

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**LONGITUD RELATIVA DE LOS TELÓMEROS EN UN AVE DE PASTIZAL EN  
DECLIVE *Ammodramus savannarum* EN EL NORTE DE MÉXICO  
POR**

**LEONARDO DAVID MIJARES VILLARREAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN  
CONSERVACIÓN, FAUNA SILVESTRE Y SUSTENTABILIDAD**

**2023**

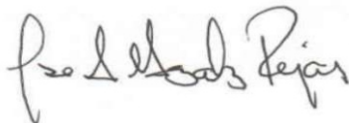
**LONGITUD RELATIVA DE LOS TELÓMEROS EN UN AVE DE PASTIZAL EN DECLIVE  
(*Ammodramus savannarum*) EN EL NORTE DE MÉXICO**

COMITÉ DE TESIS



---

Dr. Ricardo Canales del Castillo



---

PRESIDENTE

Dr. José Ignacio González Rojas

SECRETARIO



---

Dr. José Gerardo Ham


VOCAL



---

Juan Pablo Ceyca Contreras

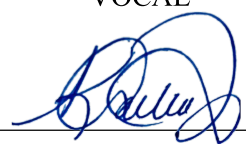
VOCAL



---

Dra. Irene Ruvalcaba Ortega

VOCAL



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño

SUBDIRECTORA DE  
POSGRADO

**LONGITUD RELATIVA DE LOS TELÓMEROS EN UN AVE DE PASTIZAL EN DECLIVE  
(*Ammodramus savannarum*) EN EL NORTE DE MÉXICO**

**COMITÉ DE TESIS**



---

Dr. Ricardo Canales del Castillo



---

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila  
ASESOR-EXTERNO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN1609-21, y 317-CN-2022. Así como por el proyecto Reestablishment of connectivity in priority grasslands of the Southern Chihuahuan Desert, Mexico Phase IV(F20AP11826-00), financiado por Neotropical Migratory Bird Conservation Act/US Fish and Wildlife Service



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ricardo Canales del Castillo y a la Dra. Irene Ruvalcaba Ortega por su apoyo, confianza, y educación constante. Un agradecimiento especial al Dr. Ricardo Canales del Castillo, por fungir como mentor tanto en mi vida personal como en mi carrera profesional, guiándola por el camino de la ética y las buenas prácticas a favor del desarrollo de la ciencia.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al Dr. Ricardo Vázquez por facilitar acceso al Rancho Ganadero Experimental “Los Ángeles” donde realizamos muestreos del organismo de interés durante el invierno del 2021 - 2022.

Un agradecimiento a todas mis amistades académicas que no dejaron de apoyarme a lo largo de la realización del proyecto, como Luis Alexander Peña Peniche, Luz Adriana Pérez, y Eliphaleth Carmona Gómez.

A mis hermanos, Eugenio Mijares Villarreal y Sara Mijares Villarreal.

Un agradecimiento al Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León por su asesoría especializada en la técnica de qPCR, así mismo a los integrantes de mi comité de tesis por su asesoría y disposición para la finalización de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a mis padres, Karina Villarreal Favela y Hernán Israel Mijares Contreras; por apoyarme durante toda mi carrera profesional y formar en gran parte la persona que soy.

A mi sobrino Santiago Mendoza Alanís.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
ANTECEDENTES.....	10
<i>Reducción de la longitud de telómeros a causa de estrés.</i> .....	10
<i>Sexo</i> .....	11
<i>Hábitat</i> .....	12
<i>Tipos de muestra y la longitud relativa de telómeros</i> .....	12
<i>Métodos de evaluación de estrés crónico e IMC</i> .....	12
<i>Métodos utilizados en la determinación de la longitud de los telómeros</i> .....	14
<i>Gorrión Chapulín (Ammodramus savannarum)</i> .....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVO.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
<i>Área de estudio</i> .....	19
<i>Método de captura</i> .....	20
<i>Extracción de ADN de plumas</i> .....	21
<i>Sexado molecular</i> .....	21
<i>Cociente heterófilos: linfocitos (H/L)</i> .....	24

<i>Índice de Masa Corporal (IMC)</i> .....	24
<i>Análisis</i> .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	25
<i>Muestreo</i> .....	25
<i>Estimación del IMC escalado entre sexos</i> .....	26
<i>Estandarización de la longitud relativa de los telómeros</i> .....	28
<i>Estimación de la longitud relativa en de los telómeros en comparación del sitio en muestras de sangre y pluma</i> .....	30
<i>Índice de masa corporal y sexo.</i> .....	41
<i>Comparar la longitud relativa de los telómeros entre ambas muestras de tejidos (sangre y pluma) de aves.</i> .....	42
<i>Efecto del sitio y el sexo</i> .....	42
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	43
<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	División celular ocasiona reducción constante en los telómeros.	8
2	Representación del efecto del estrés crónico en las estructuras teloméricas.	11
3	Representación de la estimación relativa de la longitud de los telómeros (T) mediante la comparación de un gen constitutivo con una sola copia (S).	14
4	Distribución del gorrión chapulín ( <i>Ammodramus savannarum</i> )	19
5	Representación gráfica de una electroforesis automatizada en el sistema TapeStation.	23
6	Gráficos de cajas comparando el índice de masa corporal (IMC) escalado entre machos y hembras del gorrión chapulín ( <i>A. savannarum</i> ).	27
7	Gráfico de la curva estándar del Gen TEL 1b y 2b.	29
8	Gráfico de la curva estándar del Gen GAPDHF y GAPDHR.	30
9	Gráfico de la caja de la longitud de telómeros en muestras de sangre de las especies de <i>A. savannarum</i> .	32
10	Gráfico de la caja de la longitud de telómeros en muestras de pluma de las especies de <i>A. savannarum</i> .	32
11	Gráfico de la caja de la longitud de telómeros en muestras de sangre de las especies de <i>A. savannarum</i> de ambos sexos.	33
12	Gráfico de la caja de la longitud de telómeros en muestras de pluma de las especies de <i>A. savannarum</i> de ambos sexos.	34
13	Histograma que muestra la diferencia entre T/S de pluma y sangre.	35
14	Diagrama de dispersión de la longitud de telómeros entre dos tejidos: Sangre y pluma. Muestras obtenidas de <i>A. ammodrammus</i> .	36
15	Representación gráfica de la diferencia ente la longitud de los telómeros pluma en contraste con el cociente H/L.	37
16	Representación gráfica de la diferencia ente la longitud de los telómeros pluma en contraste con el IMC escalado.	38
17	Representación gráfica de la diferencia ente la longitud de los telómeros en sangre en contraste con el cociente H/L.	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Número de muestras del gorrión chapulín ( <i>Ammodramus savannarum</i> ) obtenidas durante la temporada invernal (2018 – 2019) en tres Áreas Prioritarias para la Conservación de Pastizales.	26
<b>2</b>	Promedio e intervalos de confianza de 95% de tarso, y pesos utilizados para el índice de masa corporal por sitio y sexo para individuos capturados durante la temporada invernal 2018-2019, así como el registro total del proyecto de 2015 -2019.	28
<b>3</b>	Promedio e intervalos de confianza de 95% de la longitud de los telómeros en cada uno de los GPCA´s muestreados, así como en cada uno de los sexos.	31
<b>4</b>	Evaluación de combinaciones para la determinación del mejor modelo en muestras procedentes del plumaje.	39
<b>5</b>	Evaluación del modelo lineal en sangre, el modelo utilizado constó de las siguientes variables: Sexo, Cociente H/L ((H/L), y Sexo.	40
<b>6</b>	Evaluación de combinaciones para la determinación del mejor modelo en muestra sanguíneas.	40
<b>7</b>	Evaluación del modelo lineal en plumaje, el modelo utilizado constó de las siguientes variables: Sexo, Cociente H/L ((H/L), e índice de masa corporal escalado (IMC).	41

## RESUMEN

Los telómeros son estructuras de ADN comprimido que se localizan en las regiones terminales de los cromosomas, los cuales reducen su longitud con cada división celular. Además, factores genéticos (genes relacionados con la enzima telomerasa) y no-genéticos (estrés crónico debido a factores ambientales, antropogénicos, actividades características del ciclo vital del ave y calidad del hábitat) pueden provocar alteraciones en la longitud telomérica. El gorrión chapulín (*Ammodramus savannarum*) es un ave paseriforme migratoria y obligada de pastizal, que se distribuye durante el invierno en el Desierto Chihuahuense y cuyas poblaciones muestran una tendencia negativa desde hace 50 años. Es por ello que se estimó la relación de la longitud relativa de los telómeros en esta especie con la condición física del ave, mediante el Índice de Masa Corporal, (IMC), el sexo, el cociente Halterófilo/Linfocito (H/L) y el sitio de captura. Para determinar la longitud de los telómeros, se obtuvieron muestras de sangre y plumas de 114 individuos de poblaciones invernales en tres Áreas Prioritarias para la Conservación de los Pastizales (GPCA, por sus siglas en inglés): Valle Colombia, Mapimí, y El Tokio. Se determinó el IMC con medidas de tarso y peso, mientras que el sexo se determinó molecularmente. Se observó que la longitud relativa de los telómeros fue menor en hembras, además se encontró una variación geográfica significativa, en ambos tejidos, siendo consistentemente menor en Mapimí. La comparación entre la estimación de los telómeros en pluma y sangre, mostró que existe una diferencia significativa entre ellas, siendo mayor en pluma que en sangre. La selección de los mejores modelos para los tejidos, muestran que tanto como el sitio, el sexo son variables predictivas, para ambos, pero difiriendo en el cociente H/L para sangre y el IMC para pluma. Este estudio nos permitió explorar el alcance que posee la incorporación de la estimación relativa de los telómeros en especies migratorias, a partir de diferentes tejidos, para explorar los aspectos fisiológicos asociados a sus historias de vida.

## ABSTRACT

Telomeres are compressed DNA structures located in the terminal regions of chromosomes, which reduce in length with each cell division. In addition, genetic factors (genes related to the telomerase enzyme) and non-genetic factors (chronic stress due to environmental and anthropogenic factors, characteristic activities of the bird's life cycle and habitat quality) can cause alterations in telomeric length. The grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum*) is a migratory and obligate passerine bird of grasslands, which is distributed during the winter in the Chihuahuan Desert and whose populations have shown a negative trend for 50 years. That is why the relationship of the relative length of telomeres in this species with the physical condition of the bird (BMI), sex, heterophile/lymphocyte ratio, and site was estimated. To determine telomere length, blood and feather samples were obtained from 114 individuals from wintering populations in three Priority Grassland Conservation Areas (GPCAs): Valle Colombia, Mapimí, and El Tokio. BMI was determined with tarsus and weight measurements, while sex was determined molecularly. It was observed that the relative telomere length was shorter in females, and a significant geographic variation was found in both tissues, consistently shorter in Mapimí. The comparison between the estimation of telomeres in feather and blood showed that there is a significant difference between them, being greater in feather than in blood. The selection of the best models for the tissues, show that both site and sex are predictive variables, for both, but differing in the H/L ratio for blood and BMI for feather. This study allowed us to explore the scope for incorporating relative telomere estimation in migratory species from different tissues to explore physiological aspects associated with their life histories.

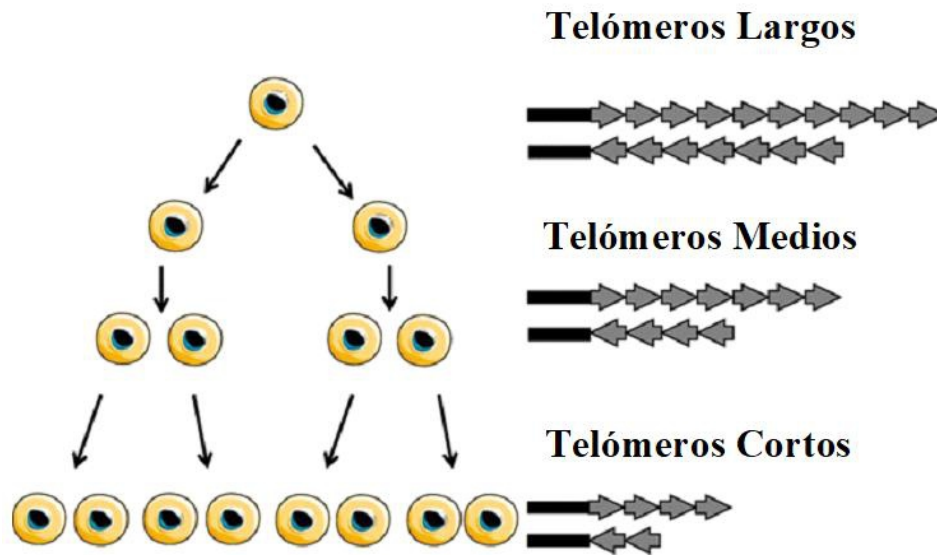


## INTRODUCCIÓN

Los telómeros son estructuras de ADN comprimido localizados en las regiones terminales de los cromosomas; en vertebrados se encuentran compuestos por la secuencia nucleotídica repetitiva no codificante TTAGGG (Bodnar, 2009; Iwasa & Marshall, 2016b). Los telómeros se acortan con cada división celular (su longitud se asocia con la edad); por lo que su integridad y la del cromosoma dependen de la enzima telomerasa, la cual provee de protección a los extremos terminales, inhibiendo el entrelazamiento de estos (Iwasa & Marshall, 2016b). La inhibición de esta enzima provoca un fallo en los mecanismos de reparación de los telómeros, lo cual acelera el acortamiento en su longitud y la senescencia de la célula (Alberts et al., 2013; Iwasa & Marshall, 2016b, Spurgin et al., 2018; Figura 1). Esta inhibición puede ser ocasionada por dos tipos de factores: genéticos y no genéticos (Morinha et al., 2020). En su mayoría, los factores genéticos suelen generar un crecimiento desmedido de la longitud telomérica, esto impide que las células mueran, volviéndolas cancerosas (Blackburn et al., 2015). Por otra parte, los factores no-genéticos se asocian principalmente con el aumento de hormonas glucocorticoides, así como del estrés oxidativo, los cuales reducen la actividad de la telomerasa y provocan un acortamiento en la longitud telomérica (Choi et al., 2008). En primera instancia, el estrés oxidativo provoca cambios en las bases de guanina, así como roturas en la doble cadena del ADN telomérico, y a diferencia de la mayor parte del ADN genómico, las guaninas sufren de modificaciones oxidativas por lo que el ADN telomérico es incapaz de repararse por medio de sus mecanismos de reparación (inhibición en la telomerasa; Houben et al., 2008). Por otra parte, el aumento de los glucocorticoides sucede como respuesta de los individuos a altos niveles de estrés durante largos periodos de tiempo (estrés crónico; Beery et al., 2012).

