1932).

En la prueba de alimentación, se partió de conocer que *N. oleander* es el principal hospedero de *S. epilais*. Sin embargo, aún no hay suficiente información que pueda relacionar a *A. obesum* y *Bougainvillea* sp. como plantas hospederas de *S. epilais*. Los resultados mostrados en esta prueba confirmaron la dieta monófaga de plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae, y se confirmó a *P. andrieuxxi* como planta

hospedera, siendo este el primer registro de esta planta como hospedera de *S. epilais*. Por otro lado, el uso de *Bougainvillea* sp. resultó en la muerte de las larvas, por lo tanto, el reporte que existe acerca de esta especie como planta hospedera de *S. epilais* puede deberse a que sea usada como fuente floral para el adulto de esta polilla y no como fuente de alimento para las larvas o un posible error en la identificación de la larva. Para obtener un buen número de individuos para la reproducción en cautiverio las larvas de *S. epilais* que se alimentaron con una dieta mixta de hojas de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxxi* presentaron supervivencia del 72% hasta su última etapa larval (prepupa). Es importante destacar que en la fase de prepupa es muy frágil y se debe evitar movimientos bruscos para evitar la muerte del insecto.

La proporción de 1♀: 3♂ tiene es adecuada para garantizar una cópula exitosa en cautiverio de *S. epilais*. Aunque se conoce que *S. epilais* emite sonidos y feromonas para la cópula, aún es poco el conocimiento acerca de su comportamiento sexual. En esta especie las hembras son las únicas productoras de feromonas que se notaron importantes a la hora de llamar a la cópula (Sanderford y Conner, 1995), realizando llamados entre las 05.00 y 06.00 horas antes del amanecer con una actividad máxima de 1 hora después de amanecer y observando las cópulas en las primeras horas de la mañana 06:00 a 08:00 horas teniendo un promedio de 5 horas la duración de la cópula. Aunque las polillas de *S. epilais* son nocturnas (Hernández-Baz *et al.*, 2015), exhiben poca actividad durante la noche pasando el período oscuro en reposo.

Los estudios sobre la proporción de sexos ayudan a identificar las condiciones en las que no se puede esperar la fertilización de todas las hembras (Vahl *et al.*, 2013) o se pueden maximizar. Para el caso de *H. grandella* la proporción menos adecuada para la crianza en el laboratorio es 1♀: 3♂ (Barradas-Juanz *et al.*, 2016), caso contrario para *S. epilais* pues esta misma relación fue con la única que se observaron copulas.

El conocimiento básico del comportamiento de *S. epilais* en cautiverio podría mejorar con el estudio de estas polillas y resolver el enigma sobre su sistema específico de protección.

CAPÍTULO III

3. BÚSQUEDA DE CARDENÓLIDOS EN *N. oleander*, *P. andrieuxii* Y *A. obesum*

3.1 INTRODUCCIÓN

La diversidad fitoquímica, es una característica de la vida en la Tierra, para su estudio se han empleado diferentes técnicas como las cromatográficas, las cuales han ayudado a entender la amplia diversidad de los productos naturales o metabolitos secundarios. Ya que estos se presentan como mezclas complejas en matrices biológicas.

Los metabolitos secundarios, se han podido asociar a ciertas respuestas en los organismos que interactúan con las plantas, de tal forma que los herbívoros ven a las especies vegetales como “blancos evolutivos móviles” donde la diversidad de los metabolitos secundarios es en sí misma es una característica defensiva. Dentro de esta gran diversidad estructural de metabolitos usados como mecanismo de defensa, se encuentran los cardenólidos.

Los cardenólidos son un grupo de metabolitos C-23 esteroidales de plantas ampliamente estudiados por su actividad biológica y papel ecológico. Su estudio ha permitido identificar a la familia *Apocynaceae* como una de las principales productoras de esto metabolitos. Identificando hasta el año 2016, 109 diferentes cardenólidos, solo en esta familia (Wen *et al.*, 2016). La extracción para su estudio y elucidación a partir de las plantas ha sido complicada debido a las bajas concentraciones en las que encuentran de forma natural (Tian *et al.*, 2016),(Jolad *et al.*, 1981), (Kareru *et al.*, 2010), (Wen *et al.*, 2016).

En México la familia *Apocynaceae* es una de las más diversas y además de cardenólidos se han reportado la presencia de diversos metabolitos secundario incluyendo; alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides y glicósidos entre otros metabolitos. A los cuales se les han asociado diversas actividades biológicas (Bhadane *et al.*, 2018).

Para el caso específico de *N. oleander*, especie perteneciente a la familia *Apocynaceae* se han reportado la presencia de 20 cardenólidos incluyendo a oleandrina, 8-hidroxi-oleandrigenina-3-O- β -D-diginosida, 5 α -oleasida A, 14-carbonil-neriasida, 16-Hidroxi-oleasida A, 21-Hidroxi-neriasida y 3 β -O-(β -D-diginosil)-14 β -hidroxi-5 β , 14 β -card-8,

16,20(22)- dienolide (Cao *et al.*, 2018). Por otra parte, se han identificado 50 cardenólidos en *A. obesum* incluyendo somalina, ongelina, obesidá C y D, siendo el mayor grupo de metabolitos producidos por la planta (Versiani *et al.*, 2014). Finalmente, aunque cuando hasta ahora no se ha reportado la presencia de cardenólidos en *P. andrieuxii*, existe evidencia de la producción de urechitoxina y oleandrina en otras especies del mismo género, ejemplo. *Pentalinun lutea* (Hassall, 1951). La búsqueda de cardenólidos en estas tres especies de plantas se realiza con el fin de establecer su producción y estudiar el papel ecológico en la interacción con *S. epilas*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Colecta y extracción del material vegetal

El material vegetal (hojas) se obtuvo colectando las plantas en la ciudad de Mérida Yucatán, para la elección de las plantas se tomaron en cuenta los reportes de plantas hospederas de *S. epilas*, en tanto que para el caso de *P. andrieuxii* se tomaron en cuenta observaciones de campo por parte del grupo de química del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Se prepararon ejemplares de herbario que se depositaron en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) con los números de colecta en listados en la (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Datos de colecta de plantas y No. de ejemplar del Herbario.

No. De colecta	Planta	No. de ejemplar herbario CICY	Fecha de colecta	Lugar de colecta
1	<i>N. oleander</i>	68854	24/03/17	Casa particular
2	<i>P. andrieuxii</i>	68850	24/04/17	Vivero CICY
3	<i>A. obesum</i>	68853	24/04/17	Terrenos CICY

Una vez colectadas las hojas de las tres diferentes especies de plantas, se congelaron con N₂, trituraron y se liofilizaron. El material vegetal seco y molido se pesó y se extrajo por maceración con metanol (1:3, m/v). Después de 24 horas se filtró y evaporó el disolvente con un rota vapor. El procedimiento de maceración se realizó por triplicado obteniendo los rendimientos mostrados en la (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Rendimientos de extractos de plantas hospederas de *S. epilais* y plantas control.

Material vegetal	Pesos seco (g)	Extracto metanólico (g)	Rendimiento (%)
<i>P. andrieuxii</i>	43.3	7.6	18
<i>Adenium obesum</i>	5.5	1.9	35
<i>Nerium oleander</i>	24.5	7.40	30
<i>Bougainvillea</i> sp.	33.5	6.4	20
<i>Lactuca</i> sp.	19.9	3.7	19

3.2.1 Fraccionamiento de los extractos metanólicos

Los extractos metanólicos de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* se suspendieron en una mezcla metanol/agua 2:3. La suspensión acuosa resultante se extrajo sucesivamente con Hx (1:1) y AcOEt (1:1), obteniéndose las fracciones de baja polaridad y polaridad media respectivamente, la fracción residual se tomó como la fracción de alta polaridad. Los rendimientos se muestran en la (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Rendimientos de particiones de los extractos metanólicos de hojas de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii*.

Planta	Extracto crudo	Partición Hx	Partición AcEtOH	Acuosa
(PA) <i>P. andrieuxii</i>	7.61 g	1.92 g 25%	0.42 g 5%	3.55 g 47%
(AO) <i>A. obesum</i>	1.95 g	0.49 g 25%	0.27 g 14 %	1.20 g 60%
(NO) <i>N. oleander</i>	7.40 g	0.57 g 7%	2.92 g 39%	1.30 g 20%

3.2.3 Método para el análisis de oleandrina, oleandrigenina y gitoxigenina por HPLC

Los extractos metanólicos de las tres especies de plantas recolectadas y polilla *S. epilais* fueron inyectadas en un HPLC Waters con una bomba binaria Waters 600 y un automuestreador 717.

Se utilizó un método de gradiente con una mezcla de acetonitrilo (CH₃CN) y H₂O, con un tiempo de corrida de 15 min, flujo de 0.5 mL/min y detector a 220 nm. El volumen total inyectado fue de 10 µL por muestra; se utilizó una columna fase reversa C-18 X select HSS 250 × 4.6 mm 5 µm. Como estándar se usó una muestra comercial de oleandrina (Sigma 465-16-7), oleandrigenina y gitoxigenina fueron obtenidas por la hidrólisis ácida de oleandrina.

3.2.4 Condiciones para el análisis de extractos crudos y fracciones semipurificadas de plantas por cromatografía de gases-masas (CG-ES)

La obtención de perfiles cromatográficos de plantas en CG se realizó con un cromatógrafo GC- OP2010 Plus (Shimadzu, Duisburg, Alemania) equipado con una columna capilar de sílice fundida (Equity TM-5; 30 m, 0.25 mm, espesor de película de 0.25 µm; SUPELCO, Bellefonte, PA) y un detector de masas con ionización de electrones a 70 eV. Las muestras (1 µL al 1%) se inyectaron a una temperatura de interfaz de 280 °C y a una presión de entrada de helio de 135 kPa. La columna se ejecutó a 150 °C durante 3 min y luego con un gradiente de temperatura de 20 °C/min hasta una temperatura final de 300 °C que se mantuvo durante 35 min.

3.2.4 Aislamiento de oleandrina a partir de hojas de *N. oleander*

El extracto metanólico de hojas de *N. oleander* (IF9, 79.00 g) se suspendió en una mezcla metanol/agua 2:3. La suspensión acuosa resultante se extrajo sucesivamente con Hx (IF9A) y AcOEt (IF9B), obteniéndose las fracciones de baja polaridad y polaridad media respectivamente.

La fracción de mediana polaridad (IF9B, 17.90 g) se purificó por VLC, para lo cual primero se adsorbió una solución de la muestra en gel de sílice (Sigma-Aldrich, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm) en una relación de 2:1 (p/p). La muestra se colocó en la parte superior de una columna de gel de sílice grado CCD de 10 cm Ø por 6 cm de altura y la elución se llevó a cabo de manera isocrática con una mezcla de CH₂Cl₂/An (8:2, v/v), monitoreando por CCD, las 19 fracciones obtenidas. Las fracciones que presentaban oleandrina se combinaron (IF9B, 1.96 g) para su posterior purificación por cromatografía en columna por gravedad

La purificación por cromatografía en columna por gravedad de la muestra (IF9BA, 1.96 g) se adsorbió en gel de sílice (Sigma-Aldrich, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm), en

una relación de 2:1 (p/p) y se colocó en la parte superior de una columna de 5 cm Ø y 60 cm de altura empacada con el mismo tipo de gel de sílice. La elución se llevó a cabo de manera isocrática utilizando una mezcla de Hx/AcOEt/MeOH (60:37:3) colectándose fracciones de 10 mL. De las 70 fracciones obtenidas, las fracciones 22-29 mostraron la presencia de oleandrina pura (IF9BA4, 20 mg).

3.2.5 Hidrólisis ácida de oleandrina y extractos metanólicos de plantas de estudio

Metodología 1. En un matraz de 5 mL se colocaron 6.8 mg de oleandrina y 3 mL de una mezcla de EtOH:H₂SO₄ (95:5, v/v), la mezcla se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 h. El curso de la reacción se siguió por CCD y para la recuperación del producto de hidrólisis, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo dos veces con CH₂Cl₂ (2:1, v/v). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ al 5% (1:1, v/v) y Después de filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo el producto hidrolizado crudo 4.4 mg.

Metodología 2. En un matraz de 5 mL se colocaron 2.0 mg de oleandrina y 3.0 mL de una mezcla de EtOH:HCl (95:5, v/v), la mezcla se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 h. El curso de la reacción se siguió por CCD y para la recuperación del producto de hidrólisis, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo dos veces con CH₂Cl₂ (2:1, v/v). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ al 5% (1:1, v/v) y después de filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo el producto hidrolizado crudo (1.0 mg).

Metodología 3; En un matraz de 5 mL se colocaron 5.0 mg de oleandrina y 3 mL de una mezcla de EtOH:HCl (95:5 v/v) y la mezcla se calentó a reflujo (70° C) en agitación constante por 1 h. El curso de la reacción se siguió por CCD y para la recuperación del producto de hidrólisis, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo dos veces con CH₂Cl₂ (2:1, v/v). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ al 5% (1:1, v/v) y después de filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo el producto hidrolizado crudo (3.5 mg).

Para la hidrólisis de los extractos metanólicos y las diferentes fracciones (polaridad baja, polaridad media, polaridad alta) de *P. andrieuxii*, *A. obesum* y *N. oleander* se siguió la metodología 3, utilizando con 500 mg de extracto de cada una de las plantas para el caso de extracto metanólico y 100 mg para las fracciones.

