

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**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**

**Jean Sebastian Rosero Capelo**

**Ingeniería en Biotecnología**

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

Quito, 14 de mayo de 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**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**

**Jean Sebastian Rosero Capelo**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Diego Cisneros-Heredia, PhD**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Juan José Guadalupe, MSc**

Quito, 14 de mayo de 2021

## © 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: Jean Sebastian Rosero Capelo

Código: 00136231

Cédula de identidad: 1722335435

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

## **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## **UNPUBLISHED DOCUMENT**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 e impacto antropogénico dentro de territorios de importancia natural para el mundo, como las islas Galápagos, ejercen una serie de presiones dentro de la fauna isleña que puede traducirse en estrés. A pesar de las diferentes metodologías existentes para medir este estado, se propone el uso de la expresión génica para establecer el estado fisiológico de *Setophaga petechia aureola*. Se diseñaron y validaron un total de 13 marcadores moleculares que pueden utilizarse en sangre u otros tejidos dentro esta especie. Se realizó RT-qPCR con 3 genes referenciales y 10 genes de expresión variable a partir de muestras de sangre de individuos cuya concentración de corticosterona en plumaje era conocida. Al comparar los niveles de mensajeros de un individuo con alta corticosterona en plumaje, con otros individuos cuya corticosterona en plumaje era baja, se obtuvo inconsistencias en cuanto a los genes que se veían sobre y sub expresados. Es decir, para estas muestras, usar como referencia la concentración de corticosterona en pluma no dictaba una tendencia clara en cuanto al comportamiento de la expresión de estos genes en sangre. Resultados variables también se obtuvieron dependiendo del gen de referencia utilizado, sugiriendo que se debe realizar un análisis de estabilidad de expresión. Acoplar la concentración de corticosterona en pluma a un análisis de expresión génica en sangre puede no ser óptimo, ya que en esta última se estima el estado fisiológico del individuo unos días o semanas atrás. Este estudio propone una nueva herramienta que puede acoplarse a otras metodologías para determinar el verdadero estado fisiológico de fauna silvestre dentro de ambientes urbanos.

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

## ABSTRACT

Urbanization and anthropogenic impact within territories of natural importance to the world, such as the Galapagos Islands, exert a series of pressures within the island fauna that can translate into stress. Despite the different existing methodologies to measure this state, the use of gene expression is proposed as a tool to establish the physiological state of *Setophaga petechia aureola*. A total of 13 molecular markers were designed and validated that can be used in blood or other tissues within this species. RT-qPCR was performed with 3 reference genes and 10 genes of variable expression in blood samples from individuals whose plumage corticosterone concentration was known. When comparing the messenger levels of an individual with high corticosterone in plumage, with other individuals whose corticosterone in plumage was low, inconsistencies were obtained regarding the genes that were seen over and under expressed. That is, for these samples, using the corticosterone concentration in feathers as a reference did not dictate a clear trend regarding the behavior of the expression of these genes in blood. Variable results were also obtained depending on the reference gene used, suggesting that an expression stability analysis should be performed. Coupling the corticosterone concentration in plumage to a blood gene expression analysis may not be optimal, since in the last one the physiological state of the individual is estimated a few days or weeks earlier. This study proposes a new tool that can be coupled with other methodologies to determine the true physiological status of wildlife within urban environments.

**Key words:** birds, Galápagos islands, anthropogenic effects, urbanism, RT-qPCR, genes, blood, *Setophaga petechia aureola*.

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN. ....	11
1.1	La urbanización y sus efectos. ....	11
1.2	Islas Galápagos y urbanización. ....	12
1.3	Importancia y distribución de <i>Setophaga petechia aureola</i> . ....	13
1.4	Medición de estrés por métodos moleculares. ....	14
2	METODOLOGÍA. ....	15
2.1	Declaración de Ética. ....	15
2.2	Área de estudio y recolección de muestras. ....	15
2.3	Diseño de primers específicos para <i>Setophaga petechia aureola</i> . ....	15
2.4	Extracción de ADN genómico en cálamo de pluma y validación de primers. ....	16
2.5	Criterio de selección de muestras y extracción de ARN total a partir de sangre...	16
2.6	Digestión con DNAsa y retrotranscripción. ....	17
2.7	RT-qPCR ....	17
2.8	Análisis estadísticos. ....	17
3	RESULTADOS. ....	18
3.1	Diseño y validación de primers. ....	18
3.2	Extracción de ARN. ....	18
3.3	Resultados RT-qPCR. ....	18
4	DISCUSIÓN. ....	20
4.1	Diseño y validación de primers. ....	20
4.2	Extracción de ARN. ....	20
4.3	Análisis de expresión génica en sangre ....	21
4.4	Relación entre niveles de expresión y corticosterona ....	22
4.5	Tejidos muestrales y otros métodos para determinar estrés. ....	23
5	CONCLUSIONES. ....	24
6	TABLAS. ....	25
7	FIGURAS. ....	26
8	REFERENCIAS. ....	28
9	ANEXOS. ....	38

**ÍNDICE DE TABLAS.**

Tabla 1. Genes referenciales y relacionados al estrés utilizados en el presente estudio. .... 25



## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR amplificados con primers diseñados a partir de ADN genómico de cálamo de plumas pertenecientes a <i>Setophaga petechia aureola</i> . .....	26
Figura 2: Niveles de expresión de genes relacionados al estrés con expresión variable AU2M3 vs NO1M1 .....	27

**ÍNDICE DE ANEXOS.**

Anexo 1 .....	38
Anexo 2 .....	39

## 1 INTRODUCCIÓN.

### 1.1 La urbanización y sus efectos.

Urbanización es un término utilizado para indicar una transición demográfica de una zona rural a una urbana (McGranahan & Satterthwaite, 2014), aquí ocurren cambios económicos y socioculturales acarreado consigo una mayor aglomeración de personas dentro de un mismo pueblo o ciudad (Hussain & Imitiyaz, 2018). Se espera que para el año 2050, aproximadamente, dos tercios de la población mundial habite en áreas urbanas (Haase et al., 2018; Kondratyeva et al., 2020). Actualmente, las zonas urbanas crecen el doble de rápido en términos de territorio (United Nations et al., 2019). Por tanto, es inevitable que la urbanización afecte al entorno natural donde se ha establecido. Los cambios en el uso de tierras y disturbios ambientales generan presiones selectivas dentro de la diversidad de especies. Por procesos de urbanización y la intervención del ser humano, se genera un impacto sobre especies animales y vegetales (Kondratyeva et al., 2020), por lo cual, es relevante estudiar la salud ecosistémica y de especies dentro de áreas afectadas por este fenómeno.

La urbanización ocasiona consecuencias en la diversidad y fenotipo dentro de las especies. Los efectos de esta pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales para la fauna nativa (Isaksson, 2018). Entre los beneficios se encuentran: la disponibilidad de comida, reducción de estresores climáticos y presencia de refugio (Watson et al., 2017; Isaksson, 2018). Del mismo modo, existen contras como: el aumento de contaminación sonora, del aire y lumínica; depredación, abundancia de comida y exposición a patógenos (Isaksson, 2018), resultando, en algunos casos, en lesiones o muerte de los animales (Donaldson et al., 2012). Esta combinación de variables confiere a los ambientes urbanos la característica de introducir

procesos selectivos donde solo las especies más aptas pueden sobrevivir a los constantes cambios (Isaksson, 2018).