Algunos de los factores que inducen dicho estrés son los cambios ambientales, alimenticios, y en la calidad de hábitat, como lo son: la fragmentación de la vegetación, calidad de alimento, y grado de perturbación humana (Hall et al., 2004; Haussmann et al., 2003; Mizutani et al., 2013; Spurgin et al., 2018). En aves, la longitud de las estructuras teloméricas puede ser utilizado como una herramienta para evaluar la condición, por ejemplo se ha visto que la longitud de los telómeros es un predictor de la habilidad que poseen a nivel individual para poder desempeñar acciones como lo es el forrajeo, es decir entre más pequeños sean los telómeros es posible que el individuo gaste

más energía y sea menos efectivo al alimentarse (Angelier et al., 2019), por lo tanto puede ser un indicador indirecto de la calidad del hábitat.



**Figura 1.** División celular ocasiona reducción constante en los telómeros. Imagen modificada a partir de Lai et al., 2018.

Uno de los ecosistemas con mayor pérdida en su extensión ( 50%) y degradación funcional a nivel Norteamérica es el pastizal nativo (Hoekstra et al., 2005); debido principalmente a la expansión de zonas agrícolas que provoca pérdida y fragmentación del hábitat, y al sobrepastoreo de ganado que acelera la desertificación (lo que causa una baja producción de semillas y de cobertura) y promueve la invasión arbustiva, principalmente de mezquite (*Prosopis* sp.) (Hoyt, 2002; Cotera et al., 2004; Sarukhán, 2006; Macías-Duarte et al., 2011). Las aves adaptadas a este ecosistema, dependen totalmente de él para alimentarse, reproducirse y encontrar refugio de los depredadores (Macías-Duarte et al., 2011), de manera que el 68% de las aves de pastizal muestran tendencias poblacionales negativas en los últimos 50 años (Sauer et al., 2020). Los factores ambientales y antropogénicos que afectan a los pastizales en su extensión y funcionalidad varían espacialmente, por lo que las condiciones locales particulares afectan la condición física a nivel individual y poblacional en las especies (Burraco et al., 2021).

El gorrión chapulín (*Ammodramus savannarum*) es una especie de pastizal mayoritariamente migratoria, que anida en EU y Canadá e inverna en el sur de EU, México y Centroamérica (Fink et al. 2022) y que ha mostrado un declive poblacional de -2.5% anual en su rango reproductivo en

EU y Canadá en los últimos 50 años (1966-2019; Sauer, et al. 2020). Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar la asociación del estrés crónico a través del cociente H/L, la condición individual a través IMC, el sexo, y el sitio de captura durante el periodo invernal, con la longitud de los telómeros de esta especie en tres Áreas Prioritarias para la Conservación de Pastizales (GPCA's por sus siglas en inglés (Grassland Priority Conservation Areas) dentro de la ecorregión del Desierto Chihuahuense: Tokio, Mapimí, y Valle Colombia.

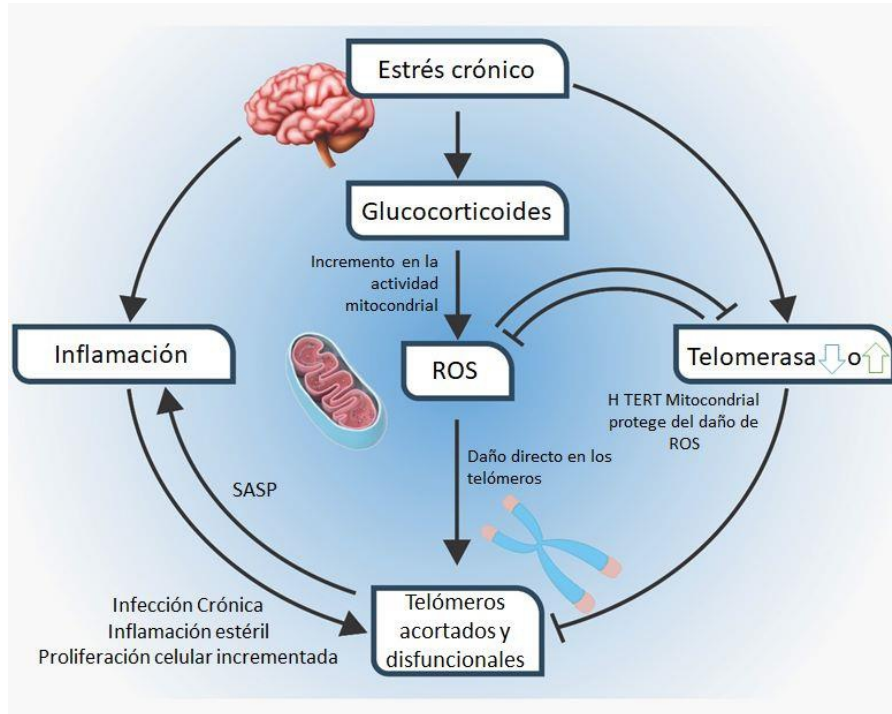
## ANTECEDENTES

### *Reducción de la longitud de telómeros a causa de estrés.*

Se ha encontrado que una exposición prolongada a la hormona del estrés, cortisol, y en general de cualquier glucocorticoides, provoca un acortamiento en la longitud de los telómeros (Costantini et al., 2011); y aunque existen diferentes estimaciones sobre cómo actúa el cortisol sobre los telómeros, se ha confirmado que una alta producción de cortisol, genera un efecto de baja actividad sobre la enzima telomerasa, provocando una reducción en la actividad de los mecanismos de reparación de los telómeros (Choi et al., 2008). La presencia de estresores provoca tres mecanismos de acción de los glucocorticoides sobre la longitud de los telómeros: 1) producción de radicales libres, 2) efectos en la división celular y el fallo en los extremos terminales (efectos relacionados al aumento de la edad en los individuos) y 3) una disminución en el mantenimiento de los telómeros lo que provoca la senescencia de la célula (Hausmann & Marchetto, 2010). Aunado a esto, se afirma que los glucocorticoides generan un aumento del estrés oxidativo (Costantini et al. 2011); su daño principal se centra en la ruptura de cadenas simples de ADN (Petersen et al. 1998), las cuales se reparan a una velocidad menor o incompleta en comparación al resto del ADN genómico (Richter et al. 2007); proponiéndose que la proteína TRF2 (Factor de Unión a repeticiones Teloméricas 2) se une a los extremos terminales de los telómeros, bloqueando el acceso a los complejos de reparación del ADN, inhibiendo la reparación de las estructuras teloméricas (Figura 1; Richter et al., 2007).

### *Estresores ambientales que afectan la longitud de los telómeros*

Los estresores ambientales pueden provenir de distintas fuentes como efecto de los cambios ambientales, alimenticios, en la calidad de hábitat y efectos resultantes del parasitismo (Hall et al., 2004; Hausmann et al., 2003; Mizutani et al., 2013; Spurgin et al., 2018).



**Figura 2.** Representación del efecto del estrés crónico en las estructuras teloméricas. Ruta fisiológica que siguen los glucocorticoides hasta los cromosomas y su acción sobre los telómeros. Imagen modificada a partir de Lin & Epel, 2022.

### ***Parasitismo***

Existe una gran variedad de estudios en los que se evalúan diversos factores que son causa de estrés en aves. Entre ellos, se determinó que una infección leve, pero crónica, por parásitos hemosporidios causantes de malaria aviar, reduce la duración de la vida en el carricero tordal (*Acrocephalus arundinaceus*), aparentemente por una degradación de los telómeros (Asghar et al. (2015). Este efecto de acortamiento se puede observar de igual manera en seis órganos distintos del lúgano (*Spinus spinus*), indicando, que los costos del parasitismo son similares en diferentes tejidos (Asghar et al., 2016).

### ***Sexo***

Ahora bien, existen diversos trabajos que han explorado la diferencia en la longitud de los telómeros entre sexo, encontrando resultados diversos. Por ejemplo, en aves residentes adultas como el cotorro gris (*Psittacus erithacus erithacus*), el sexo no fue un factor relevante fuera de la temporada de anidación, a diferencia de la edad y efectos relacionados por actividades del ámbito hogareño (protección de nido, forrajeo, defensa de territorio, etc.), que mostraron un efecto

negativo sobre la longitud de los telómeros (Aydidonat et al. 2014). Sin embargo, durante la reproducción sí se ha mostrado que el sexo es un factor importante. Durante el cuidado parental de las crías y asociado a un incremento del estrés (este evaluado por medio de corticosteroides), las hembras muestran un acortamiento mayor de telómeros que los machos (Muriel et al., 2013). De manera similar, se ha comprobado que a mayor número de crías en el estornino negro (*Sturnus unicolor*), el estrés de las mismas incrementa de manera general, pero, alcanza mayores niveles de estrés y menor longitud de telómeros en hembras que en machos (Gil y Pérez-Rodríguez, 2013).

La evaluación del efecto del sexo en organismos migratorios, fue realizado posteriormente en el junco ojos negros (*Junco hyemalis*); encontrando que los telómeros de los machos presentan una longitud menor que las hembras, pero ambos presentan longitudes menores que aves residentes de la misma especie (Bauer et al. 2016). Los machos de esta misma especie también mostraron telómeros más cortos que las hembras en sitios no reproductivos con menor disponibilidad de alimento, (Angelier et al., 2013).

### ***Hábitat***

La relación entre la calidad del hábitat y la longitud de los telómeros se ha evaluado en el pavito migratorio (*Setophaga ruticilla*) en distintos sitios durante la temporada invernal, encontrando una menor longitud telomérica en individuos usando hábitats con mala condición que aquellos en hábitats de mejores condiciones (Vleck et al., 2013).

### ***Tipos de muestra y la longitud relativa de telómeros***

La estimación de la longitud relativa de los telómeros es usualmente medida mediante muestras de sangre periférica en aves; sin embargo, se ha comprobado que el efecto de acortamiento se mantiene también en el resto de órganos internos (corazón e hígado), en el pinzón cebra *Taeniopygia guttata* (Reichert et al., 2013). Sin embargo, si se han encontrado diferencias en la cuantificación telomérica entre sangre y plumas de juveniles y adultos del papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*); observándose una menor longitud relativa en plumas en comparación con la sangre de juveniles, debido a los procesos de muda, pero no en los organismos adultos (Kärkkäinen et al., 2020).

### ***Métodos de evaluación de estrés crónico e IMC***

En aves se han utilizado dos métodos principales para evaluar niveles de estrés; ya sea por medición directa del nivel de glucocorticoides, principalmente aquellos presentes en el torrente

sanguíneo del organismo o por medio del cociente de H/L, el cual es conocido por ser un estimador del estrés crónico (Davis et al., 2008). Este último, resulta más confiable ya que se ha mostrado que no se ve afectado por el estrés producido durante la captura o manipulación del individuo Davis et al (2008), mientras que los niveles de glucocorticoides medidos en sangre sí son alterados en aproximadamente 30 min o menos (Lindström et al., 2005).

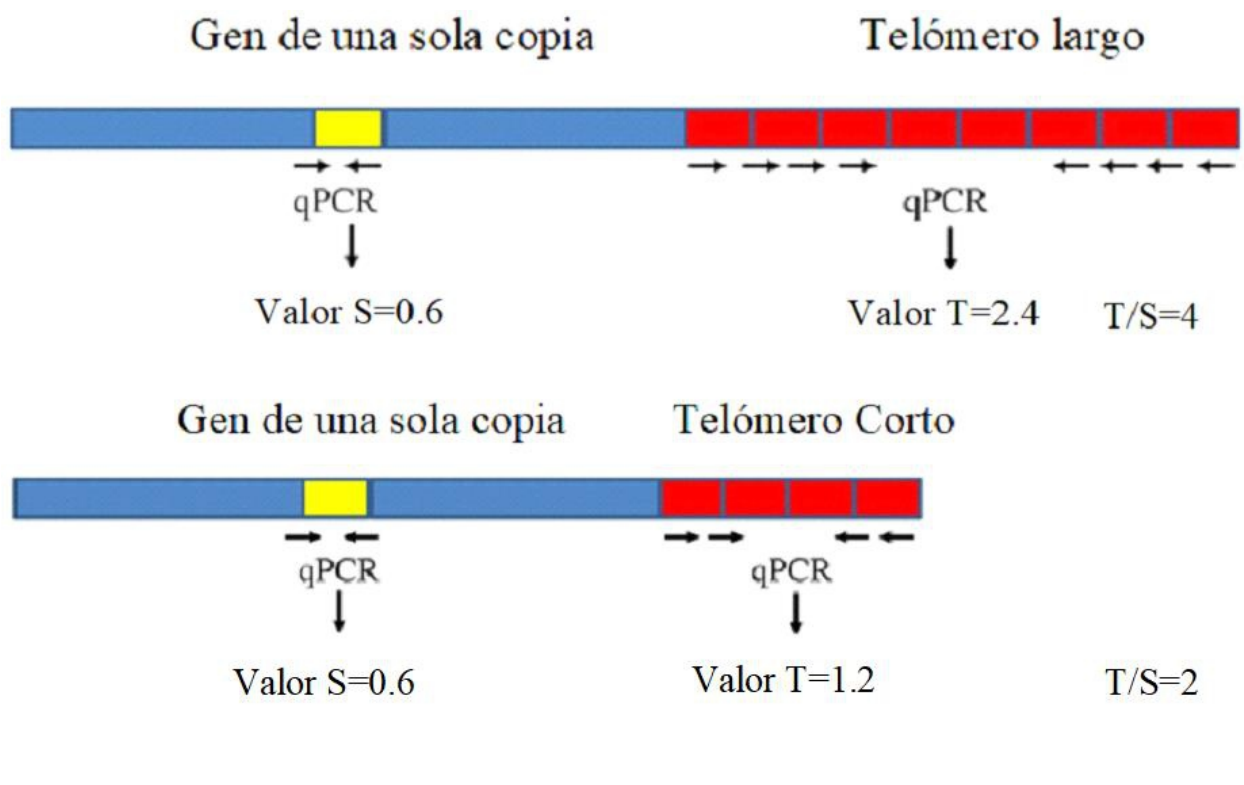
Otro indicador de condición fisiológica en aves, es el índice IMC, el cual es medido por medio de la longitud del ala, cola o tarso (en caso de muda) y la masa del individuo; aunque la medición en tarso suele preferirse, ya que es una medida con menor variación, así susceptible a variaciones de factores externos (Paterson & Lello, 2003). Ambos indicadores están estrechamente relacionados, debido a que un aumento de las hormonas del estrés (glucocorticoides), evita la síntesis de proteínas provocando un descenso en la masa muscular (Davis et al., 2008; Malheiros et al., 2003; Zehindjiev et al., 2012). Sin embargo, este no es el único factor que puede alterar la medida; se ha probado una asociación negativa entre la mala calidad de hábitat y la condición física de individuos del herrerillo común (*Cyanistes caeruleus*; Dias et al., 1996).