3.2.7 Aislamiento de oleandrigenina y gitoxigenina

Para el aislamiento de los productos de hidrólisis se utilizaron 42.5 mg de oleandrina y la metodología 3 de hidrólisis, obteniéndose 31 mg del producto crudo de reacción, el cual fue purificado por CCDP, utilizando cromatoplasacas de 20 x 20 cm impregnadas con 0.25 mm y 0.5 mm de espesor de gel de sílice 60 FG₂₅₄ (E.M. Merck), y una elución múltiple (5 veces) con Hx:AcOEt:MeOH (70:25:5). De esta forma se obtuvieron 8.4 mg de oleandrigenina y 4.3 de gitoxigenina.

3.3 RESULTADOS

Los perfiles cromatográficos por CCD de los extractos metanólicos de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* (Figura 3.1) mostraron que *A. obesum* y *N. oleander* presentan una mayor similitud, comparado con los de *P. andrieuxii*.

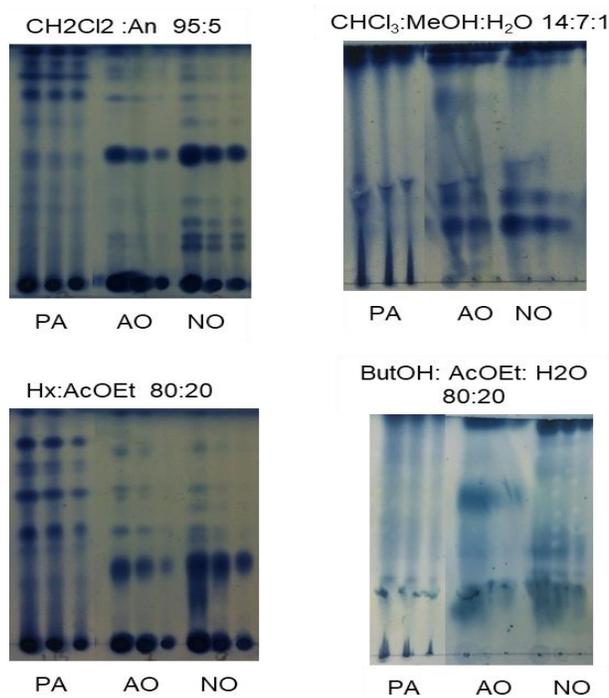


Figura 3.1 Perfiles cromatográficos por CCD de extractos totales de plantas hospederas de *S. epilais*. PA) *P. andrieuxii*, AO) *A. obesum*, NO) *N. oleander*

De la misma forma al comparar los perfiles cromatográficos por CCD (Figura 3.2) y CG-EM (Figura 3.3) de las fracciones semipurificadas obtenidas a partir de los extractos crudos de las tres plantas, las fracciones de polaridad baja mostraron la mayor similitud

entre las tres especies. El análisis por CG-EM permitió detectar la presencia de escualeno ($t_R = 16.30$ min), vitamina E ($t_R = 18.47$ min), β -sitosterol ($t_R = 20.21$ min) y lupeol ($t_R = 20.85$ min) en las fracciones de baja polaridad; la presencia de β -sitosterol y lupeol fue confirmada por comparación con muestras auténticas.

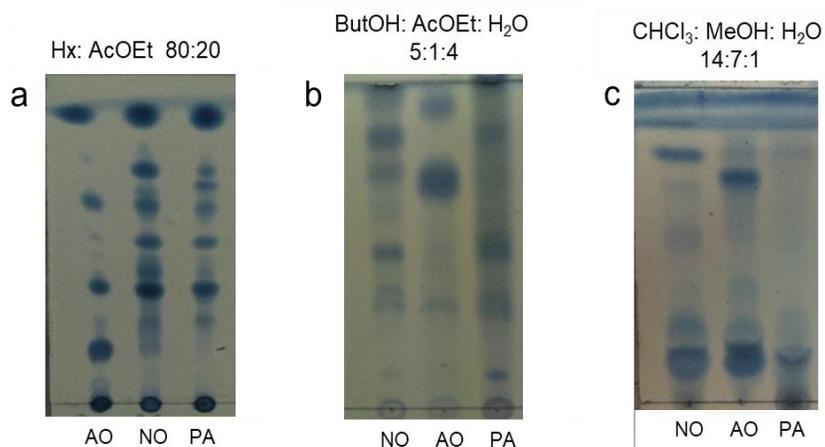


Figura 3.2 Perfiles cromatográficos de las fracciones semipurificadas de plantas hospederas de *S. epilais*, (AO) *A. obesum*, (NO) *N. oleander* y (PA) *P. andrieuxii*. a) Polaridad baja, b) Polaridad media y c) Polaridad alta

El análisis por HPLC de las fracciones de cada una de las plantas permitió detectar la presencia de oleandrina ($t_R = 8.01$ min), en la fracción de mediana polaridad del extracto de *N. oleander* (Figura 3.4).

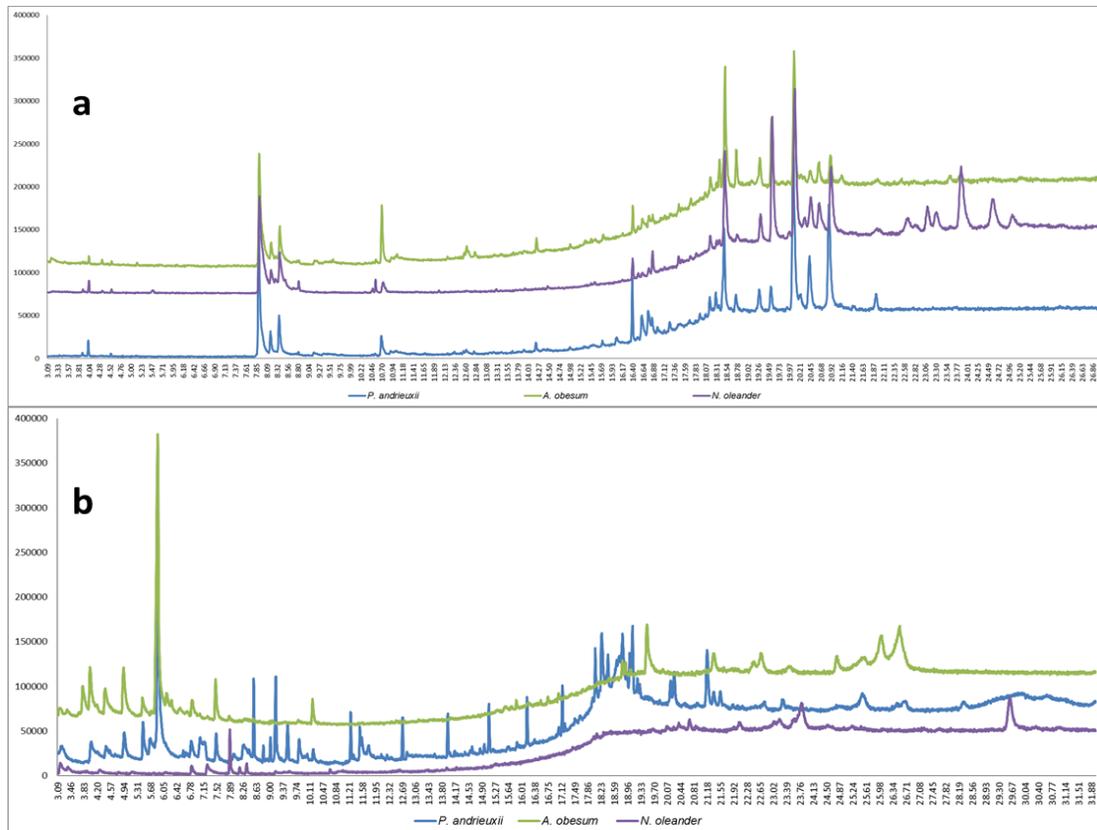


Figura 3.3 Perfiles cromatográficos de las fracciones de plantas hospederas de *S. epilaes* en CG-ES a) Polaridad baja, b) Polaridad media.

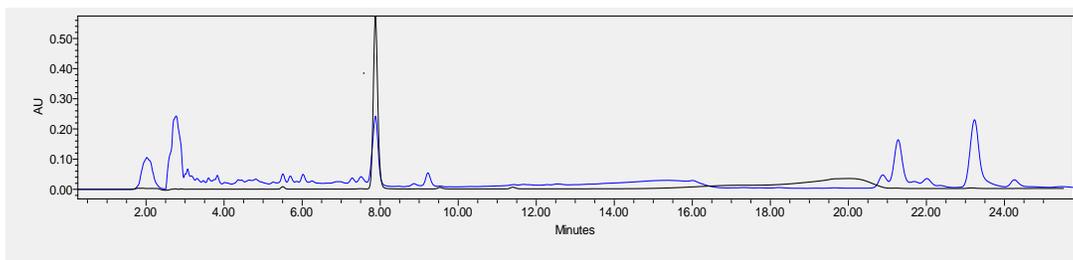


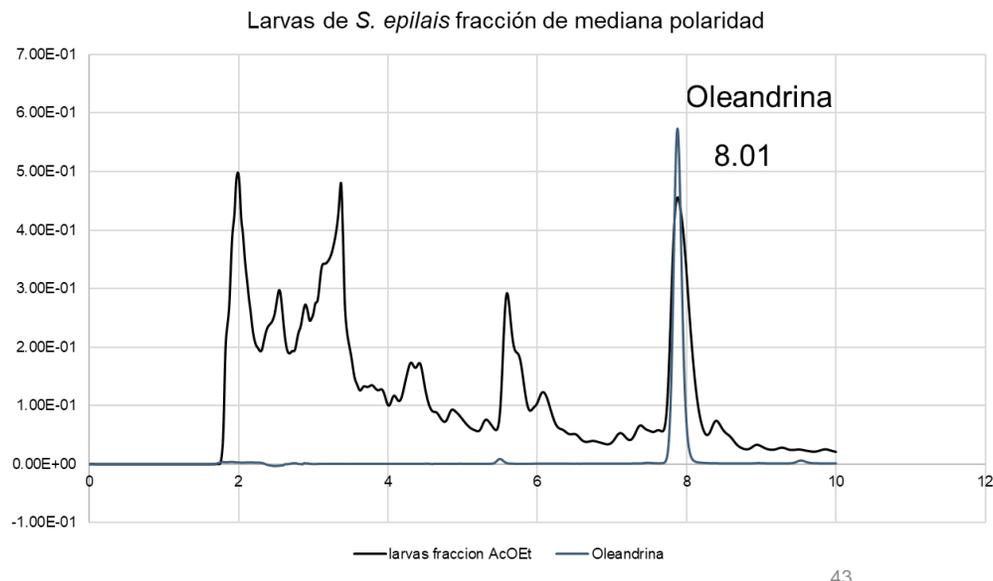
Figura 3.4 Perfiles cromatográficos por HPLC de oleandrina (negro t_R min 8.01 min y fracción de mediana polaridad de *N. oleander* enriquecida con oleandrina (azul).

Para confirmar la presencia de oleandrina en la fracción de mediana polaridad de *Nerium oleander*, se llevó a cabo su purificación por métodos cromatográficos y su identificación con base a sus datos espectroscópicos (^1H - ^{13}C RMN y experimentos bidimensionales Figura 1.3 y Tabla 3.4; Anexo Figura 9.1, 9.2 y 9.3).

Tabla 3.4 Datos espectroscópicos de RMN de oleandrina aislada de hojas de *N. oleander*.

C/H	δ_C	δ_H (J Hz)	COSY	HMBC
1	30.5			
2				
3	71.4	3.90 s		
4				
5	36.5			
6	35.3			
7				
8				
9	41.9			
10	35.7			
11	84.4			
12	50.1			
13	39.3			
14				
15	41.3	(a) 2.74 d (15.6, 9.7) (b) 1.78	H-16	9, 16, 17 11, 12, 16, 17
16	74.0	5.48 td (9.5, 2.6)	H-15, H-17	11, 20, 24
17	56.2	3.19 d (8.8)		11, 12, 16, 20, 21, 23
18	16.0	0.94		1, 6, 10
19	23.9	0.94		11, 12, 13, 17
20	167.8			
21	121.5	5.98 t (1.7)	H-23	17, 20, 22, 23
22	174.2			
23	75.7	(a) 4.98 dd, (18.1, 1.19) (b) 4.85 dd (18.1, 1.18)	H-23(a)	20, 21, 22
24	170.5			
25	21.2	1.97	H-15(a)	24
1'	95.6	4.96 d (2.0)		3, 3', 5'
2'	34.6	2.21 ddd (12.5, 4.8, 1.1)	H-3'	1', 3', 4'
3'	78.5	3.54 ddd (11.4, 8.9, 4.8)	H-2',H-4'	4', 5', 7'
4'	76.4	3.16 t (9.2)		2',3',5',6'
5'	67.7	3.72 dq (9.4, 6.2)	H-6',H-4'	
6'	17.9	1.27 d (6.3)	H-5'	4',5'
7'	56.5	3.41 s	H-5', H-16	3'

De igual manera, el análisis por HPLC de la fracción de polaridad media obtenida a partir del extracto metanólico crudo de larvas de *S. epilais* alimentadas de *N. oleander*, permitió detectar la presencia de oleandrina (Figura 3.5), confirmando el secuestro del cardenólido por parte del insecto.



43

Figura 3.5 Perfiles de HPLC de la fracción de mediana polaridad del extracto metanólico de *S. epilais* y el estándar de oleandrina ($t_R = 8.01$ min).