## **1.2 Islas Galápagos y urbanización.**

La expansión del urbanismo ha afectado a zonas de alta importancia para la conservación de la biodiversidad, como las Islas Galápagos. Este archipiélago fue reconocido como patrimonio natural de la humanidad en 1978, gracias a su alto endemismo de flora y fauna (UNESCO, s. f.). Dentro de las islas se alberga un alto porcentaje de especies endémicas aviares, ya que el 70% de aves terrestres y 58% de aves marinas de este territorio son endémicas (Wiedenfeld, 2006). Desafortunadamente, las islas han sido afectadas negativamente por la intervención antropogénica (Benítez et al., 2018), llevando al archipiélago a formar parte de la lista de Sitios del Patrimonio Mundial en Peligro de Extinción en el periodo 2007-2010 (Pazmiño et al., 2018).

Con la finalidad de buscar un mejor desarrollo sociocultural y una alternativa a la explotación indiscriminada de los recursos naturales de las islas, Galápagos se ha convertido en uno de los destinos turísticos más famosos del mundo. Sin embargo, como toda actividad humana, incluso actividades de mediano impacto causan presiones sobre ecosistemas tan delicados como los insulares (Benitez-Capistros et al., 2014). Tan solo entre los años 2010 y 2015 se presenció una expansión demográfica del 9.5% (INEC, 2015), lo cual representa una amenaza hacia la biodiversidad y conservación del hábitat. Donde se ha registrado que a causa de la expansión urbana y antropogénica se puede llegar a modular e influir procesos adaptativos dentro de la fauna isleña, específicamente en aves (León et al., 2019). Adicionalmente, las islas presentan estresores naturales que afectan a las poblaciones de fauna endémica, como su alta variación climática causada por corrientes marinas (Harvey

et al., 2021; Romero & Wikelski, 2010), estrés nutricional, predación natural, epidemias, agresión/competencia, entre otros retos que las especies deben sobrellevar (Alava et al., 2014). Las islas Galápagos poseen características ideales para estudios de procesos selectivos (Pérez-Mellado, 2010), además de ser un foco científico para analizar efectos del urbanismo en la fauna endémica (Harvey et al., 2021).

### **1.3 Importancia y distribución de *Setophaga petechia aureola*.**

Dentro de los ambientes urbanos, las aves son consideradas como excelentes indicadores del estado de salud ecológico gracias a que ocupan distintos niveles tróficos a lo largo de ecosistemas, a su ocurrencia, abundancia, además de ser sensibles hacia cambios ambientales y ser de fácil avistamiento y registro a grandes escalas (Ochoa, 2014; Villegas & Garitano, 2008). En las islas Galápagos, se propone estudiar al canario *Setophaga petechia aureola*, un ave insectívora (Charles Darwin Foundation, 2020; Ardila-Téllez & Cruz-Bernate, 2014) sensible a la degradación y pérdida de hábitat natural (Quinlan & Green, 2012), la cual ha disminuido su población y puede estar amenazada por los efectos de la intervención antropogénica (Zúñiga, 2016). *Setophaga petechia* colonizó las islas hace aproximadamente 300 mil años (Chaves et al., 2012; O. Rojas & Ortega, 2020) brindándole el reconocimiento de animal endémico a la subespecie denominada *Setophaga petechia aureola* (Browne et al., 2008; Browne et al., 2010). Actualmente se la encuentra en bosques secos y nublados del territorio galapaguense (Chaves et al., 2012), incluyendo varias zonas urbanas de las islas Isabela, Floreana, San Cristóbal y Santa Cruz (O. Rojas & Ortega, 2020). A pesar de avistamientos casuales registrados del ave a lo largo de las Galápagos, investigaciones enfocadas al ámbito genético o morfológico aún son escasas (Browne et al., 2008). Los pocos estudios realizados en el ave dentro de Galápagos están enfocados en determinar el origen poblacional o genotipado de esta especie (Bay et al., 2020; Chaves et al.,

2012). Es por ello que es de sumo interés determinar el estado fisiológico de *Setophaga petechia aureola* y evaluar cómo los estresores ambientales afectan a esta ave a lo largo de su distribución.

#### **1.4 Medición de estrés por métodos moleculares.**

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas como la transcriptómica o estudios de expresión diferencial de genes para estudiar los efectos que presenta el urbanismo sobre la expresión génica en fauna (Watson et al., 2017). Algunos de los estudios que han aplicado esta metodología para inferir el estado fisiológico aviar, han usado muestras de sangre gracias a que esta es una técnica poco invasiva, además, de ser altamente sensible a cambios en la dieta y exposición a contaminantes, por lo tanto, contribuye a la expresión genética en relación con la urbanización (Vanparys et al., 2008; Watson et al., 2017; Wang et al., 2019).

El presente estudio pretende desarrollar y evaluar marcadores moleculares asociados al estrés que permitan medir el impacto antropogénico, en sangre de *Setophaga petechia aureola*, como modelo en ambientes nativos y expuestos a efectos de urbanización en las islas Galápagos por medio de PCR cuantitativo.

## 2 METODOLOGÍA.

### 2.1 Declaración de Ética.

Este estudio fue realizado con permisos del Ministerio del Ambiente del Ecuador y del Parque Nacional Galápagos (PC-59-19).

### 2.2 Área de estudio y recolección de muestras.

Se recolectaron muestras de sangre total de *Setophaga petechia aureola* de los individuos capturados para el estudio de Pacheco, (2020), realizado en el Este de la isla San Cristóbal, Galápagos. Los individuos pertenecían a ecosistemas con distintos niveles de impacto urbano, tales como: Espacios Verdes Urbanos, Sistemas Silvopastoriles, Bosque Bajo Deciduo, y Bosque Siempreverde Estacional Alto (Laso et al., 2019; Rivas-Torres et al., 2018). La captura se realizó entre los meses de junio-julio de 2018, y mayo-julio de 2019. Las muestras de sangre (15 µl aproximadamente) fueron almacenadas en 3 volúmenes de RNAlater (150 µl) (Life Technologies, 2011) trasladadas al Laboratorio de Zoología Terrestre de la USFQ y analizadas en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, donde fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

### 2.3 Diseño de primers específicos para *Setophaga petechia aureola*.

De acuerdo con fuentes bibliográficas, se identificaron los genes de expresión diferenciada relacionados al estrés en aves y genes de referencia estables para la normalización de resultados de RT-qPCR. La secuencia de ADN para cada gen se obtuvo de la base de datos del NCBI, utilizando como referencia al organismo modelo de aves paseriformes, *Taeniopygia guttata* (Patterson & Fee, 2015). Se realizó la búsqueda de las secuencias homólogas para *Setophaga petechia aureola* utilizando el comando “blastn” del programa BLAST+ (Camacho et al., 2009) y un transcriptoma de sangre de *Setophaga petechia aureola* (No. De accesoión: SRX5582022) ensamblado *de novo* con el programa CLC

Genomics Workbench 21 con los parámetros establecidos por defecto (Qiagen, 2019). Las secuencias con mayor homología se escogieron en base a los valores de “E-score” más bajos y “Bit score” más altos reportados por el programa. Los primers fueron diseñados con el programa Primer3 (Untergasser et al., 2012), en base a los siguientes parámetros: tamaño del producto 100-50 pb, tamaño de los primers 20-35 pb, temperatura de melting 60°C con diferencia entre temperaturas <5°C y %GC 40-60% (Taylor et al., 2016). La formación de estructuras secundarias se verificó con el programa “mfold” (Zuker, 2003) y se validó la especificidad *in silico* realizando un Primer Blast (Ye et al., 2012).

