



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

# **Efecto de la heterogeneidad térmica ambiental y del grado de melanismo sobre la actividad de la enzima catalasa y la actividad de enzimas metabólicas mitocondriales del eritrocito en *Columba livia***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

**Tomás Jiménez Fandiño**

Director del Seminario de Título: Isaac Peña Villalobos

Codirector: Pablo Sabat Kirkwood

Diciembre, 2022

Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

### **Tomás Jiménez Fandiño**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biología con Mención en Medio Ambiente.

Dr. Isaac Peña Villalobos  
**Director Seminario de Título**

---

Dr. Pablo Sabat Kirkwood  
**Codirector Seminario de Título**

---

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente(a)**

---

**Evaluador(a)**

---

## **Agradecimientos**

Estipulo mi agradecimiento a las siguientes personas:

Viviana Fandiño, Santiago Jiménez, Emma Sanabria, Fernando Fandiño, Janeth Jiménez, Patricia Osorio, Humberto Jiménez, Julia González, Dr. Isaac Peña, Catalina Muñoz, Dr. Pablo Sabat, Andrés Sazo, Javiera Arcila, Francisco Del Basto, Diego Landaeta, Felipe Álvarez, Lucas Navarrete, Daniela Galdames, Manuela Fandiño, Gabriela Fandiño, David Jiménez, Martín Montes, Martín Tolosa, Matías Martínez, Ignacio Arriagada, Martín Zúñiga, Alejandro Paredes, Katherine Ortega, Jaime Rodríguez.

Por último, agradezco al Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) la oportunidad de realizar esta investigación y a FONDECYT 11221062, CONICYT PIA/BASAL FB0002 y FONDECYT 1200386 por el financiamiento.

## Índice de contenidos

Índice de Abreviaturas.....	6
Índice de Tablas.....	6
Índice de Figuras.....	6
Resumen.....	10
Abstract.....	11
1. Introducción.....	12
1.1. Islas de calor urbanas.....	12
1.1.1. Paloma bravía ( <i>Columba livia</i> ).....	13
1.2. Sistema de melanocortina.....	15
1.3. Actividad antioxidante.....	18
1.3.1. Catalasa.....	19
1.3.2. Componentes antioxidantes no enzimáticos.....	20
1.4. Metabolismo mitocondrial.....	21
2. Hipótesis y objetivos.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos específicos.....	22
3. Materiales y métodos.....	23
3.1. Determinación de zonas térmicas.....	23
3.2. Captura y obtención de muestras.....	25
3.3. Análisis de fotos para caracterización fenotípica.....	25
3.4. Capacidad antioxidante.....	28
3.4.1. TAC.....	28
3.4.2. Catalasa.....	28
3.5. Metabolismo mitocondrial.....	29
3.5.1 Citocromo c oxidasa.....	29
3.6. Análisis estadístico.....	29
4. Resultados.....	30

4.1. Caracterización fenotípica.....	30
4.2. Actividad antioxidante total .....	32
4.3. Actividad de catalasa .....	35
4.4. Actividad citocromo c oxidasa .....	40
5. Discusión.....	47
5.1. Caracterización fenotípica.....	47
5.2. Capacidad antioxidante .....	48
5.3. Actividad enzimática mitocondrial .....	51
6. Conclusiones .....	52
7. Referencias.....	53

## Índice de Abreviaturas

<b>COX</b>	Citocromo c oxidasa
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>GSH</b>	Glutación
<b>LST</b>	Land Surface Temperature
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	$\alpha$ -Melanocortin Stimulating Hormone
<b>MC1R</b>	Melanocortin 1 Receptor
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>TAC</b>	Total Antioxidant Capacity
<b>TRE</b>	Trolox Equivalent

## Índice de Tablas

**Tabla 1.** Número de individuos capturados según fenotipo y ambiente térmico.

**Tabla 2.** Valores de la media de melanismo por fenotipo y su desviación estándar.

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Fenotipos de paloma encontrados más frecuentemente en zonas urbanas.

---

**Figura 2.** Cascada de señalización provocada por la unión de la melanocortina  $\alpha$ -MSH al receptor MC1R para promover la traducción y transcripción de la tirosinasa y comenzar la síntesis de melanina.

---

**Figura 3.** Esquema simplificado del sistema de melanocortina, su pleiotropía, y la síntesis de eumelanina y feomelanina. Se muestra como el gen *POMC* genera 4 ligandos distintos (ACTH,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH) para 5 receptores de melanocortina (MC1R-MC5R) ubicados en distintos tejidos diana en el cuerpo.

---

**Figura 4.** Reacciones catalíticas de la catalasa según concentración de sustrato

---

**Figura 5.** Mapa térmico de la zona urbana de Santiago de Chile para la determinación de zonas de muestreo en base a la temperatura de la superficie terrestre (LST).

---

**Figura 6.** Espectro de grises en el ImageJ. Valores más bajos indican un píxel más oscuro y está vinculado a palomas más melánicas, mientras que los valores altos indican un píxel más claro y una paloma menos melánica.

---

**Figura 7.** Zonas de análisis de melanismo dibujadas en ImageJ en una paloma eutanasiada

---

**Figura 8.** Histograma producto de un análisis de la foto A en la Figura 6. El programa provee la media (Mean) de la intensidad de la zona, y su desviación estándar (StdDev)

---

**Figura 9.** Medias de melanismo basado en la intensidad de los píxeles calculado a través de ImageJ.

---

**Figura 10.** Niveles de TAC expresado categorizado por fenotipo y ambiente térmico. Diferencias significativas fueron probadas mediante One-Way ANOVA y una prueba de Fisher *a posteriori*.

---

**Figura 11.** Concentración de TAC en el plasma de *Columba livia* en función de la variabilidad de melanismo en el plumaje del ala.

---

**Figura 12.** Efecto de una zona térmica intermedia en Santiago sobre la concentración de TAC en plasma de *Columba livia* en función de la variabilidad de melanismo en el plumaje corporal.

---

**Figura 13.** Concentración de TAC detectado en plasma del fenotipo blue bar en función de variación en el plumaje del ala, y plumaje a lo largo del cuerpo.

---

**Figura 14.** Concentración de TAC en plasma del fenotipo checker en función de la variabilidad en el plumaje corporal.

---

**Figura 15.** Concentración de TAC en plasma del fenotipo white en función de temperatura corporal y melanismo del ala y melanismo corporal.

---

**Figura 16.** Actividad enzimática de catalasa en eritrocitos de *Columba livia* y su relación con el pool de datos de residuales del largo del ala en función a la masa corporal, melanismo del ala y variabilidad en el plumaje del ala.