La medición de los niveles de estrés para estudios ecológicos, tienen como finalidad diferenciar alteraciones en el ambiente que perjudiquen al estado homeostático de los individuos de interés (Boonstra, 2013). Aunque el aumento de estas hormonas durante breves periodos de tiempo, aumenta la probabilidad de supervivencia (Ketterson et al., 2015), a largo plazo se interrumpe la homeostasis dando paso a una producción constante de estas hormonas (estrés crónico), lo cual no solo provoca inmunodeficiencia, sino una alteración en el crecimiento del individuo, así mismo, se generan graves pérdidas proteicas en los tejidos, así como modificaciones en las funciones neuronales y reproductivas (Bergeon et al., 2014). La interrupción de la homeostasis es causada principalmente por cambios drásticos en el ambiente (Walker et al., 2015), los cuales se pueden caracterizar por alimentación escasa, cambios extremos en las condiciones climáticas, presión por competitividad y depredación (Bruijn & Romero, 2011). Existen distintas formas en las que se es posible detectar el efecto de la calidad de hábitat sobre la avifauna (Pidgeon et al., 2006). Por ejemplo, se ha determinado que en los hábitats donde los recursos alimenticios son escasos, individuos de pavito migratorio (*Setophaga ruticilla*) presentaban índices altos de corticosteroides, y una pérdida de peso, sugiriendo que dichos individuos podrían no recuperarse por completo de dicha pérdida (Marra y Holberton, 1998).



### *Métodos utilizados en la determinación de la longitud de los telómeros*

De los métodos más comunes para realizar una evaluación relativa de las estructuras teloméricas es la metodología empleada de la qPCR (Figura 3), en la cual se resaltan dos técnicas distintas: TaqMan (Holland et al., 1991) y SybrGreen (Cawthon et al., 2002). La primera técnica utiliza sondas las cuales al unirse al fragmento de interés puede generar una señal fluorescente (Holland et al., 1991). Sin embargo, la técnica SybrGreen es técnicamente un colorante el cual se intercala en la doble cadena de ADN para lograr el monitoreo de la amplificación del gen de interés (Cawthon et al., 2002). Aunque ambas son eficientes, el SybrGreen es altamente recomendado gracias a su gran funcionalidad y menor costo de adquisición (Cao & Shockey, 2012).



**Figura 3. Representación de la estimación relativa de la longitud de los telómeros (T) mediante la comparación de un gen constitutivo con una sola copia (S). La estimación representada como T/S se considera absoluta. Imagen modificada a partir de Lai et al., 2018.**

### **Gorrión Chapulín (*Ammodramus savannarum*)**

Estos pequeños gorriónes miden de 10 a 14 cm de largo. Los adultos tienen el dorso vetado de marrón, gris, negro y blanco; mientras que el pecho posee un color marrón claro, el vientre blanco y la cola corta de color marrón. El rostro es de color marrón claro con un anillo en los ojos y una



corona de color marrón oscuro con una franja clara central estrecha. Existen variaciones regionales en la apariencia de esta ave (History et al., 1985). Su dieta consiste en granos e insectos, y presenta preferencia por áreas abiertas cubiertas de pastizal (Ossa & Olave-Gómez, 2015).

En cuanto a su ámbito reproductivo, generalmente se reproducen en mayo a agosto. Tienen a una sola pareja de por vida, con las cuales pueden llegar a poner hasta cuatro huevos blancos con manchas grisáceas o rojizas, por cada temporada reproductiva. Usualmente colocan su nido en el suelo, utilizando ramas de pasto seco y juncos como materiales. En cuanto a su estado de conservación a nivel global no se encuentra dentro de ninguna lista en las cuales se les pueda categorizar dentro de algún estatus de riesgo. Sin embargo, sus poblaciones actuales se encuentran en disminución debido a la pérdida de su territorio (Ossa & Olave-Gómez, 2015).

## JUSTIFICACIÓN

La longitud de los telómeros permite conocer la historia de vida de los organismos. Este acortamiento es natural con el crecimiento del individuo. A su vez, esta reducción está asociada al estrés provocado por distintos factores, entre los cuales, los ecológicos suelen ser los más comunes, y en su mayoría involucrados al ciclo anual, entre los cuales la reproducción y la migración suelen ser los procesos que representan mayor desgaste físico para los individuos, así mismo, existen una gran variedad de agentes estresantes, entre ellos el parasitismo, cambios en las condiciones del hábitat, y variaciones hormonales. Dichos factores influyen en la capacidad de tolerancia fisiológica que poseen los individuos para adecuarse a estos cambios, lo que ocasiona diferencias individuales, así como en poblaciones dentro de la misma especie. Además, dichos factores podrían tener diferentes efectos según el tejido. Así pues, con el propósito de observar el efecto de las variables potencialmente estresantes en las poblaciones invernales del gorrión chapulín en tres GPCA's del territorio del Desierto Chihuahuense, se evaluaron los indicadores fisiológicos de H/L, IMC y longitud relativa de los telómeros en dos tejidos.

## HIPÓTESIS

Dada que la longitud relativa de los telómeros del gorrión chapulín (*A. savannarum*) en distintos tejidos será afectada negativamente por las condiciones del hábitat invernal, así como de las condiciones en la etapa reproductiva previa; por lo que, si dichas condiciones fueron malas, causarán estrés crónico y reducirán la condición física:

- a) Altos niveles del cociente H/L (indicador de estrés crónico) y un menor índice de masa corporal (indicador de la condición física) estarán relacionados con una menor longitud relativa de telómeros.
- b) Las longitudes relativas de los telómeros entre tejidos (pluma y sangre) mostrarán diferencias a nivel individual, sin embargo, a nivel poblacional será posible encontrar una similitud en las tendencias de las longitudes teloméricas.

## OBJETIVO

### *Objetivo general*

- Evaluar la asociación entre la longitud relativa de los telómeros y la condición de estrés crónico y condición física en tres poblaciones invernales del gorrión chapulín (*A. savannarum*) en el Desierto Chihuahuense.

### *Objetivos específicos*

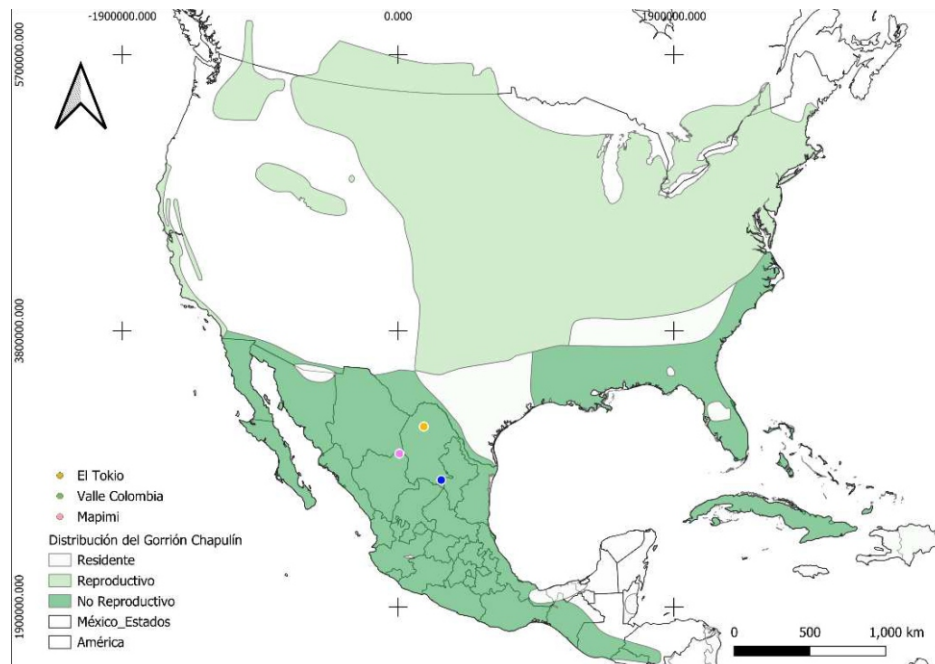
- Estimar el índice de masa corporal mediante la longitud del tarso y la masa del ave, como indicador del estado físico.
- Estimar el cociente H/L, como indicador de estrés crónico, mediante conteos de células blancas a partir de frotis sanguíneos.
- Estimar el sexo de las aves mediante el método de PCR a partir de muestras de sangre.
- Estimar la longitud relativa de los telómeros por medio de un gen constituyente GAPDH, a través del método de qPCR y a partir de muestras de sangre y pluma.
- Comparar la longitud relativa de los telómeros en sangre y pluma.
- Evaluar la el índice de masa corporal, el cociente H/L, el sexo y el sitio como predictores la longitud relativa de los telómeros en *A. savannarum* invernando en el Desierto Chihuahuense mediante modelos lineares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

Se muestrearon un total de tres Áreas Prioritarias para la Conservación de Pastizales (GPCA, por sus siglas en inglés; CEC & TNC, 2005, Pool & Panjabi, 2010), ubicados en el este de la ecorregión del Desierto Chihuahuense, en el norte de México: (El Tokio, Mapimí, y Valle Colombia; Fig. 4.):

- Mapimí: por su parte es una reserva de la biosfera, cuyos pastizales nativos se encuentran en recuperación, con un porcentaje del 46% de pastizal nativo y el 51% de pastizal halófilo (Panjabi et al., 2010).
- Valle Colombia: específicamente el sitio visitado es un rancho ganadero, el cual se dedica a la ganadería rotativa, lo que permite la recuperación de los pastizales nativos. El sitio tiene una cobertura de pastizal del 50% la cual en su mayoría pertenece a pastizal nativo (Panjabi et al., 2010).
- El Tokio: aunque posee parches de pastizal remarcados, el sitio muestreado fue en la periferia de una estación de estudio llamado Rancho los Ángeles, el cual pertenece a la Universidad Agraria Antonio Narro. El pastizal en esta zona está representado por una cobertura del 22% principalmente de pastizal gipsófilo, el cual cubre el 17.6%, mientras que el 4.4% restante es nativo (Panjabi et al., 2010).



**Figura 4. Sitios de muestreo y distribución del gorrión chapulín (*Ammodramus savannarum*, NatureServe, Ridley et al., 2003).**

### ***Método de captura***

Se realizaron capturas de individuos del gorrión chapulín (*A. savannarum*) en una localidad dentro de cada uno de los tres GPCA previamente descritos (Valle Colombia: -102.2948968 y 28.3597162, El Tokio: -100.7264662 y 25.4593684 así como Mapimí: -103.929675 y 26.634661), durante una temporada invernal (2018-2019). Se utilizó una técnica activa de “arreo” de las aves, con un semicírculo de personas caminando hacia las redes de niebla ornitológicas (12 m de ancho x 2.5 m de altura) para lograr la captura de individuos de esta especie (Permisos SGPA/DGVS/12947/18 y SGPA/DGVS/6272/19). Cada individuo capturado de la especie se procesó a la mayor brevedad posible, tomando medidas morfológicas (longitud de ala, culmen, tarso y peso). Se tomó una pluma rectriz para la determinación molecular del sexo y otra para la determinación de la longitud relativa de los telómeros. La sangre se extrajo directamente de la vena braquial, por medio de una jeringa de insulina y un tubo sin heparina. Una fracción de la sangre obtenida en campo fue utilizada inmediatamente para realizar frotis sanguíneos en laminillas de 75x25 mm, las cuales fueron fijadas por medio de metanol al 100% y secadas en sombra (Santiago-Alarcón y Carbó-Ramírez, 2015). Se transportaron al laboratorio en cajas especiales para laminillas, mismas que se tiñeron con Giemsa para su subsecuente revisión. El volumen aproximado de la muestra sanguínea para la determinación de la longitud relativa de los

telómeros fue de 40-75  $\mu\text{L}$  y fueron vaciados en tubos de criogenia con Buffer Queen's. Debido a que el volumen de la muestra puede variar dependiendo de las condiciones ambientales e individuo todas se llevaron en un volumen total de 600  $\mu\text{L}$ . Todo esto para evitar complicaciones en caso de falta de volumen. Una vez en el tubo, las muestras se colocaron en una gradilla, la cual fue almacenada posteriormente en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Morinha et al., 2020) hasta su procesamiento.

