

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Cuantificación de la expresión diferencial de genes relacionados
con el estrés de *Setophaga petechia aureola* en San Cristóbal-
Galápagos**

Ricardo Paúl Yépez Freire

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 13 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Cuantificación de la expresión diferencial de genes relacionados con el estrés de *Setophaga petechia aureola* en San Cristóbal-Galápagos

Ricardo Paúl Yépez Freire

Nombre del profesor, Título académico

Juan José Guadalupe, MSc.

Nombre del profesor, Título académico

Diego F. Cisneros, PhD.

Quito, 13 de mayo de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Ricardo Paúl Yépez

Freire Código: 00200039

Cédula de identidad: 1724343858

Lugar y fecha: Quito, 13 de mayo de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>

RESUMEN

La urbanización y la disrupción humana afectan ecosistemas de gran importancia, como el archipiélago de Galápagos, provocando diversas respuestas fisiológicas en la avifauna isleña. Una consecuencia es elevados niveles de estrés, cuyos efectos a largo plazo pueden afectar el bienestar de una especie o incluso de toda su población. Los canarios María (*Setophaga petechia aureola*) son una subespecie endémica del archipiélago, que lleva cohabitando entornos urbanos relativamente poco tiempo, lo cual podría afectar su fisiología, por lo tanto, es importante evaluar los efectos de la actividad humana. En el presente estudio se propone cuantificar la expresión diferencial de genes relacionados al estrés en canarios María en diferentes localidades de San Cristóbal - Islas Galápagos. Mediante RT-qPCR de 6 genes representativos de estrés aviar, junto con 13 muestras de ARN de individuos de *S. petechia aureola* de hábitats con diferentes niveles de impacto antropogénico. Se obtuvieron resultados variables que denotan una alta diversidad en los niveles de expresión génica, los cuales no ostentan relación con los lugares de procedencia de las muestras. No fue posible denotar una correlación entre los hábitats con intervención antropogénica y una sobreexpresión de los genes utilizados en este estudio. Estos resultados sugieren que los factores antropogénicos no constituyen una fuente adicional de estrés para las muestras analizadas, sin embargo, se requiere estudios adicionales para corroborar esta información, y así obtener una idea más clara acerca del estado fisiológico de esta especie. Este estudio presenta nuevas herramientas para analizar expresión génica de estrés mediante métodos cuantitativos, para determinar e inferir un posible estado fisiológico de una especie silvestre dentro de hábitats con impactos antropogénicos, sin embargo, no puede ni debe ser considerada como una metodología estándar para cuantificación de estrés.

Palabras clave: *Setophaga petechia aureola*, ave, Galápagos, estrés, impactos antropogénicos, RT-qPCR, genes, sangre.

ABSTRACT

Urbanization and human disruption affect ecosystems of great importance, such as the Galapagos archipelago, causing various physiological responses in the island's avifauna. One consequence is high levels of stress, the long-term effects of which can affect the well-being of a species or even its entire population. The Galapagos Yellow Warbler (*Setophaga petechia aureola*) are an endemic subspecies of the islands, which has been cohabiting urban environments for a relatively short time, which could affect their physiology, therefore, it is important to evaluate the effects of human activity. In the present study, it is proposed to quantify the differential expression of genes related to stress in Galapagos Yellow Warbler in different localities of San Cristóbal - Galapagos Islands. Using RT-qPCR of 6 representative avian stress genes, together with 13 RNA samples from individuals of *S. petechia aureola* from habitats with different levels of anthropogenic impact. Variable results were obtained that denote a high diversity in gene expression levels, which bear no relation to the places of origin of the samples. It was not possible to denote a correlation between the habitats with anthropogenic intervention and an overexpression of the genes used in this study. These results suggest that anthropogenic factors do not constitute an additional source of stress for the analyzed samples, however, additional studies are required to corroborate this information, and thus obtain a clearer idea about the physiological state of this species. This study presents new tools to analyze stress gene expression through quantitative methods, to determine and infer a possible physiological state of a wild species within habitats with anthropogenic impacts, however, it cannot and should not be considered as a standard methodology for quantifying stress.

Keywords: *Setophaga petechia aureola*, bird, Galapagos, stress, anthropogenic impacts, RT-qPCR, genes, blood.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	11
1.1. Impactos antropogénicos	11
1.2. Islas Galápagos e impactos antropogénicos	12
1.3. Importancia de <i>Setophaga petechia aureola</i> en las Islas Galápagos	13
1.4. Cuantificación de estrés	13
2. Metodología	15
2.1. Estándares éticos	15
2.2. Área de investigación y toma de muestras	15
2.3. Indicadores de expresión diferencial utilizados en el estudio	15
2.4. Extracción y almacenamiento de ARN total a partir de sangre	15
2.5. Retrotranscripción y digestión con DNAsa	16
2.6. PCR en tiempo real	16
2.7. Método de cuantificación relativa Ct y análisis estadísticos	16
3. Resultados	18
3.1. Indicadores de expresión diferencial utilizados en el estudio	18
3.2. Retrotranscripción y digestión con DNAsa	18
3.3. Resultados de la PCR en tiempo real	18
4. Discusión	21
5. Conclusiones	25
6. Tablas	26
7. Figuras	28
8. Referencias bibliográficas	32
Anexos	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes utilizados en el presente estudio.	26
Tabla 2. Datos de las muestras utilizadas en el presente estudio.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión diferencial del gen TLR4 con relación a las muestras.	28
Figura 2. Expresión diferencial del gen EXO1 con relación a las muestras.	29
Figura 3. Expresión diferencial del gen LAGLS3 con relación a las muestras.....	29
Figura 4. Expresión diferencial del gen SCN4A con relación a las muestras.	30
Figura 5. Expresión diferencial del gen SIRT1 con relación a las muestras.	30
Figura 6. Expresión diferencial del gen MTR con relación a las muestras.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Pruebas de normalidad	38
Anexo 2: Electroforesis en gel de agarosa	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Impactos antropogénicos

La urbanización puede definirse como el cambio de una población de asentamientos rurales a urbanos. Esta transición viene acompañada de cambios tanto económicos, como socioculturales, así como de una afluencia de personas proveniente de las zonas rurales aledañas al sitio de urbanización (Mcgranahan & Satterthwaite, 2014). Durante las últimas décadas las zonas urbanas han duplicado su territorio cada año, de acuerdo con un informe de las Naciones Unidas del año 2019.

Los espacios creados por humanos forman paisajes complejos, los cuales afectan a los entornos naturales. Esto se conoce como impacto antropogénico, el cual denota aquellas actividades derivadas del hombre que tienen un impacto en la biodiversidad. Comúnmente estos impactos afectan de manera directa a la fauna, ya sea mediante la sobrepesca, la caza o destrucción de hábitats como consecuencia de la agricultura y expansión urbana. A pesar de esto, muchas especies han logrado adaptarse a las nuevas tensiones, fuentes de alimentos, depredadores y amenazas de los entornos urbanos, proporcionando información valiosa acerca de los procesos selectivo y evolutivos de estos organismos (Hunter, 2007).

Todos estos impactos antropogénicos provocan varios tipos de respuestas fisiológicas en aquellos animales que habitan estos espacios. Una de las más frecuentes es el estrés ambiental, que surge de la contaminación del aire, la luz artificial nocturna, el ruido, los depredadores, entre otros factores antropogénicos (Isaksson, 2018). El estrés ambiental provoca errores celulares que alteran las funciones transcripcionales, traduccionales y postraduccionales en los ácidos nucleicos, provocando fallos multiorgánicos en aquellos organismos que lo padecen, induciendo alteraciones y atrofas en la musculatura de los animales, así como fallas metabólicas multinivel (Biggar & Storey, 2015). También ocasiona cambios comportamentales y cognitivos en varias especies animales, además puede causar

efectos transgeneracionales estables en la expresión de genes cerebrales, el comportamiento y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), sin embargo, aún no se comprende del todo las interacciones entre el estrés ambiental y la epigenética (Jensen, 2014).

1.2. Islas Galápagos e impactos antropogénicos

La actividad antropogénica afecta a lugares de gran importancia en materia de biodiversidad y conservación, como son las Islas Galápagos. Estas fueron reconocidas como patrimonio natural de la humanidad en 1978, debido a su gran endemismo de fauna y flora (Bay et al., 2020). Dentro del archipiélago se encuentra una gran cantidad de especies endémicas las cuales se han visto afectadas por a la intrusión del hombre, provocando presiones antropogénicas sobre las especies que habitan este lugar (Benítez et al., 2018).