El perfil cromatográfico por CG-ES del producto de hidrólisis de oleandrina utilizando HCl a reflujo por una hora, mostró la presencia de un componente principal ($t_R = 23.7$ min), con un ion molecular correspondiente al peso molecular de oleandrigenina (432 g/mol).

La purificación del producto de hidrólisis de oleandrina resultó en la obtención de siete productos puros (Figura 3.6).

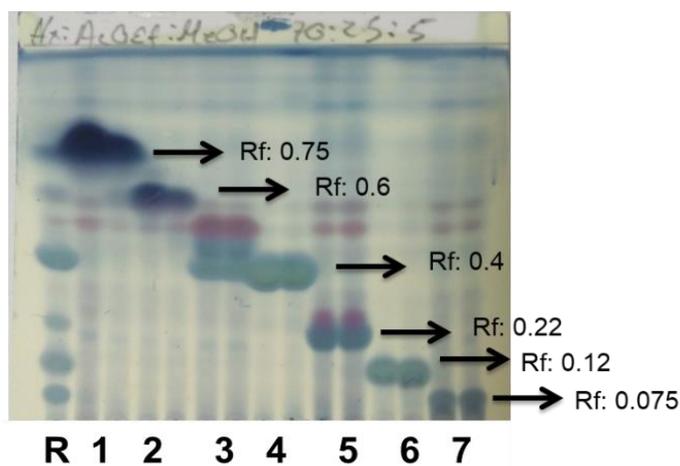


Figura 3.6 Perfil cromatográfico en CCD de los productos aislados de la hidrólisis ácida de oleandrina.

El producto obtenido con un R_f de 0.12 se identificó como Oleandrigenina (Figura 3.7 b) (Anexo Figura 9.5, 9.6 y Tabla 9.1, espectro de ^1H y ^{13}C), en tanto que el producto con R_f de 0.075 se identificó como gitoxigenina (Figura 3.7 c), (Anexo Figura 9.7, 9.8 y Tabla 9.2, espectro de ^1H y ^{13}C). Observándose para el caso de oleandrigenina la pérdida de las señales de los azúcares ubicados en la región de 3 a 5 ppm y en el caso de la gitoxigenina, el desplazamiento a un campo más bajo del H-16 (5.48 ppm, td, ^1H) y la pérdida de H-25 (1.97 ppm) correspondiente al acetato en el C-16.

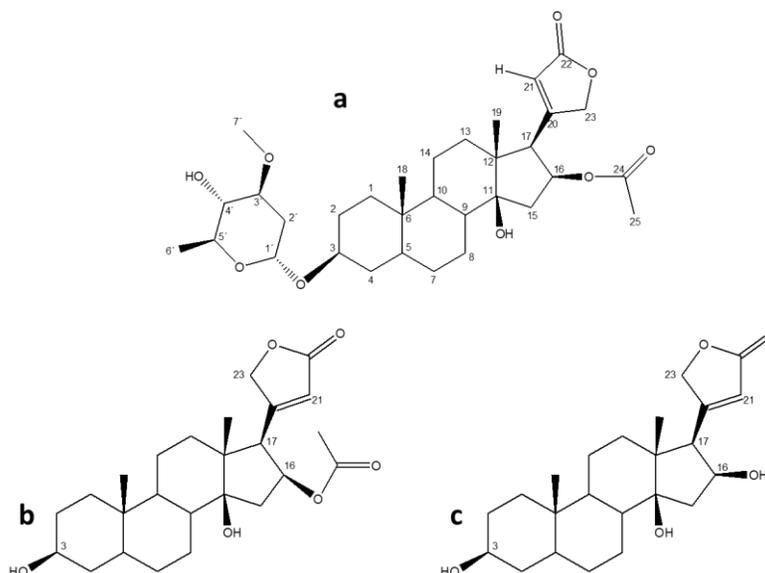


Figura 3.7 Estructuras de cardenólidos a) oleandrina, b) oleandrigenina, c) gitoxigenina.

El análisis por CG-ES de las muestras puras de oleandrigenina y gitoxigenina mostró que ambas presentan un componente principal con el mismo tiempo de retención y un patrón de fragmentación similar.

El análisis por HPLC de los tres CDs aislados mostró que la gitoxigenina es la de mayor polaridad (Figura 3.8).

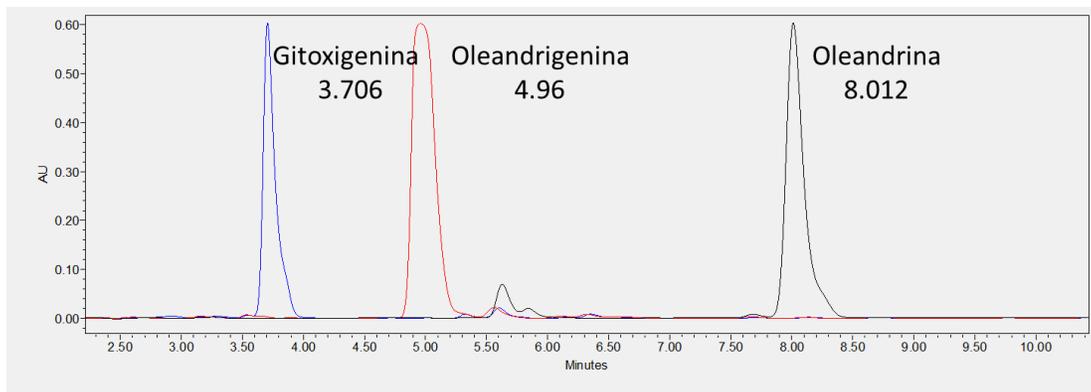


Figura 3.8 Perfiles cromatográficos por HPLC de los cardenólidos purificados

En un primer experimento, se decidió realizar la hidrólisis del extracto total de *A. obesum*, Los perfiles por HPLC de los productos de hidrólisis de los extractos crudos de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* no permitieron detectar la presencia de gitoxigenina u oleandrigenina en ninguno de ellos (Figura 3.9).

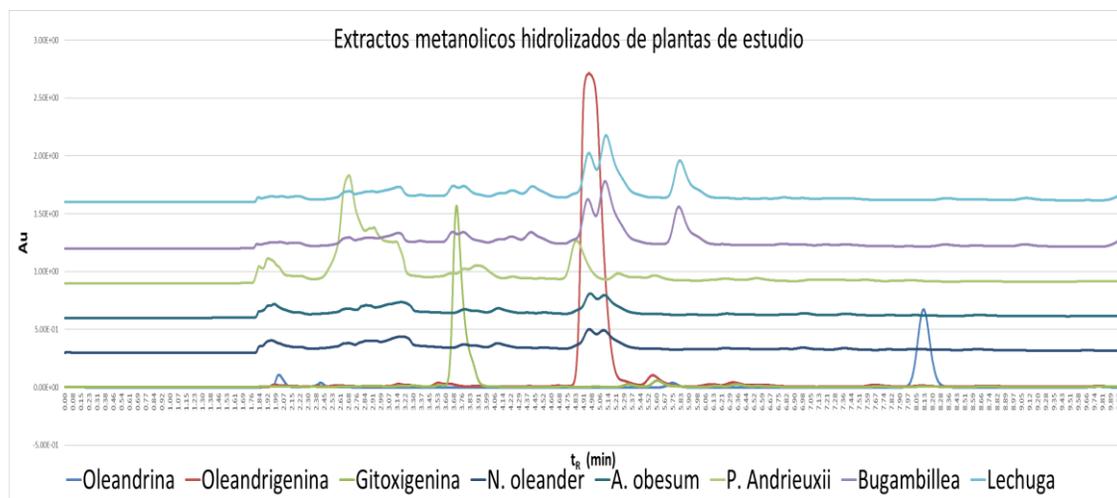


Figura 3.9 Perfiles cromatográficos del producto de hidrólisis de *P. andrieuxii*, *A. obesum* y *N. oleander* extractos totales.

Sin embargo, los perfiles cromatográficos por HPLC de los productos de hidrólisis de las fracciones de mediana y alta polaridad de *A. obesum* y *P. andrieuxii*, permitió detectar la presencia de oleandrigenina ($t_R = 4.96$) en los productos de hidrólisis de las fracciones de polaridad media de *P. andrieuxii* y *A. obesum* y de gitoxigenina ($t_R = 3.71$) en el producto de hidrólisis de la fracción de alta polaridad de *P. andrieuxii* (Figura 3.10).

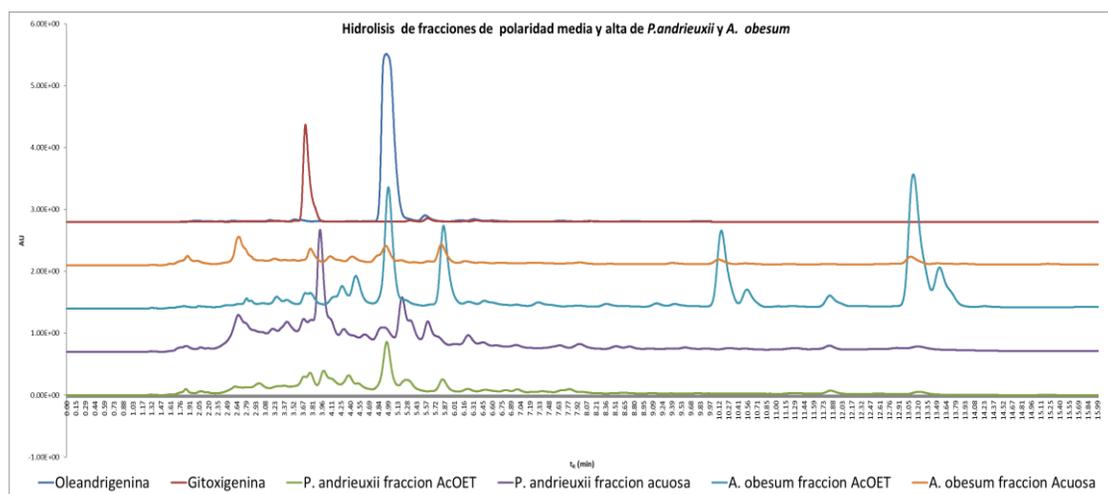


Figura 3.10 Perfiles cromatográficos de los productos de hidrólisis de las fracciones de mediana y alta polaridad de *P. andrieuxii* y *A. obesum*.

3.4 DISCUSIÓN

En el estudio preliminar de los extractos crudos y fracciones semipurificadas de *A. obesum*, *N. oleander* y *P. andrieuxii* por CCD y CG-ES, se determinó que la fracción con menor polaridad es la que presenta mayor similitud de las tres plantas. Logrando identificar a Escualeno (precursor de terpenos), vitamina E (usada para el crecimiento y procesos fisiológicos), β -sitosterol (fitoesterol) y lupeol (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). Sin embargo, el análisis comparativo de las fracciones semipurificadas de las tres diferentes plantas no resultó en la identificación de cardenólidos.

Por otra parte oleandrina es un cardenólido mono glicosilado por oleandrosa el cual ha sido aislado de las hojas de *N. oleander* (Liu *et al.*, 2018) y asociado al secuestro de cardenólidos por parte de *S. epilais*. Con esta información se buscó la presencia de oleandrina en los extractos crudos y fracciones semipurificadas de *A. obesum* y *P. andrieuxii* para reafirmar que este cardenólido es el buscado por la polilla para la selección de su alimento. Los resultados mostraron que oleandrina solo está presente en la fracción semipurificada de mediana polaridad de *N. oleander* y que *S. epilais* al alimentarse de las hojas de esta planta secuestra a oleandrina para usarlo como uno de sus mecanismos de defensa. Por otra parte con estos resultados se establece que *S. epilais* realiza el secuestro de diferentes cardenólidos dependiendo su planta hospedera

ya sea *N. oleander*, *A. obesum* o *P. andrieuxii* posiblemente con la misma aglicona (oleandrigenina) pero diferente glicosilación.

Para el estudio de la producción de cardenolidos producidos por *A. obesum* y *P. andrieuxii* se trabajo con las agliconas de oleandrina obtenidas por medio de hidrólisis ácida. Con esto se busco evaluar la presencia de agliconas en la fracciones semipurificadas de las plantas de forma natural como lo reporta (Agrawal *et al.*, 2012) para plantas de la familia Apocynaceae.

En la estandarización de la detección de las agliconas de cardenolidos se comenzó utilizando CG- ES, mostrando en los perfiles cromatograficos del producto de hidrólisis, un componente principal con características a las de oleandrigenina. Sin embargo, al purificar los productos resultantes de la hidrólisis y determinar su estructura por RMN se logro identificar a oleandrigenina y gitoxigenina, que al ser comparados sus perfiles cromatográficos y patrones de fragmentación, se observaron ser los mismos en ambos casos, a pesar de presentar diferentes características estructurales. Por lo que un proceso pirolisis en la columna de CG pudiera estar sucediendo como se observa para el caso de lupeol-3-(3'R)-hidroxi-esterato (Yam-Puc *et al.*, 2013).

Finalmente, HPLC mostró los mejores resultados para el estudio de los cardenolidos, mostrando en un primer análisis que las fracciones semipurificadas de las tres plantas no presentaban las agliconas oleandrigenina y gitoxigenina de forma natural probablemente por no presentar las condiciones que indujera la liberación de estas. Sin embargo, al hidrolizar la fracción de mediana polaridad y alta polaridad de *A. obesum* y *P. andrieuxii* los perfiles cromatograficos por HPLC sugieren la presencia de cardenolidos con diferentes características de glicosilacion. Para el caso de *A. obesum* podría deberse a Obesida B y C, Obebiosida B y C, Hongeliotriosida y Obetriosida B ya reportadas anteriormente en *A. obesum* (Yamauchi y Abe, 1990). Y para el caso de *P. andrieuxii* podría deberse a la Urechitoxina encontrada en *Pentalinun lutea* (Hassall, 1951).