#### **2.4 Extracción de ADN genómico en cálamo de pluma y validación de primers.**

Se validaron los primers diseñados *in vivo* mediante la amplificación de ADN genómico de *Setophaga petechia aureola*, extraído a partir de muestras de cálamo de pluma en el estudio de Pacheco (2020), utilizando el protocolo de Bello *et al.*, (2001) modificado (Anexo 1). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl utilizando 1 µl de ADN genómico y las siguientes concentraciones finales para cada uno de los reactivos: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primer forward 0.3 µM, primer reverse 0.3 µM, Taq Platinum 0.5U y BSA 0.05 mg/ml. El termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, y finalmente una extensión final a 75 °C por 5 min. Se realizó una electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1.5%.

#### **2.5 Criterio de selección de muestras y extracción de ARN total a partir de sangre**

Se usaron tres muestras de sangre de *Setophaga petechia aureola* con diferentes concentraciones de corticosterona en pluma como posibles indicadores de estrés y de cambios fisiológicos, determinadas en el estudio de Pacheco (2020). Una muestra con alta



concentración de corticosterona (NO1M1, 17.47 ng/mg) y las otras dos con bajas concentraciones de corticosterona (AU2M3 y PN1M2-3; 9.85 ng/mg y 10.47 ng/mg respectivamente). De estas muestras se extrajo el ARN total utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo de Galen *et al.*,(2020) y Rojas *et al.*, (2021) (Anexo 2). Se cuantificaron las muestras por Qubit™ RNA BR Assay Kit y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## 2.6 Digestión con DNAsa y retrotranscripción

Alrededor de 200 ng de ARN total fueron utilizados como material de entrada para la digestión de ADN genómico con la DNAsa I (Invitrogen) y la retrotranscripción con la SuperScriptIII (Invitrogen), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante.

## 2.7 RT-qPCR

Para la RT-qPCR se utilizó 7.5 µl del SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad), 0.3 µM de cada primer, 1.5 µl de cDNA y 5.1 µl de Agua Ultra Pura, para un volumen final de 15 µl por reacción. Para cada muestra amplificada con cada primer se realizó la reacción por duplicado. El termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, hibridación a 58 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s, y finalmente un paso de melting de 60 °C a 95 °C, con pasos de 0.5°C y lectura de 10 s para cada temperatura. Los resultados obtenidos fueron normalizados con los obtenidos para los genes de referencia GAPDH, PGK1, TFRC y BUDD23/18S.

## 2.8 Análisis estadísticos

Con los resultados del RT-qPCR se aplicó el algoritmo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para cada una de las muestras con sus respectivos genes. Para la comparación estadística, se escogió el nivel de los transcritos de las muestras “bajas en corticosterona” como el nivel basal de expresión. Se analizaron los resultados con el estadístico t de Student considerando varianzas iguales.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Diseño y validación de primers

Se diseñaron un total de 18 genes relacionados al estrés en aves presentados en la Tabla 1. Los genes GAPDH, TFRC, PGK1 y BUDD23/18S son genes referenciales de expresión constante en aves utilizados para analizar resultado de RT-qPCR. Los genes MT4, CP, EXO, FEN1, MTR, GATA3, TLR4, LY86, CDH23, SCN4A, LGALS23, JKAMP, SIRT1 y CREB1 son genes que presentan expresión diferenciada entre de individuos sometidos a diferentes estresores causados por el urbanismo. Mismos que se validaron en ADN genómico a partir del cálamo de plumas. En la Figura 1 se indican los resultados de un PCR en gel de agarosa en donde no se presentó amplificación de los genes LY86 ni GATA3. Sin embargo, se evidenció una amplificación tenue para el gen SCN4A, mismo que presenta un tamaño de producto diferente al esperado que se calculó previamente en el diseño de primers.

#### 3.2 Extracción de ARN

Los resultados de la extracción, cuantificados por medio del instrumento Qubit, dieron una concentración de 27.9 ng/μl, 24,6 ng/μl y 61.1 ng/μl de ARN de las muestras AU2M3, PN1M2-3 y NO1M1 respectivamente.

#### 3.3 Resultados RT-qPCR

Al realizar RT-qPCR utilizando los genes referenciales GAPDH, TFRC, PGK1 y BUDD23/18S con los genes de expresión variable MTR, EXO1, MT4, LGALS3, JKAMP, TLR4, CP, FEN1, SCN4A y SIRT1 no se detectó amplificación del gen de referencia PGK1 y del gen marcador de estrés CREB para la muestra NO1M1. De igual manera el gen CDH23 presentó un tamaño producto amplificado con cDNA mayor a lo recomendado para RT-qPCR (200pb), por lo que se descartaron a estos genes de los análisis subsiguientes. Dando

como resultado un total de 13 genes para determinar el estado fisiológico en *Setophaga petechia aureola*.

Al realizar una normalización de datos con los genes GAPDH, TFRC y BUDD23/18S se obtuvieron los siguientes resultados:

1) Al comparar los resultados de la muestra AU2M3 con respecto a NO1M1 con el gen referencial BUDD23/18S se encontró la subexpresión de los genes: LGALS3 (p=0.007), FEN1 (p=0.001), SCN4A (p=0.017) y SIRT1 (p=0.002). Por otro lado, haciendo uso del gen referencial TFRC se encontró la subexpresión de los genes: MT4 (p=0.02), JKAMP (p=0.011), TLR4 (p=0.001), FEN1 (p=0.001), SCN4A (p=0.003) y SIRT1 (p=0.006). Finalmente, utilizando al gen GAPDH como gen referencial en las mismas muestras, se presentó la subexpresión de los genes: EXO1 (p=0.013), MT4 (p=0.000), JKAMP (p=0.045), TLR4 (p=0.011), CP (p=0.036), FEN1 (p=0.007), SCN4A (p=0.007) y SIRT1 (p=0.002).

2) Si se comparan los resultados de la muestra PN1M2-3 con respecto a NO1M1 con el gen referencial BUDD23/18S se encontró la sobre-expresión de los genes: MTR (p=0.023) y EXO1 (p=0.042) y subexpresión de los genes LGALS3 (p=0.049) y SIRT1 (p=0.002). Por otro lado, haciendo uso del gen referencial TFRC se encontró subexpresión del gen SCN4A (p=0.041). Finalmente, utilizando el gen GAPDH como gen referencial se presentó la subexpresión de los genes: EXO1 (p=0.050) y SCN4A (0.017).