La intrusión humana en este archipiélago es relativamente reciente a comparación del continente, por lo tanto, cualquier factor adaptativo por parte de las especies nativas es inferior frente a sus parientes continentales (Laso et al., 2019). Durante la década pasada se ha observado un crecimiento poblacional importante en las islas, tanto en las zonas urbanas como rurales y de agricultura; dicha expansión influye en la fauna galapaguense, provocando presiones adaptativas sobre las mismas (Walsh et al., 2010). Esto se ve reflejado en la gran cantidad aves amenazadas de las Galápagos (Jiménez-Uzcátegui et al., 2019), así como en extinciones de avifauna autóctona de varias islas alrededor del planeta (Steadman, 1989; Blondel, 2000; Steadman, 2003).

Por otra parte, existen estudios que observan las interacciones del estrés ambiental en animales de Galápagos, donde, mediante análisis químicos de corticosterona en sangre, no se logró identificar diferencias significativas relevantes entre grupos de iguanas de zonas turísticas frente a sitios no perturbados por humanos (Romero & Wikelski, 2010), también se ha demostrado que la retroalimentación negativa frente a la liberación de corticosterona confiere una ventaja adaptativa de supervivencia durante periodos de inanición (Romero &

Wikelski, 2010). Debido a estas características es interesante analizar al archipiélago de las Galápagos mediante estudios que analicen los efectos de los impactos antropogénicos sobre la fauna endémica.

1.3. Importancia de *Setophaga petechia aureola* en las Islas Galápagos

Las aves ostentan una gran importancia ecológica en ambientes urbanos, ya que ocupan diferentes niveles de la cadena trófica y su presencia o ausencia puede determinar la salud de un ecosistema. Son relativamente fáciles de monitorear debido a su amplia distribución y observación (Ali Tabur & Ayvaz, 2010).

La presente investigación plantea estudiar a *Setophaga petechia aureola*, la cual es una pequeña ave de color amarillo brillante, nativa de las Islas Galápagos (Wiedenfeld, 2006). Se cree que esta subespecie arribó a las Galápagos hace poco más de trecientos mil años. Es un ave insectívora la cual presenta una amplia distribución en los bosques nublados y secos a lo largo del archipiélago. Se ha reportado que la mayor parte de su población se encuentra en las islas San Cristóbal, Isabela, Floreana y Santa Cruz (Browne et al., 2010). Varios estudios han determinado que la población de esta especie ha disminuido a través de los años, pese a esto, no hay información clara acerca de este suceso, ya que los estudios se enfocan en su genotipo o en su origen poblacional, mas no en las posibles causas y consecuencias de su desaparición en hábitats nativos (Quinlan & Green, 2012; Zuñiga Paredes, 2016; Lynton-Jenkins et al., 2021).

1.4. Cuantificación de estrés

Numerosos estudios han señalado los cambios comportamentales, fisiológicos y morfológicos de los organismos que habitan áreas urbanas, con niveles variados de intervención antropogénica, frente a su contraparte natural/nativa (Savage et al., 2014; Rebolofrán et al., 2015; Wang et al., 2019). Sin embargo, pocos estudios se encargan de desentrañar la base genética de cómo los rasgos fenotípicos responden, de forma adaptativa o no, a entornos

nuevos o cambiantes, a su vez, esto tendría implicaciones importantes para nuestra comprensión y gestión del cambio ambiental inducido por el hombre (Hunter, 2007).

Mediante el estudio realizado por Watson y colaboradores (2017) se conoce sobre la posibilidad de cuantificar la regulación de genes frente a las condiciones ambientales locales, a un nivel molecular. La cuantificación de la expresión de genes relacionados con estrés, mediante tecnologías de secuenciación, puede ayudarnos a comprender e identificar genes que contribuyen a la variación genotípica entre individuos y poblaciones. Estudios como este han revelado genes y rutas metabólicas que juegan un papel importante en las respuestas mecánicas a los desafíos ambientales en los organismos de vida libre.

El presente estudio pretende cuantificar la expresión diferencial de genes relacionados con el estrés en *Setophaga petechia aureola* en diferentes localidades de San Cristóbal - Islas Galápagos. Esto con la finalidad de medir e inferir una posible correlación del impacto antropogénico de las zonas urbanas frente a las zonas naturales/nativas en el archipiélago, esto mediante PCR cuantitativo.

2. METODOLOGÍA

2.1. Estándares éticos

El presente trabajo se realizó con la autorización del Parque Nacional Galápagos y del Ministerio del Ambiente del Ecuador (PC-59-19).

2.2. Área de investigación y toma de muestras

Se colectaron muestras de sangre de individuos capturados de *Setophaga petechia aureola* en un estudio previo realizado por Pacheco (2020), en la isla San Cristóbal – Islas Galápagos. Los individuos correspondían a entornos con diferentes niveles de intervención antropogénica. Se validó un total de 13 muestras, siendo 5 de estas pertenecientes a hábitats antropogénicos, mientras que las 8 restantes, pertenecían a hábitats silvestres. La recolección de muestras de sangre, de aproximadamente 15 µl, fue realizada en el periodo de mayo a julio del 2019. Las muestras fueron recolectadas en 150 µl de RNAlater (Life Technologies, 2011). Posteriormente, fueron trasladadas a la Universidad San Francisco de Quito, para ser analizadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

2.3. Indicadores de expresión diferencial utilizados en el estudio

En base a estudios previos (Watson et al., 2017; Rosero, 2021) se determinó el uso de 6 genes de expresión diferencial concernientes al estrés aviar, así como el uso de 1 gen estable de referencia para la normalización de resultados de RT-qPCR. Las secuencias de ADN se obtuvieron a partir de la base de datos del NCBI, empleando un transcriptoma de *Setophaga petechia aureola*, junto con el patrón del organismo *Taeniopygia guttata*, representativo de aves paseriformes (Balakrishnan et al., 2010). Los primers utilizados en este estudio, su función, así como el gen normalizador utilizado se encuentran detallados en la Tabla 1.

2.4. Extracción y almacenamiento de ARN total a partir de sangre

Se extrajo ARN total a partir de la colección de muestras del estudio de Pacheco (2021). Para esto se utilizó Trizol (Invitrogen), siguiendo los protocolos de Rojas et al., (2021) y Galen

et al., (2020). Finalmente, la cuantificación se realizó mediante Qubit™ RNA BR Assay Kit y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

2.5. Retrotranscripción y digestión con DNAsa

Se utilizó 200 ng del ARN total para la síntesis de ADN complementario (cDNA). Se siguió el protocolo del fabricante en el que se utilizó DNAsa I (Invitrogen) y retrotranscriptasa SuperScriptIII (Invitrogen).

2.6. PCR en tiempo real

El protocolo utilizado para la RT-qPCR utiliza un volumen final de 15 µl por reacción, el cual está compuesto de los siguientes reactivos: 7.5 µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad), 5.1 µl de Agua UltraPura, 0.45 µl de primer forward y 0.45 µl de primer reverse, y 1.5 µl de cDNA. La reacción se realizó por triplicado para cada muestra utilizada. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min., 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 seg. por cada ciclo, hibridación a 58 °C durante 30 seg., extensión a 72 °C durante 30 seg., y melting de 60°C a 95°C, con lectura de temperatura cada 10 seg. Los resultados conseguidos fueron normalizados con el gen de expresión referencial GAPDH.

2.7. Método de cuantificación relativa Ct y análisis estadísticos

Con los resultados obtenidos del RT-qPCR se optó por realizar un método de cuantificación relativa de Ct. Para aplicar este método se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ a cada muestra con sus respectivos genes (Rao et al., 2013). Para ello se determinó la muestra que presentó el menor nivel de expresión y se la asignó como muestra “target”, la cual será nuestro nivel de expresión basal con el gen control (Livak & Schmittgen, 2001). Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-((CT(\text{Gen X-target}) - CT(\text{Gen housek-target})) - (CT(\text{Gen X-muestras}) - CT(\text{Gen housek-muestras})))}$$

Donde “Gen X” corresponde al gen de interés relacionado al estrés, y “Gen housek”

corresponde al gen control.

Para determinar si las diferencias obtenidas mediante el método de cuantificación relativa de Ct son estadísticamente significativas, se optó por realizar la prueba t de Student, considerando varianzas iguales, utilizando un $\alpha=0.05$ (Valiente & Tejedor, 2010). Si los valores obtenidos del método de cuantificación relativa de Ct no presentan una distribución normal, se realizará una transformación de Box-Cox mediante el software estadístico Minitab 18 (Blaylock & Smallwood, 1985). También se utilizó la Tasa de Descubrimiento Falso, o FDR por sus siglas en inglés (False Discovery Rate), para descartar posibles falsos positivos generados durante la prueba estadística t de Student (Brinster et al., 2018).