### ***Extracción de ADN de plumas***

Las muestras se procesaron en la brevedad posible dentro del laboratorio, el protocolo utilizado corresponde al de DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen Inc), con algunas modificaciones específicas para plumas, en primera se mantuvo la proteína de lisis a  $56^{\circ}\text{C}$  durante la noche acompañada de 20  $\mu\text{L}$  de DTT. Finalmente se diluyó en un 30  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Nussey et al., 2014). Después de la experimentación se resguardaron las muestras a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Nussey et al., 2014), para pruebas futuras. La comprobación de la calidad del ADN genómico, se realizó por medio del Nanodrop, así como la cuantificación del ADN.

### ***Sexado molecular***

El sexo se determinó mediante el método de PCR, por medio de los primers 2550F y 2718R (Fridolfsson & Ellegren, 1999), los cuales amplifican los genes CHD1, debido a que es un diferenciador del sexo, este posee dos copias, el CHD1Z posee una longitud de 600 pb, por otra parte, el CHD1W el cual posee una longitud de 450 pb. Las alícuotas se prepararon de 15  $\mu\text{L}$ , en ellas se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  de ADN, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1X Rxn Buffer, 0.33 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTP's, y 0.1 de AmpliTaq. El programa implementado para determinar el sexo fue: una etapa de un ciclo de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , la segunda etapa conformada por un minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , un minuto a  $48^{\circ}\text{C}$ , así como dos minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ , y una tercera etapa de 10 min a  $72^{\circ}\text{C}$  durante un ciclo.

### ***Determinación de la longitud relativa del telómero***

Por otra parte, la longitud de los telómeros fue estimada utilizando el método de longitud relativa por medio de una qPCR (Cawthon et al., 2002). El método consiste en amplificar una secuencia repetitiva específica de los telómeros aviares y un gen endógeno a manera de calibrador (GAPDH; Criscuolo et al. 2009). Debido a que las secuencias teloméricas son altamente conservadas en vertebrados, se recomienda el uso de los primers tel1b y tel2b para la amplificación de los telómeros, los cuales son ampliamente utilizados en estudios de aves (Cawthon, 2002), haciendo uso de los primers GAPDH-F y GAPDH-R para la amplificación del gen GAPDH como método de control para normalizar la cantidad de telómeros con la cantidad del ADN en la reacción (Criscuolo et al., 2009).

El master mix contiene un total de 5  $\mu$ L, en los cuales la mitad del volumen es perteneciente al SYBR Green Master Mix (2.5  $\mu$ L), 0.15  $\mu$ L de cada primer, 1.2  $\mu$ L de Agua y 1  $\mu$ L de .8 ng de ADN (para ambas muestras; Qin & Sciences, 2011). La amplificación tanto para el gen de referencia y los telómeros es basada en el protocolo elaborado por Criscuolo et al. (2009), cada una se realizó en placas distintas, en el caso de la PCR para estimar la longitud de los telómeros inicia con un ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 56°C y 1 ciclo de 95°C, en cambio, para el gen GAPDH se recomienda iniciar con un ciclo de 95°C de 10 min, seguido de 40 ciclos de 56°C y uno de 1 min a 95°C, cabe especificar que todo esto fue desarrollado en el Thermo ABI 7500 Fast Real-Time.

Como método de control interno se realizó una curva de calibración con una muestra de referencia (una por cada especie) en un gradiente de siete puntos con distinta dilución 1:16 – 1:1024 (Lin et al., 2019). Para mantener un control en la eficiencia de cada una de las reacciones se utilizaron aquellas cuya desviación estándar era menor al 5% realizando un duplicado por cada una, y un triplicado para la muestra referencia (para disminuir error humano; Lin et al., 2019). Así mismo se realizó una cromatografía automatizada para la comprobación de amplificación específica del Master mix utilizado (Figura 5), en ella es posible detectar una amplificación de 50pb, lo cual equivale a una correcta amplificación de los primers Tel 1y2b. Las amplificaciones asociadas a las bandas entre 75pb y 150pb son el resultado del segundo Master mix probado (Jena Bioscience qPCR SybrMaster highROX), el cual indica una amplificación que no corresponde a los 50pb esperados de los primers Tel 1y2b.





Se utilizó el método de Pfaffl **Figura 5.** Representación gráfica de una electroforesis automatizada en el sistema TapeStation. Utilizada para la detección de eficiencia de amplificación del Master mix. Carril A1: marcador molecular, carriles B1, C1, F1 y G1: muestras realizadas con el master mix de Applied biosystems, y carriles D1, E1, A2, B2: muestras realizadas con el master mix de Jena Bioscience.

(2001), para determinar la diferencia de amplificación entre el gen de referencia y el gen endógeno para poder calcular los niveles relativos de expresión. Este método es desglosado de la siguiente forma por Olsen et al. (2012):

- Debe de producirse una curva estándar por medio del  $\log_{10}$  del ADN en comparación del CT, esto para lograr una regresión lineal de  $y = ax + b$  ( $y = CT$ ,  $x = \log_{10}$  del ADN esperado de la dilución,  $a =$  a la pendiente y  $b =$  es el intercepto).
- La eficiencia del estándar objetivo debe calcularse por medio de la curva estándar con la fórmula  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ , de igual manera debe hacerse para el estándar del endógeno.
- La cantidad de telómero observable se estima de la siguiente manera  $T = E^{(Cq \text{ calibrador} - Cq \text{ de la muestra})}$  el cual la T corresponde a  $10^{((Cq \text{ calibrador} - Cq \text{ de muestra})/\text{pendiente})}$ .
- Longitud relativa de telómeros (T/S) es estimada como la proporción entre la cantidad de telómero (T) y el gen de referencia (S).

### ***Cociente heterófilos: linfocitos (H/L)***

A partir de los frotis teñidos se realizó el conteo diferencial de 100 leucocitos (heterófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos y basófilos) por medio de un microscopio compuesto (Amscope), con aumento de 1000X (Martinez et al., 2017).

### ***Índice de Masa Corporal (IMC)***

Debido a que el tamaño del muestreo fue pequeño durante este estudio, y dado que la función utilizada para evaluar el IMC escalado es más robusta si se tiene una mayor cantidad de datos, se utilizó la base de datos de los proyectos Patrones temporal y espacial de supervivencia del género especialista de pastizales *Ammodramus* mediante el uso de radio-telemetría durante su etapa invernal en el Desierto Chihuahuense de México (SEP-CONACYT Ciencia Básica CB 2013-222920-B) y Radio-telemetry project to monitor survival of wintering grassland bird populations in Grassland Priority Conservation Areas in the Chihuahuan Desert of northern Mexico (Bird conservancy of the Rockies). , con las medidas del tarso, peso y el sexo de un total de 455 individuos de las temporadas invernales 2015 – 2019, de las cuales se estimaron sus promedios por sexo, así como intervalos de confianza y se compararon mediante pruebas t (Tabla 2).

### ***Análisis***

Dado el incumplimiento de los supuestos asociados a las pruebas t pareada y de la signada de Wilcoxon, se utilizó la prueba no paramétrica del signo (Sign Test) para evaluar si la mediana diferencias pareadas de la longitud relativa de los telómeros (T/S) obtenidas a partir de los tejidos de sangre y pluma para cada individuo es distinto de cero (Rivaz-Ruiz et al, 2013). Asociado a esto se realizó una correlación de Pearson para determinar la relación entre ambos tejidos.

Se realizaron modelos lineales, con una distribución normal, realizados por medio de R (R core team, 2022), con los paquetes tidyverse (v1.3.0; Wickham et al., 2019), rstatix (Kassambra, 2019), y predicts (Leeper, 2019) de todas las posibles combinaciones de la longitud relativa de los telómeros (T/S) como variable respuesta y las cuatro variables de interés: Sexo, Sitio, IMC y cociente H/L, como variables explicativas. El mejor modelo se seleccionó mediante el Criterio de Información de Akaike (Brewer et al., 2016) corregido para muestras pequeñas AICc se seleccionaron los mejores modelos tanto de sangre y pluma.

## RESULTADOS

### *Muestreo*

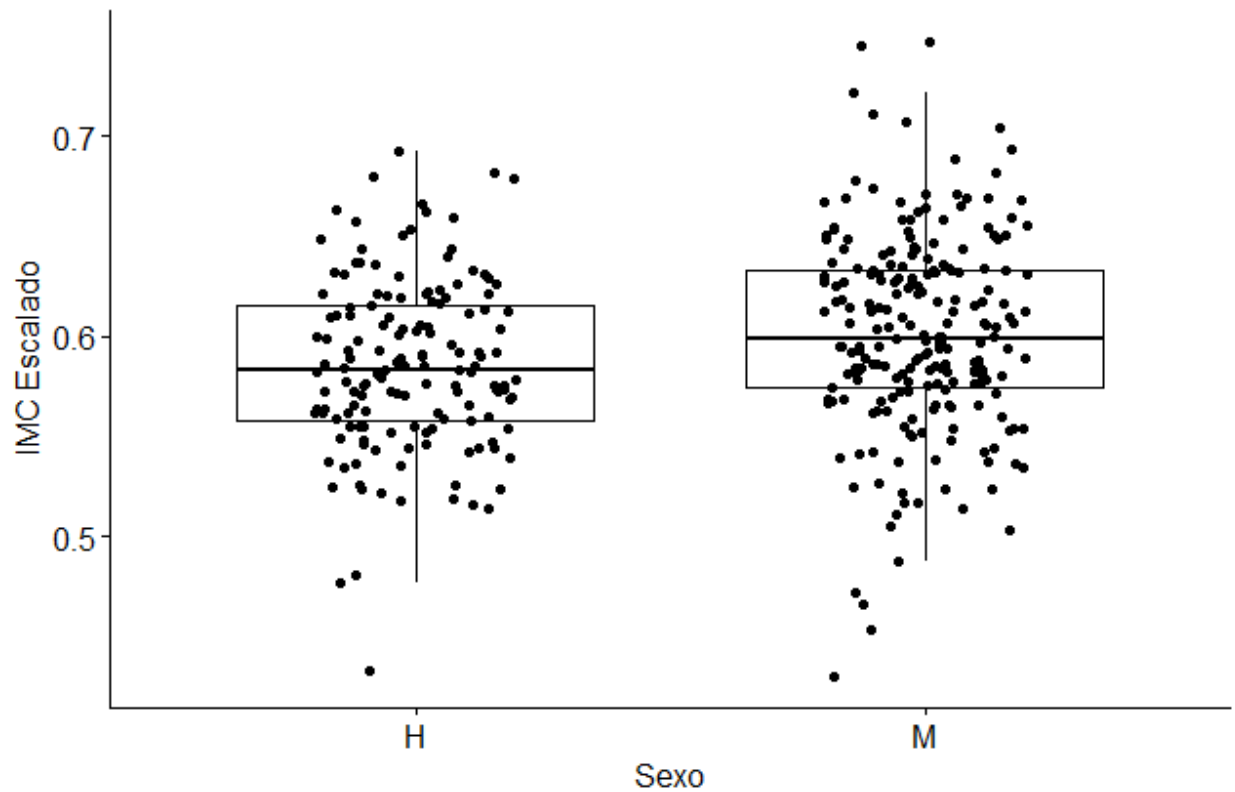
Se obtuvieron 70 muestras de sangre, así como 44 de plumas del gorrión chapulín durante la temporada invernal 2018 -2019 de tres localidades, en los GPCA'S: Mapimí, Valle Colombia y El Tokio. Sin embargo, debido a las variaciones inter-anales en la densidad y distribución invernal de la especie, el muestreo no fue balanceado en los sitios y los años (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número y tipo de muestras del gorrión chapulín (*A. savannarum*) obtenidas durante la temporada invernal (2018 – 2019) en tres Áreas Prioritarias para la Conservación de Pastizales.

	Mapimí	Valle Colombia	El Tokio
<b>Sangre</b>	29	26	15
<b>Pluma</b>	29	0	15

### *Estimación del IMC escalado entre sexos*

El IMC fue significativamente menor para las hembras (n=150) en comparación a los machos (n=222;  $p = 0.0001$ ; Figura 6), y aunque la magnitud de la diferencia fue pequeña ( $d$  de Cohen = 0.218, se decidió incluir el factor sexo como una variable explicativa en los modelos de longitud relativa de telómeros subsecuentes.



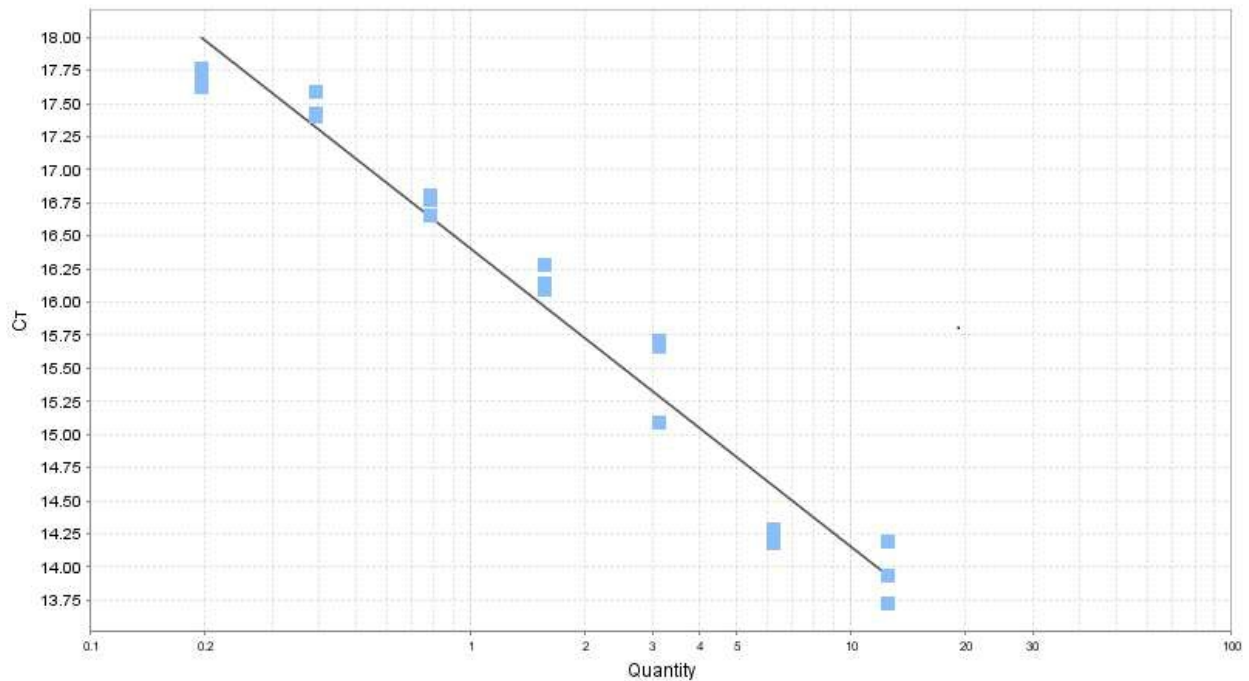
**Figura 6.** Gráficos de cajas comparando el índice de masa corporal (IMC) escalado entre machos y hembras del gorrion chapulín (*A. savannarum*) invernando en el Desierto Chihuahuense (2015 - 2019).