CAPÍTULO IV

4. METILACIÓN DE 5-mC ASOCIADOS A LA ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO DE *S. epilais*

4.1 INTRODUCCIÓN

La metilación del ADN se basa en la modificación covalente que ocurre con la adición de un grupo metilo a las citosinas del ADN. Desempeña un papel en el silenciamiento y expresión de los genes (Bewick *et al.*, 2017), su estudio ha sido empleado para evaluar los cambios a gran escala como la hipometilación e hipermetilación durante el crecimiento, desarrollo, reproducción y adaptación a señales ambientales en plantas y animales (Glastad *et al.*, 2011).

Las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) son las encargadas de regular y llevar a cabo la metilación del ADN, clasificándolas *de novo* y mantenimiento, encontrando a las DNMT3a y DNMT3b asociadas a la metilación *de novo* y la DNMT1 a la metilación de mantenimiento (Goll y Bestor, 2005).

Las DNMTs se encuentran en animales e insectos, las cuales son asociadas a la diversidad y plasticidad (Glastad *et al.*, 2014). En genomas eucariontes, el porcentaje de metilación de citosinas en insectos es del 0-3%, en mamíferos y pájaros del 5%, en peces y anfibios del 10% y en algunas plantas más del 30% (Field *et al.*, 2004).

La presencia de 5-mC ha sido reportada en varias especies de insectos, aunque de igual manera se ha presentado la ausencia del ADN metilado en ciertos ordenes de insectos. Sin embargo, estos datos deben ser interpretados con precaución, debido a que la metilación del ADN puede restringirse a etapas de desarrollo particulares, ya que es posible que la metilación del ADN se conserva en la mayoría, si no es que en todas las especies de insectos (Field *et al.*, 2004). En lepidópteros la metilación global del ADN se ha reportado por debajo del 5% tanto en las áreas codificantes como en las no codificantes, encontrando principalmente DNMT1 y DNMT2 (Bewick *et al.*, 2017). Sin embargo, aún se desconoce la función específica que realiza en insectos. Por lo que establecer los niveles de metilación asociados a diferentes dietas y durante el crecimiento de *S. epilais* un lepidóptero asociado a su alimentación especializada ayudara a identificar las posibles aplicaciones de la metilación del ADN en insectos y desarrollo de tolerancia.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Colecta de insectos

Se colectaron larvas de *S. epilais* en sus plantas hospederas para ser criadas en cautiverio como lo indica el Capítulo 2. Las larvas fueron alimentadas con diferentes dietas proporcionándoles hojas de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii* con el fin de obtener mayor cantidad de individuos. Después de ser criada *S. epilais* en cautiverio se muestrearon 3 individuos por cada estadio (Larva, Prepupa, Pupa y Polilla) y por cada dieta proporcionada. Para posteriormente congelarlas a -80 °C hasta tener todas las muestras para su posterior análisis (Anexo Tabla 9.3).

Para la obtención del material biológico correspondiente a las larvas alimentadas de *Lactuca sp.* Se colectaron 30 larvas entre el tercer y cuarto instar, las cuales habían sido alimentadas previamente con hojas de *N. oleander*, posterior a esto se alimentaron con hojas de *Lactuca sp* por 10 días, pasando este periodo se colectaron las larvas y congelaron a -80 °C.

4.2.2 La extracción de ADN genómico

La extracción del ADN de los diferentes estadios de *S. epilais*, se realizó siguiendo el método (Echevarría-Machado *et al.*, 2005). El ADN extraído se re-suspendió en 50 µL de agua para HPLC con Ph ajustado, su integridad se verificó a través de un gel de agarosa al 1% y cuantifico espectrofotométricamente mediante un equipo NanoDrop para su posterior análisis (Anexo Tabla 9.5).

4.2.3 Evaluación del porcentaje de metilación del ADN en *S. epilais*

Para la determinación del porcentaje de metilación en cada uno de las etapas de vida de *S. epilais*, se usó un kit comercial 5-mC DNA ELISA, 2 × 96 rxns, marca Zymoresearch, evaluando a una concentración de 100 ng/µL de ADN señalada por el kit.

4.3 RESULTADOS

S. epilais fue criada en condiciones controladas para poder ser colectadas cada una de las muestras del insecto. Se compararon los pesos individuales de las larvas, prepupas pupas y polillas realizando un análisis de varianza de un factor (ANOVA, $p < 0.05$).

Encontrándose diferencias significativas exclusivamente en las larvas alimentadas con *Lactuca* sp. (Figura 4.1).

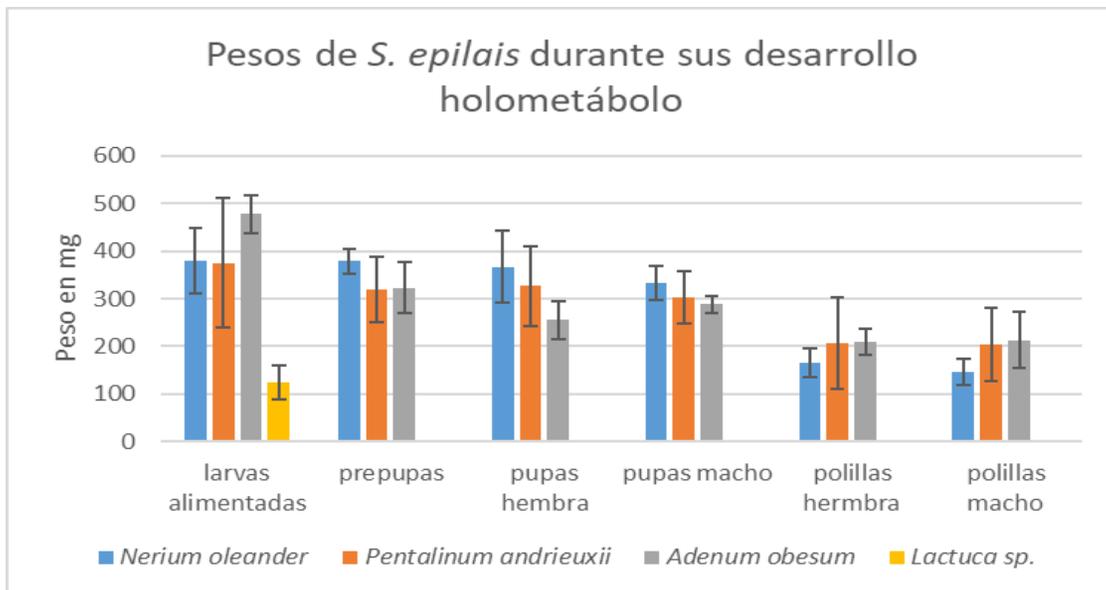


Figura 4.1 Pesos de *S. epilais* durante su desarrollo holometábolo presentando diferentes dietas en la etapa larval.

La extracción del ADN de insectos fue siguiendo la metodología establecida por (Echevarría-Machado *et al.*, 2005). Las muestras del ADN, fueron cuantificadas (Anexo Tabla 9.5) y relacionadas con un gel de electroforesis para confirmar su integridad (Figura 4.2). Para la extracción de ADN solo fueron procesadas dos de las tres muestras obtenidas de cada uno de los insectos debido a la capacidad del KIT usado para la evaluación de la metilación global del ADN.

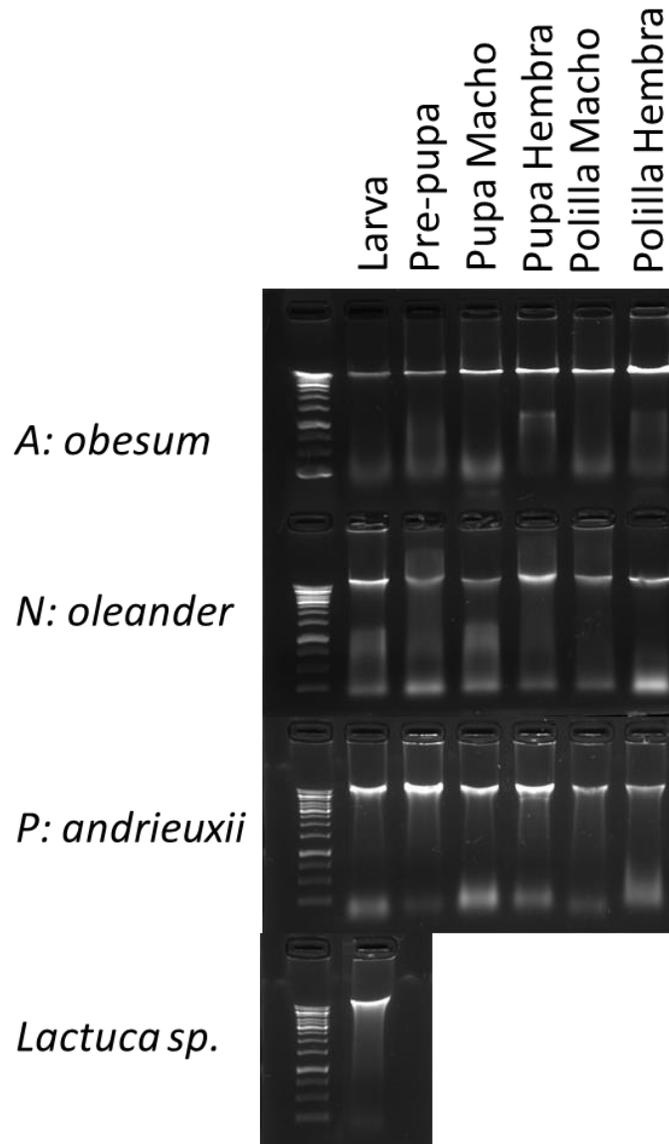


Figura 4.2 Gel de agarosa con muestras de ADN de las diferentes etapas de vida de *S. epilais*, usadas en el análisis de metilación del ADN.

Confirmada la integridad del ADN y su cuantificación, se realizaron diluciones a 100 ng/ μ l para la evaluación de la metilación global del ADN por medio del kit comercial 5-mC DNA ELISA. Para este análisis se realizó una curva de calibración con el fin de evaluar el porcentaje de metilación global de ADN (Anexo Figura 9.9).

Los resultados de la evaluación de la metilación global del ADN en el ciclo de vida holometábolo de *S. epilais* alimentada con diferentes dietas, muestran no tener diferencias significativas independientemente de la fuente de alimento con la que fueron

METILACIÓN DE 5-mC ASOCIADOS A LA ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO DE *S. epilais*

criadas en estado larval. Sin embargo, se puede observar que en su desarrollo holometábolo presenta una ligera tendencia en el aumento del porcentaje global de metilación del ADN ya que en estado larval presenta un promedio del 2% en la metilación global comparado con un 2.5-3% en el de polillas. Finalmente, al evaluar el porcentaje de metilación en larvas alimentadas de *Lectuca sp.* se observó un aumento de una unidad con esta dieta (Figura 4.3, Anexo Tabla 9.4).

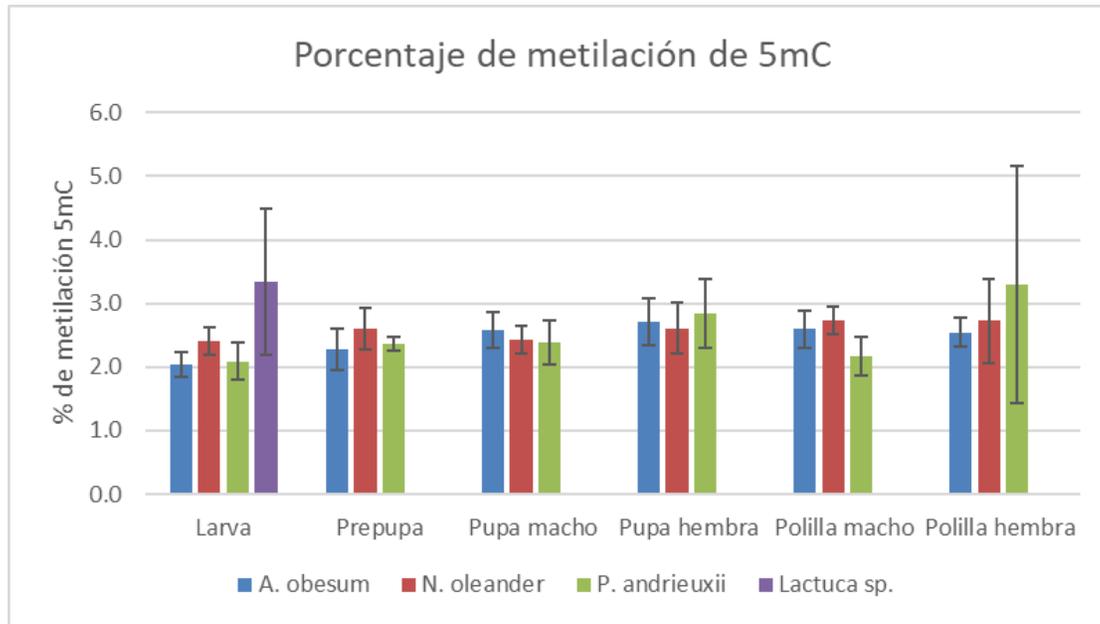


Figura 4.3 Metilación global en el ciclo holometábolo de *S. epilais*

4.4 DISCUSIÓN

En el ciclo de vida de *S. epilais*, los pesos de larvas, prepupas, pupas y polillas no mostraron diferencias significativas asociados a la dieta proporcionada. Sin embargo, durante el desarrollo de la metamorfosis los valores presentaron diferencias significativas con una tendencia a la pérdida de peso. Estos datos son consistentes con la pérdida de peso esperada para lepidópteros del 20-80% durante la metamorfosis (Molleman, 2011).