3. RESULTADOS

3.1. Indicadores de expresión diferencial utilizados en el estudio

De los 18 genes relacionados al estrés en aves presentados en el trabajo de titulación de Jean Rosero, se redujo a 7 genes, lo cuales están presentados en la Tabla 1. Se decidió eliminar los primers TFRC, PGK1 y BUDD23/18S correspondientes a genes referenciales de expresión constante en aves, debido a que se observó que el gen de referencia GAPDH presenta un mayor nivel de estabilidad para los propósitos de este estudio. De los 14 genes que presentan expresión diferencial de estrés se eliminaron 4, siendo estos el MT4, JKAMP, CP y FEN1.

3.2. Retrotranscripción y digestión con DNAsa

Los resultados de la retrotranscripción fueron cuantificados mediante el instrumento Qubit. Las concentraciones obtenidas de las muestras PN1M24, PN2M31, NC1M5, UC3T2 y UM2T5 fueron de 1.25 ng/μl, 1.96 ng/μl, 2.45 ng/μl, 3.18 ng/μl y 1.89 ng/μl respectivamente

3.3. Resultados de la PCR en tiempo real

Al realizar la TR-qPCR se encontró que algunas muestras de cDNA no amplificaban con ciertos genes, por lo cual se optó por eliminar dichas muestras. Las muestras eliminadas son la PN1M11 con el gen TLR4, y la muestra PN2M31 con el gen SCN4A.

Los valores obtenidos del método de cuantificación relativa de Ct no presentan una distribución normal, por lo cual se realizó la transformación de Box-Cox en el software Minitab 18, con la finalidad de ajustar los datos a la normalidad (Blaylock & Smallwood, 1985). Posterior a esto se realizaron pruebas de normalidad de cada gen utilizado en el presente estudio, las pruebas realizadas están detalladas en el Anexo 1.

Pese a la transformación de Box-Cox no se logró llegar a una normalización completa de los datos obtenidos, pese a esto, se realizó la prueba t de Student considerando varianzas iguales, con la finalidad de obtener diferencias estadísticamente significativas. La prueba estadística t de Student es una prueba que ostenta una “robustez” notable frente a la no

homogeneidad de varianzas, por lo cual es posible hacer válidas las conclusiones alcanzadas mediante este método (Valiente & Tejedor,2010), el cual ha sido utilizado ampliamente en análisis de expresión génica, con un éxito analítico considerable frente a suposiciones de normalidad que no son exactas (Goni et al., 2009).

Finalmente, se utilizó la Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) para descartar falsos positivos de la prueba t de Student (Storey, 2010). Se obtuvieron los siguientes resultados:

1) La expresión diferencial del gen TL4 presenta subexpresión de la muestra UC3T2 ($p=0.003$). También presenta sobreexpresión de las muestras UM2T5 ($p=0.004$), UM3T2 ($p=0.004$), NC1M5 ($p=0.003$), NL1T2 ($p=0.002$), PN1M24 ($p=0.004$) y PN2M11($p=0.006$). Los resultados se encuentran en la Figura 1.

2) La expresión diferencial del gen EXO1 presenta subexpresión en las muestras UC3T2 ($p=0.002$), NO2T3 ($p<0.001$) y PN2M31 ($p=0.004$). También presenta sobreexpresión de las muestras AC3M2 ($p<0.001$), UM2T5 ($p<0.001$), NC1M5 ($p<0.001$), NL1T1 ($p<0.001$), NL1T2 ($p<0.001$), PN1M24 ($p<0.001$), PN2M11 ($p<0.001$). Los resultados se encuentran en la Figura 2.

3) La expresión diferencial del gen LAGLS3 no presenta ninguna muestra con subexpresión estadísticamente significativa. Por otro lado, presenta sobreexpresión en las muestras AC3M2 ($p=0.02$), UM2T5 ($p=0.02$), UM3T2 ($p=0.01$), NC1M5 ($p=0.01$), NL1T1($p=0.01$), NL1T2 ($p=0.02$), PN1M24 ($p=0.02$) y PN2M11($p=0.02$). Los resultados se encuentran en la Figura 3.

4) La expresión diferencial del gen SCN4A no presenta ninguna muestra con subexpresión o sobreexpresión estadísticamente significativa. Los resultados se encuentran en la Figura 4.

5) La expresión diferencial del gen SIRT1 presenta subexpresión en las muestras AC3M2 ($p=0.004$), NL1T1 ($p=0.001$) y PN1M11 ($p=0.004$). Por otro lado, no presenta

ninguna muestra con sobreexpresión estadísticamente significativa. Los resultados se encuentran en la Figura 5.

6) La expresión diferencial del gen MTR presenta subexpresión en las muestras UC3T2 ($p=0.004$) y NO2T3 ($p=0.005$). También presenta sobreexpresión de las muestras AC3M2 ($p=0.003$), UM2T5 ($p<0.001$), UM3T2 ($p=0.001$), NC1M5 ($p<0.001$), NL1T1 ($p=0.001$), NL1T2 ($p=0.001$), PN1M24 ($p=0.001$) y PN2M11 ($p=0.001$). Los resultados se encuentran en la Figura 6.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos denotan una alta diversidad en los niveles de expresión de los genes concernientes al estrés aviar en las muestras de *S. petechia* utilizadas en este estudio, los cuales no ostentan relación con los lugares de procedencia de las muestras, por lo cual no es posible denotar una correlación entre los hábitats con intervención antropogénica y una sobreexpresión de los genes utilizados en este estudio. Pese a esto, es posible inferir el estado de las muestras con relación a los genes utilizados (Zhu et al., 2013; Rydenfelt et al., 2020).

El impacto de los estudios de expresión diferencial de genes radica en obtener una mayor comprensión de aquellos mecanismos moleculares involucrados en respuestas contra factores estresores (Nebert et al., 1990; Babenko et al., 2016), ya sea para utilizar estrategias de conservación, u obtener una mejor comprensión de estos mecanismos multifactoriales en humanos (Nanni et al., 2006; Craig, 2007; Heim & Binder, 2012). Todas las muestras “targets” asignadas corresponden a muestras provenientes de hábitats silvestres por lo cual podemos inferir que se observa una expresión basal de genes relacionados al estrés en aquellas muestras provenientes de hábitats silvestres.

El gen TLR4 está involucrado en la proliferación de linfocitos B, los cuales intervienen en la regulación positiva de la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo. También está implicado en mecanismos de reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño tisular o apoptosis celular (Hanson et al., 2021). La expresión diferencial de TLR4 (Figura 1), indican una sobreexpresión estadísticamente significativa en 6 de las 13 muestras analizadas y que fue evidenciable tanto en hábitats intervenidos antropogénicos, como en hábitats silvestres. El estudio realizado por Capilla-Lasheras y colaboradores (2017), realizada en el ave herrerillo común, indica que la sobreexpresión del gen TLR4 provoca un menor éxito reproductivo, un peso inferior en sus polluelos y una tasa menor éxito de supervivencia de los polluelos. Esto

puede indicar que aquellas muestras que presenten sobreexpresión estén expuestas a diversos factores ambientales que promueven el estrés oxidativo, provocando una alteración en la función normal de este gen y, en consecuencia, presentar las mismas complicaciones asociadas al funcionamiento de este gen.

El gen EXO1 desempeña funciones clave en la reparación del ADN debido a la oxidación, así como en el acortamiento de telómeros como consecuencia del estrés oxidativo y en la reparación de errores de emparejamiento durante la recombinación del ADN (Watson et al., 2017). Los resultados de la expresión diferencial de EXO1 (Figura 2) indican una sobreexpresión estadísticamente significativa en 7 de las 13 muestras analizadas. La expresión elevada del gen EXO1 está relacionada con carcinoma y carcinogénesis de cáncer de mama en humanos (Dai et al., 2018; Liu & Zhang, 2021), sin embargo, las vías metabólicas de este gen en otros organismos no están del todo claras. Es posible inferir que aquellas muestras que presenten una sobreexpresión de este gen posean una alteración, que podría conllevar a un malfuncionamiento del gen y las vías metabólicas consecutivas a la expresión del mismo, lo que eventualmente podría conducir a carcinogénesis.

El gen LAGLS3 está involucrado en la regulación de la proliferación y apoptosis de linfocitos T. Ostenta un rol significativo en el crecimiento, diferenciación, angiogénesis y apoptosis de varias clases de tejidos tanto normales como cancerosos (He et al., 2019). La expresión diferencial de LAGLS3 (Figura 3), indica una sobreexpresión estadísticamente significativa en 8 de las 13 muestras analizadas. Se sabe que una alta expresión de este gen provoca alteraciones en los músculos liso-vasculares en conejos, que produce complicaciones como la aterogénesis, en donde se da una acumulación de grasas sobre las paredes de las arterias (Arar et al., 1998), así como en diversos tipos de cáncer en humanos (Yoshimura et al., 2003), sin embargo, los estudios de expresión génica de LAGLS3 son escasos y no

proporcionan información útil sobre los posibles efectos de una sobreexpresión. Pese a esto, y en base a los resultados y a la literatura es posible inferir que una sobreexpresión de este gen podría conllevar a fallas en músculos liso-vasculares y oncogénesis.