---

**Figura 17.** Correlación entre actividad de catalasa y variabilidad en el plumaje del pecho en un ambiente térmico frío en Santiago.

---

**Figura 18.** Efecto de una zona cálida en Santiago sobre la actividad de catalasa en función de la masa y temperatura del ave.

---

**Figura 19.** Actividad enzimática de la catalasa en eritrocitos del fenotipo blue bar en función del melanismo del pecho y ala, así como de la variabilidad en el plumaje del pecho.

---

**Figura 20.** Actividad enzimática de la catalasa en eritrocitos del fenotipo t-checker en función de su variabilidad en el plumaje del ala.

---

**Figura 21.** Actividad enzimática de COX y su relación con la variabilidad en el plumaje del cuerpo y ala en el pool de datos

---



**Figura 22.** Actividad enzimática de COX en función de concentración de TAC, actividad enzimática de catalasa y la variabilidad en el plumaje del ala en una zona térmica intermedia en Santiago.

---

**Figura 23.** Actividad enzimática de COX en función de melanismo del pecho, variación en el plumaje del ala y variabilidad en el plumaje del pecho en una zona térmica cálida en Santiago.

---

**Figura 24.** Actividad enzimática de COX y su relación con la variabilidad en el plumaje del pecho en una zona térmica fría de Santiago

---

**Figura 25.** Actividad enzimática de COX en eritrocitos del fenotipo blue bar y su correlación con melanismo de la espalda y pecho, variabilidad en el plumaje del cuerpo y espalda.

---

**Figura 26.** Correlación en el fenotipo t-checker entre COX y, variabilidad en el plumaje del ala y variabilidad en el plumaje del pecho, como también la correlación en el fenotipo checker entre COX y, melanismo del pecho y variabilidad del plumaje en el pecho.

---

## Resumen

Las palomas ferales (*Columba livia*) presentan una gran variación fenotípica en la coloración de su plumaje, fenómeno que se denomina polimorfismo. Esta variabilidad se manifiesta en diversos grados de melanismo, los cuales se asocian con atributos fisiológicos debido al carácter pleiotrópico del sistema de la melanocortina, el cual consiste en una serie de péptidos llamados melanocortinas y sus receptores. Estos últimos son los responsables de diversas funciones como la síntesis de melanina, estimulación de actividad antioxidante, metabolismo y respuesta antiinflamatoria. Adicionalmente, diversos rasgos en especies sinantrópicas pueden resultar afectados por actividades o fenómenos antropogénicos como es el caso de la heterogeneidad térmica en zonas urbanas, conocidas como Islas de Calor Urbanas. Estas islas pueden promover una selección positiva de fenotipos con aptitudes fisiológicas compatibles con la existencia en el entorno urbano, como es la respuesta ante el estrés oxidativo, respuesta antiinflamatoria, homeostasis energética, entre otros.

El objetivo de este estudio fue determinar la variación de la capacidad antioxidante en palomas con distintos grados de pigmentación y procedentes de tres contextos térmicos urbanos, mediante la medición de la actividad enzimática de la catalasa y capacidad total antioxidante. Junto a ello, se evaluó la actividad metabólica mitocondrial a través de la actividad de la enzima citocromo-c oxidasa, para así pesquisar una relación con la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos indican que tanto el metabolismo mitocondrial en eritrocitos, así como la actividad antioxidante son favorecidos en individuos más uniformes en su coloración. Se concluye que la heterogeneidad térmica urbana incidiría principalmente en la actividad antioxidante de las palomas. Así, la temperatura ambiental se asociaría directamente con mecanismos de defensa antioxidante, donde prevalecen compuestos fenólicos a temperaturas más bajas y la actividad de catalasa en zonas más cálidas. Finalmente, este trabajo provee evidencia del impacto de la heterogeneidad térmica sobre el sistema pleiotrópico de la melanocortina.

**Palabras claves:** Actividad antioxidante, ecología urbana, estrés térmico, Islas de Calor Urbanas, pleiotropía, sistema de melanocortinas.

## Abstract

Feral pigeons (*Columba livia*) present a great phenotypic variation in the coloration of their plumage, a phenomenon called polymorphism. This variability is manifested in various degrees of melanism, which are associated with physiological attributes due to the pleiotropic nature of the melanocortin system, which consists of a series of peptides called melanocortins and their receptors. The latter are responsible for various functions such as melanin synthesis, stimulation of antioxidant activity, metabolism and anti-inflammatory response. Additionally, various traits in synanthropic species may be affected by anthropogenic activities or phenomena, such as thermal heterogeneity in urban areas, known as Urban Heat Islands. These islands can promote a positive selection of phenotypes with physiological aptitudes compatible with existence in the urban environment, such as the response to oxidative stress, anti-inflammatory response, energy homeostasis, among others.

The objective of this study was to determine the variation of the antioxidant capacity in pigeons with different degrees of pigmentation and from three urban thermal contexts, by measuring the enzymatic activity of catalase and total antioxidant capacity. Along with this, mitochondrial metabolic activity was evaluated through the activity of the cytochrome-c oxidase enzyme, in order to investigate a relationship with antioxidant activity. The results obtained indicate that both mitochondrial metabolism in erythrocytes, as well as antioxidant activity, are favored in more uniform individuals in their coloration. It is concluded that urban thermal heterogeneity would mainly affect the antioxidant activity of pigeons. Thus, environmental temperature would be directly associated with antioxidant defense mechanisms, where phenolic compounds prevail at lower temperatures and catalase activity in warmer areas. Finally, this work provides evidence of the impact of thermal heterogeneity on the pleiotropic system of melanocortin.

**Keywords:** Antioxidant activity, heat stress, melanocortin system, pleiotropy, selective pressure, urban ecology, Urban Heat Islands.

## 1. Introducción

### 1.1. Islas de calor urbanas

El “Antropoceno”, es la denominación con la cual científicos sugieren nombrar a esta época de la Tierra gracias al efecto de las actividades humanas, o también conocido como impacto antropogénico sobre los ecosistemas (Lewis & Maslin, 2015). Los humanos han alterado el entorno biofísico enormemente a través de explotación de recursos, contaminación, sobrepoblación y deforestación, para cumplir con demandas económicas y sociales que rigen las comunidades humanas. Esto último ha producido la modificación física irreversible del paisaje y medio ambiente, y con ello ha impactado la biodiversidad a nivel tanto ecológico como genético (Radespiel & Bruford, 2014; Wang et al., 2017; Kling et al., 2020). Entre las alteraciones del paisaje, la urbanización es una de las principales acciones antropogénicas que afecta ecosistemas y al componente biótico, promoviendo presiones selectivas (Des Roches et al., 2021).