En la Figura 2 se evidencia una comparación gráfica de los resultados del algoritmo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de cada uno de los genes con respecto a cada gen referencial comparable utilizando muestras con baja concentración de corticosterona (AU2M3 y PN1M2-3) vs. una muestra con alta concentración de corticosterona (NO1M1).

## 4 DISCUSIÓN.

### 4.1 Diseño y validación de primers

Para determinar la unión de los primers diseñados *in silico*, a una sección del material genético del ave, se utilizó ADN genómico de cálamo de plumas pertenecientes a *Setophaga petechia aureola*. Dentro del gel de agarosa (Figura 1) no se amplificaron dos genes y hubo una amplificación tenue, resultando en 16 primers candidatos para el estudio. Los errores de amplificación pueden explicarse debido al diseño de primers a partir de las regiones exónicas del transcriptoma de sangre. Debido a que existe la posibilidad de haberlos diseñado en zonas cercanas a los límites de intrones-exones del genoma de *Setophaga petechia aureola*. Estos errores se pueden evitar estudiando los límites de estas regiones y diseñando primers únicamente para las regiones céntricas de los exones (Jax et al., 2018; Wit et al., 2015).

### 4.2 Extracción de ARN.

Gracias a la fácil degradación de ARN por parte de RNAsas endógenas y a la presencia de eritrocitos nucleados en sangre que aumentan la presencia de contaminantes proteicos y de ADN, es difícil realizar extracción de ARN en sangre que cuente con concentraciones óptimas para análisis de expresión génica (Mewis et al., 2014). En la presente investigación se aplicaron metodologías para extraer ARN con Trizol a partir de sangre, obteniendo concentraciones desde 24,6 ng/μl hasta 61.1 ng/μl de ARN total. En estudios previos, aplicando la misma metodología de extracción en sangre aviar (Galen et al., 2020; Mewis et al., 2014), se reportan concentraciones de ARN total desde 10 ng/μl hasta >100 ng/μl (Galen et al., 2020), indicando que las concentraciones obtenidas en el presente estudio están en el rango óptimo para análisis de expresión génica.

### 4.3 Análisis de expresión génica en sangre

Para determinar los niveles de expresión génica se realizó RT-qPCR, en conjunto con el algoritmo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para medir cambios en la expresión de un gen de interés con respecto a un normalizador (Rao et al., 2013). Mismo que es empleado para evaluar la expresión génica en respuesta al estrés de diferentes organismos (Yousefi et al., 2020; Porcel et al., 2006; Desalvo et al., 2008). Para minimizar el error técnico (Olias et al., 2014), los genes normalizadores no deben verse afectados por el tratamiento estudiado en la fase experimental (Livak & Schmittgen, 2001), en este caso; la concentración de corticosterona.

Los genes de referencia GAPDH, PGK1, TFRC y BUDD23/18S son óptimos para medir la expresión génica en el modelo de aves paserinas, *Taeniopygia guttata*, debido a que su expresión es más estable entre individuos de una misma especie (Olias et al., 2014; Atema et al., 2013). Sin embargo, la expresión de estos genes puede tener variación entre tejidos, por lo tanto; es necesario realizar una selección minuciosa de los genes referenciales (Olias et al., 2014; Lynn et al., 2015). De estos cuatro genes, únicamente se utilizaron tres para RT-qPCR, puesto que; el gen PGK1 no amplificó para la muestra con alta corticosterona NO1M1. En la Figura 2 se evidencian diferentes niveles de expresión según su gen de referencia, corroborando la importancia en la selección de un gen referencial idóneo.

Se evidenció coincidencias en la subexpresión de al menos un gen para ambos análisis con respecto a cada gen referencial (Figura 2). Para el gen de referencia GAPDH, se presentó la subexpresión significativa del gen EXO1, mismo que interviene en la reparación de ADN (Watson et al., 2017), y del gen SCN4A, relacionado en procesos de estrés oxidativo en canales de sodio muscular (Fukuda et al., 2005), la subexpresión de estos genes indican que estos procesos ocurren en menor proporción dentro de la población con alta corticosterona.

Por otro lado, se encontró la subexpresión del gen SCN4A con respecto al gen referencial TFRC para ambos análisis. Finalmente, para el gen referencial BUDD23/18S, se encontró la subexpresión del gen LGALS3, mismo que interviene en la defensa contra patógenos por parte del sistema inmune innato (Díaz-Alvarez & Ortega, 2017) y SIRT1, cuya expresión está relacionada con la longevidad en animales por reparación de ADN (Ramis et al., 2015). Con estos resultados de expresión no se pueden realizar conclusiones acerca del estado fisiológico del ave, ya que a simple vista no se determina una tendencia entre la expresión génica y la concentración de corticosterona en pluma ya que únicamente hubo pocas coincidencias entre análisis. Es necesario desarrollar una metodología óptima para la selección de un gen referencial idóneo que funcione con todas las muestras y tejidos.

#### **4.4 Relación entre niveles de expresión y corticosterona**

Al utilizar tres muestras para el estudio con diferentes niveles de corticosterona, el tamaño muestral no es representativo estadísticamente en base al teorema del límite central, sería necesario el uso de un mayor tamaño muestral ( $n \geq 30$ ) (Islaqm, 2018). Por lo tanto, no se puede realizar conclusiones certeras sobre el estado fisiológico de *Setophaga petechia aureola* en base a estas muestras (Islaqm, 2018).

En este estudio se utilizaron muestras con diferentes concentraciones de corticosterona en plumaje, cuya concentración es el resultado de la acumulación de esta hormona a lo largo de varios días o semanas (Freeman & Newman, 2018). En contraste con la expresión génica; misma que brinda información con respecto al estado fisiológico actual del individuo (Arasappan et al., 2010). No es posible considerar a la corticosterona como un factor para separar muestras con diferente respuesta al estrés urbano con el fin de analizar expresión génica, ya que el análisis temporal de ambos casos es diferente.

Es propicio definir un umbral de corticosterona que determine el verdadero estado fisiológico de cada especie aviar. Ya que previamente se han reportado inconsistencias con respecto a la concentración de corticosterona en diferentes especies aviares como respuesta a factores urbanos (Birnie-Gauvin et al., 2016). En este caso no se conoce el umbral de corticosterona que determine que *Setophaga petechia aureola* se encuentre en estrés, dificultando los posteriores análisis que se guían en base a este factor.

#### **4.5 Tejidos muestrales y otros métodos para determinar estrés**

Los niveles de expresión génica varían según el tejido muestreado. Considerando que las respuestas a factores ambientales operan en todos los tejidos, los genes que intervienen en estos procesos son diferentes (Watson et al., 2017; Jax et al., 2018). Se propone investigar las respuestas fisiológicas al estrés en otros tejidos como: hígado, cerebro o intestino y no únicamente en sangre (Løtvedt et al., 2017; Watson et al., 2017). Sin embargo, estos procedimientos son altamente invasivos en poblaciones salvajes debido a que se debe sacrificar al individuo para la extracción de la muestra. Optando por la sangre y plumas como alternativas idóneas para analizar expresión génica en aves silvestres (Jax et al., 2018).