**Tabla 2.** Promedio de tarso y peso por localidad de *A. savannarum* capturados durante la temporada invernal 2018-2019.

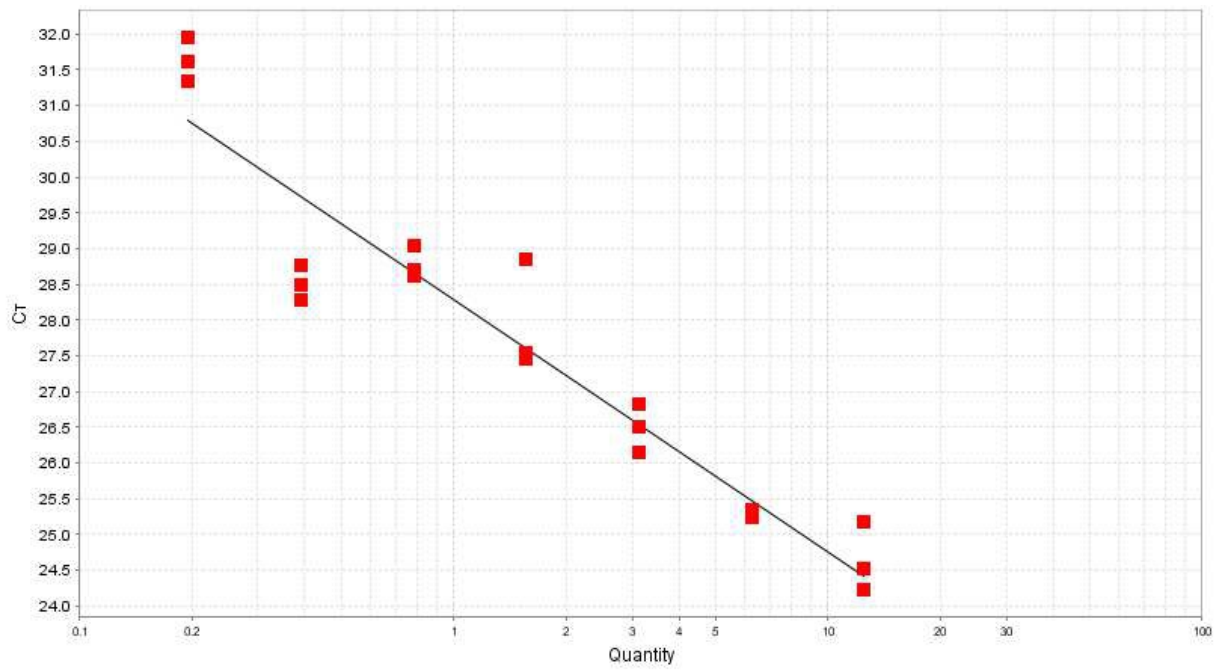
<b>Localidad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tarso (mm)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>IMC Escalado</b>	<b>n</b>
<b>El Tokio</b>	Macho	20.78 (19.68 – 21.88)	15.64 (15.22 - 16.05)	0.68 (0.63 – 0.74)	9
	Hembra	15.6 (14.31 – 16.87)	15.6 (15.102 - 16.10)	0.68 (0.62 – 0.74)	6
<b>Mapimí</b>	Macho	20.42 (20.02 – 20.81)	17.33 (16.670 - 17.99)	0.49 (0.47 - 0.52)	2
	Hembra	20.49 (19.85 – 21.13)	17.39 (16.355 – 18.42)	0.46 (0.44 – 0.5)	8
<b>Valle Colombia</b>	Macho	18.8 (18.57 – 19.03)	16.81 (16.38 – 17.24)	0.54 (0.52 – 0.56)	2
	Hembra	18.8	17.0	0.55	1
		(18.5– 19.1)	(16.5 – 17.6)	(0.53 – 0.56)	1

### *Estandarización de la longitud relativa de los telómeros*

Con el propósito de estandarizar la técnica de qPCR para la estimación relativa de los telómeros y como método para disminuir el error, se realizó una curva estándar con la muestra referencia (la cual fue seleccionada al azar, tomando en cuenta una gran cantidad de muestra) tanto en TEL (Figura 7), así como en GAPDH (Figura 8). De dicha calibración interna, se obtuvo una R2 de 0.963 para TEL y 0.90 para GAPDH, permitiéndonos observar la amplificación de la muestra entre diluciones con un factor de 1:2 entre muestra, partiendo desde 12.5 ng/uL (Figura 7 y 8). Esto nos indica que el método era eficiente, y que cualquiera de dichas disoluciones utilizadas era fiable para llevar a cabo la qPCR, sin embargo, por cuestiones prácticas se decidió por utilizar una concentración de 0.8 ng/ $\mu$ L.



**Figura 7.** Gráfico de la curva estándar del Gen TEL 1b y 2b. Se utilizó una muestra de referencia con una dilución de factor 1:2. Pendiente: -2.248, Intervalo-Y: 16.398, R2: 0.963, y % efectividad: 178.547.



**Figura 8.** Gráfico de la curva estándar del Gen GAPDHF y GAPDHR. Se utilizó una muestra de referencia con una dilución de factor 1:2. Pendiente: -3.529, Interval-Y: 28.299, R2: 0.09, y % efectividad: 92.022.

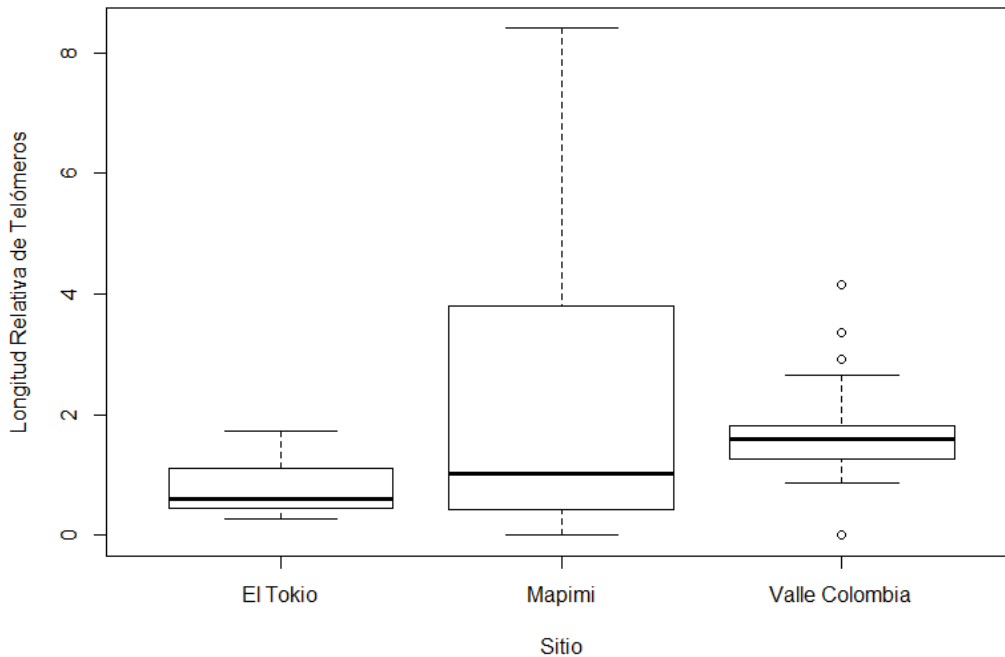
***Estimación de la longitud relativa en de los telómeros en comparación del sitio en muestras de sangre y pluma***

Se utilizaron un total de total de 78 muestras, 50 de sangre y 28 de pluma; (Tabla 1). Sin embargo, para Valle Colombia se analizó únicamente muestras de sangre. Se observó que los individuos analizados con pluma, tuvieron una longitud relativa de telómeros significativamente mayores en Mapimí ( $p = 0.016$ ), mientras que, en el caso de sangre, que no se contó con muestras de Valle Colombia, los individuos de Mapimí fueron significativamente mayores que los del Tokio ( $p = 0.02$ ; Figura 9 y 10; Tabla 3).

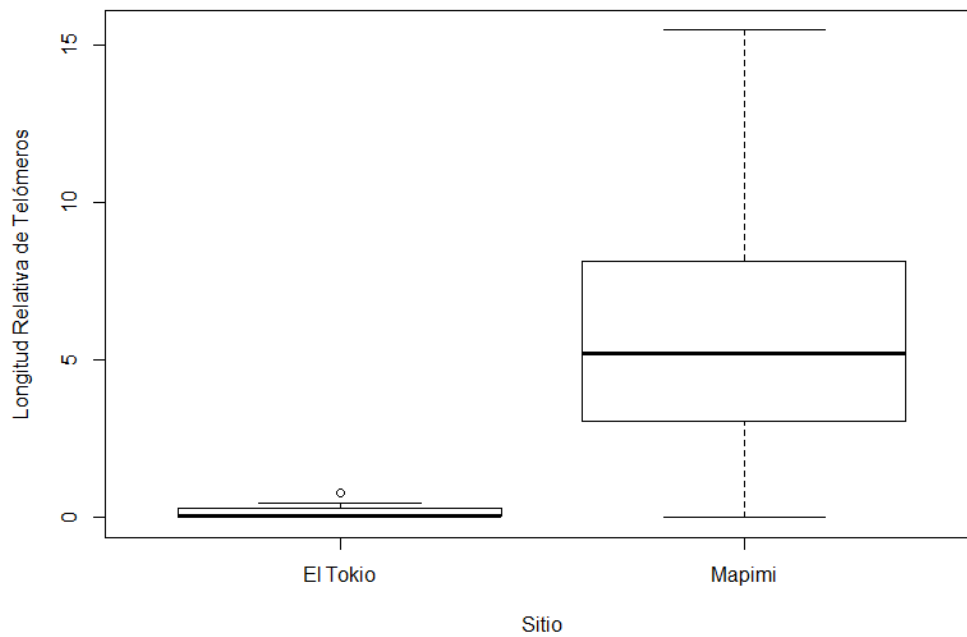
**Tabla 3.** Promedio e intervalos de confianza del 95% de la longitud de los telómeros (T/S) de *A. savannarum* durante la temporada invernal 2018-2019 en tres Áreas Prioritarias para la Conservación de Pastizales (GPCA's).

Localidad	Sexo	Sangre		Pluma	
		T/S	n	T/S	n
El Tokio	Global	0.815 (0.52 - 1.11)	11	0.285 (0.07 - 0.50)	7
	Macho	0.681 (0.42 - 1.48)	7	0.323 (0.61 - 0.59)	5
	Hembra	0.945 (1.61 - 3.49)	4	0.475 (0.20 - 0.76)	2
Mapimí	Global	2.442 (1.38 - 3.51)	19	7.782 (2.75 - 12.81)	21
	Macho	2.552 (-0.28 - 2.33)	15	9.309 (3.38 - 15.24)	16
	Hembra	1.026 (-0.63 - 3.75)	4	3.517 (-0.03 - 7.07)	5
Valle Colombia	Global	1.636 (1.28 - 1.99)	20		
	Macho	1.563 (0.86 - 3.22)	12		
	Hembra	2.04 (-1.09 - 1.09)	8		





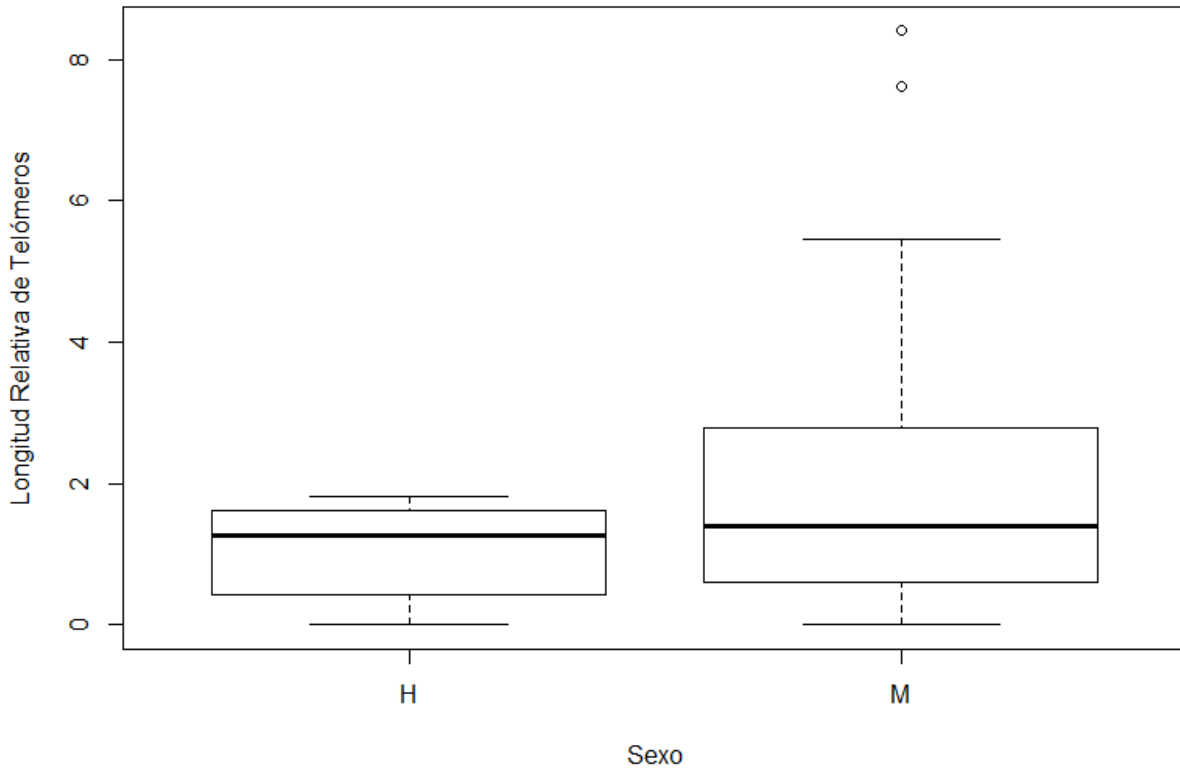
**Figura 9.** Gráfico de caja de la longitud de telómeros en muestras de sangre de gorrión chapulín (*Ammodramus savannarum*) durante la temporada invernal 2018-2019.