El gen SCN4A pertenece a una familia de genes que proporcionan instrucciones para crear canales de sodio, los cuales juegan un papel clave en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas (Fukuda et al., 2005). Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de SCN4A (Figura 4) no presentan una expresión estadísticamente significativa, sin embargo, si presenta sobreexpresión y subexpresión del gen en relación con las muestras analizadas. Se sabe que la mutación del gen SCN4A de la subunidad α del canal de sodio presenta complicaciones como la paramiotonía congénita, la cual es una alteración del músculo esquelético del corazón humano, causando consecuencias cardíacas que pueden ser mortales (McClatchey et al., 1992; Péréon et al., 2003). Las consecuencias de la sobreexpresión de SCN4A, así como la consecuente alteración del músculo esquelético del corazón no está muy definida para aves, no obstante, es posible inferir que la alteración del funcionamiento de este gen puede alterar la función de los canales de sodio, perturbando la respuesta de otros grupos musculares en aquellas muestras que presenten sobreexpresión de este gen (Watson et al., 2017).

El gen SIRT1 codifica para una enzima trabaja en vías de recombinación del ADN y los mecanismos de reparación celular. Además, está involucrado en mecanismos de apoptosis, respuesta celular al estrés, secreción de insulina, así como para una respuesta conductual al hambre (Ramis et al., 2015). Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de SIRT1 (Figura 5) no presentan ninguna sobreexpresión estadísticamente significativa. Los estudios realizados con el gen SIRT1 indican que los productos de transcripción de este gen contribuyen a prolongar la longevidad (Wang et al., 2019), por lo cual una sobreexpresión de este gen podría

contribuir de manera positiva en la respuesta de estrés celular en las muestras celulares, sin embargo, los resultados indican que 7 muestras presentan subexpresión, lo que podría indicar que las muestras no ostentan gran cantidad de transcritos, denotando un posible malfuncionamiento del gen, esto posiblemente debido a factores estresantes.

El gen MTR codifica para la metiltransferasa, que cataliza la adición de grupos metilo al ADN. La metilación del ADN juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica (Cao et al., 2020). Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de MTR (Figura 6) revelan una sobreexpresión en 8 de las 13 muestras analizadas. La alta expresión de este gen de metiltransferasa corresponde a metilación del ADN, lo cual se asocia con una expresión génica más reducida (Watson et al., 2017). Por otra parte, las variantes reguladoras del gen MTR aumentan el riesgo de cardiopatía coronaria en humanos (Zhao et al., 2013). Debido a la alta expresión de este gen (8 de 13 muestras), es posible que los niveles de expresión génica observados en los resultados de los otros genes analizados en este proyecto tengan estén sesgados y, por tanto, ostenten niveles generales más bajos (Head, 2014), sin embargo, no se conocen las vías metabólicas específicas de este gen con relación al ave de estudio y sus posibles consecuencias son aún desconocidas, por ende, sería erróneo inferir una correlación directa entre este gen y una expresión génica reducida con los demás genes analizados.

Al utilizar 13 muestras de ARN de canaritos María para la realización de este proyecto, el tamaño muestral no es estadísticamente significativo, en base al teorema del límite central ($n \geq 30$). Por consiguiente, realizar conclusiones acerca del estado de una población de esta especie es erróneo (Islaqm, 2018). Estos resultados sugieren que los factores antropogénicos no constituyen una fuente adicional de estrés para las muestras analizadas (Pacheco, 2020). Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para corroborar esta información, y así obtener una idea más clara acerca del estado fisiológico de esta especie.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró analizar la expresión diferencial de 6 genes relacionados con estrés aviar en 13 muestras de *Setophaga petechia aureola* provenientes de hábitats con diferentes niveles de intervención antropogénica en San Cristóbal-Galápagos.

Los análisis realizados mediante cuantificación relativa de Ct proporcionan información útil acerca de los niveles de expresión génica de las muestras utilizadas en este proyecto, sin embargo, no fue posible denotar una correlación y/o patrón con los lugares de procedencia de las muestras. El tamaño muestral utilizado no es estadísticamente representativo para una población, por tanto, no es posible inferir un estado fisiológico sobre la especie estudiada, esto debido a que esta condición está relacionada a diversos factores. Pese a esto, si es posible inferir acerca de la expresión génica presente en las muestras analizadas.

Para estudios posteriores se propone obtener un mayor número de muestras para ser analizadas, las cuales provengan de hábitats más específicos. También se recomienda analizar detalladamente los genes utilizados en este proyecto, ya que existe poca información sobre sus rutas metabólicas e interacciones específicas dentro de los contextos de hábitats con impactos antropogénicos en aves. Además, es necesario realizar otro tipo de metodologías como la transcriptómica.

Este estudio presenta nuevas herramientas para analizar expresión génica de estrés mediante métodos cuantitativos, para determinar e inferir un posible estado fisiológico de una especie silvestre dentro de hábitats con impactos antropogénicos, sin embargo, no puede ni debe ser considerada como una metodología estándar para cuantificación de estrés. El combinar diversas metodologías y variables proporcionará un diseño experimental más sólido para comprender cómo funcionan estos mecanismos y como afectan a la especie que se desea estudiar.

6. TABLAS

Tabla 1. Genes utilizados en el presente estudio. Cada gen ostenta el nombre de la proteína codificante, la descripción de su función, el organismo de referencia, los bits, E-value, primers forward/reverse, ΔG y tamaño probable del producto de amplificación. El gen referencial esta resaltado de color azul y los genes de expresión variable están resaltados de color rojo.

GEN	Proteína	Descripción del gen	Organismo	Bits	E-value	Left	Right	ΔG (kcal/mol) primer left	ΔG (kcal/mol) primer right	Product size primer3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gen de control, metabolismo de carbohidratos	<i>Taeniopygia guttata</i>	2239	0.0	GACTTGTCACTTC TCATGGTTGAC	ATATGTTGGAGTC TACTGGTGTCTT	-0.6 A 0.24	-0.15 A 1.04	150
EXO1	Exonuclease 1	Reparación del ADN, reparación de mismatch	<i>Taeniopygia guttata</i>	313	6.00E-88	GTAAGGTCACATATG GTAACAAGCTC	GTCACACCTTAITTT CAGTATCACAGT	-1.12	0.71, 1.21	121
MTR	Methionine synthase (5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase)	Añade grupos metilo al ADN, reduce expresión de genes.	<i>Taeniopygia guttata</i>	263	9.00E-73	GTTGCTGAACACCTA CTGCTCTAGT	CTTGTGTTTCTAAG AGCAGAATT	-1.03, -0.07	-2.22 a -1.70	139
TLR4	Toll like receptor 4	Respuesta contra bacterias gram negativas. Respuesta contra estrés oxidativo.	<i>Taeniopygia guttata</i>	750	0.0	AGATAGATGTATCC TGTTAGAGGAGA	GAATTTAGCCACAA CAGCATTACT	-1.98	-0.12 a 0.85	107
SCN4A	Sodium voltage-gated channel alpha subunit-4	Relacionado a canales de sodio, estrés oxidativo afecta disponibilidad de canales de sodio, posibles fallas cardíacas	<i>Taeniopygia guttata</i>	82.4	4.00E-19	GTGTCCCTATGGATT TGTGAAA	ACAGCCACGATGAG GAAATC	0.02, 0.75	-0.18 a 0.79	69
LGALS3	Galectin 3	Respuesta inmune, proliferación linfocitos T, regulación apoptosis	<i>Taeniopygia guttata</i>	952	0	GAACTTGGATTGCA GACGATAACT	GTTTTCACTGGATTT CAAGAGAGG	0.55 A 1.49	0.54 A 1.52	100
SIRT1	Sirtuin 1	Relacionado a la reparación del ADN, respuestas al estrés	<i>Pica pica</i>	1565	0.0	CTGTCTTGTTCCTAT CTCGCTAT	CTAAGACCTACTGTG GCAGCTAATTTT	1.40 a 2.38	-0.42 a 0.09	103

Tabla 2. Datos de las muestras utilizadas en el presente estudio. Se indica cada muestra de sangre utilizada en este estudio de manera alfabética. Se detalla el año de recolección de la muestra, el lugar, la alteración antropogénica, la localidad y el impacto.