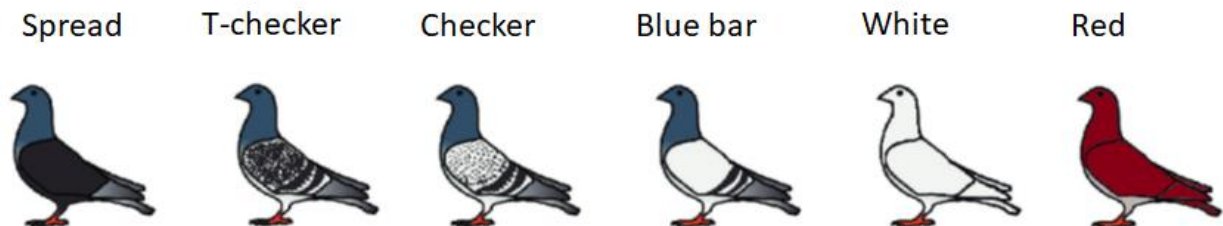
Las Islas de Calor Urbanas o *Urban Heat Islands* en inglés (UHI) son un fenómeno de microclima causado por la urbanización, en el cual las temperaturas del aire y la superficie son mayores que de las zonas rurales adyacentes (Bornstein, 1968). Esto se debe al aumento de superficies con bajo albedo, es decir, superficies no reflectantes que absorben una gran cantidad de radiación solar en comparación a superficies vegetativas. Además, contaminantes, actividad industrial, vehículos, características de la superficie, meteorología local, y medidas de mitigación implementadas como la siembra de árboles en las calles, pueden afectar la intensidad de la UHI de forma diferencial en una zona urbana (Taha, 1997; Rosenzweig et al., 2006), por lo cual se ha considerado usar el término “Archipiélago de Islas de Calor Urbanas” (Rosenzweig et al., 2006).

La importancia del estudio de los efectos de heterogeneidad térmica se basa en su relación con el cambio climático, la salud humana relacionada con el calor y el efecto en la biología y biodiversidad de organismos afectados por este fenómeno, sobre todo animales urbanos (Kaiser et al., 2016; Manoli et al., 2019; Des Roches et al., 2021). En este sentido, las palomas constituyen un buen modelo de estudio para analizar los efectos de las islas de calor urbanas, gracias a su estrecha asociación con poblaciones urbanas humanas, su gran variedad en fenotipos de plumaje (llamado polimorfismo) (Murton et al., 1974), y los efectos que este polimorfismo tiene sobre la supervivencia de palomas con ciertos caracteres fenotípicos (Obukhova, 2007; Vickrey et al., 2018).

### 1.1.1. Paloma bravía (*Columba livia*)

La paloma (*C. livia*, Columbidae) es una especie de ave de mediano tamaño que rara vez excede los 380 gramos de peso y que posee estimaciones desde 31-34 cm en longitud y desde 63 a 72 cm en envergadura de alas para individuos adultos (SEO, 2022). Sus rasgos más distintivos son su cabeza pequeña y oscura, con una estructura carnosa y blanca llamada cera en la parte superior del pico, la presencia de iridiscencias violetas y verdes en su cuello y sus ojos de color generalmente naranja, blanco o café (Maclary et al., 2021).

El plumaje puede variar fuertemente dentro de esta misma especie, en particular en zonas urbanas (Obukhova, 2007). Este fenómeno es conocido como polimorfismo, en el cual diferentes individuos dentro de la misma especie y población presentan diversas coloraciones y grados de melanismo conformando numerosos fenotipos en función a estas características. Tales fenotipos son reconocidos como: white (blancas en su totalidad o mayoría); *Red* o *Rufous* (coloración de beige/rojo); *Blue Bar* (grises con dos bandas negras en sus alas); *Checker* (misma coloración que blue bar, con presencia de manchas formando un tablero de damas); *T-Checker* (más oscura que checker con presencia de algunas manchas claras) y *Spread* (negras totales), por mencionar las más frecuentes (Čanádý & Mošanský, 2013).



**Figura 1.** Fenotipos de paloma encontrados más frecuentemente en zonas urbanas, esquema modificado de Feigin & Mallarino, (2018).

### Hábitat y distribución

Es un ave presente en todos los continentes, aunque originalmente es nativa del sur de Europa, parte de las islas británicas, Norte de África y el suroeste de Asia. Sin embargo, gracias a la actividad humana se encuentra distribuida como especie introducida en la mayor parte de América, las zonas templadas de Oceanía, sur de África, norte de Europa, y otras secciones de

Asia como Asia central, China, Japón e Indonesia (Stringham et al., 2012). Las poblaciones introducidas ferales (semidomésticas) descienden de poblaciones silvestres de fenotipo blue bar (Botni & Williamson, 1949).

Su hábitat natural se constituye en acantilados costeros, montañosos, y cortados fluviales. Las poblaciones semidomésticas en zonas urbanas reemplazan los barrancos y acantilados por edificaciones altas humanas, lugares donde también anidan, y suelen estar cerca de parques públicos donde pueden alimentarse de sobras de alimento o semillas (Przybylska et al., 2012; SEO, 2022).

### **Comportamiento, alimentación y reproducción**

Esta especie posee una conducta gregaria y es de dieta omnívora, si bien su dieta natural consiste en principalmente semillas, es capaz de alimentarse de frutas y hasta algunos invertebrados (Murton & Westwood, 1966; Lefebvre & Giraldeau 1984; Jokimaki & Suhonen 1998). En zonas urbanas se conglomeran para comer entusiasmadamente sobras de comida humana, y son comúnmente alimentadas con migas de pan (Sol et al., 1998).

Es una especie monógama, y puede reproducirse a lo largo de todo el año, aunque alcanzan su máxima actividad en primavera y verano (Goodwin, 1960). El sitio del nido tiende a estar ubicado en rincones y grietas de acantilados o edificios, sitios que el macho suele escoger y atraer una pareja mediante arrullos. Usualmente una pareja empolla dos huevos de color blanco y ambos se reparten el cuidado parental, desde la incubación la cual dura entre 16-19 días, hasta la alimentación de los pichones mediante “leche de paloma”, denominación al alimento regurgitado de los progenitores (Wendell, 1977). Los pichones maduran entre 30-35 días, donde ya pueden volar y dejar el nido (Moye et al., 2016; Shallu, 2020).