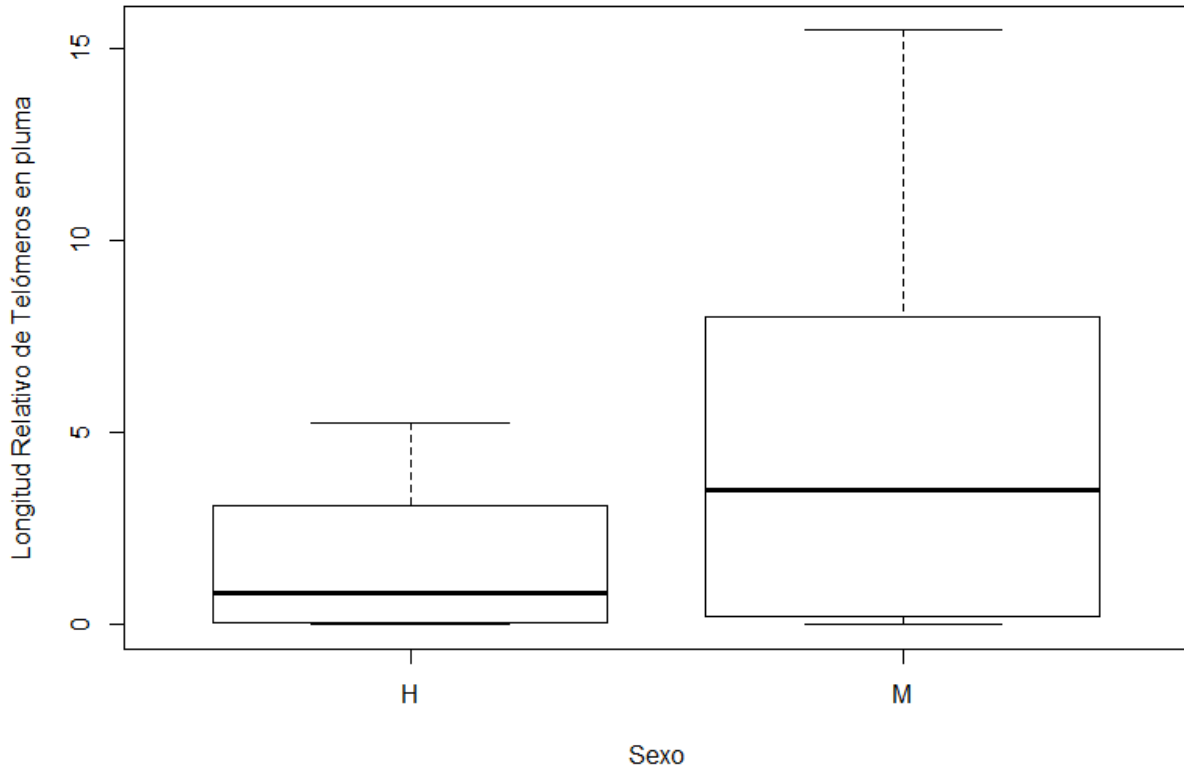
**Figura 10.** Gráfico de caja de la longitud de telómeros en muestras de pluma de las especies de *A. savannarum*. Muestras obtenidas durante la temporada invernal 2018-2019.

## Estimación de la longitud relativa e n de los telómeros e n comparación de l se xo e n muestras de sangre y pluma

Se encontró una menor longitud relativa promedio en hembras, en ambos tejidos ( $p_{sangre} = 0.04$  y  $p_{pluma} = 0.01$ ; Figura 9 y 10).

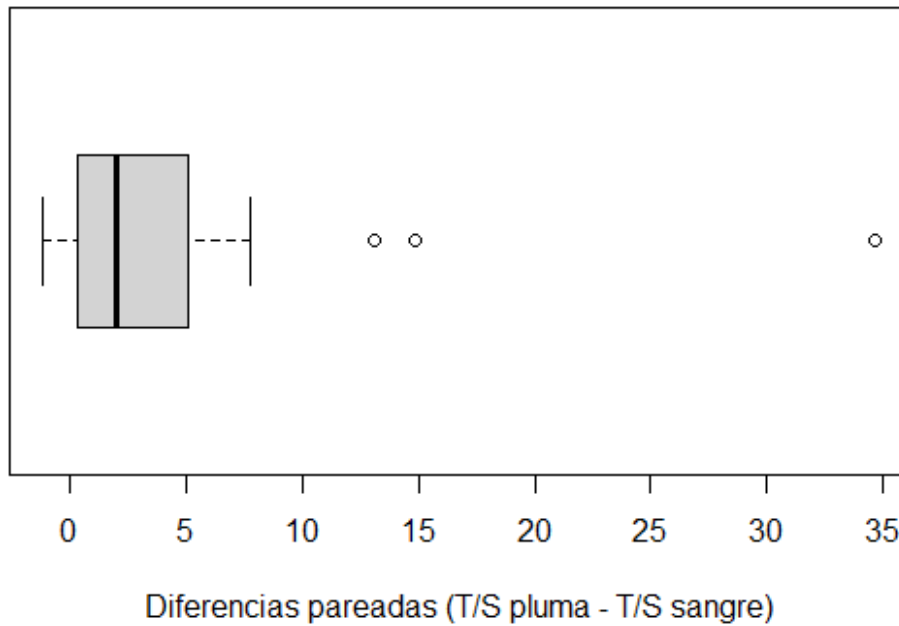


**Figura 11.** Gráfico de la caja de la longitud relativa de telómeros (T/S) en muestras de sangre de las especies de *A. savannarum* de ambos sexos. Muestras obtenidas durante la temporada invernal 2018-2019.

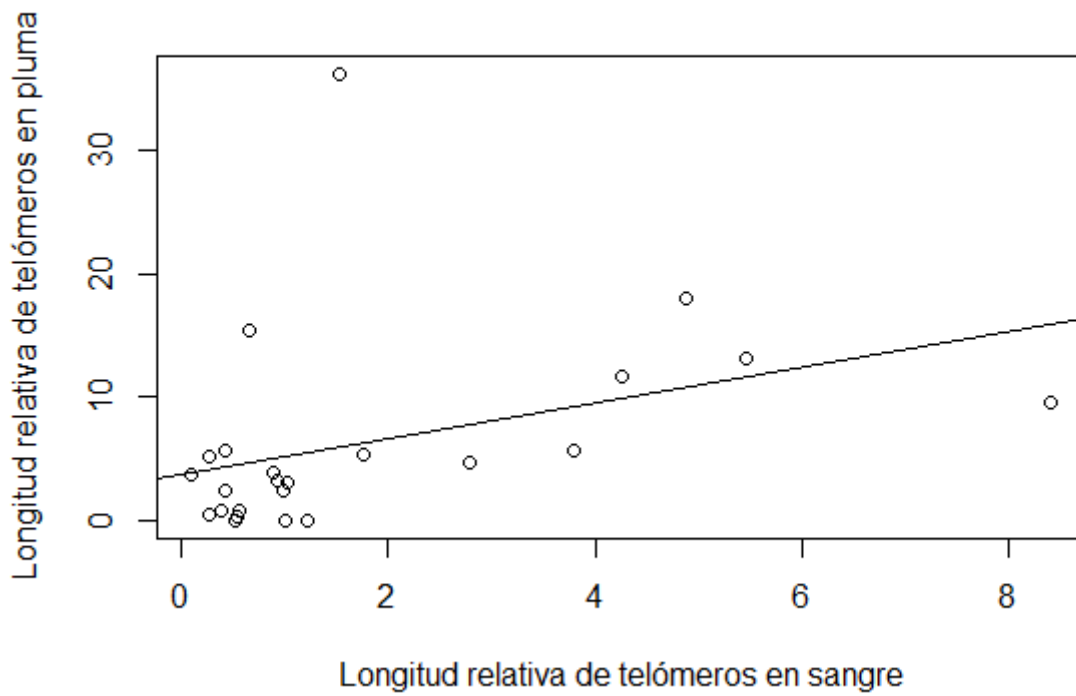


**Figura 12.** Gráfico de la caja de la longitud relativa de telómeros (T/S) en muestras de pluma de las especies de *A. savannarum* de ambos sexos. Muestras obtenidas durante la temporada invernal 2018-2019.

Se encontró evidencia de una diferencia significativa en la mediana de las diferencias pareadas de la longitud relativa de los telómeros (T/S) entre tejidos ( $p = 0.008$ ), encontrando que el 87% de un total de 23 individuos, muestran una longitud relativa de los telómeros mayor a partir de pluma que de sangre (Figura 13). Por su parte, se encontró una correlación débil y marginalmente significativa en la longitud relativa de los telómeros entre pluma y sangre ( $r=0.37$ ,  $p=0.07$ ; Figura 14).



**Figura 13.** Box plot de las diferencias pareadas de la longitud relativa de los telómeros (T/S) de pluma y sangre. Muestras obtenidas de *A. ammodrammus*.

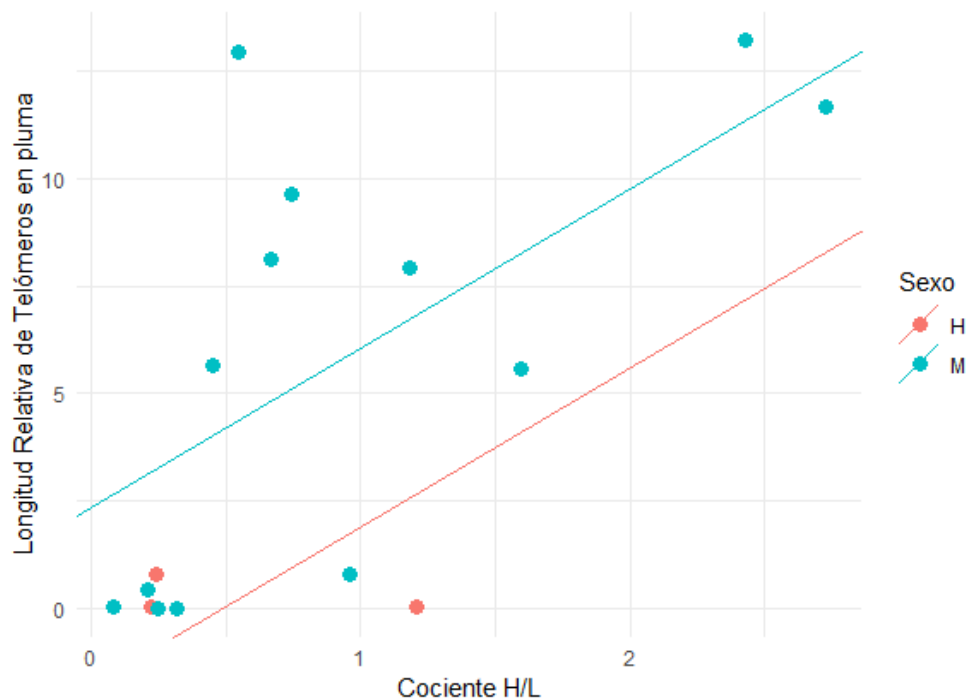


**Figura 14.** Diagrama de dispersión de la longitud de telómeros entre dos tejidos: Sangre y pluma.

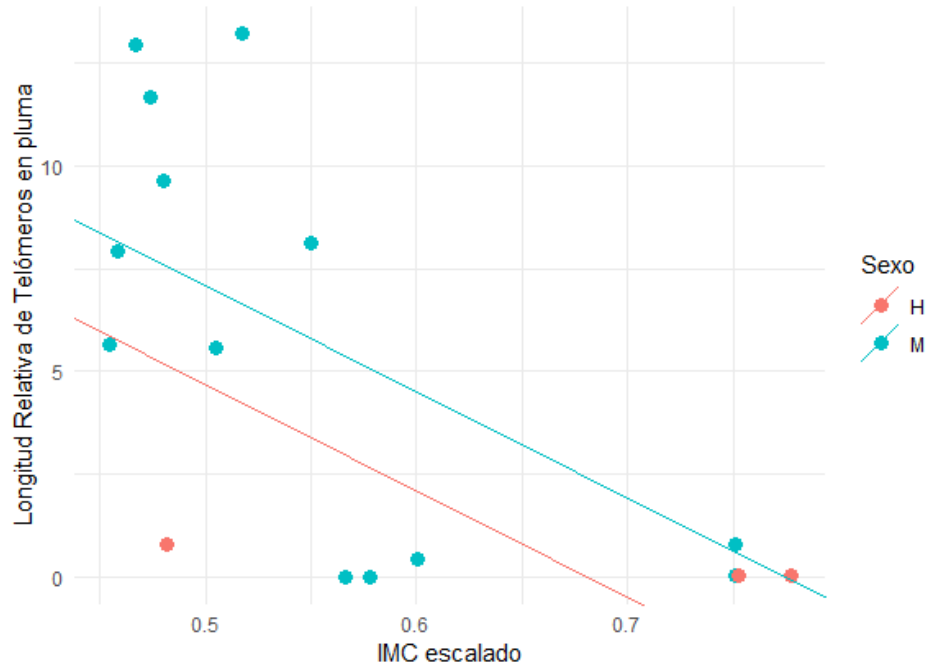
## Análisis de la longitud relativa entre sitios, localidad, sexo, IMC e scalado, cociente H/L y tejido