Muestras	Año	Lugar	Alteración	Localidad
AC1T4	2019	CASA ABANDONADA	Antropogénica	Agrícola
AC3M2	2019	CASA ABANDONADA	Antropogénica	Agrícola
NC1M5	2019	CAROLA	Silvestre	Nativo
NL1T1	2019	LOBERIA	Silvestre	Nativo
NL1T2	2019	LOBERIA	Silvestre	Nativo
NO2T3	2019	OCHOA	Silvestre	Nativo
PN1M11	2019	Parque nacional	Silvestre	Nativo alto
PN1M24	2019	Parque nacional	Silvestre	Nativo alto
PN2M11	2019	Parque nacional	Silvestre	Nativo alto
PN2M31	2019	Parque nacional	Silvestre	Nativo alto
UC3T2	2019	Coliseo	Antropogénica	Urbana
UM2T5	2019	Media	Antropogénica	Urbana
UM3T2	2019	Media	Antropogénica	Urbana

7. FIGURAS

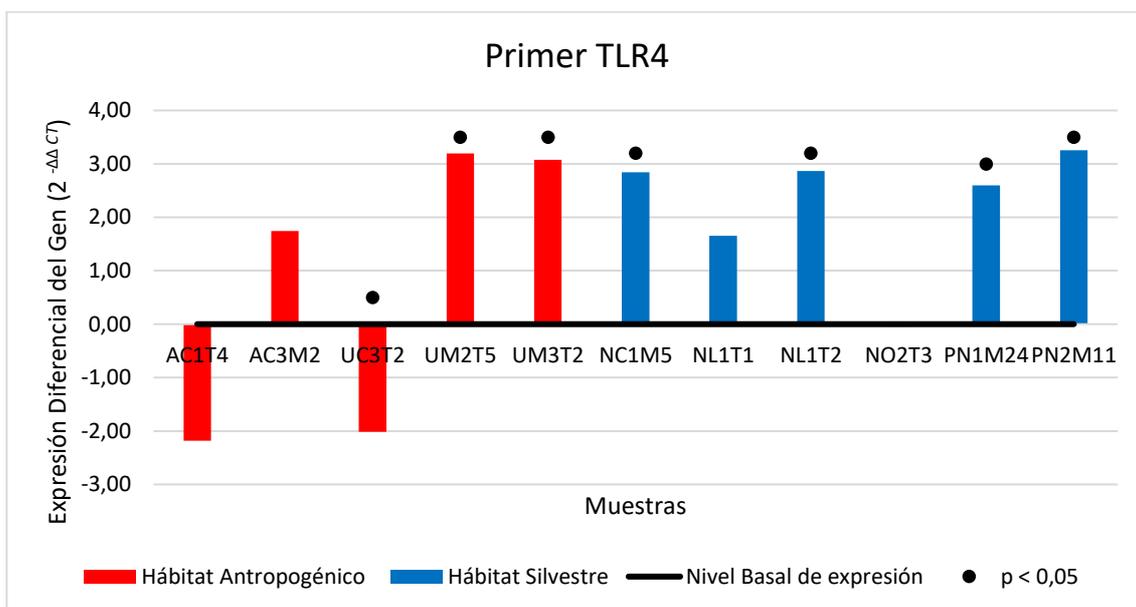


Figura 1. Expresión diferencial del gen TLR4 con relación a las muestras. Las barras de color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

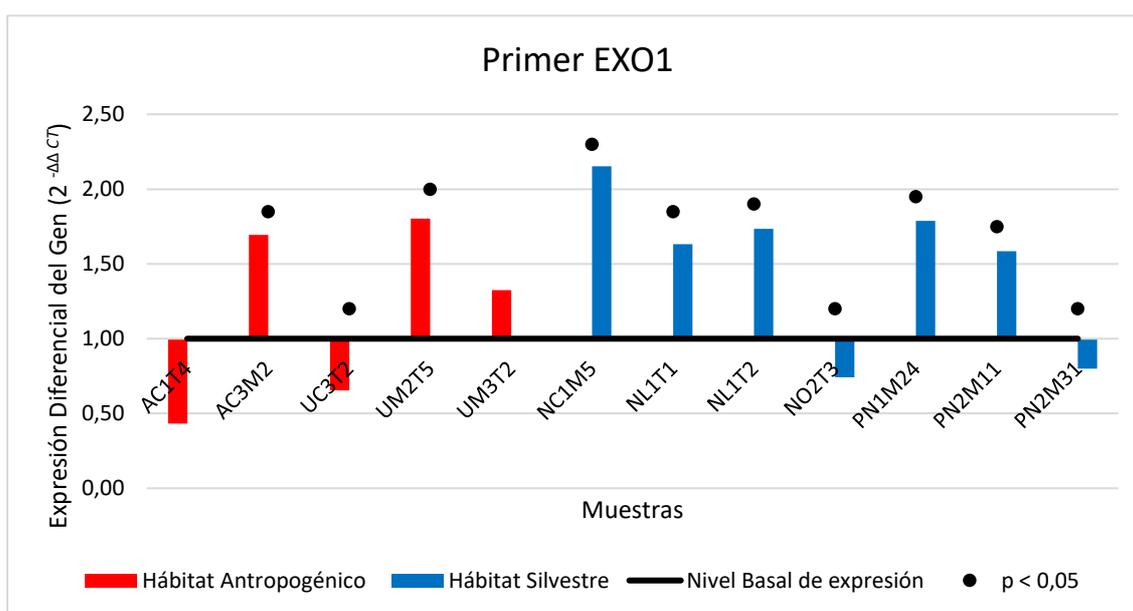


Figura 2. Expresión diferencial del gen EXO1 con relación a las muestras. Las barras de color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

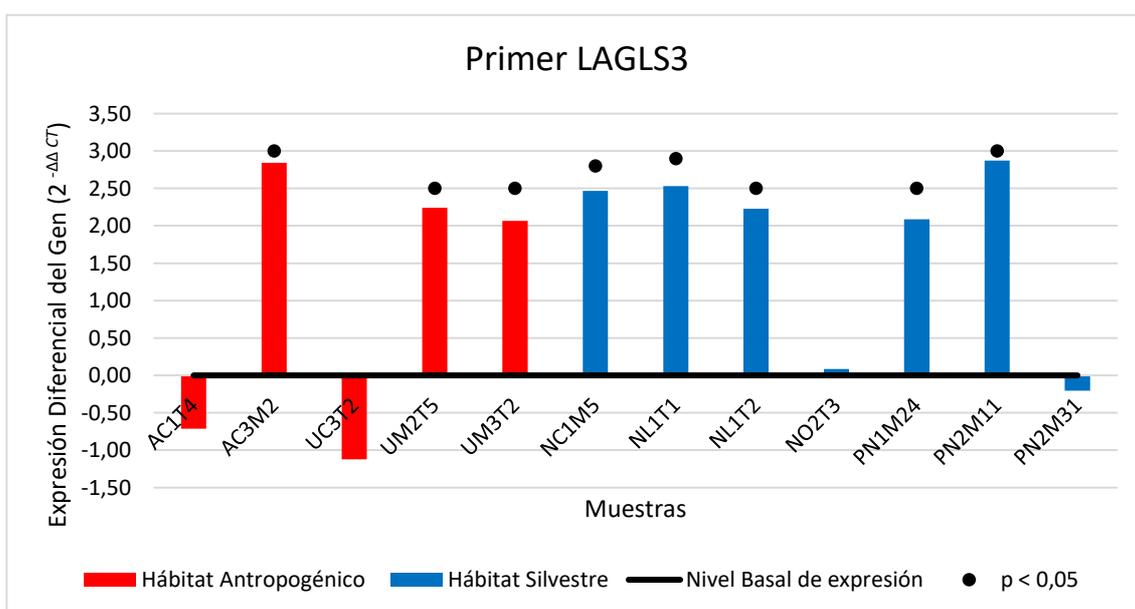


Figura 3. Expresión diferencial del gen LAGLS3 con relación a las muestras. Las barras de color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