### **Relación con humanos**

Los humanos y las palomas poseen una larga historia de convivencia e interacción, siendo estas últimas domesticadas hace alrededor de 5000 años (Stringham et al., 2012). A lo largo de la historia han obtenido distintos propósitos tales como mascotas, alimento (Driscoll et al., 2009), hasta ser mensajeras gracias a su gran habilidad de orientación, incluso llegando a ser usadas en guerras hasta el siglo XX. Esta relación estrecha implicó el desarrollo de poblaciones semidomesticadas, es decir, palomas domesticadas que escaparon y regresaron a una vida

silvestre, estableciéndose en comunidades y urbes humanas donde encontraron diversos espacios de nidificación y recursos (Wendell, 1977; Przybylska et al., 2012). La gran distribución de esta especie se explicaría por el desplazamiento de comunidades humanas que utilizaron palomas con diversos fines y por el desarrollo de condiciones propicias para el establecimiento de las palomas.

Los ambientes urbanos imponen *Evolutionary social drivers* (Des Roches et al., 2021), tales como las ya mencionadas Islas de Calor Urbanas. Las características térmicas de estos ambientes pueden generar presiones selectivas en poblaciones de palomas hacia ciertos fenotipos. Por ejemplo, en palomas se ha identificado que ciertos grados de melanismo o patrones de pigmentación determinan su éxito reproductivo en ambientes urbanos (Vickrey et al. 2018). Además, se reporta que fenotipos más melánicos son más susceptibles al estrés térmico y los costos que conllevan este estrés para el animal, esto en comparación con individuos menos melánicos que poseen mayor capacidad termorreguladora en exposición al sol (Angelier et al., 2020). Esto podría explicar la gran diversidad de fenotipos melánicos en palomas de ambientes urbanos en comparación a aquellas poblaciones rurales (Obukhova, 2007).

## 1.2. Sistema de melanocortina

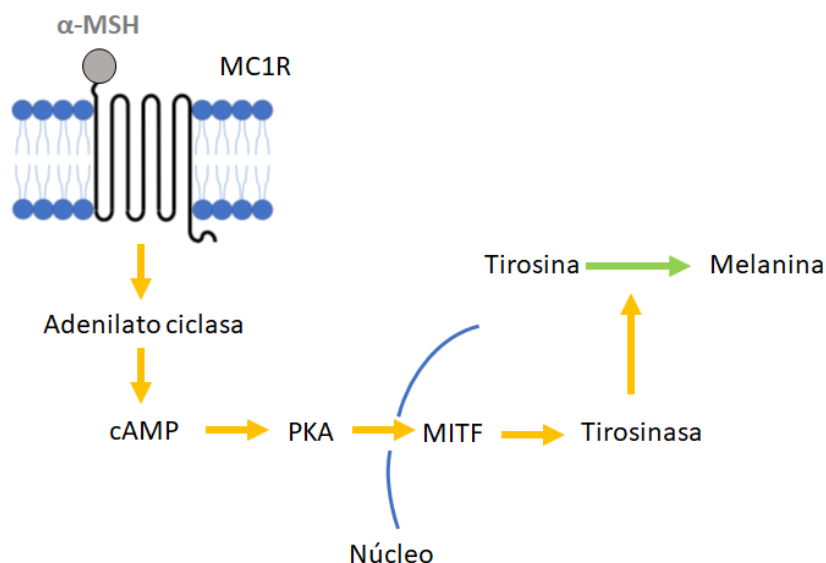
Los vertebrados consiguen la coloración de su piel, cutícula, pelaje y plumaje por pigmentos llamados melanina, produciendo una amplia variación de fenotipos a través de la distribución y combinación específica de niveles entre tipos de melanina, siendo esta la eumelanina asociada al color negro y feomelanina asociada al color rojo (Prota, 1980; Ducrest et al., 2008). Este tipo de coloración ha sido asociada a funciones tales como camuflaje, termorregulación, selección sexual (Darwin, 1871; Anderson 1994; Fan et al., 2005) entre otras. El mecanismo subyacente a la melanogénesis es mediado por el sistema de la melanocortina; un conjunto de genes altamente conservados en vertebrados (Schiöth et al., 2005; Cone, 2006) que codifican una serie de ligandos y receptores directamente involucrados en la síntesis de melanina, o melanogénesis, así como otros procesos fisiológicos como la estimulación de actividad antioxidante, metabolismo y respuesta antiinflamatoria (Ducrest et al., 2008; Roulin & Ducrest, 2011).

La melanogénesis es un proceso que ocurre principalmente en los melanocitos (Mundy, 2005), y su regulación mediante la acción conjunta del sistema nervioso y endocrino, donde un estímulo externo detectado por el primero se traduce por el segundo o en una vía neuroendocrina (Senger,

1997). Un ejemplo de estímulos externos que promueven melanogénesis es la incidencia de radiación UV (Böhm et al., 2005).

### Melanocortinas, receptores y antagonistas

Las melanocortinas son hormonas de carácter proteico y consisten en modificaciones postraduccionales de las proopiomelanocortinas: Estas melanocortinas consisten en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH y ACTH (hormona adrenocorticotropina) y son sintetizadas principalmente en la hipófisis por el gen *POMC* (Schiöth et al., 2005). Estas hormonas, en especial la  $\alpha$ -MSH, están involucradas en gran medida en la pigmentación de los vertebrados, incluidos los mamíferos mediante la síntesis de eumelanina (Geschwind et al., 1972; Ducrest et al., 2008). Las hormonas proteicas como la  $\alpha$ -MSH, se unen a receptores en la membrana celular, más específicamente proteínas G triméricas, generando la activación de la proteína adenilato ciclasa y que, a su vez, convierta el ATP en cAMP (Senger, 1997) permitiendo la activación de quinasas y enzimas partícipes de la síntesis de eumelanina tales como la enzima tirosinasa (Mason, 1948). En particular,  $\alpha$ -MSH induce la melanogénesis uniéndose al receptor de membrana MC1R (Scherer & Kumar 2010), el receptor principalmente implicado en la pigmentación de la piel. Estos receptores de melanocortinas (MC1R a MC5R) están distribuidos a lo largo del cuerpo de los animales (Emaresi et al., 2013).



**Figura 2.** Síntesis de melanina producto de una cascada de señalización provocada por la unión de la melanocortina  $\alpha$ -MSH al receptor MC1R. La formación de cAMP gracias a la actividad de



la adenilato ciclasa permite la activación de quinasas, que por su parte fosforilan al factor de transcripción MITF (Yasumoto et al., 1995) y así promover la traducción y transcripción de la tirosinasa y comenzar la síntesis de melanina.