Los resultados asociados a la metilación global de 5-mC durante el desarrollo de la metamorfosis y dieta proporcionada no presentaron diferencias significativas. Y aunque se sabe que los insectos presentan un gran estrés durante el proceso de metamorfosis y selección de su alimento aún no queda claro cómo se da a nivel molecular la expresión de los diversos genes que ayudaran a la formación de cada uno de sus fenotipos o en la respuesta a cierto estrés (Jones, 1986; Jin *et al.*, 2018). Un primer acercamiento en el estudio epigenético asociado a la metilación del ADN fue el realizado para *Mamestra brassicae* mostrando un aumento en el porcentaje de metilación global comparando la etapa larval con un 8.9% y polilla con un 9.3% (Mandrioli y Volpi, 2003). Patrón ligeramente observado en *S. epilais* durante el proceso de metamorfosis, que, aunque el porcentaje de metilación se observa dentro del rango del 2 y 3 por ciento los resultados se observan con una tendencia a aumentar de larvas a polillas. Por otra parte se ha visto que durante la metamorfosis en lepidópteros también influyen otros mecanismos epigenéticos como lo es la acetilación de las histonas con *Galleria mellonella* el cual reportó una mayor acetilación en las histonas al darse la metamorfosis (Mukherjee *et al.*, 2012). Estos resultados podrían sugerir el uso de mecanismos epigenéticos sinérgicos en el desarrollo de la metamorfosis y el ciclo de vida de lepidópteros.

Aunque el trabajo se enfocó en la determinación del porcentaje de metilación de 5-mC. Es importante tener en cuenta otras marcas epigenética asociadas a la metilación del ADN que pudiera jugar un papel importante como lo son la N 6-metil adenina (6mA), N 4- metil citosina (4mC), 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). Ya que para el caso de la modificación N 6- metiladenina (6mA) recientemente se reportó como una marca importante para el desarrollo de *Bombyx mori* (Wang *et al.*, 2018). Quizá sea este el motivo por el cual el porcentaje de metilación global de 5-mC sea bajo en lepidópteros comparado con otros organismos.

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN GENERAL

Durante el seguimiento del ciclo de vida de *S. epilais* y de acuerdo a trabajos publicados, el tiempo que tarda el desarrollo de cada una de sus etapas de vida, varía y no presenta un patrón en el tiempo de crecimiento. Así también, en las condiciones de laboratorio probadas, se logró obtener copulas de la polilla y huevos para continuar con su estudio, aun cuando trabajos previos mencionan no haber podido criar en cautiverio a la polilla (Wink y Schneider, 1990).

Por otra parte, dentro de las plantas hospederas reportadas para *S. epilais*, en estado larval, se había reportado a *Bougainvillea* sp la cual no produce CDs (Quinn, 2008). Los resultados de la prueba de alimentación, arrojaron que las larvas únicamente se alimentan de plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae y el reporte de *Bougainvillea* sp como planta hospedera puede deberse a que el adulto (polilla) la use como una de sus fuentes florales para su alimentación en esta etapa de vida. Por otra parte y debido a que la familia Apocynaceae es reportada como principal productora de CDs (Wen *et al.*, 2016), para la búsqueda de estos metabolitos se trabajó exclusivamente con plantas pertenecientes a esta familia.

En el estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de *N. oleander*, *A. obesum* y *P. andrieuxii*, se observó, en los perfiles cromatográficos por CCD y CG- ES una alta similitud en la fracción menos polar, lo cual podría deberse a que se conoce que plantas de la misma familia producen metabolitos secundarios similares de acuerdo a su parentesco quimiotaxonómico (Chen *et al.*, 2017). Estas características ayudan al sustento de la producción de CDs en *P. andrieuxii* la cual aún no ha sido reportada con la presencia de estos metabolitos secundarios, que, caso contrario para *N. oleander* y *A. obesum* se han reportado la producción de CDs con el mismo núcleo esteroideo y diferente glicosilación (Versiani *et al.*, 2014; Quinn, 2008), probablemente debido a que las dos especies de plantas son hermanas al estar muy próximas en el árbol filogenético (Agrawal *et al.*, 2012).

En el estudio de los CDs asociados en la interacción planta-insecto, oleandrina se pensaba era uno de los principales CDs relacionados con el secuestro de *S. epilais* y

podría ser el determinante para que las polillas elija a sus plantas hospederas (Rothschild *et al.*, 1973). Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que este CD solo está presente en *N. oleander* de tres plantas estudiadas (Figura 3.4), lo que refleja que son otras características las que busca para que la polilla elija una planta huésped. Continuando con el estudio de CDs se optó por trabajar con las agliconas pues se había reportado que *S. epilaís* podría estar hidrolizando los CDs para usarlos de esa manera (Black, 1976). Sin embargo, en *S. epilaís* solo se identificó en el extracto de mediana polaridad a oleandrina y las agliconas de CDs no se lograron identificar en ninguna fracción semipurificada tanto de plantas como de insectos. Por otra parte, para obtener un acercamiento sobre lo cardenólidos producidos en *P. endrieuxii* se realizaron hidrólisis ácida a las fracciones de la planta, identificando que en la fracción de mediana y alta polaridad están presentes cardenólidos similares a oleandrigenina y gitoxigenina.

La importancia de este tipo de estudios está en el hecho de que en algunos insectos se ha observado la acumulación de una gran cantidad de compuestos tóxicos que pueden ser excretados o secuestrados para ser utilizados como sustancias defensivas contra predadores y patógenos (Zagrobelyny *et al.*, 2004; Ode, 2006; Nishida, 2002), para que pueda darse este mecanismo de defensa se requiere un transporte selectivo y la capacidad de almacenar que evite la interferencia de la toxina con procesos fisiológicos del insecto (Kuhn *et al.*, 2004) estos mecanismos de tolerancia a la toxicidad podrían ser regulados por mecanismos epigenéticos ya que para el caso del árbol filogenético de las familias *Arctiinae* y *Nymphalidae*, *S. epilaís* es la única que presenta este mecanismo de defensa (secuestro de cardenólidos) lo cual podría deberse a modificaciones puntuales en el ADN que permitieran la expresión de proteínas que a su vez permitan la adaptación para esta especie (Wink y Von Nickisch-Roseneck, 1997).

Con relación a los resultados de metilación global del ADN, no presentaron diferencias significativas en la dieta proporcionada y en el desarrollo holometábolo de *S. epilaís*. Mostrando que la metilación del ADN no está asociada a la alimentación folívora. Sin embargo, no se descarta que pudiera estar asociada en la tolerancia de los cardenólidos que este secuestrando independiente de la fuente donde los obtenga. Ya que, aunque se ha reportado que los insectos que realizan su ciclo de vida holometábolo muestran niveles bajos de metilación global del ADN para *Apis mellífera* resulta importante la presencia de este mecanismo para poder establecer las castas sociales (Provataris *et al.*, 2018), así

también es importante continuar con el estudio y determinación de las zonas donde se encuentra metilado el ADN pues se reporta que las zonas metiladas del ADN para caso de insectos puede no representar la inhibición de la expresión del gen y por lo contrario observarse una zona conservada y mayor expresada, todo dependerá de la zona donde se encuentre metilado el ADN (Jeong *et al.*, 2018).

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

En la búsqueda de cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* el uso de controles como *N. oleander* y *A. obesum* ayudaron para la comparación de perfiles cromatográficos e identificar que solo *N. oleander* produce oleandrina. Con esto se estableció la posible producción de diferentes cardenólidos en las tres especies, logrando identificar tentativamente la presencia de agliconas de CDs en *P. andrieuxii*, lo cual ayudará en estudios futuros para establecer la interacción de *P. andrieuxii*- *S. epilais*.

Para el análisis del papel fisiológico de los cardenólidos en el desarrollo de *S. epilais* orientado a la metilación del ADN, se estableció una metodología para la crianza en cautiverio de la polilla, con la cual se pudo obtener el suficiente número de individuos para observar que en la metilación de 5mC del ADN, existen variación en cada una de sus etapas de vida, aumentando conforme se va desarrollando la metamorfosis y en relación a la dieta proporcionada no existen variaciones significativas.

6.2 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone continuar trabajando en el estudio de los insectos que usen como plantas hospederas a *P. andrieuxii*, *N. oleander* y *A. obesum*, ya que durante la observación en campo. Se logró identificar a diferentes insectos con diferentes preferencias alimenticias, es decir monófagos, olífagos y generalistas. Con esto se pretende tener un registro más completo de los insectos depredadores de estas plantas y contribuir a su estudio en relación a la tolerancia de sus metabolitos tóxicos que presenta.

De igual manera se invita a continuar en la búsqueda de cardenólidos. Primeramente, confirmando la presencia de agliconas de CDs en *P. andrieuxii* y *A. obesum*, con el objetivo de establecer la relación que presentan con la polilla *S. epilaís*, así como el estudio metabólico de plantas que han sido hospedadas por *S. epilaís* y plantas que no lo han sido. Con el objetivo de establecer las características específicas que busca *S. epilaís* para ovipositar en su planta hospedera, así como posibles defensas que presentan las plantas para evitar a sus depredadores.

Por otra parte, continuar con el estudio de *S. epilaís* como modelo del secuestro de cardenólidos. Estableciendo para el estado larval una dieta artificial con y sin cardenólidos además de agregarle azacitidina en su dieta, con el fin de establecer si la metilación del ADN está directamente asociada a la metamorfosis en *S. epilaís* y a la tolerancia a cardenólidos. Además de usar la tecnología MethylC-Seq para identificar los genes que se estén metilando y a su vez puedan estar asociados a la metamorfosis o estrés.

Finalmente, investigar diferentes mecanismos epigenéticos como la modificación en las histonas, la organización de la cromatina o micro ARN en la metamorfosis y secuestro de cardenólidos, podría dar un panorama más completo de los diversos métodos que usa *S. epilaís* para generar las adaptaciones y desarrollo de su especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F. y Yamauchi, T. (1992). Cardenolide triosides of oleander leaves. *Phytochemistry*, 31, 2459-2463.
- Agrawal, A. A., Petschenka, G., Bingham, R. A., Weber, M. G. y Rasmann, S. (2012). Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions. *New Phytologist*, 194, 28-45.
- Allen, T. J., Brock, J. P., Brock, J. P. y Glassberg, J. (2005). *Caterpillars in the field and garden: a field guide to the butterfly caterpillars of North America*, Oxford University Press.
- Barradas-Juanz, N., Díaz-Fleischer, F., Montoya, P., Dorantes, A. y Pérez-Staples, D. (2016). New rearing method and larval diet for the mahogany shoot borer *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Florida Entomologist*, 99, 185-191.
- Beckerman, P., Ko, Y.-A. y Susztak, K. (2014). Epigenetics: a new way to look at kidney diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29, 1821-1827.
- Begon, M., Townsend, C. R. y Harper, J. L. (2009). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*, Wiley.
- Bewick, A. J., Vogel, K. J., Moore, A. J. y Schmitz, R. J. (2017). Evolution of DNA Methylation across Insects. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 654-665.
- Bhadane, B. S., Patil, M. P., Maheshwari, V. L. y Patil, R. H. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy Research*, 32, 1181-1210.
- Black, D. W. (1976). Studies on cardiac glycoside storage in moths, publisher not identified.
- Bowers, M. D. (2009). Chemical defenses in woolly bears: sequestration and efficacy against predators and parasitoids. Tiger moths and woolly bears: behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae, 83-102.
- Bratley, H. E. (1932). The Oleander Caterpillar, *Syntomeida epilais*, Walker. *The Florida Entomologist*, 15, 57-64.
- Cammack, R., Attwood, T. K., Campbell, P. N., Parish, J. H., Smith, A. D., Stirling, J. L. y Vella, F. (2011). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology* (2nd Edition). Oxford University Press.
- Cao, Y.-L., Zhang, M.-H., Lu, Y.-F., Li, C.-Y., Tang, J.-S. y Jiang, M.-M. (2018). Cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Fitoterapia*, 127, 293-300.