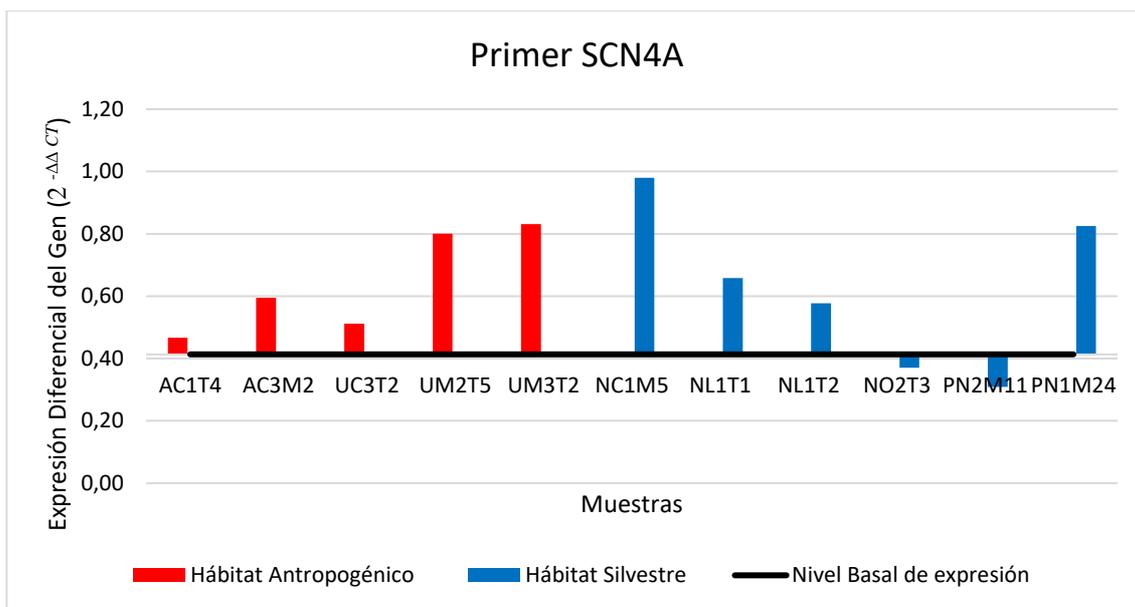


Figura 4. Expresión diferencial del gen SCN4A con relación a las muestras. Las barras de color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

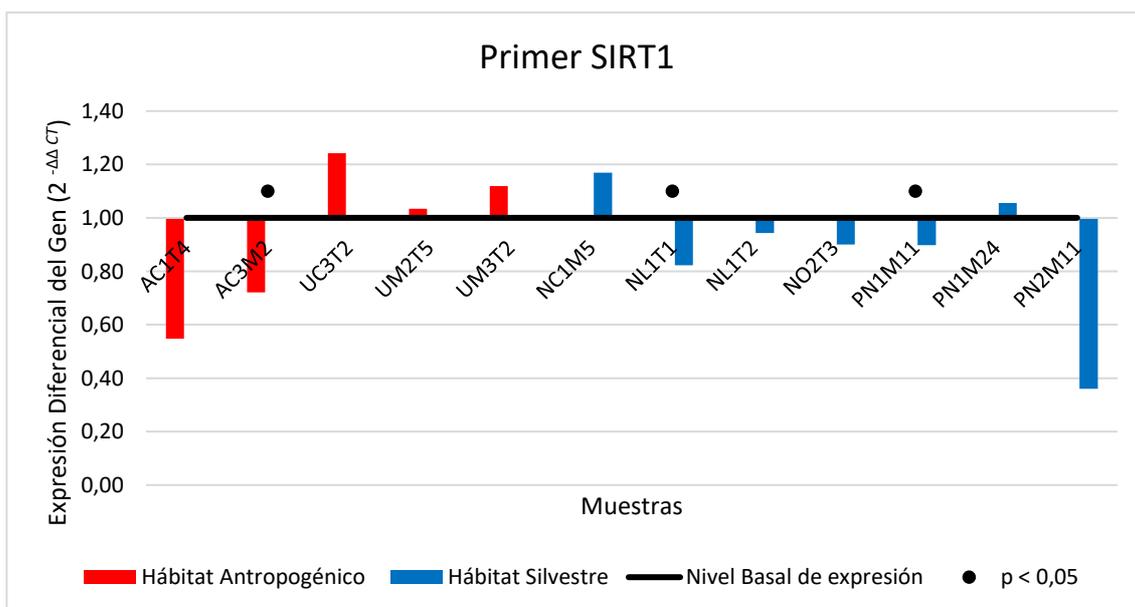


Figura 5. Expresión diferencial del gen SIRT1 con relación a las muestras. Las barras de

color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

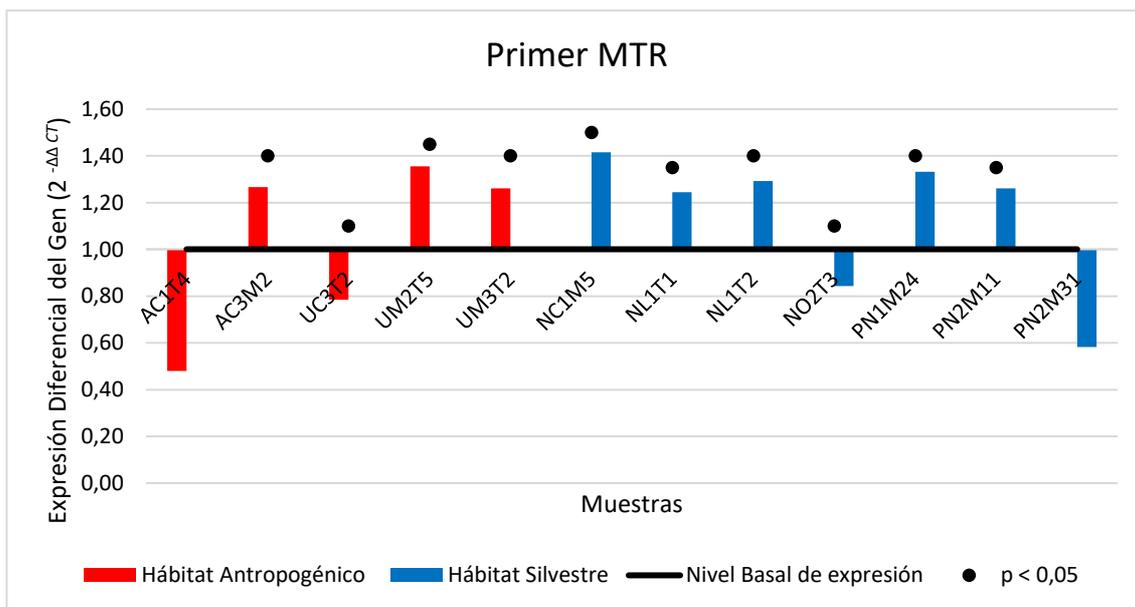


Figura 6. Expresión diferencial del gen MTR con relación a las muestras. Las barras de color rojo representan las muestras que provienen de un hábitat antropogénico y las barras de color azul representan las muestras que provienen de un hábitat silvestre. Los niveles de expresión fueron medidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La línea negra indica el nivel de expresión basal, dada por la muestra “target”. Los puntos indican aquellas muestras que presentan una diferencia significativa mediante el análisis estadístico de la prueba t de Student.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali Tabur, M., & Ayvaz, Y. (2010, June). (PDF) *Ecological Importance of Birds*. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/272153124_Ecological_Importance_of_Birds
- Arar, C., Gaudin, J.-C., CapronL., & Legrand, A. (1998). Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 430(3), 307–311. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00683-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00683-8)
- Atema, E., Oers, K. van, & Verhulst, S. (2013). GAPDH as a Control Gene to Estimate Genome Copy Number in Great Tits, with Cross-Amplification in Blue Tits. *Ardea*, 101(1), 49–54. <https://doi.org/10.5253/078.101.0107>
- Babenko, V. N., Bragin, A. O., Spitsina, A. M., Chadaeva, I. V., Galieva, E. R., Orlova, G. V., Medvedeva, I. V., & Orlov, Y. L. (2016). Analysis of differential gene expression by RNA-seq data in brain areas of laboratory animals. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 13(4), 1–15. <https://doi.org/10.1515/jib-2016-292>
- Balakrishnan, C. N., Edwards, S. V., & Clayton, D. F. (2010). The Zebra Finch genome and avian genomics in the wild. *Emu - Austral Ornithology*, 110(3), 233–241. <https://doi.org/10.1071/mu09087>
- Bay, R. A., Karp, D. S., Saracco, J. F., Anderegg, W. R. L., Frishkoff, L. O., Wiedenfeld, D., Smith, T. B., & Ruegg, K. (2020). Genetic variation reveals individual-level climate tracking across the annual cycle of a migratory bird. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043331>
- Benítez, F., Mena, C., & Zurita-Arthos, L. (2018). Urban Land Cover Change in Ecologically Fragile Environments: The Case of the Galapagos Islands. *Land*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.3390/land7010021>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995, November). *Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing*. Research Gate; Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Methodological 57:289 - 300. https://www.researchgate.net/publication/221995234_Controlling_The_False_Discovery_Rate_-_A_Practical_And_Powerful_Approach_To_Multiple_Testing
- Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2015). Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *Journal of Experimental Biology*, 218(9), 1281–1289. <https://doi.org/10.1242/jeb.104828>
- Bio-Rad. (n.d.-a). *SsoFast EvaGreen Supermixes*. Bio-Rad Laboratories. Retrieved April 10, 2022, from <https://www.bio-rad.com/es-ec/product/ssofast-evagreen-supermixes?ID=MH5HL6MNI>
- Blaylock, J. R., & Smallwood, D. M. (1985). Box-Cox Transformations and a Heteroscedastic Error Variance: Import Demand Equations Revisited. *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique*, 53(1), 91. <https://doi.org/10.2307/1402882>