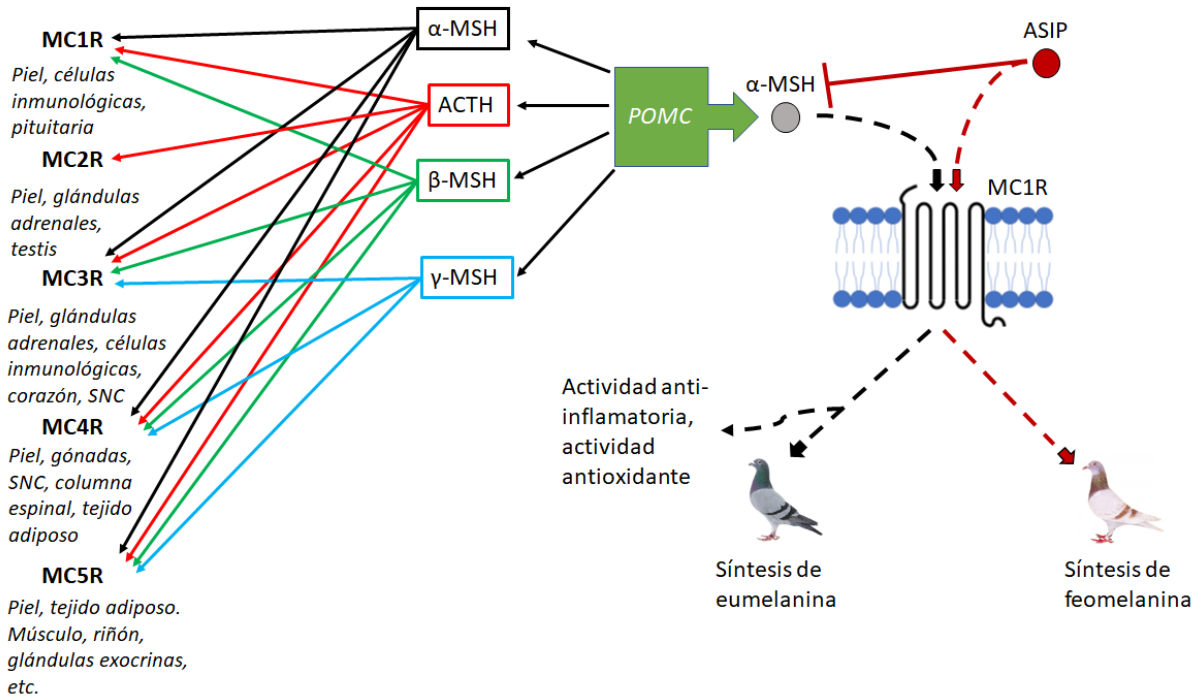
El último componente del sistema de melanocortina corresponde al gen *ASIP* y sus proteínas homónimas, los antagonistas *agouti signaling protein* (ASIP), proteínas paracrinas que compiten con las melanocortinas por la unión a los receptores MC1-5R (Ducrest et al., 2008). Gracias a estos antagonistas se regulan los niveles de eumelanina y feomelanina, produciendo niveles relativos de coloración (Schiöth et al., 2003). La síntesis de feomelanina, el pigmento responsable de coloración roja y/o amarilla en animales (Miller et al., 1993; Rees, 2000), es una vía alternativa a la síntesis de eumelanina. Esta se activa ya sea debido a que ASIP se une a MC1R y por tanto inhibe el proceso desencadenado por  $\alpha$ -MSH o debido a alguna mutación que afecte la unión entre  $\alpha$ -MSH y MC1R (Ito, 2003; Ducrest et al., 2008).

### **Pleiotropía**

En los vertebrados el melanismo tiene implicancias fisiológicas y conductuales (Ducrest et al., 2008; Roulin & Ducrest, 2011). Por ejemplo, individuos oscuros suelen tener mayor resistencia a estrés, agresividad, actividad sexual, actividad en la tiroides y metabolismo energético (Ducrest et al., 2008). Este fenómeno fisiológico puede ser explicado por la pleiotropía del sistema de melanocortina (Ducrest et al., 2008).

Cada melanocortina puede ser ligando para varios receptores (Figura 3), cuya cascada de señalización culmina en un proceso fisiológico distinto dependiendo del tejido y receptor (Ducrest et al., 2008; Emaresi et al., 2013). En particular, la melanocortina  $\alpha$ -MSH, y su receptor MC1R, participan de los procesos de melanogénesis, homeostasis energética, respuesta antiinflamatoria, resistencia a estrés, actividad antioxidante y actividad conductual (sexual y agresividad) (Ducrest et al., 2008; Maresca et al., 2010). Otros ejemplos de este fenómeno lo constituyen: i) ACTH con el receptor MC2R, que induce la secreción de hormonas sexuales esteroidales (Eberle, 1988); ii) la deficiencia de MC5R que reduce agresividad (Morgan et al., 2004) y; iii) la unión de  $\alpha$ -MSH y MC4R, que promueve la resistencia ante estímulos estresantes y resistencia al daño oxidativo (Böhm et al., 2005; Racca et al., 2005) pero también poseen una importante función fisiológica adaptativa. En el contexto de las Islas de Calor, las aves siendo animales homeotermos, regulan su temperatura corporal mediante el sistema nervioso central, el cual detecta cambios en la en la alimentación o en la temperatura ambiental. Un mecanismo

adaptativo es mediante  $\alpha$ -MSH, el cual se asocia fuertemente con un incremento en hormonas TSH (Thyroid Stimulating Hormone) y T4, y MC4R que se asocia fuertemente con el balance energético y la temperatura corporal vía termogénesis (Fan et al., 2005).



**Figura 3.** Esquema simplificado del sistema de melanocortina y su pleiotropía, mostrando como el gen *POMC* genera 4 ligandos distintos (ACTH,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH) para 5 receptores de melanocortina (MC1R-MC5R) ubicados en distintos tejidos diana en el cuerpo. Como una situación representativa se muestra como la melanocortina  $\alpha$ -MSH se une a MC1R para activar la síntesis de eumelanina, así como otras funciones fisiológicas (e.g., actividad anti-inflamatoria, actividad antioxidante), también se observa la actividad de antagonista ASIP, uniéndose a MC1R e impidiendo al mismo tiempo la unión de  $\alpha$ -MSH al mismo receptor, y así induciendo la síntesis de feomelanina.