El mejor modelo que explica la variación en la longitud relativa de telómeros a partir de sangre incluye el sexo del individuo, cociente H/L y el sitio (Estimado Mapimí = 4.41,  $SE$ : 1.62, y  $p$  = 0.01; Tablas 4 y 5; Figura: 17); mientras que, para los datos obtenidos a partir de pluma, fueron sexo del individuo (Estimado hembras = 12.67,  $SE$  = 5.61,  $p$  = 0.04; Tablas 6 y 7; Figura: 15), cociente H/L (Estimado H/L = 3.05,  $SE$  = 1.06,  $p$  = 0.01; Tablas 6 y 7; Figura: 15) e IMC (Estimado IMC = -20.97,  $SE$  = 7.68,  $p$  = 0.02; Tablas 6 y 7; Figura: 16)

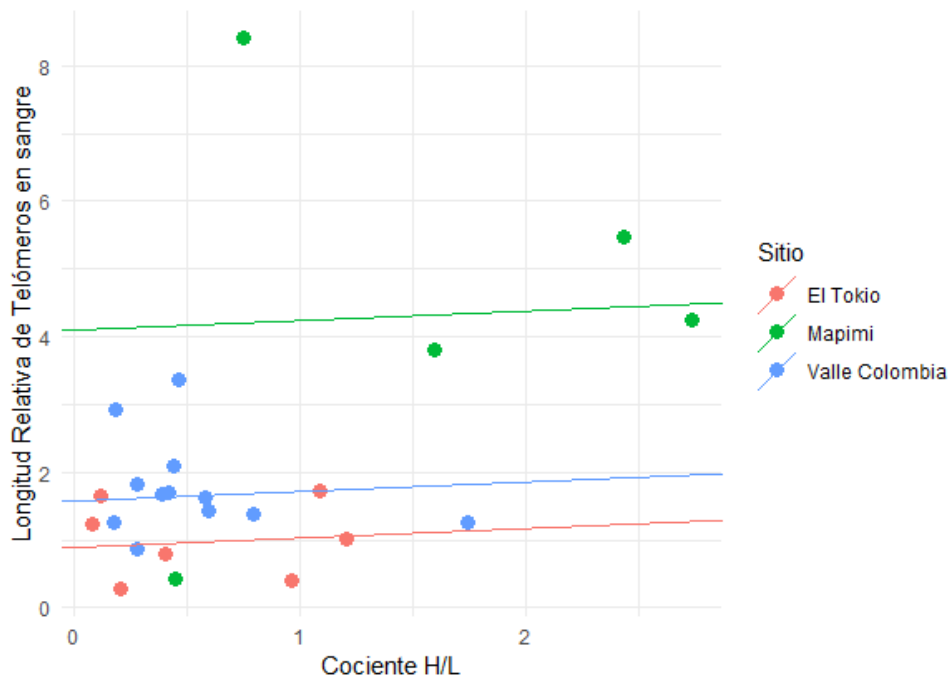
La estimación relativa de los telómeros en pluma muestra diferencias significativas entre el cociente H/L ( $p_{pluma}$  = 0.02; Figura 15), mientras que en sangre su diferencia no muestra significancia ( $p_{sangre}$ =0.3066). Así mismo, el IMC también resultó significativo en plumas ( $p_{pluma}$  = 0.009; Figura 16), lo cual refleja un estado de desgaste fisiológico crónico, al igual que el cociente H/L. Así mismo en sangre es posible observar la diferencia significativa ( $p_{sangre}$ =0.001) que se encontró por sitio.



**Figura 15.** Representación gráfica de la diferencia entre la longitud de los telómeros en pluma en contraste con el cociente H/L.



**Figura 16.** Representación gráfica de la diferencia ente la longitud de los telómeros pluma en contraste con el IMC escalado.



**Figura 17.** Representación gráfica de la diferencia ente la longitud de los telómeros en sangre en contraste con el cociente H/L.

**Tabla 4** Evaluación de combinaciones para la determinación del mejor modelo en muestra sanguíneas, en los modelos se evaluaron las siguientes variables: Sexo, Sitio, Cociente H/L ((H/L), e índice de masa corporal escalado (IMC).

<b>Modelos</b>	<b>Valor AICc</b>	<b>Normalidad de Residuales</b>
TSSangre ~ Sitio + H/L	28.03	0.02365
TSSangre ~ Sexo + Sitio + H/L	29.67	0.011
TSSangre ~ Sitio + H/L + IMC	29.81	0.015
TSSangre ~ Sexo + H/L + IMC	31.09	0.00014
TSSangre ~ Sexo + H/L	31.63	9.42*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ Sexo + Sitio + IMC + H/L	31.86	0.01
TSSangre ~ H/L	32.5	0.00019
TSSangre ~ SMIROB + H/L	32.64	0.000389
TSSangre ~ Sexo + IMC	56.32	1.01*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ Sitio + Sexo	56.9	4.117*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ Sexo	58.02	1.62*10 <sup>-06</sup>
TSSangre ~ Sitio	58.13	4.93*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ Sexo + Sitio + IMC	58.9	4.27*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ Sitio + IMC	59.68	2.58*10 <sup>-05</sup>
TSSangre ~ IMC	60.39	1.18*10 <sup>-06</sup>



**Tabla 5.** Evaluación del modelo lineal en sangre, el modelo utilizado constó de las siguientes variables: Sexo, Cociente H/L ((H/L), y Sitio, con una R2 de 0.37.

	<b>Estimado</b>	<b>Error e estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>P</b>
<b>(Inte rce pto)</b>	0.89	0.76	1.17	0.26
<b>IMC</b>	0.14	0.54	0.26	0.80
<b>H/L</b>	0.06	0.70	0.09	0.93
<b>Mapimí</b>	3.29	1.07	3.09	0.01
<b>El tokio</b>	0.78	0.70	1.11	0.28

**Tabla 6.** Evaluación de combinaciones para la determinación del mejor modelo en muestras procedentes del plumaje, en los modelos se evaluaron las siguientes variables: Sexo, Sitio, Cociente H/L ((H/L), e índice de masa corporal escalado (IMC).

<b>Mode los</b>	<b>Valor AICc</b>	<b>Normalidad de re siduale s</b>
TSpluma ~ Sexo + H/L + IMC	39.21	0.631
TSpluma ~ Sexo + Sitio + H/L	39.91	0.192
TSpluma ~ Sexo + Sitio + IMC + H/L	40.83	0.6168
TSpluma ~ Sexo + H/L	47.35	0.2975
TSpluma ~ Sitio + H/L	49.28	0.1901
TSpluma ~ Sitio + H/L + IMC	50.98	0.4825
TSpluma ~ IMC + H/L	52.5	0.01831
TSpluma ~ H/L	54.83	0.1172
TSpluma ~ Sexo + IMC	117.39	1.17*10 <sup>-05</sup>

TSpluma ~ Sexo + Sitio + IMC	119.05	3.42*10 <sup>-05</sup>
TSpluma ~ Sitio + Sexo	123.2	1.42*10 <sup>-06</sup>
TSpluma ~ IMC	123.59	9.887*10 <sup>-05</sup>
TSpluma ~ Sitio	124.43	8.29*10 <sup>-06</sup>
TSpluma ~ Sitio + IMC	125.04	7.05*10 <sup>-05</sup>
TSpluma ~ Sexo	127.95	4.05*10 <sup>-06</sup>

**Tabla 7.** Evaluación del modelo linear en plumaje, el modelo utilizado constó de las siguientes variables: Sexo, Cociente H/L ((H/L), e índice de masa corporal escalado (IMC), con una R2 de 0.70.

	<b>Estimado</b>	<b>Error e estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>P</b>
<b>(Inte rce pto)</b>	12.67	5.61	2.26	0.04
<b>IMC</b>	-20.97	7.68	-2.73	0.02
<b>H/L</b>	3.05	1.06	2.87	0.01
<b>Se xoM</b>	1.86	2.22	0.84	0.42

## DISCUSIÓN

La estimación relativa de los telómeros en vertebrados y en lo particular en aves ha sido útil para probar diversas hipótesis relacionadas con la ecología e historia de vida. Principalmente ha sido utilizada para evaluar diversas formas de estrés crónico en las aves, y su efecto en las estructuras teloméricas, autores como Costantini et al. (2011) describen como el cortisol puede afectar directamente a estas estructuras y como afecta a la supervivencia del ave. Así mismos autores como Vleck et al. (2013) ha determinado que el hábitat ejerce una presión constante en la longitud de los telómeros. Además de que otros factores como el sexo pueden relacionarse con una variabilidad en sus longitudes. Debido a lo anterior, en este proyecto determinamos la longitud de los telómeros en aves de pastizal en tres sitios de importancia para la conservación en el desierto chihuahuense.

De acuerdo a los métodos de evaluación de la longitud de los telómeros, existen en primera instancia un método absoluto (TRF), y uno relativo (TAQMAN y SYBR), se decidió por el relativo ya que tiene ventajas de costo, de manejo en campo e implementación (Cao & Shockey, 2012). Aunque existen dos métodos relativos, Taqman y Sybr, la primera está basada en sondas mientras que la segunda en fluorescencia, sin embargo, se decidió utilizar SybrGreen debido a su alto uso y menor costo. Asimismo, para los análisis de los resultados y la estimación relativa se utilizó el método de Pfaffl (2001) el cual a diferencia de Livak & Schmittgen (2001), corrige agregando la eficiencia del PCR en tiempo real en ambos genes, lo cual permite corregir la eficiencia de la cuantificación relativa de los telómeros (Pfaffl, n.d.). En base a esto se realizaron los análisis de cuantificación relativa, en los cuales se agregaron algunos pasos de estandarización generales para garantizar una lectura ideal: a) las muestras se estandarizaron a 0.8 ng/uL después de una cuantificación por gradientes, para garantizar una correcta lectura de ambos tipos de muestra, b) así como una estandarización de los resultados de las lecturas del equipo por medio del software LinRegPCR (versión 2013.1), el cual ayudó a establecer una línea base del ruido del fondo, ayudando a reducir el error en el análisis.

### ***Índice de masa corporal y sexo.***

La diferencia en IMC de machos ( $M = 0.60$ ) y hembras ( $M = 0.58$ ) puede estar asociada al desgaste energético que conlleva la producción de huevos, así mismo la migración posterior que conlleva un alto costo en términos de energía para los individuos (Blem, 1980; Raveling, 1979).

### ***Comparar la longitud relativa de los telómeros entre ambas muestras de tejidos (sangre y pluma) de aves.***

La longitud relativa de telómeros de manera general se estima mayor en sangre que en pluma ( $p=0.009$ ), mientras que Kärkkäinen et al. (2020), mostró que en individuos adultos es viable utilizar ambos tipos de muestra, ya que, en juveniles al encontrarse en crecimiento constante, los resultados podrían interpretarse de manera incorrecta. Dado lo anterior, las respuestas variables podrían explicarse a la edad de los individuos. Por su parte, diversos autores como Choi et al. (2008) y Costantini et al. (2011), han determinado y comprobado que el estrés es un causante de la reducción directa de los telómeros por efecto del cortisol y su factor inhibidor en los mecanismos de reparación (telomerasa) de los telómeros. Sin embargo, esto no aclara la diferencia entre pluma y sangre, así como es mencionado por Pyle et al. (2008), esta respuesta puede deberse a que la muda se realiza previo a la migración, por lo que es posible, que este estrés represente el gran costo energético que es provocado por causa de la migración, y el efecto que tiene sobre las estructuras teloméricas

### ***Efecto del sitio y el sexo***

En ambos tejidos la longitud de los telómeros era considerablemente mayor en machos en comparación a las hembras, sin embargo, solo en plumas el resultado fue significativo (Pluma  $p = 0.04$ ). Esto ha sido comprobado por distintos autores, en primera instancia Aydidonat et al. (2014) menciona que la diferencia entre sexos es común en aves migrantes, ya que en residentes no es posible discernir entre ambos sexos. Así mismo Muriel et al. (2013) menciona que esta diferencia es debido a actividades relacionadas al sexo, un ejemplo de esto es por causa del cuidado parental, este mismo provoca un gran estrés en los individuos lo que marca una gran diferencia entre los machos. Por su parte, las diferencias en la longitud relativa de telómeros que es explicada por el sitio, en el caso de ambos tejidos pareciera ser mayor en Mapimí ( $p = 0.01$ ), es similar a lo comprobado por Vleck (2013) el cual, al comparar la longitud de estructuras teloméricas en distintos sitios invernales en la candelita norteña (*Setophaga ruticilla*), descubrió que las condiciones de los hábitats influyen significativamente en la longitud de los telómeros, esto coincide con los pastizales muestreados, donde la cobertura de pasto era mayor en Valle Colombia, así como el Tokio, poseía la menor cobertura.

## CONCLUSIÓN

De manera general nuestra investigación fue capaz de explorar la capacidad que tiene la utilización de un método molecular como la qPCR, para estimar la longitud relativa de las estructuras teloméricas. Creemos que la evaluación de dichas estructuras permite visualizar de manera efectiva la historia individual de cada uno de los organismos, sin embargo, estos métodos acompañados de la evaluación de indicadores de la condición física como el IMC y el cociente H/L permite una percepción más amplia de los procesos a los que pueden estar sometidas las aves. Mediante la utilización de esta técnica, fue posible evaluar las estructuras teloméricas en tres poblaciones invernales de *A. savannarum* en el norte de México, lo cual permitió ahondar en su historia de vida de manera individual y poblacional.