- Blondel, J. (2000). EVOLUTION AND ECOLOGY OF BIRDS ON ISLANDS: TRENDS AND PROSPECTS. *Vie et Milieu / Life & Environment*, 205. <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03186916>
- Brinster, R., Köttgen, A., Tayo, B. O., Schumacher, M., & Sekula, P. (2018). Control procedures and estimators of the false discovery rate and their application in low-dimensional settings: an empirical investigation. *BMC Bioinformatics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2081-x>
- Brockerhoff, M., & Nations, U. (1998). World Urbanization Prospects: The 1996 Revision. *Population and Development Review*, 24(4), 883. <https://doi.org/10.2307/2808041>
- Browne, R., Collins, E., & Anderson, D. (2010). *Morphological variation of Galapagos island populations of the Yellow Warbler Dendroica petechia aureola Item Type article*. https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/36281/GR_67_p9-13.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cao, C., Gilbert, E. R., & Cline, M. A. (2020). The anorexigenic effect of beta-melanocyte-stimulating hormone involves corticotrophin-releasing factor and mesotocin in birds. *Neuroscience Letters*, 736, 135282. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135282>
- Capilla-Lasheras, P., Dominoni, D. M., Babayan, S. A., O'Shaughnessy, P. J., Mladenova, M., Woodford, L., Pollock, C. J., Barr, T., Baldini, F., & Helm, B. (2017). Elevated Immune Gene Expression Is Associated with Poor Reproductive Success of Urban Blue Tits. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00064>
- Craig, I. W. (2007). The importance of stress and genetic variation in human aggression. *BioEssays*, 29(3), 227–236. <https://doi.org/10.1002/bies.20538>
- Dai, Y., Tang, Z., Yang, Z., Zhang, L., Deng, Q., Zhang, X., Yu, Y., Liu, X., & Zhu, J. (2018). EXO1 overexpression is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Cell Cycle*, 17(19-20), 2386–2397. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1534511>
- Doran, L. (2021, August 11). *cDNA Synthesis Using SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*. *Protocols.io*. https://www.protocols.io/view/cdna-synthesis-using-superscript-iii-first-strand-n2bvjxmmbk5/v1?version_warning=no
- Fukuda, K., Davies, S. S., Nakajima, T., Ong, B.-H., Kupersmidt, S., Fessel, J., Amarnath, V., Anderson, M. E., Boyden, P. A., Viswanathan, P. C., Roberts, L. J., & Balser, J. R. (2005). Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circulation Research*, 97(12), 1262–1269. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000195844.31466.e9>
- Galen, S. C., Borner, J., Williamson, J. L., Witt, C. C., & Perkins, S. L. (2019). Metatranscriptomics yields new genomic resources and sensitive detection of infections for diverse blood parasites. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 14–28. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13091>
- Goni, R., García, P., & Foissac, S. (2009). The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*, 1, 1-9.

- Hanson, H. E., Zimmer, C., Koussayer, B., Schrey, A. W., Maddox, J. D., & Martin, L. B. (2021). Epigenetic potential affects immune gene expression in house sparrows. *Journal of Experimental Biology*, 224(6), jeb238451. <https://doi.org/10.1242/jeb.238451>
- He, X., Zhang, S., Chen, J., & Li, D. (2019). Increased *LGALS3* expression independently predicts shorter overall survival in patients with the proneural subtype of glioblastoma. *Cancer Medicine*, 8(5), 2031–2040. <https://doi.org/10.1002/cam4.2075>
- Head, J. A. (2014). Patterns of DNA Methylation in Animals: An Ecotoxicological Perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 54(1), 77–86. <https://doi.org/10.1093/icb/icu025>
- Heim, C., & Binder, E. B. (2012). Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Experimental Neurology*, 233(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.032>
- Hunter, P. (2007). The human impact on biological diversity. How species adapt to urban challenges sheds light on evolution and provides clues about conservation. *EMBO Reports*, 8(4), 316–318. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400951>
- Isaksson, C. (2018). Impact of Urbanization on Birds. *Fascinating Life Sciences*, 235–257. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91689-7_13
- Islaqm, M. R. (2018, February). (PDF) *Sample size and its role in Central Limit Theorem (CLT)*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/325574161_Sample_size_and_its_role_in_Central_Limit_Theorem_CLT
- Jensen, P. (2014). Behaviour epigenetics – The connection between environment, stress and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 157, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.02.009>
- Jiménez-Uzcátegui, G., Wiedenfeld, D., Valle, C. A., Vargas, H., Piedrahita, P., Muñoz-Abril, L. J., & Alava, J. J. (2019). Threats and Vision for the Conservation of Galápagos Birds. *The Open Ornithology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.2174/1874453201912010001>
- Juskiewicz, A. (2017). *Anthropogenic impact on Galapagos benthic ecosystem: case of Floreana Island*. https://libstore.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/763/749/RUG01-002763749_2019_0001_AC.pdf
- Laso, F. J., Benítez, F. L., Rivas-Torres, G., Sampedro, C., & Arce-Nazario, J. (2019). Land Cover Classification of Complex Agroecosystems in the Non-Protected Highlands of the Galapagos Islands. *Remote Sensing*, 12(1), 65. <https://doi.org/10.3390/rs12010065>
- Life Technologies. (2011). *RiboPure-Blood Kit*.
- Liu, J., & Zhang, J. (2021). Elevated EXO1 expression is associated with breast carcinogenesis and poor prognosis. *Annals of Translational Medicine*, 9(2), 135–135. <https://doi.org/10.21037/atm-20-7922>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lynton-Jenkins, J. G., Russell, A. F., Chaves, J., & Bonneaud, C. (2021). Avian disease surveillance on the island of San Cristóbal, Galápagos. *Ecology and Evolution*, 11(24), 18422–18433. <https://doi.org/10.1002/ece3.8431>
- McClatchey, A. I., Van den Bergh, P., Pericak-Vance, M. A., Raskind, W., Verellen, C., McKenna-Yasek, D., Rao, K., Haines, J. L., Bird, T., Brown, R. H., & Gusella, J. F. (1992). Temperature-sensitive mutations in the III–IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell*, 68(4), 769–774. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90151-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90151-2)
- Mcgranahan, G., & Satterthwaite, D. (2014). *Urbanisation concepts and trends*. <https://pubs.iied.org/sites/default/files/pdfs/migrate/10709IIED.pdf>
- Nanni, L., Romualdi, C., Maseri, A., & Landranchi, G. (2006). Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(6), 934–948. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.08.009>
- Nebert, D. W., Petersen, D. D., & Fornace, A. J. (1990). Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environmental Health Perspectives*, 88, 13–25. <https://doi.org/10.1289/ehp.908813>
- Nolan, T., Huggett, J., Sanchez, E., Sanders, R., Redshaw, N., & Wilkes, T. (2013). *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition 2013 Co-authors Malcolm Burns (2)*. <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- Pacheco Jiménez, K. M. (2020). Estrés fisiológico y morfometría en poblaciones del Canario María *Setophaga petechia aureola* con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos. *Repositorio.usfq.edu.ec*. <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/10166>
- Péréon, Y., Lande, G., Demolombe, S., Tich, S. N. T., Sternberg, D., Marec, H. L., & David, A. (2003). Paramyotonia congenita with an SCN4A mutation affecting cardiac repolarization. *Neurology*, 60(2), 340–342. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000042093.96309.5A>
- Quinlan, S. P., & Green, D. J. (2012). Riparian habitat disturbed by reservoir management does not function as an ecological trap for the Yellow Warbler (*Setophaga petechia*). *Canadian Journal of Zoology*, 90(3), 320–328. <https://doi.org/10.1139/z11-138>
- Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2015). Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 146-148, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.03.008>