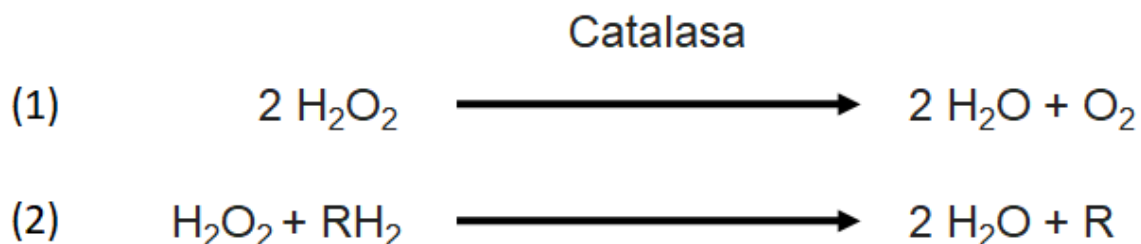
### 1.3. Actividad antioxidante

El oxígeno es esencial para los organismos aeróbicos, sin embargo, puede ser dañino mediante su acción oxidativa. Esto se debe a la capacidad del oxígeno de formar radicales libres llamados especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*) (Sansas et al., 2008) como consecuencia de la respiración celular en la mitocondria, durante la fase de fosforilación

oxidativa. Debido a los electrones desapareados de los ROS estos pueden reaccionar con moléculas celulares y extracelulares, causando la oxidación de proteínas y DNA, generando riesgo de mutaciones, y la peroxidación lipídica (Halliwell & Aruoma, 1991; Sies, 1997), por lo que es fundamental para los organismos poseer mecanismos de protección contra especies reactivas como el  $\bullet\text{O}^{-2}$  (radical superóxido),  $\bullet\text{OH}$  (radical hidroxilo) o el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno) (Sansas et al., 2008). Estas defensas pueden ser de origen enzimático como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa las cuales catalizan reacciones de estas especies reactivas a no reactivas. Otro origen de los antioxidantes es no enzimático, tal como las vitaminas C y E, y el ácido úrico, tales compuestos cuales actúan como agentes reductores o absorbiendo los radicales libres (Apak et al., 2004; Tsahar et al., 2006).

### 1.3.1. Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una de las enzimas más importantes para la actividad antioxidante debido a su respuesta ante el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 4), el cual es descompuesto en agua y oxígeno (Izawa et al., 1996). Si bien esta frecuentemente localizada dentro de organelos tales como los peroxisomas (Alberts, 2017) o al interior de las mitocondrias por ser la principal fuente de producción de ROS (Neubert et al., 1962; Srinivasan & Avadhani 2012), en eritrocitos se puede encontrar soluble en el citoplasma (Breton-Goriu & Guichard, 1975).



**Figura 4.** (1) Vía catalítica: a concentraciones abundantes de peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  este se descompone en agua y oxígeno. (2) Vía peroxidativa: a bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donantes de hidrógeno son oxidados formando agua (Schriner & Linford, 2006).

El sistema de melanocortina posee diversas relaciones con la actividad antioxidante. Específicamente, se conoce que la síntesis de eumelanina posee una vía metabólica oxidativa, por lo cual requiere del desarrollo de actividad antioxidante que evite o reduzca la oxidación de componentes celulares y daño al ADN por oxidación (Böhm et al., 2005). Adicionalmente, el

carácter pleiotrópico del sistema de melanocortina permite, mediante  $\alpha$ -MSH, la activación de mecanismos de protección (e.g., contra rayos UV), induciendo un aumento de la actividad antioxidante de la catalasa, en un proceso independiente de la melanogénesis (Böhm et al., 2005; Maresca et al., 2010).

Las condiciones ambientales pueden alterar la actividad de catalasa en animales, en particular las aves sometidas a deshidratación son susceptibles al estrés oxidativo (Navarrete et al., 2021) lo que requiere mecanismos de defensa tales como la catalasa, enzima que se ha reportado aumenta su actividad en condiciones de deshidratación desde animales como la rana leopardo hasta semillas de girasol, e incluso la levadura *S. cerevisiae* es más susceptible a la pérdida de agua en ausencia de catalasa (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002; Bailly et al., 2004; França et al., 2005). Si bien, la temperatura afecta la actividad enzimática, las aves son animales homeotermos, por lo que la incidencia del calor o frío sobre la catalasa llegaría mediante mecanismos indirectos, tales como la deshidratación y el calor, o un aumento del metabolismo basal en frío que conlleva a una mayor actividad antioxidante. Por último, se ha demostrado que en palomas habitantes de entornos contaminados por actividad humana existe un incremento de la actividad antioxidante, sin embargo, ciertos componentes antioxidantes, tales como la glutatión reductasa o la superóxido dismutasa, pueden ver su actividad reducida por la presencia de contaminantes como plomo o cadmio (Kurhalyuk et al., 2009), por lo que el aumento de la capacidad antioxidante estaría asociada principalmente a una alta actividad de catalasa como compensación (Kurhalyuk et al., 2009).

### 1.3.2. Componentes antioxidantes no enzimáticos

Los componentes antioxidantes no enzimáticos de los animales consisten en su mayoría moléculas de carácter fenólico que presentan un benceno con un grupo hidroxilo como elemento en común entre los compuestos (Elzaawely et al., 2012), ejemplos de estos compuestos son carotenos, las vitaminas A, C y E, y en particular el ácido úrico, siendo el principal desecho nitrogenado excretado por las aves y siendo un potente antioxidante en el plasma de estas (Wright, 1995; Tsahar et al., 2006). El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la concentración de estas moléculas, y la cantidad de hidroxilos y disposición de los grupos hidroxilo dentro de las mismas (Vertuani et al., 2004; Azman et al., 2014), en esta misma línea para describir la capacidad antioxidante total de estas moléculas no enzimáticas se usa la abreviatura TAC (Total Antioxidant Capacity).

En el caso del glutatión (GSH), cuya presencia es importante puesto que además de poseer un rol antioxidante, sus niveles de concentración también determinan la vía de síntesis de melanina (Ducrest et al., 2008). Bajos niveles de GSH promueven la eumelanogénesis, y altos niveles de GSH promueven la feomelanogénesis, tales proporciones pueden afectar el plumaje post eclosión en pichones de paseriformes, donde individuos más melánicos poseen menos GSH y mayores antioxidantes no enzimáticos en el plasma (Galván & Alonso-Álvarez 2008). Puesto que la relación entre elementos antioxidantes es sinérgica (Sies, 1993) ante bajos niveles de GSH de lidiar con la producción de ROS en la eumelanogénesis el sistema compensa con otros elementos antioxidantes (Galván & Alonso-Álvarez 2008; Galván & Solano, 2015), adicionalmente se ha reportado en salmónidos que individuos más melánicos poseen mayor TAC (Parolini et al., 2018), esta información sugiere que los elementos antioxidantes no enzimáticos se correlacionan con el sistema de melanocortina.