- Carpenter, J. E., Bloem, S. y Bloem, K. A. (2001). Inherited sterility in *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *The Florida Entomologist*, 84, 537-542.
- Castro, Y. C., Rojas, C. G., Cedeño, C. V. y Velásquez, V. V. (2009). Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en marcha*, 22, 28-37.
- Chacón, I. y Montero, J. J. M. R. (2007). *Butterflies and moths of Costa Rica* (order Lepidoptera), Editorial INBio.
- Chan-Bacab, M. J. y Pena-Rodriguez, L. M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18, 674-688.
- Chen, Q., Lu, X., Guo, X., Guo, Q. y Li, D. (2017). Metabolomics Characterization of Two Apocynaceae Plants, *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, Using GC-MS and LC-MS Methods in Combination. *Molecules*, 22, 997.
- Chen, T. P., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z. J. y Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 5594-5605.
- De-La-Peña, C., Nic-Can, G., Galaz-Ávalos, R., Avilez-Montalvo, R. y Loyola-Vargas, V. (2015). The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 635.
- Dolomatov, S., Sataieva, T., Zukow, W., Kondakova, Y. y Ramazanova, E. (2018). Ecological aspects of molecular mechanisms of epigenetic rearrangement of humoral systems of the renal function regulation. 2018, 29, 19.
- Domínguez-Carmona, D. B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinell, G., Gutierrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M. J., Giménez-Turba, A. y Peña-Rodríguez, L. M. (2010). Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*, 17, 379-382.
- Dubendorfer, A., Hediger, M., Burghardt, G. y Bopp, D. (2003). *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *International Journal of Developmental Biology*, 46, 75-79.
- Dyar, H. G. (1907). Descriptions of new American Lepidoptera. *Journal of the New York Entomological Society*, 15, 50-53.
- Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R. y Moreno-Valenzuela, O. A. (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31, 129-135.

- Ehrlich, P. R. y Raven, P. H. (1964). Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution*, 18, 586-608.
- Elvira, S., Gorriá, N., Muñoz, D., Williams, T. y Caballero, P. (2010). A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Effect on *S. exigua* Nucleopolyhedrovirus Production. *Journal of Economic Entomology*, 103, 17-24.
- Endler, J. A. y Mappes, J. (2004). Predator mixes and the conspicuousness of aposematic signals. *The American Naturalist*, 163, 532-547.
- Evans, D. L. S. J. O. (1990). *Insect defenses : adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*, Albany (N.Y.) : State university of New York press.
- Feliciello, I., Parazajder, J., Akrap, I. y Ugarković, Đ. (2013). First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*. *Epigenetics*, 8, 534-541.
- Field, L. M., Lyko, F., Mandrioli, M. y Pranter, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology*, 13, 109-115.
- Glastad, K. M., Hunt, B. G. y Goodisman, M. a. D. (2014). Evolutionary insights into DNA methylation in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 1, 25-30.
- Glastad, K. M., Hunt, B. G., Yi, S. V. y Goodisman, M. a. D. (2011). DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Molecular Biology*, 20, 553-565.
- Goll, M. G. y Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 481-514.
- Gómez, R. (2006). Plan de manejo propuesto para la cría de mariposas promisorias como alternativa productiva para comunidades indígenas de la Amazonia colombiana. *Bol Soc Entomol Aragonesa*, 38, 451-460.
- González-Rocha, E. y Cerros-Tlatilpa, R. (2015). La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. *Acta botánica mexicana*, 21-70.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. y Fujita, M. (2014). Chapter 12 - Role of Tocopherol (Vitamin E) in Plants: Abiotic Stress Tolerance and Beyond. In: Ahmad, P. y Rasool, S. (eds.) *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. San Diego: Academic Press.
- Hassall, C. H. (1951). 702. The cardiac glycosides of *Urechites suberecta*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3193-3195.
- Herbario Cicy, U. D. R. N. (2010). *Flora Digital: Península de Yucatán*.

- Hernández-Baz, F., Bailey, A. C. y Monzón, J. (2015). Lepidoptera: notes on some Ctenuchinae dry season (Lepidoptera: Arctiidae) from a cloud forest and pine-oak forest in Guatemala, Middle America. *Dugesiana*, 15.
- Higginson, A. D. y Ruxton, G. D. (2010). Optimal defensive coloration strategies during the growth period of prey. *Evolution*, 64, 53-67.
- Holzinger, F. y Wink, M. (1996). Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): Role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 1921-1937.
- Hristov, N. y Conner, W. E. (2005). Effectiveness of tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae) chemical defenses against an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). *Chemoecology*, 15, 105-113.
- J H Law, A. y Regnier, F. E. (1971). Pheromones. *Annual Review of Biochemistry*, 40, 533-548.
- Jeong, H., Wu, X., Smith, B. y Yi, S. V. (2018). Genomic Landscape of Methylation Islands in Hymenopteran Insects. *Genome Biology and Evolution*, 10, 2766-2776.
- Jin, T., Gao, Y., He, K. y Ge, F. (2018). Expression Profiles of the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene Associated With Thermal Stress in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Insect Science*, 18, 7.
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Cole, J. R., Tempesta, M. S. y Bates, R. B. (1981). 3'-O-Methylevomonoside: a new cytotoxic cardiac glycoside from *Thevetia ahouia* A. DC (Apocynaceae). *The Journal of Organic Chemistry*, 46, 1946-1947.
- Jones, D. (1986). Use of parasite regulation of host endocrinology to enhance the potential of biological control. *Entomophaga*, 31, 153-161.
- Kareru, P. G., Keriko, J. M., Kenji, G. M., Thiong'o, G. T., Gachanja, A. N. y Mukiira, H. N. (2010). Antimicrobial activities of skincare preparations from plant extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 7, 214-218.
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M. y Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 16, 2272-2280.
- Kilvitis, H. J., Alvarez, M., Foust, C. M., Schrey, A. W., Robertson, M. y Richards, C. L. (2014). Ecological Epigenetics. In: Landry, R. C. y Aubin-Horth, N. (eds.) *Ecological Genomics: Ecology and the evolution of genes and genomes*. Dordrecht: Springer Netherlands.

- Krause, B., Sobrevia, L. y Casanello, P. (2009). Epigenetics: New Concepts of Old Phenomena in Vascular Physiology. *Current Vascular Pharmacology*, 7, 513-520.
- Kuhn, J., Pettersson, E. M., Feld, B. K., Burse, A., Termonia, A., Pasteels, J. M. y Boland, W. (2004). Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13808-13813.
- Leimu, R., Riipi, M. y Stærk, D. (2005). Food preference and performance of the larvae of a specialist herbivore: variation among and within host-plant populations. *Acta Oecologica*, 28, 325-330.
- Liu, H., Chen, S.-Y., Guo, J.-Y., Su, P., Qiu, Y.-K., Ke, C.-H. y Feng, D.-Q. (2018). Effective natural antifouling compounds from the plant *Nerium oleander* and testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 170-177.
- Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., #Xe1, Vila-Ortiz, G., Mart, #Xed y Nez-Ayala, A. L. (2018). Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018, 13.
- Mandrioli, M. y Volpi, N. (2003). The genome of the Lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like Content of Methyl-cytosine. *Genetica*, 119, 187-191.
- Martin, R. A. y Lynch, S. P. (1988). Cardenolide content and thin-layer chromatography profiles of monarch butterflies, *Danaus plexippus* L., and their larval host-plant milkweed, *Asclepias asperula* subsp. *Capricornu* (woods.) woods., in north central Texas. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 295-318.
- Matsuoka, K., Yamamoto, M., Yamakawa, R., Muramatsu, M., Naka, H., Kondo, Y. y Ando, T. (2008). Identification of Novel C20 and C22 Trienoic acids from Arctiid and geometrid female moths that produce polyenyl type II Sex pheromone components. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1437-1445.
- Mcauslane, H. J. (2008). Aposematism. In: Capinera, J. L. (ed.) *Encyclopedia of Entomology*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Montero, J. J. M. R. (2007). *Manual para el manejo de mariposarios*, Editorial INBio.
- Moranz, R. y Brower, L. P. (1998). Geographic and temporal variation of cardenolide-based chemical defenses of queen butterfly (*Danaus gilippus*) in Northern Florida. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 905-932.
- Mukherjee, K., Fischer, R. y Vilcinskis, A. (2012). Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Frontiers in Zoology*, 9, 25.

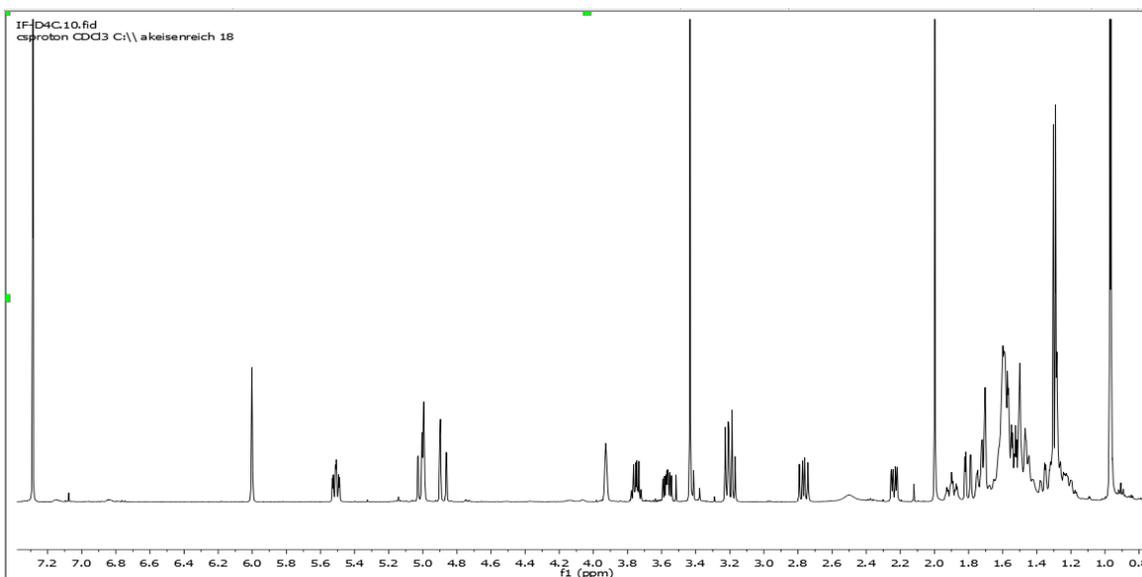
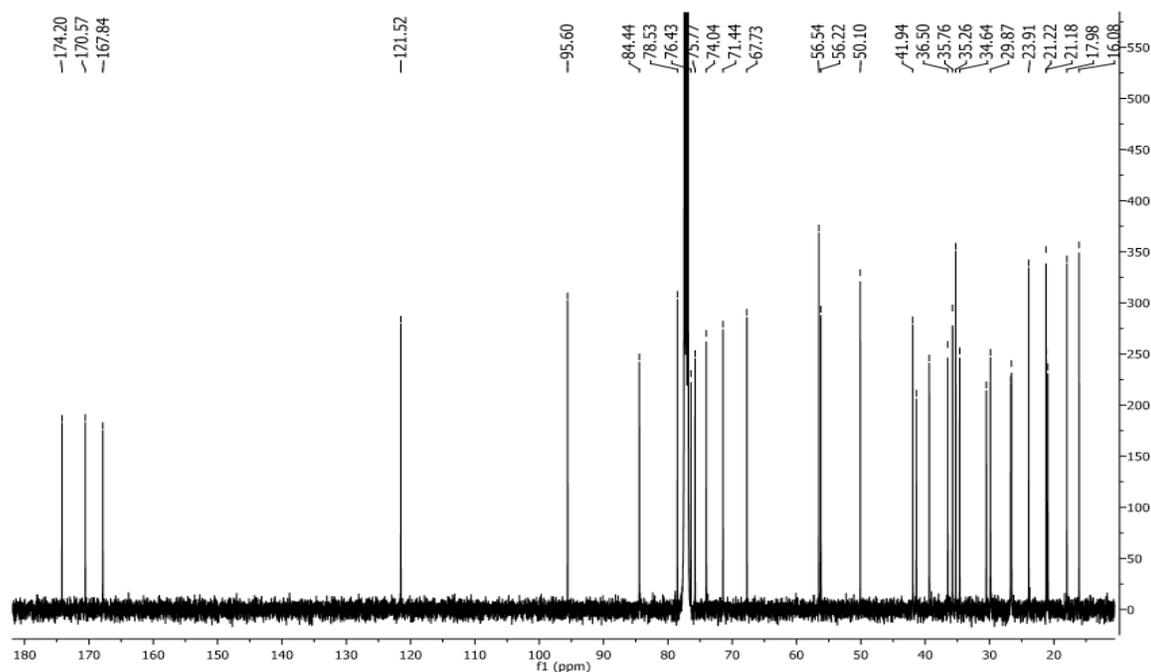
-
- Nishida, R. (2002). Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 47, 57-92.
- Nishida, R. (2014). Chemical ecology of insect–plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 1-13.
- Ode, P. J. (2006). Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on herbivore and natural enemy interactions. *Annual Review of Entomology*, 51, 163-185.
- Opitz, S. E. W. y Müller, C. (2009). Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology*, 19, 117-154.
- Pan, L., Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P., Calomeni, E. P., Fuchs, J. R., Satoskar, A. R. y Kinghorn, A. D. (2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*, 82, 128-135.
- Pavelka, J. y Koudelová, J. (2001). Inheritance of a temperature-modified phenotype of the short antennae (sa) mutation in a moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Heredity*, 92, 234-242.
- Provataris, P., Meusemann, K., Niehuis, O., Grath, S. y Misof, B. (2018). Signatures of DNA Methylation across Insects Suggest Reduced DNA Methylation Levels in Holometabola. *Genome Biology and Evolution*, 10, 1185-1197.
- Quinn, M. (2008). Polka-dot wasp moth *Syntomeida epilais* (Walker, 1854) [Online]. Texas Lep Information. Available: <http://texasento.net/epilais.htm> [Accessed 22/10/2016 2016].
- Quintero, F. A. (2011). Epigenética, conceptualización y alcance epistémico/ Epigenetics. Conceptualization and epistemological scope. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 13, 7.
- Rojas, J. C., León, J. C. R., Malo, E. A. y Rivera, E. a. M. (2012). Temas selectos en ecología química de insectos, El Colegio de la Frontera Sur.
- Rothschild, M., Ew, J. V. y Reichstein, T. (1973). Cardiac Glycosides (Heart Poisons) in the Polka-Dot moth *Syntomeida Epilais* Walk. (Ctenuchidae: Lep.) with Some Observations on the Toxic Qualities of *Amata* (=Syntomis) *phegea* (L.). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 183, 227-247.
- Sanderford, M. V. y Conner, W. E. (1995). Acoustic courtship communication in *Syntomeida epilais* Wlk. (Lepidoptera: Arctiidae, Ctenuchinae). *Journal of Insect Behavior*, 8, 19-31.