Finalmente, utilizar una sola metodología para el estudio de estrés en aves es inadecuado (Cotter, 2015). La combinación de metodologías y variables para determinar el estado fisiológico en aves, tales como: niveles de glucocorticoides, de la proteína de shock térmico HSP 60, proporción heterófilos/linfocitos, coloración en plumaje, índice de condición corporal, entre otros; es una opción viable (Kennedy, 2010; O'Dell et al., 2014; Weimer et al., 2018; Milenkaya et al., 2013). Esto se debe a que cada factor estudiado revela más información sobre la verdadera condición fisiológica del ave, al igual que su interacción con el ambiente que lo rodea (Tang et al., 2018; Cotter, 2015; Merino et al., 2006).

## 5 CONCLUSIONES.

En el presente estudio se logró sintetizar y validar un total de 13 marcadores moleculares con el fin de cuantificar la expresión génica relacionada al estrés en muestras de sangre de *Setophaga petechia aureola*. Los primers diseñados pueden utilizarse para medir el estrés en sangre u otros tejidos dentro de la especie analizada en este estudio.

Los ensayos de RT-qPCR encontraron expresión diferencial en ciertos genes con respecto a su normalizador, pese a esto; establecer el verdadero estado fisiológico a partir de este análisis resulta inadecuado en virtud de que no existe una tendencia en los resultados a simple vista.

Este estudio propone una nueva herramienta que puede acoplarse a diferentes métodos cuantitativos de estrés, para intentar determinar el estado fisiológico de la fauna silvestre dentro de ambientes urbanos y cómo éste afecta la biodiversidad en su entorno.

De modo que el tamaño muestral sea capaz de representar estadísticamente a la población, es necesario trabajar con un mayor número de muestras ( $n \geq 30$ ). De igual manera, se propone realizar una estandarización de genes referenciales para cada tejido y especie, puesto que; se pudo determinar la expresión variable de los tres genes referenciales dentro de las tres muestras analizadas, brindando error e inconsistencia en los datos.

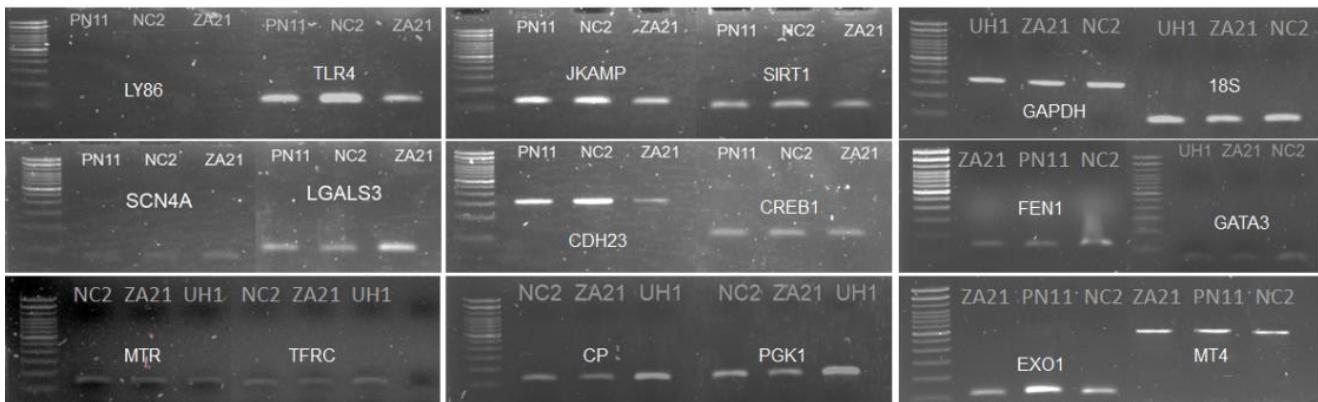


## 6 TABLAS.

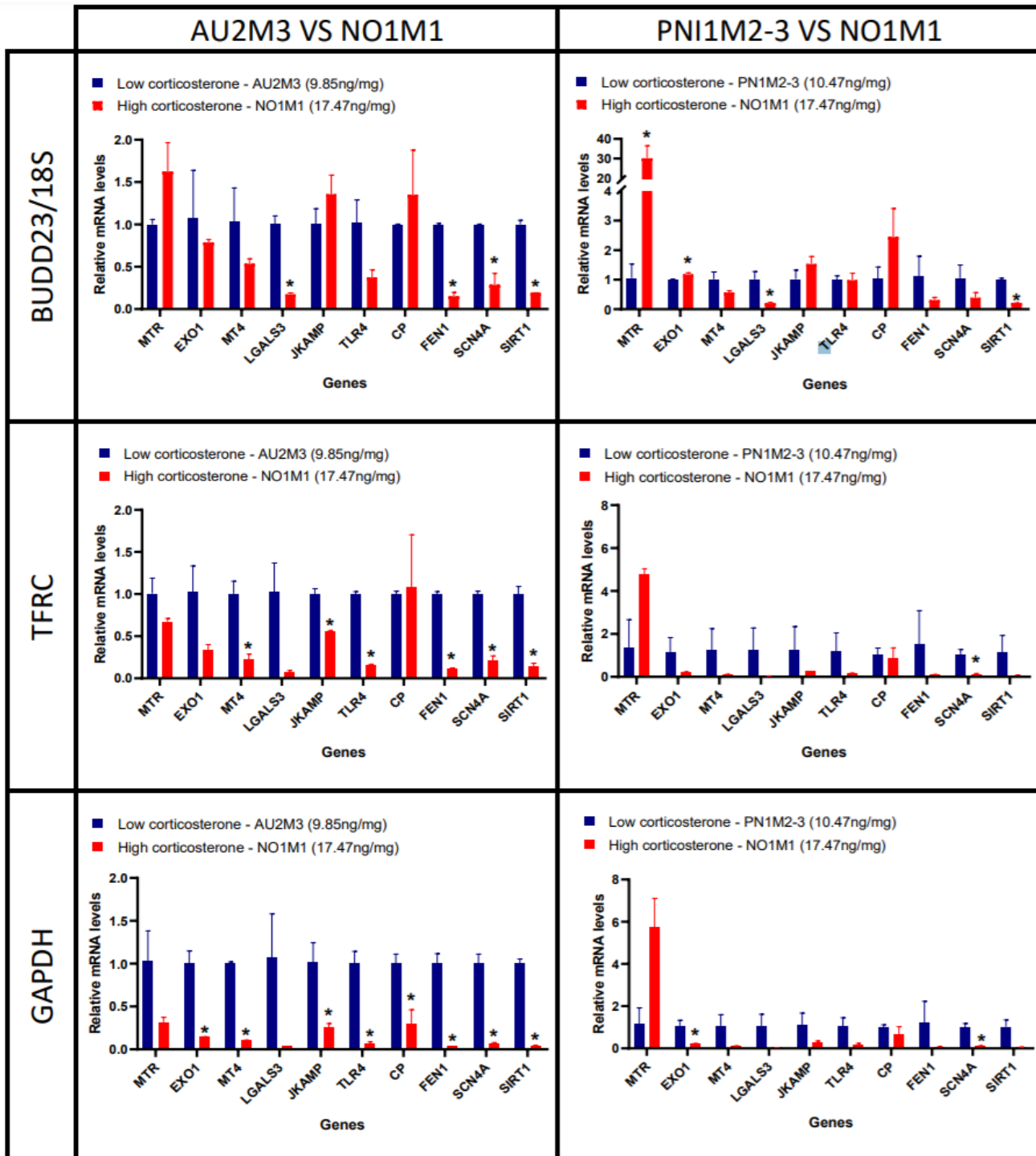
**Tabla 1. Genes referenciales y relacionados al estrés utilizados en el presente estudio.** Cada gen posee el nombre de la proteína codificante, descripción, organismo de referencia, bits, E-value, primer izquierdo, primer derecho,  $\Delta G$  y tamaño esperado del producto de amplificación. Resaltado en celeste se encuentran los genes referenciales y en amarillo los genes de expresión variable.