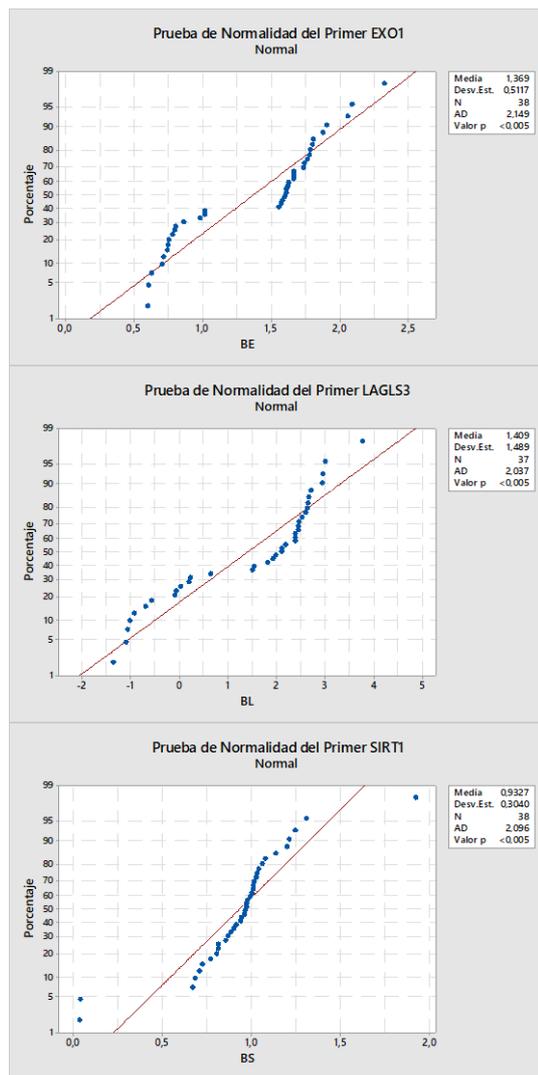
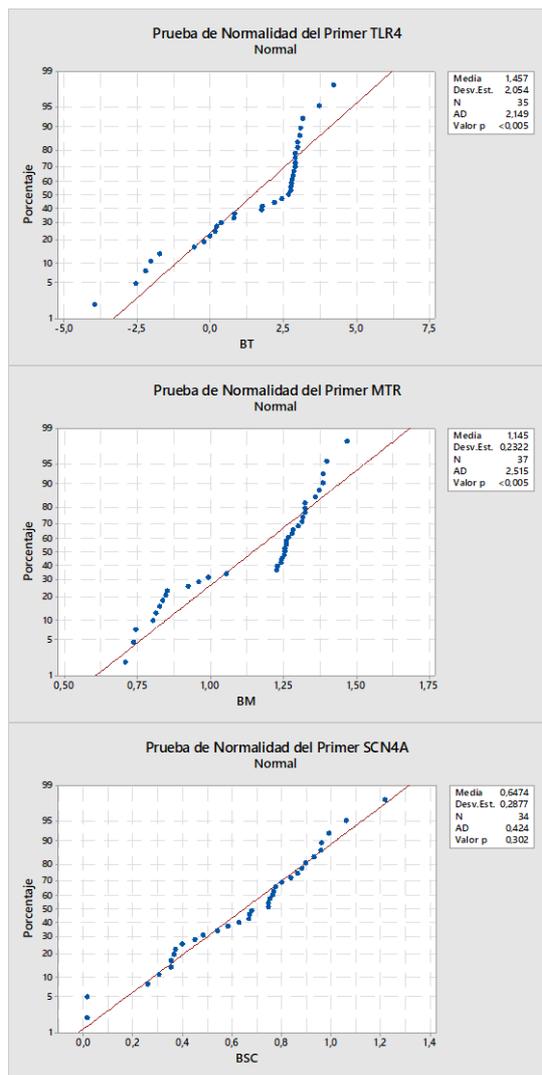
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280562/>
- Rebollo-Ifrán, N., Carrete, M., Sanz-Aguilar, A., Rodríguez-Martínez, S., Cabezas, S., Marchant, T. A., Bortolotti, G. R., & Tella, J. L. (2015). Links between fear of humans, stress and survival support a non-random distribution of birds among urban and rural habitats. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep13723>
- Rojas, M. I., Giles, S. S., Little, M., Baron, R., Livingston, I., Dagenais, T. R. T., Baer, J., Cobián-Güemes, A. G., White, B., & Rohwer, F. (2021). Swabbing the Urban Environment - A Pipeline for Sampling and Detection of SARS-CoV-2 From Environmental Reservoirs. *Journal of Visualized Experiments*, 170. <https://doi.org/10.3791/62379>
- Romero, L. M., & Wikelski, M. (2010). Stress physiology as a predictor of survival in Galapagos marine iguanas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1697), 3157–3162. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0678>
- Rosero Capelo, J. S. (2021). Evaluación de marcadores moleculares para la medición de efectos antropogénicos sobre genes que intervienen directamente en el estrés de *Setophaga petechia* por medio de PCR cuantitativo. Repositorio.usfq.edu.ec. <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/10556>
- Rouam, S. (2013). False Discovery Rate (FDR). *Encyclopedia of Systems Biology*, 731–732. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_223
- Rydenfelt, M., Klinger, B., Klünemann, M., & Blüthgen, N. (2020). SPEED2: inferring upstream pathway activity from differential gene expression. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W307–W312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa236>
- Savage, A. M., Hackett, B., Guénard, B., Youngsteadt, E. K., & Dunn, R. R. (2014). Fine-scale heterogeneity across Manhattan's urban habitat mosaic is associated with variation in ant composition and richness. *Insect Conservation and Diversity*, 8(3), 216–228. <https://doi.org/10.1111/icad.12098>
- Steadman, D. (2003). The late Quaternary extinction and future resurrection of birds on Pacific islands. *Earth-Science Reviews*, 61(1-2), 133–147. [https://doi.org/10.1016/s0012-8252\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s0012-8252(02)00116-2)
- Steadman, D. W. (1989). Extinction of birds in Eastern polynesia: A review of the record, and comparisons with other Pacific Island groups. *Journal of Archaeological Science*, 16(2), 177–205. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(89\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0305-4403(89)90065-4)
- Storey, J. (2010). *False Discovery Rates Multiple Hypothesis Testing*. http://theta.edu.pl/wp-content/uploads/2012/10/Storey_FDR_2010.pdf
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

- Valiente, L. P., & Tejedor, I. H. (2010). *Bioestadística sin dificultades matemáticas*. Ediciones Díaz de Santos.
- Walsh, S. J., McCleary, A. L., Heumann, B. W., Brewington, L., Raczkowski, E. J., & Mena, C. F. (2010). Community Expansion and Infrastructure Development: Implications for Human Health and Environmental Quality in the Galápagos Islands of Ecuador. *Journal of Latin American Geography*, 9(3), 137–159. <https://www.jstor.org/stable/25765336>
- Wang, R., Zhao, J., Meitner, M. J., Hu, Y., & Xu, X. (2019). Characteristics of urban green spaces in relation to aesthetic preference and stress recovery. *Urban Forestry & Urban Greening*, 41, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2019.03.005>
- Wang, Y., Guo, J., Wang, L., Tian, H., & Sui, J. (2019). Transcriptome analysis revealed potential mechanisms of differences in physiological stress responses between caged male and female magpies. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5804-0>
- Watson, H., Videvall, E., Andersson, M. N., & Isaksson, C. (2017). Transcriptome analysis of a wild bird reveals physiological responses to the urban environment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44180>
- Wiedenfeld, D. A. (2006). Aves, The Galapagos Islands, Ecuador. *Check List*, 2(2), 1. <https://doi.org/10.15560/2.2.1>
- Yoshimura, A., Gemma, A., Hosoya, Y., Komaki, E., Hosomi, Y., Okano, T., Takenaka, K., Matuda, K., Seike, M., Uematsu, K., Hibino, S., Shibuya, M., Yamada, T., Hirohashi, S., & Kudoh, S. (2003). Increased expression of the LGALS3 (Galectin 3) gene in human non-small-cell lung cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 37(2), 159–164. <https://doi.org/10.1002/gcc.10205>
- Zhao, J.-Y. ., Qiao, B., Duan, W.-Y. ., Gong, X.-H. ., Peng, Q.-Q. ., Jiang, S.-S. ., Lu, C.-Q. ., Chen, Y.-J. ., Shen, H.-B. ., Huang, G.-Y. ., Jin, L., & Wang, H.-Y. . (2013). Genetic variants reducing MTR gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations. *European Heart Journal*, 35(11), 733–742. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh221>
- Zhu, J. J., Arzt, J., Puckette, M. C., Smoliga, G. R., Pacheco, J. M., & Rodriguez, L. L. (2013). Mechanisms of Foot-and-Mouth Disease Virus Tropism Inferred from Differential Tissue Gene Expression. *PLoS ONE*, 8(5), e64119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064119>
- Zuñiga Paredes, M. R. (2016). Estudio de impacto del tráfico vehicular sobre las aves en las vías principales de la isla Santa Cruz, provincia de Galápagos. *Dspace.espace.edu.ec*. <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/5156>

ANEXOS

Anexo 1: Pruebas de normalidad

Mediante el software Minitab 18 se realizaron pruebas de normalidad a los primers utilizados en el presente estudio. Esta prueba de normalidad fue realizada en los valores obtenidos después del cálculo del $2^{-\Delta\Delta CT}$, y después de haberlos sometido a la transformación Box-Cox.



Anexo 2: Electroforesis en gel de agarosa

Mediante electroforesis en gel de agarosa se pudo comprobar los resultados de las amplificaciones de RT-qPCR.