- Schutt, C. y Nothiger, R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development*, 127, 667-677.
- Tian, D.-M., Cheng, H.-Y., Jiang, M.-M., Shen, W.-Z., Tang, J.-S. y Yao, X.-S. (2016). Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. *Journal of Natural Products*, 79, 38-50.
- Tori, K., Ishii, H., Wolkowski, Z. W., Chachaty, C., Sangaré, M., Piriou, F. y Lukacs, G. (1973). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of cardenolides. *Tetrahedron Letters*, 14, 1077-1080.
- Vahl, W. K., Boiteau, G., De Heij, M. E., Mackinley, P. D. y Kokko, H. (2013). Female fertilization: effects of sex-specific density and sex ratio determined experimentally for Colorado potato beetles and *Drosophila* fruit flies. *PloS one*, 8, e60381.
- Vandegheuchte, M. B. y Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 36-45.
- Versiani, M. A., Ahmed, S. K., Ikram, A., Ali, S. T., Yasmeen, K. y Faizi, S. (2014). Chemical constituents and biological activities of *Adenium obesum* (Forsk.) Roem. et Schult. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 171-180.
- Vílchez, B. y Rocha, O. (2004). Fenología y biología reproductiva del nazareno (*Peltogyne purpurea* Pittier) en un bosque intervenido de la Península de Osa, Costa Rica, América Central. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 1, 47-60.
- Wang, X., Li, Z., Zhang, Q., Li, B., Lu, C., Li, W., Cheng, T., Xia, Q. y Zhao, P. (2018). DNA methylation on N6-adenine in lepidopteran *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861, 815-825.
- Weiner, S. A. y Toth, A. L. (2012). Epigenetics in Social Insects: A New Direction for Understanding the Evolution of Castes. *Genetics Research International*, 2012, 11.
- Weiss, M. R. (2006). Defecation behavior and ecology of insects. *Annual Reviews of Entomology*, 51, 635-661.
- Weller, S. J., Simmons, R. B., Boada, R. y Conner, W. E. (2000). Abdominal modifications occurring in wasp mimics of the Ctenuchine- *Euchromiine* Clade (Lepidoptera: Arctiidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 920-928.
- Wen, S., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., Ding, L. y Jiang, M. (2016). Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. *Fitoterapia*, 112, 74-84.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.

- Wink, M. y Schneider, D. (1990). Fate of plant-derived secondary metabolites in three moth species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 389-400.
- Wink, M. y Von Nickisch-Roseneck, E. (1997). Sequence data of mitochondrial 16S rDNA of Arctiidae and Nymphalidae: evidence for a convergent evolution of pyrrolizidine alkaloid and cardiac glycoside sequestration. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1549-1568.
- Yam-Puc, A., Chee-González, L., Escalante-Erosa, F., Arunachalampillai, A., Wendt, O. F., Sterner, O., Godoy-Hernández, G. y Peña-Rodríguez, L. M. (2012). Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*, 5, 45-48.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ramírez-Torres, F. G., Chan-Bacab, M. J., Eisenreich, W., Huber, C., Knispel, N., Godoy-Hernández, G. y Peña-Rodríguez, L. M. (2013). A case of mistaken identity: Lupeol-3-(3'R)-hydroxystearate can be mistakenly identified as lupeol acetate when only analyzed by GC-MS. *Phytochemistry Letters*, 6, 649-652.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M. J., Arunachalampillai, A., Wendt, O. F., Sterner, O. y Peña-Rodríguez, L. M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the Root Extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Natural Products*, 72, 745-748.
- Yamauchi, T. y Abe, F. (1990). Cardiac glycosides and pregnanes from *Adenium obesum* (studies on the constituents of *Adenium*. I). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38, 669-672.
- Zagrobely, M., Bak, S., Rasmussen, A. V., Jørgensen, B., Naumann, C. M. y Lindberg Møller, B. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry*, 65, 293-306.

8. ANEXOS

CAPÍTULO 3

Figura 8.1 Espectroscopia de oleandrina de RMN ^1H , (CDCl_3 , 500 MHz)Figura 8.2 Espectroscopia de oleandrina de RMN ^{13}C , (CDCl_3 , 500 MHz)

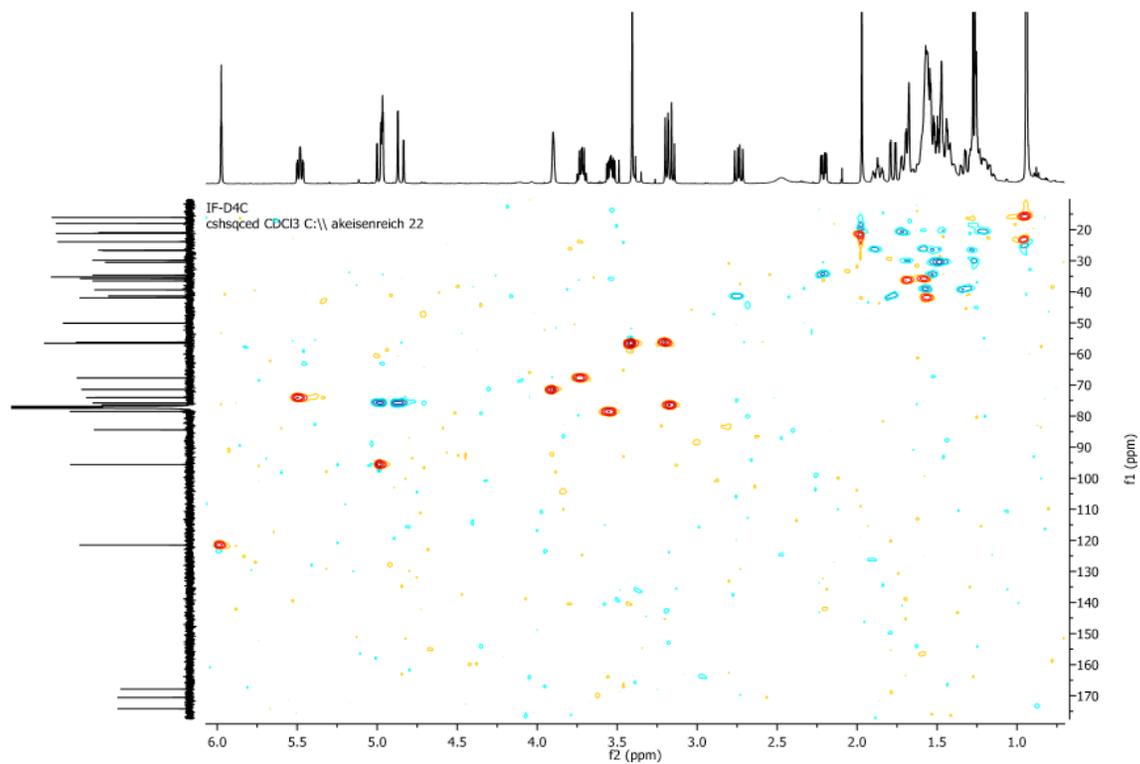


Figura 8.3 Espectroscopia de oleandrina de RMN, espectro de HMBC

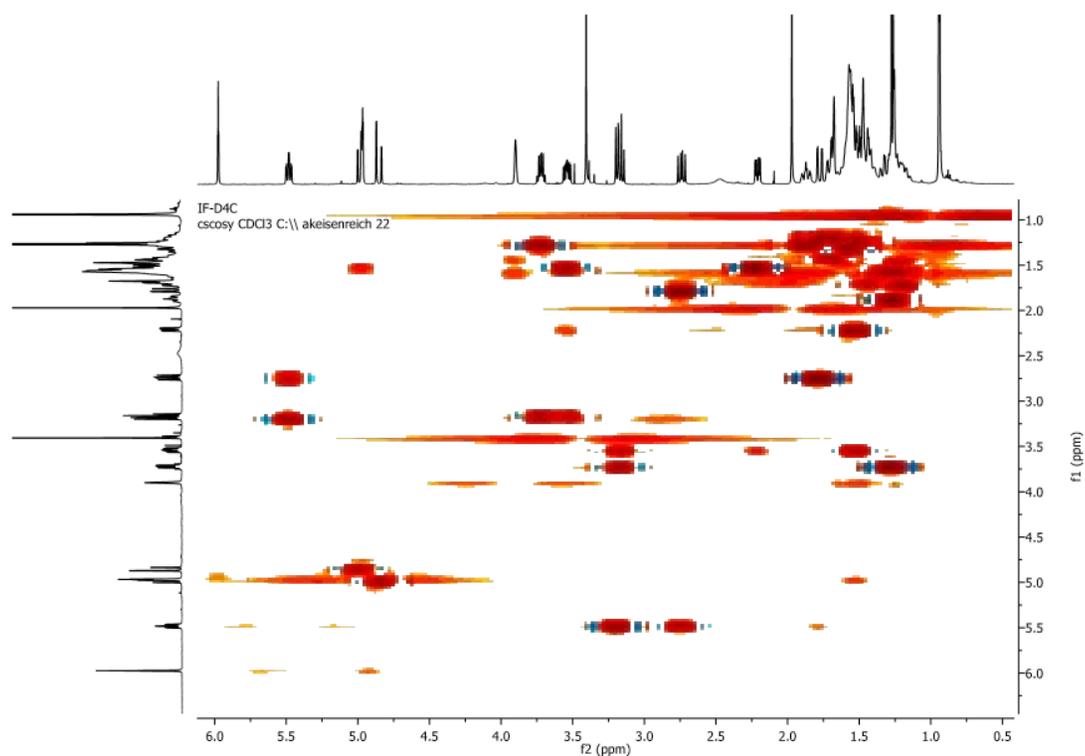


Figura 8.4 Espectroscopia de oleandrina de RMN, espectro de HSQC

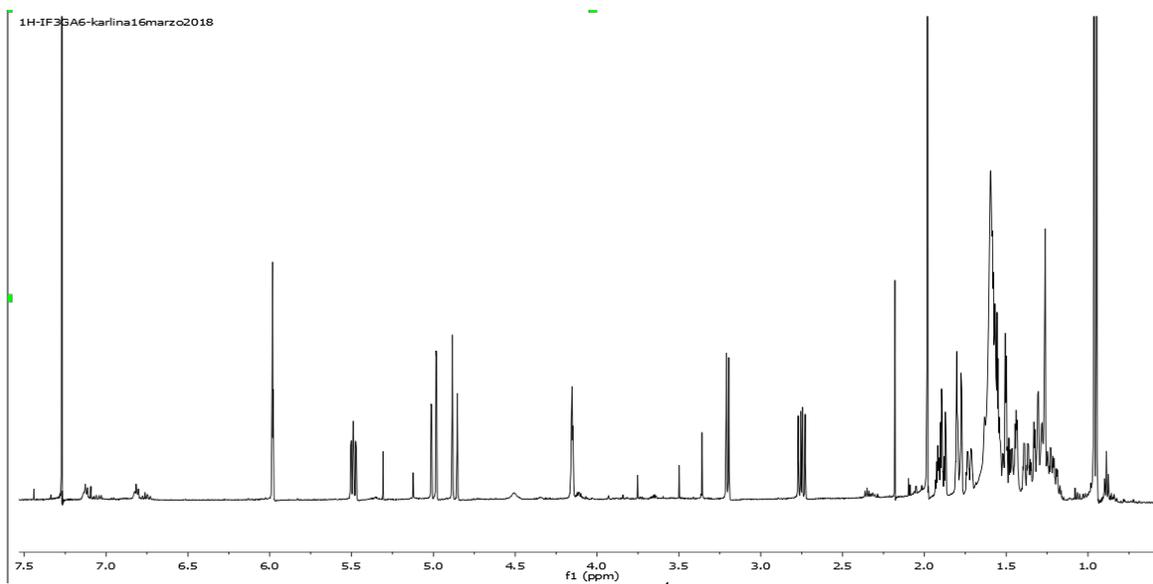


Figura 8.5 Espectroscopia de oleandrigenina de RMN ^1H , (CDCl_3 , 600 MHz)