GEN	Proteína	Descripción del gen	Organismo	Bits	E-value	Left	Right	$\Delta G$ (kcal/mol) primer left	$\Delta G$ (kcal/mol) primer right	Product size primer3
1	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Taeniopygia guttata</i>	2239	0.0	GACCTGTCATACT CICATGGTTGAC	ATATGTTGGGAGT CTACTGGTGTCTT	-0.6 A 0.24	-0.15 A 1.04	150
2	TFRC	Transferrin receptor	<i>Taeniopygia guttata</i>	1519	0.0	TCCCTGTTTTGTC ACTAGGTTTAG	AAAACTAAGAGCTC AGGTGTTTCTC	-0.09 a 0.82	-1.09, -0.39	109
3	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	<i>Taeniopygia guttata</i>	767	0.0	CTACTTTAATAAGC AGCAGACCCACT	ACTCAGCAACTAG TGAGTGTGAAAC	-1.04 A 1.97	-1.71 A -0.81	125
4	BUD23/18S	BUD23 RNA methyltransferase and ribosome maturation factor	<i>Taeniopygia guttata</i>	390	7.00E-112	GAGAAGAGGCGCA ACATACAGTGTCT	GTTTACTGTGTGCT GTACTGTGAGCTA	-0.74 a 0.08	-0.75, -0.58	112
5	MT4	Metallothionein	<i>Taeniopygia guttata</i>	571	2.00E-167	GCACCATGTACATT TGCAGTIT	AGCCACCAGACAT GGACTC	-0.41 a 0.29	-2.27	102
6	CP	Cenuloplasmin	<i>Taeniopygia guttata</i>	641	0.0	GGGTACTAATAAGA TTTTCTAGGGCTTG	ACAAGCCTCTATCT AACAAGACACATC	-0.26 a 0.74	0.87 a 1.38	125
7	EXO1	Exonuclease 1	<i>Taeniopygia guttata</i>	313	6.00E-88	GTAAGGTACATAT GGTAACAAGCTC	GTCCACACCTTATTT TCAGTATCAGACT	-1.12	0.71, 1.21	121
8	FEN1	Flap endonuclease 1	<i>Taeniopygia guttata</i>	335	1.00E-95	CTGAAACTTAATTT GTCCCTGAGTCTG	TCAGTGTGTGTGT TAGTGTCTG	-0.37	-1.72	138
9	MTR	Methionine synthase (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase)	<i>Taeniopygia guttata</i>	263	9.00E-73	GTTGCTGAACACCT ACTGCTCTAGTIT	CTTGCTGTTTCTTAA GAGCAGAACTT	-1.03, -0.07	-2.22 a -1.70	139
10	GATA 3	GATA binding protein 3	<i>Taeniopygia guttata</i>	2121	0.0	CATAGTCAGGGGTC TGTTAATAATTTG	AACTGTCAAGACCAC CACTACCAC	-0.96	0.39 A. 19	114
11	TLR4	Toll like receptor 4	<i>Taeniopygia guttata</i>	750	0.0	AGATAGATGTGATC CTGTTAGAGGAGA	GAATTTAGGCCACA ACAGCATTACT	-1.98	-0.12 a 0.85	107
12	LY86	Lymphocyte antigen 86 (MD1)	<i>Taeniopygia guttata</i>	1989	0.0	CCCTCATAATAGAC ATGTTCTCCTTTTC	GAAGAAGTGTCCCTA ACCTACTCAGAGA	-0.43	-1.01	100
13	CDH23	Cadherin related 23	<i>Taeniopygia guttata</i>	473	1.00E-136	GTAGTACCAGTTC TGAGGATGAGA	CTTCAGGAACTACA ACGTGCTG	-1.49	-0.63, -0.15	149
14	SCN4A	Sodium voltage-gated channel alpha subunit-4	<i>Taeniopygia guttata</i>	82.4	4.00E-19	GTGTGCCTATGAT TTTGTAAA	ACAGCCACGATGAG GAAATC	0.02, 0.75	-0.18 a 0.79	69
15	LGALS3	Galectin 3	<i>Taeniopygia guttata</i>	952	0	GAACCTGGAAATTGC AGCAAGTAACCT	GTTTTACTGGGATT TCAAGAGAGG	0.65 A 1.49	0.54 A 1.52	100
16	JKAMP	JNK1MAPK9 associated membrane protein	<i>Pica pica</i>	322	3.00E-91	AGTGCAGGTGGTG ATGATG	CCTGGTACTCTGC TGCCTCA	-1.93	1.17 A 2.15	128
17	SIRT1	Sirtuin 1	<i>Pica pica</i>	1565	0.0	CTGCTGTTTCCCA TCTCGCTAT	CTAAGACTACTGT GGCAGCTAATTTT	1.40 a 2.38	-0.42 a 0.09	103
18	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	<i>Taeniopygia guttata / Pica pica</i>	944	0.0	AATCAGTAGCAAA TTACACAGCTC	CTGAAGTGTCCAC TATGAGAAGTIT	-1.26, -1.07	-0.56 a 0.40	110

## 7 FIGURAS.



**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR amplificados con primers diseñados a partir de ADN genómico de cálamo de plumas pertenecientes a *Setophaga petechia aureola*. El gel de agarosa al 1.5% indica amplificación de bandas en todos los genes en diferentes muestras de ADN, exceptuando en el gen LY86, GATA3 y una amplificación tenue en el gen SCN4A.



**Figura 2: Niveles de expresión de genes relacionados al estrés con expresión variable AU2M3 vs NO1M1** Las barras en color azul representan la expresión génica de la muestra con baja concentración de corticosteronas y las de color rojo el nivel de expresión de la muestra estresada NO1M1. Los niveles de expresión se midieron con respecto al  $2^{-\Delta\Delta CT}$  usando a las muestras con baja corticosterona como muestras sin tratamiento. Los asteriscos representan muestras que mostraron diferencias significativas por medio del uso de la prueba t de Student con varianza igual utilizando un  $\alpha=0.05$ .