Se observó un mayor IMC en los machos, lo que podría explicarse porque muchas especies migratorias los procesos hormonales que se presentan en las hembras son tales que conllevan un alto desgaste energético, lo cual de manera consecuente promueve el acortamiento acelerado de los telómeros.

El efecto del estrés crónico, reflejado en H/L, mostró una asociación entre una corta longitud de las estructuras teloméricas en plumas y altos niveles de estrés crónico, pero no en sangre. Estas diferencias pueden deberse a la temporalidad de las muestreas, es decir, la sustitución de la sangre ocurre en ciclos aproximados de tres semanas a comparación de la pluma, que, al ser renovada antes de la migración, refleja el desgaste de dicho proceso.

Se observaron diferencias significativas en la longitud relativa de los telómeros entre los sitios, siendo de mayor longitud los individuos en Valle Colombia y menores en el Tokio, lo que está relacionado con el porcentaje de pastizales presentes en el área.

La evaluación entre tejidos resultó en una longitud relativa mayor en plumas que para las muestras sanguíneas. Esto puede deberse a la diferencia en el periodo en el que se renuevan cada uno de los tejidos, en el caso de las plumas antes de la migración, y las muestras sanguíneas en un aproximado de 4 semanas.

## LITERATURA CONSULTADA

- Alberts, B., Hopkin, K., Jhonson, A., Morgan, D., & Raff, M. (2013). Essential Cell Biology. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- American Ornithologists' Union (AOU). 1998. Check-list of North American birds. Seventh edition. American Ornithologists' Union, Washington, D.C. [as modified by subsequent supplements and corrections published in *The Auk*]. Also available online: <http://www.aou.org/>.
- Angelier, F., Vleck, C. M., Holberton, R. L., & Marra, P. P. (2013). Telomere length, non-breeding habitat and return rate in male American redstarts. *Functional Ecology*, 27(2), 342–350. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12041>
- Angelier, F., Weimerskirch, H., Barbraud, C., & Chastel, O. (2019). Is telomere length a molecular marker of individual quality? Insights from a long-lived bird. *Functional Ecology*, 33(6), 1076–1087. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13307>
- Asghar, M., Palinauskas, V., Zaghdoudi-Allan, N., Valkiūnas, G., Mukhin, A., Platonova, E., Färnert, A., Bensch, S., & Hasselquist, D. (2016). Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1836). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1184>
- Askins, R. A., Chavez-Ramirez, F., Dale, B. C., Haas, C. A., Herkert, J. R., Knopf, F. L., & Vickery, P. D. (2007). Conservation of grassland birds in North America: Understanding ecological processes in different regions. *Ornithological Monographs*, 64(64), 1–46. [https://doi.org/10.1525/0078-6594\(2007\)64\[1:COGBIN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1525/0078-6594(2007)64[1:COGBIN]2.0.CO;2)
- Bergeon, C. M., Rosvall, K. A., Hahn, T. P., Demas, G. E., & Ketterson, E. D. (2014). Hormones and Behavior Examining sources of variation in HPG axis function among individuals and populations of the dark-eyed junco. *Hormones and Behavior*, 65(2), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.10.006>

- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265), 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>
- BLEM, C. R. (1980a). The Energetics of Migration. In *Animal Migration, Orientation and Navigation* (pp. 175–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091833-4.50008-0>
- BLEM, C. R. (1980b). The Energetics of Migration. In *Animal Migration, Orientation and Navigation* (pp. 175–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091833-4.50008-0>
- Bodnar, A. G. (2009). Marine invertebrates as models for aging research. *Experimental Gerontology*, *44*(8), 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.05.001>
- Boonstra, R. (2013). Reality as the leading cause of stress: Rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*, *27*(1), 11–23. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12008>
- Brewer, M. J., Butler, A., & Cooksley, S. L. (2016). The relative performance of AIC, AICC and BIC in the presence of unobserved heterogeneity. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*(6), 679–692. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12541>
- Bruijn, R. De, & Romero, L. M. (2011). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Behavioral and physiological responses of wild-caught European starlings ( *Sturnus vulgaris* ) to a minor , rapid change in ambient temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, *160*(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.011>
- Burraco, P., Lucas, P. M., & Salmón, P. (2021). Telomeres in a spatial context: a tool for understanding ageing pattern variation in wild populations. *Ecography*. <https://doi.org/10.1111/ecog.05565>
- Cao, H., & Shockey, J. M. (2012). Comparison of TaqMan and SYBR green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(50), 12296–12303. <https://doi.org/10.1021/jf304690e>
- CEC, & TNC. (2005). North American Grassland Priority Conservation Areas : for Environmental Cooperation and. *Technical Report and Documentation. J.W. Karl and J. Hoth (Eds.)*, 1:152.

- Choi, J., Fauce, S. R., & Effros, R. B. (2008). Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.12.004>
- Cristol, D. A., Baker, M. B., & Carbone, C. (1999). DIFFERENTIAL MIGRATION REVISITED: Latitudinal Segregation by Age and Sex Class.
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Fink, D., T. Auer, A. Johnston, M. Strimas-Mackey, S. Ligocki, O. Robinson, W. Hochachka, L. Jaromczyk, A. Rodewald, C. Wood, I. Davies, A. Spencer. 2022. eBird Status and Trends, Data Version: 2021; Released: 2022. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York.
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116–121. <https://doi.org/10.1163/003925995X00233>
- Granados-Sánchez, D., Sánchez-González, A., Granados-Victorino, R. L., & Borja-de la Rosa, A. (2011). ECOLOGÍA DE LA VEGETACIÓN DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE VEGETATION. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XVII, 111–130. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa>
- Gress©, B. (n.d.). *Molt and Aging Criteria for Four North American Grassland Passerines Biological Technical Publication*.
- Hall, M. E., Nasir, L., Daunt, F., Gault, E. A., Croxall, J. P., Wanless, S., & Monaghan, P. (2004). Telomere loss in relation to age and early environment in long-lived birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1548), 1571–1576. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2768>
- Hausmann, M. F., & Marchetto, N. M. (2010). Telomeres : Linking stress and survival , ecology and evolution. *Current Zoology*, 56(6), 714–727.



- Hausmann, M. F., Vleck, C. M., & Nisbet, I. C. T. (2003). Calibrating the telomere clock in common terns, *Sterna hirundo*. *Experimental Gerontology*, 38(7), 787–789. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00109-8)
- History, N., Basin, G., Christ-, A., Counts, B., Basin, G., Christmas, A., & Counts, B. (1985). *RAINFALL AND WINTER SPARROW DENSITIES: A VIEW FROM THE NORTHERN Dunning and Brown (1982) assumed that in- ers (e.g. MacArthur 1958, Lack 1966, Cody 1968) have suggested that competition for food plays a key role in determining the structure of m. January*, 152–158.
- Hoekstra, J. M., Boucher, T. M., Ricketts, T. H., & Roberts, C. (2005). Confronting a biome crisis: Global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters*, 8(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00686.x>
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-\* 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Houben, J. M. J., Moonen, H. J. J., van Schooten, F. J., & Hageman, G. J. (2008). Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.001>
- Hoyt, C. a. (2002). The Chihuahuan Desert: Diversity at Risk. *Endangered Species Bulletin*, XXVII(2), 16–17.
- Iwasa, J., & Marshall, W. (2016a). Cell and molecular biology. In *Wiley*. <https://doi.org/10.1017/cbo9781107587519.005>
- Iwasa, J., & Marshall, W. (2016b). The Cytoskeleton and Cell Motility. In *Cell And Molecular Biology* (pp. 309–365). <https://doi.org/10.1017/cbo9781107587519.005>
- Kärkkäinen, T., Bize, P., & Stier, A. (2020). Correlation in telomere lengths between feathers and blood cells in pied flycatchers. *Journal of Avian Biology*, 51(4). <https://doi.org/10.1111/jav.02300>

- Kassambara, A. (2019). Rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests in R. Recuperado el 15 de abril, 2020 de: <https://github.com/kassambara/rstatix>
- Ketterson, E. D., Fudickar, A. M., Atwell, J. W., & Greives, T. J. (2015). ScienceDirect Seasonal timing and population divergence: when to breed, when to migrate. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 6, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.09.001>
- Lai, T. P., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2018). Comparison of telomere length measurement methods. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1741). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0451>
- Leeper TJ (2019). prediction: Tidy, Type-Safe 'prediction()' Methods. R package version 0.3.14.
- Lin, J., & Epel, E. (2022). Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 73). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>
- Lin, J., Smith, D. L., Esteves, K., & Drury, S. (2019). Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 99, pp. 271–278). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.005>
- Macías-Duarte, A., Panjabi, A. O., & Calderón-Aguirre, C. E. (2011). *Compartiendo sus Agostaderos con las Aves de Pastizal* (Rocky Mountain Bird Observatory, Ed.).
- Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B., Collin, A., Decuypere, E., & Buyse, J. (2003). Free diet selection by broilers as influenced by dietary macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection, organ weights, and plasma metabolites. *Poultry Science*, 82(1), 123–131. <https://doi.org/10.1093/ps/82.1.123>
- Martínez Quintanilla, Martha C., Torres Bugarín, Olivia, Martínez Guerrero, José Hugo, Delgado León, Tania Guadalupe, Salas Pacheco, José Manuel, & Pereda Solís, Martín E.. (2017). Relación heterófilo/linfocito, frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados y prolongaciones nucleares en el ganso nevado (*Chen caerulescens*): Una propuesta como posible biomonitor de estrés y genotóxicos ambientales. *Huitzil*, 18(1), 102-111. Recuperado en 27 de abril de 2023, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S187074592017000100102&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187074592017000100102&lng=es&tlng=es).

Mizutani, Y., Tomita, N., Niizuma, Y., & Yoda, K. (2013). Environmental perturbations influence telomere dynamics in long-lived birds in their natural habitat. *Biology Letters*, 9(5). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0511>

Morinha, F., Magalhães, P., & Blanco, G. (2020). Standard guidelines for the publication of telomere qPCR results in evolutionary ecology. *Molecular Ecology Resources*, 0–3. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13152>

Muriel, J., Pérez-Rodríguez, L., Puerta, M., & Gil, D. (2013). Differential effects of yolk testosterone and androstenedione in embryo development and nestling growth in the spotless starling (*Sturnus unicolor*). *General and Comparative Endocrinology*, 194, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.09.013>

Olsen, M. T., Bérubé, M., Robbins, J., & Palsbøll, P. J. (2012). Empirical evaluation of humpback whale telomere length estimates; quality control and factors causing variability in the singleplex and multiplex qPCR methods. *BMC Genetics*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-77>

Ossa, D. D., & Olave-Gómez, K. (2015). *LINEAMIENTOS PARA UNA PROPUESTA DE CONSERVACIÓN DEL SABANERO GRILLO (Ammodramus savannarum caucae) UNA SUBESPECIE ENDÉMICA Y EN PELIGRO CRÍTICO EN EL MUNICIPIO DE SANTIAGO DE CALI, DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA.*

Panjabi, Arvind, Erin Youngberg and Gregory Levandoski. 2010. Wintering Grassland Bird Density in Chihuahuan Desert Grassland Priority Conservation Areas, 2007-2010. Rocky Mountain Bird Observatory, Brighton, CO, RMBO Technical Report I-MXPLAT-08-03. 83 pp.

Paterson, S., & Lello, J. (2003). Mixed models: Getting the best use of parasitological data. *Trends in Parasitology*, 19(8), 370–375. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00149-1)

Pfaffl, M. W. (n.d.). *UNCORRECTED PROOF Quantification Strategies in Real-time Polymerase Chain Reaction.*

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 9).
- Pidgeon, A. M., Radeloff, V. C., & Mathews, N. E. (2006). Contrasting measures of fitness to classify habitat quality for the black-throated sparrow (*Amphispiza bilineata*). *Biological Conservation*, 132(2), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.03.024>
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RIDGELY, R. S., T. F. ALLNUTT, T. BROOKS, D. K. MCNICOL, D. W. MEHLMAN, B. E. YOUNG AND J. R. ZOOK. 2003. Digital distribution maps of the birds of the Western Hemisphere. Virginia: NatureServe. Version 1.
- Rivas-Ruiz, R., Moreno-Palacios, J., & Talaveraa, J. O. (2013). Diferencias de medianas con la U de Mann-Whitney. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 51(4), 414-9.
- Ruth, J. M. (n.d.). *Status Assessment and Conservation Plan for the Grasshopper Sparrow (Ammodramus savannarum)*. <http://digitalcommons.unl.edu/usfwspubsh><http://digitalcommons.unl.edu/usfwspubsh/471>
- Rzedowski, J. (2005). Vegetación de México. In *Conabio* (Issue 1). <https://doi.org/10.2307/1219727>
- Spurgin, L. G., Bebbington, K., Fairfield, E. A., Hammers, M., Komdeur, J., Burke, T., Dugdale, H. L., & Richardson, D. S. (2018). Spatio-temporal variation in lifelong telomere dynamics in a long-term ecological study. *Journal of Animal Ecology*, 87(1), 187–198. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12741>
- Walker, B. G., Meddle, S. L., Romero, L. M., Landys, M. M., Reneerkens, J., & Wingfield, J. C. (2015). *Breeding on the Extreme Edge : Modulation of the Adrenocortical Response to Acute Stress in Two High Arctic Passerines. January.* <https://doi.org/10.1002/jez.1923>

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.

Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Scebba, S., Dimitrov, D., Valkiūnas, G., Hegemann, A., Tieleman, B. I., & Bensch, S. (2012). Haemosporidian infections in skylarks (*Alauda arvensis*): A comparative PCR-based and microscopy study on the parasite diversity and prevalence in southern Italy and the Netherlands. *European Journal of Wildlife Research*, 58(1), 335–344. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0586-y>