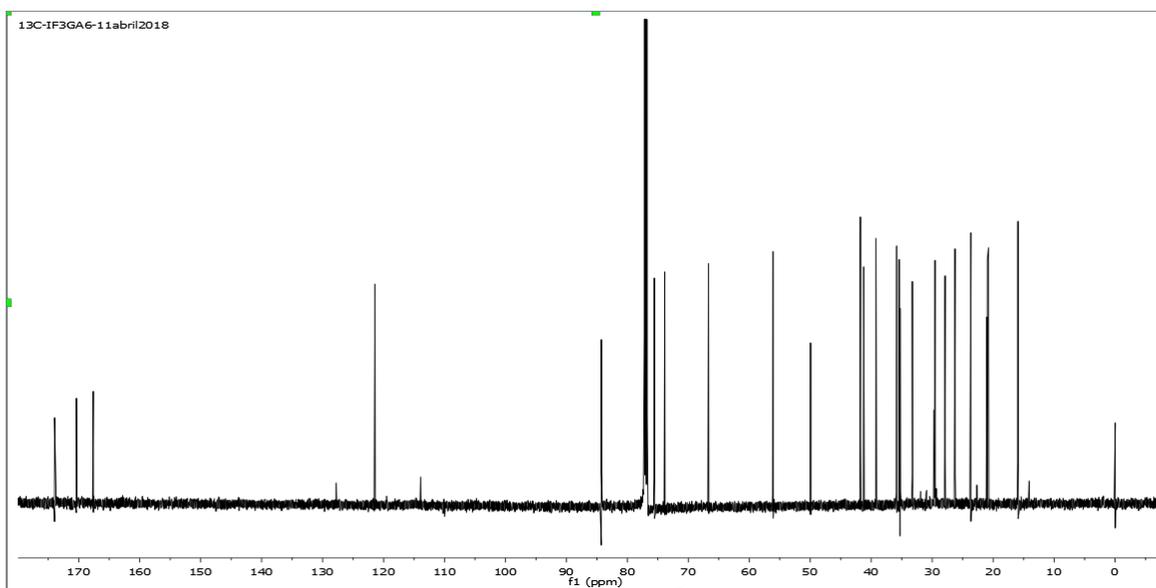


Figura 8.6 Espectroscopia de oleandrigenina de RMN ^{13}C , (CDCl_3 , 600 MHz)

Tabla 8.1 Datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente de oleandrigenina comparados con oleandrina

C/H	oleandrina		oleandrigenina	
	δ_C	δ_H (J Hz)	δ_C	δ_H (J Hz)
1	30.5			
2				
3	71.4	3.90 s	66.8	4.15 p
4				
5	36.5		35.8	
6	35.3		35.2	
7				
8				
9	41.9		41.7	
10	35.7		35.4	
11	84.4		84.2	
12	50.1		49.9	
13	39.3		39.2	
14				
15	41.3	(a) 2.74 d (15.6, 9.7)	41.2	(a) 2.75 dd (15.7, 9.6)
		(b) 1.78		
16	74.0	5.48 td (9.5, 2.6)	73.8	5.49 ddd (9.6, 8.7, 2.6)
17	56.2	3.19 d (8.8)	56.1	3.2 d (8.7)
18	16.0	0.94 s	15.9	0.95 s
19	23.9	0.94 s	23.6	0.96 s
20	167.8		167.6	
21	121.5	5.98 t (1.7)	121.4	5.98 t (1.9)
22	174.2		173.9	
23	75.7	(a) 4.98 dd, (18.1, 1.19)	75.5	(a) 5.00 dd, (18.2, 1.9)
		(b) 4.85 dd (18.1, 1.18)		(b) 4.87 dd (18.2, 1.8)
24	170.57		170.3	
25	21.22	1.97 s		1.98 s

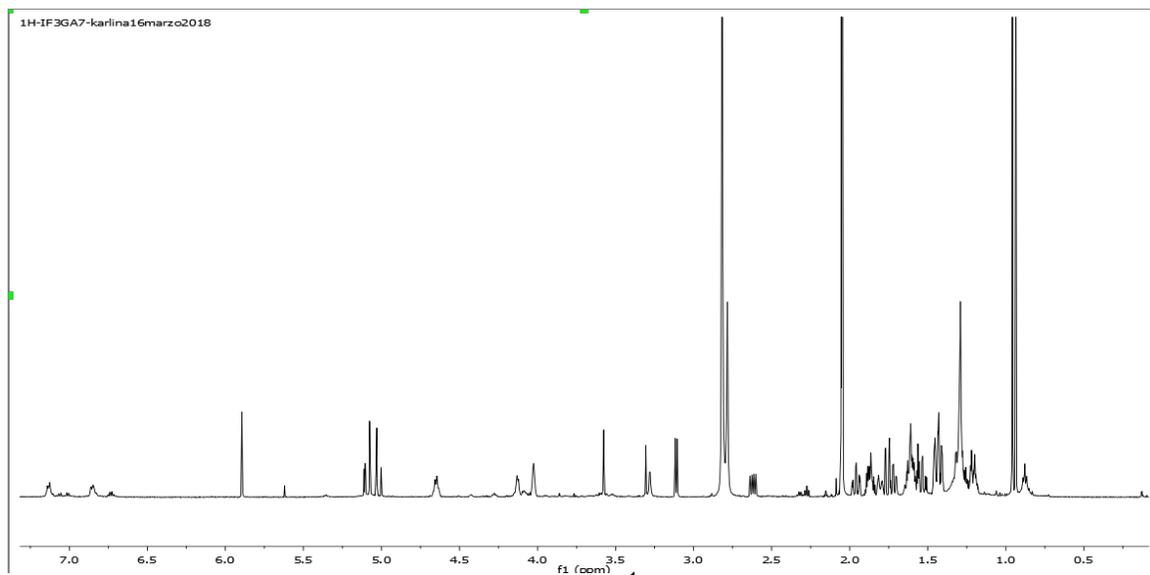


Figura 8.7 Espectroscopia de gitoxigenina de RMN ^1H , (Acetona-D6, 600 MHz)

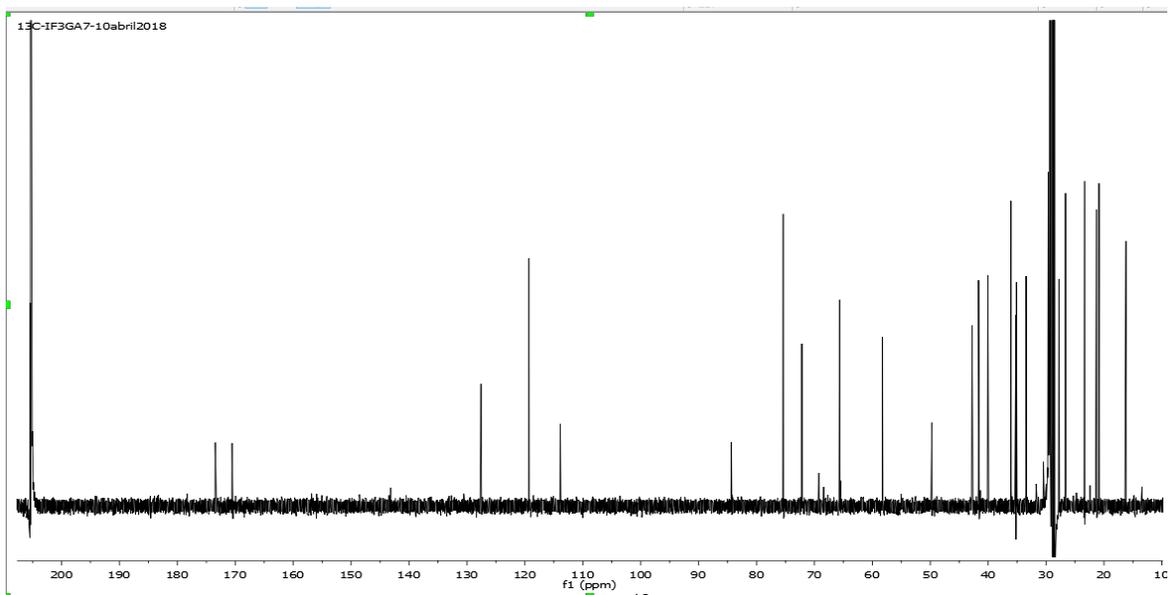


Figura 8.8 Espectroscopia de gitoxigenina de RMN ^{13}C , (Acetona-D6, 600 MHz)

Tabla 8.2 Datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente de gitoxigenina comparados con los reportados en la literatura (^{13}C) y experimentalmente de oleandrigenina

C/H	Datos de ^{13}C obtenidos de (Tori <i>et al.</i> , 1973) en TMS		gitoxigenina datos experimentales	
	δC	δC	δC	δ_{H} (J Hz)
1	30.0	29.6		
2	28.0	27.7		
3	66.8	63.6		4.02 m
4	33.5	33.4		
5	36.4	36.0		
6	27.0	26.6		
7	21.4	20.8		
8	41.8	41.6		
9	35.8	35.1		
10	35.8	35.2		
11	21.9	21.2		
12	41.2	40.0		
13	50.4	49.7		
14	85.2	84.3		
15	42.6	42.7		(a) 2.62 dd (14.8, 7.8)
16	72.8	72.1		4.65 d (7.5)
17	58.8	58.2		3.11 d (7.6)
18	16.9	16.1		0.94 s
19	23.9	23.3		0.96 s
20	171.8	170.5		
21	76.7	75.3		5.98 t (1.9)
22	119.6	119.3		
23	175.3	173.4		(a) 5.09 dd, (18.2, 1.9)
				(b) 5.02 dd (18.2, 1.8)

CAPÍTULO 4

Tabla 8.3 Pesos de insectos muestreados (mg)

Larvas alimentadas	Prepupas	Pupas hembra	Pupas macho	Polillas hembra	Polillas macho
<i>Nerium oleander</i>					
403.8	383	333.8	337	156.1	172
475.9	355.9	373.7	286.1	222.8	152.5
382.2	362.1	430.5	386.4	153.8	110.1
<i>Adenium obesum</i>					
470.2	397	277	281	214	199.8
532.3	350.2	301.1	302.3	237.1	168.3
435.2	233	189.4	313.8	170.6	208.4
<i>Pentalinum andrieuxii</i>					
546.2	249.2	216.3	210.1	339.5	207
408.8	309.2	303.6	371.1	208.5	286.4
487.8	407.3	255.8	311.6	114	220.4

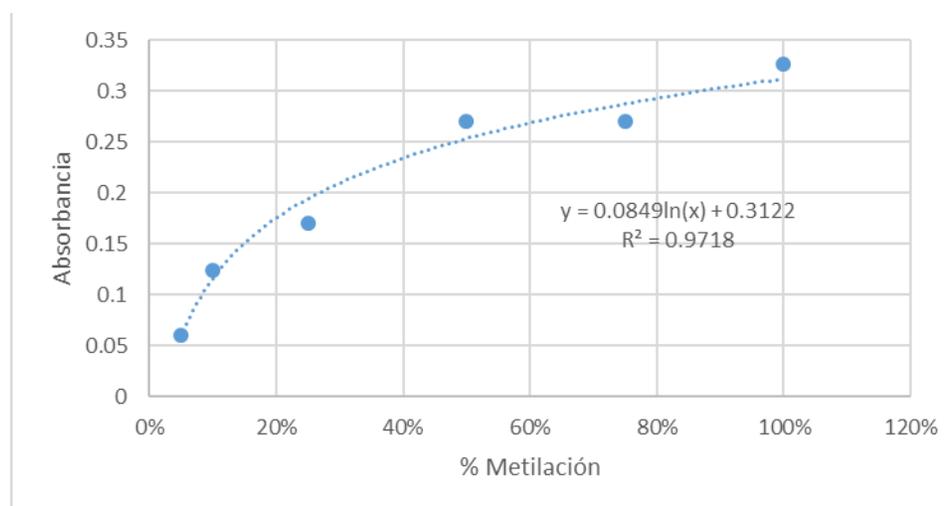


Figura 8.9 Curva de calibración con estándares de 5-mC

Tabla 8.4 Porcentaje de metilación de 5mC

	<i>A. obesum</i>	<i>N. oleander</i>	<i>P. andrieuxii</i>	<i>Lactuca sp.</i>
Larva	2.0	2.4	2.1	3.3
Prepupa	2.3	2.6	2.4	
Pupa macho	2.6	2.4	2.4	
Pupa hembra	2.7	2.6	2.8	
Polilla macho	2.6	2.7	2.2	
Polilla hembra	2.5	2.7	3.3	

Tabla 8.5 Resultados de extracción de ADN

	<i>A. obesum</i>			<i>N. oleander</i>			<i>P. andrieuxii</i>			Lactuca sp.		
	ng/μl	260/280	260/230	ng/μl	260/280	260/230	ng/μl	260/280	260/230	ng/μl	260/280	260/230
Larva 1	364.5	1.46	0.58	285.0	1.03	0.46	145.0	1.73	0.73	70.0	1.96	1.16
Larva 2	390.8	1.17	0.62	204.2	1.55	0.59	141.3	1.91	1.15	74.4	1.96	1.39
										85.1	1.92	1.33
Prepupa 1	174.0	1.77	1.28	261.5	1.20	0.50	174.7	1.74	1.11			
Prepupa 2	220.0	1.49	0.61	207.0	1.19	0.49	87.9	1.55	0.78			
Pupa macho 1	94.7	1.82	1.38	160.7	1.77	0.93	263.2	1.93	1.49			
Pupa macho 2	155.0	1.20	0.42	267.0	1.60	0.78	268.7	1.88	1.42			
Pupa hembra 1	280.6	1.72	1.16	193.0	1.33	0.57	306.8	1.90	1.38			
Pupa hembra 2	210.0	1.59	0.89	163.6	1.18	0.34	200.1	1.81	1.35			
Polilla macho 1	168.0	1.50	0.60	150.7	1.91	1.08	247.8	1.59	2.36			
Polilla macho 2	231.0	1.19	0.55	104.0	1.33	0.48	100.7	1.86	1.12			
Polilla hembra 1	165.0	1.75	0.82	136.4	1.87	1.13	127.0	2.00	1.70			
Polilla hembra 2	260.1	1.90	1.39	113.0	1.75	0.89	136.0	1.99	1.56			