## 8 REFERENCIAS.

- Alava, J. J., Palomera, C., Bendell, L., & Ross, P. S. (2014). Pollution as an Emerging Threat for the Conservation of the Galapagos Marine Reserve: Environmental Impacts and Management Perspectives. En J. Denkinger & L. Vinueza (Eds.), *The Galapagos Marine Reserve* (pp. 247-283). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-02769-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-02769-2_12)
- Arasappan, D., Fang, H., Perkins, R., & Tong, W. (2010). Interpretation of Toxicogenomics Data. En *Comprehensive Toxicology* (pp. 663-683). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00237-2>
- Ardila-Téllez, J. D., & Cruz-Bernate, L. (2014). *ASPECTOS ECOLÓGICOS DE LAS AVES MIGRATORIAS NEÁRTICAS EN EL CAMPUS DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE*. 16.
- 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>
- Bay, R., Karp, D., Saracco, J., Anderegg, W., Frishkoff, L., Wiedenfeld, D., Smith, T., & Ruegg, K. (2020). *Genetic variation reveals individual-level climate tracking across the full annual cycle of a migratory bird*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043331>
- Bello, N., Francino, O., & Sánchez, A. (2001). Isolation of Genomic DNA from Feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(2), 162-164. <https://doi.org/10.1177/104063870101300212>
- 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>

- Birnie-Gauvin, K., Peiman, K., Gallagher, A., de Bruijn, R., & Cooke, S. (2016). Sublethal consequences of urban life for wild vertebrates. *Environmental Reviews*, 24. <https://doi.org/10.1139/er-2016-0029>
- Browne, R. A., Collins, E., & Anderson, D. J. (2008). GENETIC STRUCTURE OF GALÁPAGOS POPULATIONS OF THE YELLOW WARBLER. *The Condor*, 110(3), 549-553. <https://doi.org/10.1525/cond.2008.8540>
- Browne, R. A., Collins, E. I., & Anderson, D. J. (2010). *MORPHOLOGICAL VARIATION OF GALAPAGOS ISLAND POPULATIONS OF THE YELLOW WARBLER DENDROICA PETECHIA AUREOLA*. 5.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Charles Darwin Foundation. (2020). *Galapagos Species Checklist*. Charles Darwin Foundation. <https://www.darwinfoundation.org/en/datazone/checklist>
- Chaves, J. A., Parker, P. G., & Smith, T. B. (2012). Origin and population history of a recent colonizer, the yellow warbler in Galápagos and Cocos Islands: Phylogeography of yellow warblers in Galápagos. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(3), 509-521. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02447.x>
- Cotter, P. F. (2015). An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. *Poultry Science*, 94(3), 512-517. <https://doi.org/10.3382/ps/peu009>
- Desalvo, M. K., Woolstra, C. R., Sunagawa, S., Schwarz, J. A., Stillman, J. H., Coffroth, M. A., Szmant, A. M., & Medina, M. (2008). Differential gene expression during thermal

- stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology*, 17(17), 3952-3971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03879.x>
- Díaz-Alvarez, L., & Ortega, E. (2017). The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9247574>
- Donaldson, R., Finn, H., Bejder, L., Lusseau, D., Calver, M., Gompper, M., & Williams, R. (2012). The social side of human–wildlife interaction: Wildlife can learn harmful behaviours from each other. *Animal Conservation*, 15. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2012.00548.x>
- Freeman, N. E., & Newman, A. E. M. (2018). Quantifying corticosterone in feathers: Validations for an emerging technique. *Conservation Physiology*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy051>
- 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., & Balsler, 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. (2020). 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>
- Haase, D., Güneralp, B., Dahiya, B., Bai, X., & Elmqvist, T. (2018). *Global Urbanization: Perspectives and Trends* (pp. 19-44). <https://doi.org/10.1017/9781316647554.003>

- Harvey, J. A., Chernicky, K., Simons, S. R., Verrett, T. B., Chaves, J. A., & Knutie, S. A. (2021). Urban living influences the nesting success of Darwin's finches in the Galápagos Islands. *Ecology and Evolution*, *n/a(n/a)*.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.7360>
- Hussain, M., & Imityaz, I. (2018). URBANIZATION CONCEPTS, DIMENSIONS AND FACTORS. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>
- Isaksson, C. (2018). Impact of Urbanization on Birds. En D. T. Tietze (Ed.), *Bird Species: How They Arise, Modify and Vanish* (pp. 235-257). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-91689-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91689-7_13)
- Islaqm, M. (2018). *Sample size and its role in Central Limit Theorem (CLT)*. 4, 1-7.
- Jax, E., Wink, M., & Kraus, R. H. S. (2018). Avian transcriptomics: Opportunities and challenges. *Journal of Ornithology*, *159(3)*, 599-629. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1532-5>
- Kondratyeva, A., Knapp, S., Durka, W., Kühn, I., Vallet, J., Machon, N., Martin, G., Motard, E., Grandcolas, P., & Pavoine, S. (2020). Urbanization Effects on Biodiversity Revealed by a Two-Scale Analysis of Species Functional Uniqueness vs. Redundancy. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00073>
- 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>
- León, L. F. D., Sharpe, D. M. T., Gotanda, K. M., Raeymaekers, J. A. M., Chaves, J. A., Hendry, A. P., & Podos, J. (2019). Urbanization erodes niche segregation in Darwin's

- finches. *Evolutionary Applications*, 12(7), 1329-1343.  
<https://doi.org/10.1111/eva.12721>
- Life Technologies. (2011). *RiboPure-Blood Kit*.
- 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>
- Løtvedt, P., Fallahshahroudi, A., Bektic, L., Altimiras, J., & Jensen, P. (2017). Chicken domestication changes expression of stress-related genes in brain, pituitary and adrenals. *Neurobiology of Stress*, 7, 113-121.  
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.08.002>
- Lynn, S. E., Perfito, N., Guardado, D., & Bentley, G. E. (2015). Food, stress, and circulating testosterone: Cue integration by the testes, not the brain, in male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *General and Comparative Endocrinology*, 215, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.03.010>
- McGranahan, G., & Satterthwaite, D. (2014). *Urbanisation concepts and trends*.
- Merino, S., Moreno, J., Tomás, G., Martínez, J., Morales, J., Puente, J. M.-D. L., & Osorno, J. L. (2006). Effects of parental effort on blood stress protein HSP60 and immunoglobulins in female blue tits: A brood size manipulation experiment. *Journal of Animal Ecology*, 75(5), 1147-1153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01135.x>
- Mewis, J. L., Sun, X., Zuidhof, M. J., & Guan, L. L. (2014). Research note: Methodology for high-quality RNA extraction from poultry whole blood for further gene expression analysis. *British Poultry Science*, 55(2), 194-196.  
<https://doi.org/10.1080/00071668.2014.888397>



- Ochoa, E. (2014). *Aves silvestres como bioindicadores de contaminación ambiental y metales pesados*. *CES Salud Pública*. 2014; 5: 59-69.
- Olias, P., Adam, I., Meyer, A., Scharff, C., & Gruber, A. D. (2014). Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in Multiple Avian Species. *PLoS ONE*, 9(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099678>
- Pacheco, K. (2020). *Estrés fisiológico y morfometría en poblaciones del Canario María Setophaga petechia aureola con distintos impactos antropogénicos en San Cristóbal, Galápagos*. Universidad San Francisco de Quito.
- Patterson, M. M., & Fee, M. S. (2015). Zebra Finches in Biomedical Research. En *Laboratory Animal Medicine* (pp. 1109-1134). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00023-7>
- Pazmiño, A., Serrao-Neumann, S., & Low Choy, D. (2018). Towards Comprehensive Policy Integration for the Sustainability of Small Islands: A Landscape-Scale Planning Approach for the Galápagos Islands. *Sustainability*, 10(4), 1228.  
<https://doi.org/10.3390/su10041228>
- Pérez-Mellado, V. (2010). Darwin y las islas. *Anuari ornitològic de les Balears: revista d'observació estudi i conservació dels aucells; Núm.: 23*.
- Porcel, R., Aroca, R., Azcón, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2006). PIP Aquaporin Gene Expression in Arbuscular Mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa Plants in Relation to Drought Stress Tolerance. *Plant Molecular Biology*, 60(3), 389-404.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-4210-y>
- Qiagen. (2019, diciembre 10). *CLC Genomics Workbench User Manual*.  
[http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/2000/User\\_Manual.pdf](http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/2000/User_Manual.pdf)

- 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.
- Rivas-Torres, G. F., Benítez, F. L., Rueda, D., Sevilla, C., & Mena, C. F. (2018). A methodology for mapping native and invasive vegetation coverage in archipelagos: An example from the Galápagos Islands. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 42(1), 83-111. <https://doi.org/10.1177/0309133317752278>
- Rojas, M., 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. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 170, e62379. <https://doi.org/10.3791/62379>
- Rojas, O., & Ortega, M. (2020). Primer registro de depredación de un gecko por un parúlido ( *Setophaga petechia aurea* ) en las Islas Galápagos. *Neotropical Biodiversity*, 6(1), 60-61. <https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1738030>

- 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>
- Tang, S., Zhou, S., Yin, B., Xu, J., Di, L., Zhang, J., & Bao, E. (2018). Heat stress-induced renal damage in poultry and the protective effects of HSP60 and HSP47. *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 1033-1040. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0912-3>
- Taylor, C. M., Jost, R., Erskine, W., & Nelson, M. N. (2016). Identifying Stable Reference Genes for qRT-PCR Normalisation in Gene Expression Studies of Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *PLOS ONE*, 11(2), e0148300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148300>
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, & Population Division. (2019). *World urbanization prospects: The 2018 revision*.
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., & Eens, M. (2008). Metallothioneins (MTs) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of The Total Environment*, 401(1-3), 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.009>
- Villegas, M., & Garitano, Á. (2008). Las comunidades de aves como indicadores ecológicos para programas de monitoreo ambiental en la ciudad de La Paz, Bolivia. *Ecología en Bolivia*, Vol. 43(2), 146-153. <https://ecologiaenbolivia.com/documents/Villegas432.pdf>

- 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), 447. <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), 44180. <https://doi.org/10.1038/srep44180>
- Wiedenfeld, D. (2006). Aves, The Galapagos Islands, Ecuador. *Check List*, *2*. <https://doi.org/10.15560/2.2.1>
- Wit, P. D., Pespeni, M. H., & Palumbi, S. R. (2015). SNP genotyping and population genomics from expressed sequences – current advances and future possibilities. *Molecular Ecology*, *24*(10), 2310-2323. <https://doi.org/10.1111/mec.13165>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yousefi, M., Shabunin, S. V., Vatnikov, Y. A., Kulikov, E. V., Adineh, H., Khademi Hamidi, M., & Hoseini, S. M. (2020). Effects of lavender (*Lavandula angustifolia*) extract inclusion in diet on growth performance, innate immunity, immune-related gene expression, and stress response of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, *515*, 734588. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734588>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406-3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Zúñiga, M. (2016). *“ESTUDIO DE IMPACTO DEL TRÁFICO VEHICULAR SOBRE LAS AVES EN LAS VÍAS PRINCIPALES DE LA ISLA SANTA CRUZ, PROVINCIA DE GALÁPAGOS”*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

## 9 ANEXOS.

### Anexo 1

#### **Extracción de ADN genómico a partir de cálamo de pluma y validación de primers**

Se hizo uso del protocolo desarrollado por Bello et al., (2001) con modificaciones. Primero se cortó longitudinalmente al cálamo de pluma de *Setophaga petechia aureola* en una caja Petri para luego colocarlo dentro de un tubo Eppendorf con 5.83 µl de Proteinasa K 15 mg/ml disuelto en 500 µl Buffer de lisis. Posterior, se incubó el tubo a 56 °C por 12 horas y centrifugó a 12000g por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf donde se colocó 1 volumen (Vol) de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, se centrifugó a 16000g por 5 min donde se recuperó el sobrenadante para ser lavado con 1 Vol de Cloroformo. Se centrifugó a 16000g por 5 min para repetir el paso de cloroformo y centrifugación con 2 Vol de Cloroformo. Se recuperó el sobrenadante para luego añadir 50 µl de 2M NaCl y 2 Vol de EtOH absoluto. Se incubó a -20°C por 12 horas y se centrifugó a 9000 rpm por 20 min. Se lavó con 500 µl de EtOH 75% y se dejó secar el pellet para resuspenderlo en 30 µl de agua ultrapura.

## **Anexo 2**

### **Extracción de ARN a partir de sangre**

Se hizo uso de un protocolo desarrollado por Galen et al., (2020) y M. Rojas et al., (2021) Donde se centrifugó la muestra que contiene sangre y RNALater por un minuto a 8000 g. La sangre y el pellet formado se pipetó dentro de un nuevo tubo Eppendor de 1.5 ml con 500 µl de Trizol. Se tomó todo el volumen de sangre y Trizol dentro de una jeringuilla y se dispensó en un nuevo tubo. Se repitió el proceso con la jeringuilla 10 veces hasta eliminar la posible presencia de coágulos. Se añadió 500 µl de Trizol y realizó vortex por 30 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y añadió 400 µl de cloroformo frío con vortex. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y centrifugó a 4°C a velocidad máxima por 30 minutos. Pasado este tiempo 50-60% del volumen se presentó en forma de una fase acuosa clara. Se colectó 500 µl de fase acuosa y dispensó en 500 µl de isopropanol frío con 5 µl de Glycoblue seguido de un vortex. Se incubó por 5 minutos a -20°C y por 10 minutos a 4°C. Se centrifugó a 13000 g por 20 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante. Al pellet encontrado en el tubo se resuspendió en 50 µl de agua DEPC y se añadió 50 µl de NH<sub>4</sub>Ac 5M y 250 µl de EtOH absoluto. Esta muestra se incubó a -20 °C por 12 horas para centrifugar a 13000 g por 20 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se procedió a lavar el pellet con 1 ml de etanol a -20°C 80% . Una vez lavado el pellet se centrifugó a 8000g por 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire por aproximadamente 15 minutos. Se resuspendió en 30 µl de Agua PCR y se cuantificó el ARN con el kit Qubit High Sensitivity o Broad Range.