#### 1.4. Metabolismo mitocondrial

Se ha demostrado que, en algunos grupos de mamíferos, aves y reptiles, los individuos más melánicos poseen una tasa metabólica basal más alta que otros individuos de la misma especie (Roulin & Ducrest, 2011), esto se asocia a que las melanocortinas  $\alpha$ - y  $\beta$ - MSH y los receptores MC3R y MC4R inducen la producción de hormonas en la tiroides, estimulando mayor metabolismo y actividad física (Ducrest et al., 2008). Paralelamente, las melanocortinas estimulan la termogénesis aumentando aún más el gasto de energía (Ducrest et al., 2008). Dicho lo anterior, se puede esperar que el grado de melanismo se asocie a una mayor actividad mitocondrial la cual es mediada por la actividad de enzimas metabólicas. Una enzima clave del metabolismo aeróbico y las ROS es la citocromo-c oxidasa (COX; E.C. 1.9.3.1), la cual durante el último paso de la fosforilación oxidativa transfiere electrones a una molécula de oxígeno, promoviendo la formación del radical superóxido  $\bullet\text{O}^{-2}$ , el cual es dismutado sintetizándose  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el sustrato de la catalasa (Li et al. 2013).

Dado que tanto el metabolismo como la actividad antioxidante pueden variar junto con la pigmentación gracias a los mecanismos fisiológicos del sistema de melanocortina, se propone la medición de la actividad enzimática de la catalasa y componentes antioxidantes no enzimáticos

entre palomas de distintos grados de melanismo. Así mismo, se propone medir la actividad metabólica mitocondrial a través de la actividad de la enzima citocromo-c oxidasa, y así establecer una relación con la actividad antioxidante, debido a su producción secundaria del precursor del sustrato de la catalasa, y con el melanismo. Por último, las palomas con diferentes grados de melanismo permiten la oportunidad para dilucidar el efecto de las Islas de Calor a nivel interpoblacional e intrapoblacional sobre su fisiología por diversas razones: i) los fenotipos de su plumaje son fácilmente reconocibles y se basan en un mecanismo bien documentado; ii) la pleiotropía del sistema de melanocortina sugiere una relación entre la coloración de las aves y otras características fisiológicas, como termorregulación, metabolismo, respuesta inmune y estrés oxidativo (Ducrest et al., 2008; Emaresi et al., 2013; Angelier et al., 2018; Côte et al., 2018; Angelier et al., 2020); iii) el color del plumaje en *C. livia* se ha relacionado recientemente con la termorregulación y estrés térmico (Angelier et al., 2020); iv) los paisajes urbanos imponen impulsores sociales humanos como las Islas de Calor, que podrían generar presiones selectivas sobre la fisiología de palomas salvajes en función de su respuesta termorreguladora. Dicho esto, se busca evaluar cómo la heterogeneidad térmica-espacial afecta diferencialmente la respuesta de las palomas en función del estrés térmico.

## 2. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

Dada la existencia de diversos grados de melanismo en palomas, se espera que la actividad de antioxidante varíe en función de la pigmentación de estas aves, de la actividad de mitocondrial y del estrés térmico ambiental.

### Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante de las palomas de acuerdo con su fenotipo de coloración y características térmicas de su hábitat.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente aves de tres ambientes térmicos contrastantes, en función del grado de melanismo, mediante el análisis digital de fotografías.

2. Caracterizar rasgos fisiológicos a partir de muestras de sangre, mediante la evaluación de las actividades enzimáticas de catalasa, citocromo -c oxidasa y actividad antioxidante total.
3. Evaluar el efecto de las condiciones ambientales y el fenotipo de coloración, sobre la relación entre actividad antioxidante y metabolismo mitocondrial.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Determinación de zonas térmicas

Para determinar zonas urbanas con diferentes temperaturas en la ciudad de Santiago, se empleó la temperatura de la superficie terrestre (*Land Surface Temperature*, LST). El LST se usa ampliamente en una variedad de campos que incluyen clima urbano, evapotranspiración, cambio climático, ciclo hidrológico, entre otros (Li et al., 2013). Este índice se calcula del siguiente modo:

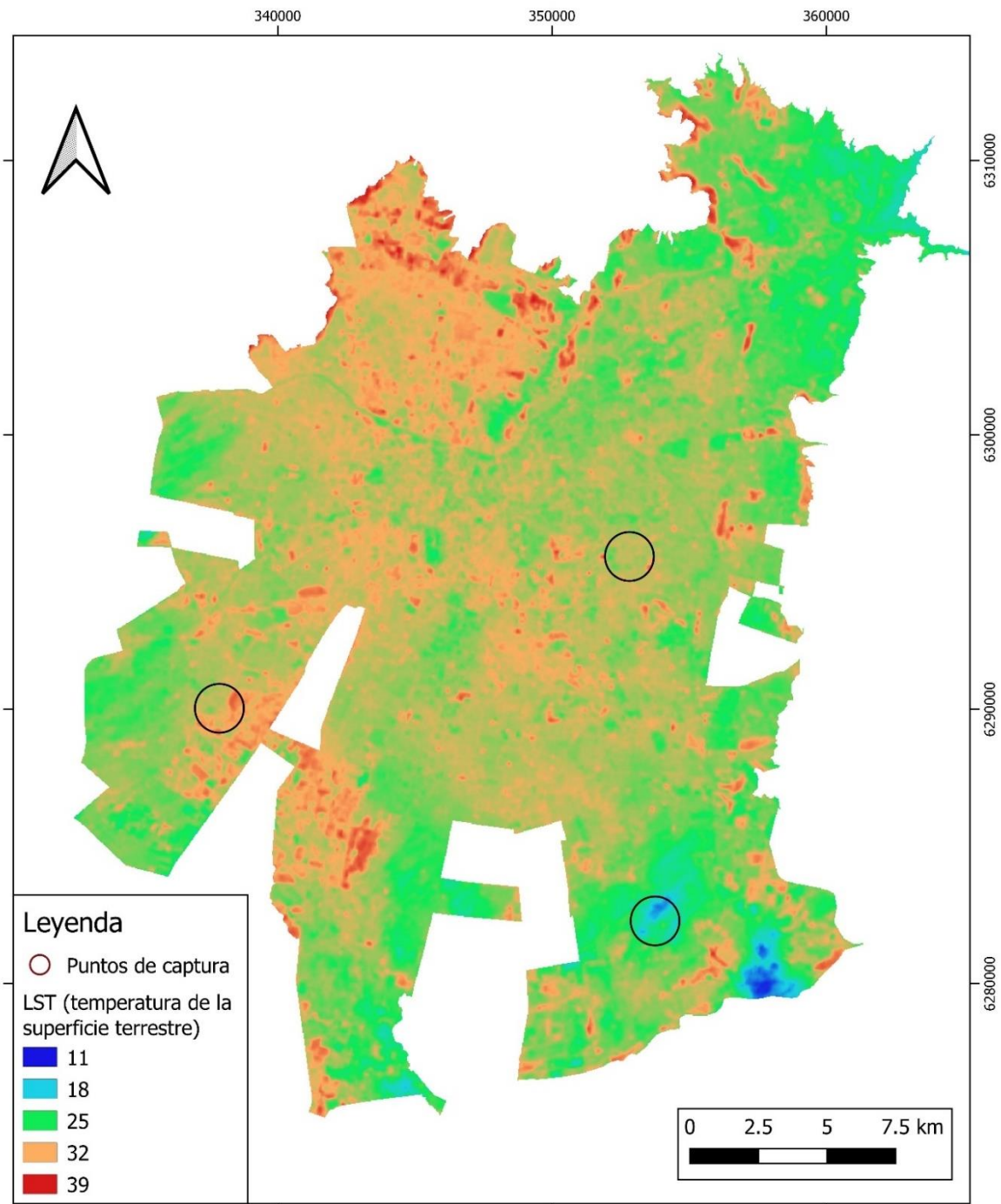
$$LST = (BT / (1 + (0.00115 * BT / 1.4388) * \ln(\epsilon)))$$

Donde:

BT= Temperatura de brillo (radiación emitida)

$\epsilon$ = Emisividad

La determinación del LST fue realizada en Qgis 3.14.16, a través de una imagen de enero del 2022 del satélite Landsat 8 donde se obtuvieron los valores de LST por píxeles de 30 por 30 metros obteniendo los puntos más fríos y calientes de Santiago (Figura 5). Las zonas seleccionadas para la captura de palomas corresponden a tres puntos con diferentes valores de LST, contemplando una isla de calor (zona de Maipú/Cerrillos), uno de los puntos más fríos de la ciudad (Puente Alto) y una zona intermedia (Ñuñoa). La isla de calor seleccionada está en consenso con lo reportado por Sarricolea Espinoza & Martín-Vide (2014) y Montaner-Fernández et al., (2020).



**Figura 5.** Mapa térmico de la zona urbana de Santiago de Chile para la determinación de zonas de muestreo en base a la temperatura de la superficie terrestre (LST).



### 3.2. Captura y obtención de muestras

Se capturaron 48 individuos desde tres zonas con diferencias térmicas sostenidas en el tiempo: punto frío (Puente Alto), temperatura intermedia (Ñuñoa) e isla de calor urbana (Maipú/ Lo Espejo). En estas zonas se capturaron individuos adultos en un gradiente de melanismo abarcando los fenotipos eumelánicos: spread, t-checker, checker, blue bar y white (Čanádý & Mošanský, 2013). Las palomas se capturaron mediante trampas de piso para su posterior caracterización y obtención de muestras en las dependencias de la Facultad de Ciencias.

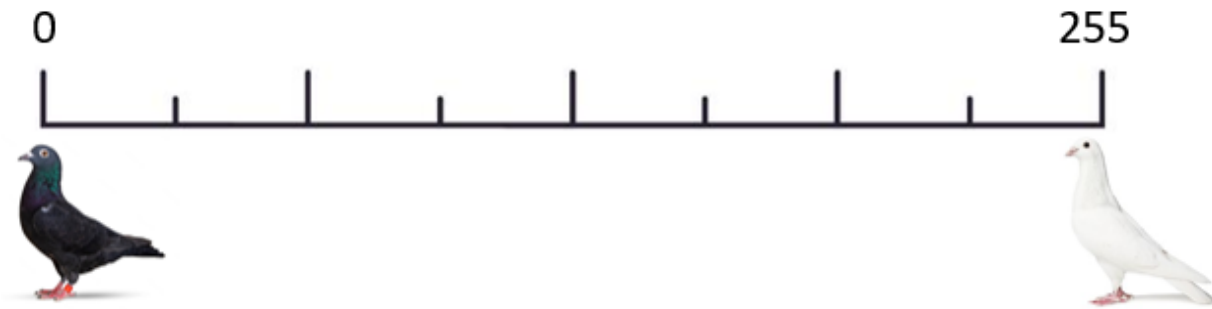
La caracterización consistió en identificar su fenotipo basado en los patrones de pigmentación descritos por Čanádý & Mošanský (2013), y la medición de varios parámetros. Antes de ser eutanasiadas se registraron: masa corporal ( $\pm 0,01$  g); temperatura corporal ( $\pm 0,05$  °C) con una termocupla insertada 1 cm en la cloaca, y después de la eutanasia, se registraron dimensiones corporales (tarso, ala, cola, pico y longitud total) con un pie metro y una regla ( $\pm 0,1$  cm). Finalmente, se fotografiaron vistas dorsales, ventrales y del ala derecha extendida para analizar el grado de melanismo mediante el uso del programa computacional ImageJ (Schneider et al., 2012).

Previo a la eutanasia se extrajo sangre (2-3 mL) en dos tubos de centrifugación de 1,5 mL heparinizados. La sangre fue centrifugada por 10 minutos a 15000 rpm y 4°C con la finalidad de separar el plasma y los eritrocitos. Tras la separación estos componentes se almacenaron a -80°C hasta el desarrollo de los ensayos enzimáticos y mediciones de antioxidantes (TAC). Los valores netos obtenidos para estas mediciones fueron estandarizados por la concentración de proteína de la muestra, usando el método descrito por Bradford (1976).

Las actividades realizadas en este trabajo fueron aprobadas por el CICUA de la Universidad de Chile (22534-FCS-UCH) y el Servicio Agrícola y Ganadero (Resolución exenta N°: 892/2022), en el contexto del proyecto FONDECYT de iniciación n° 11221062 (ANID).

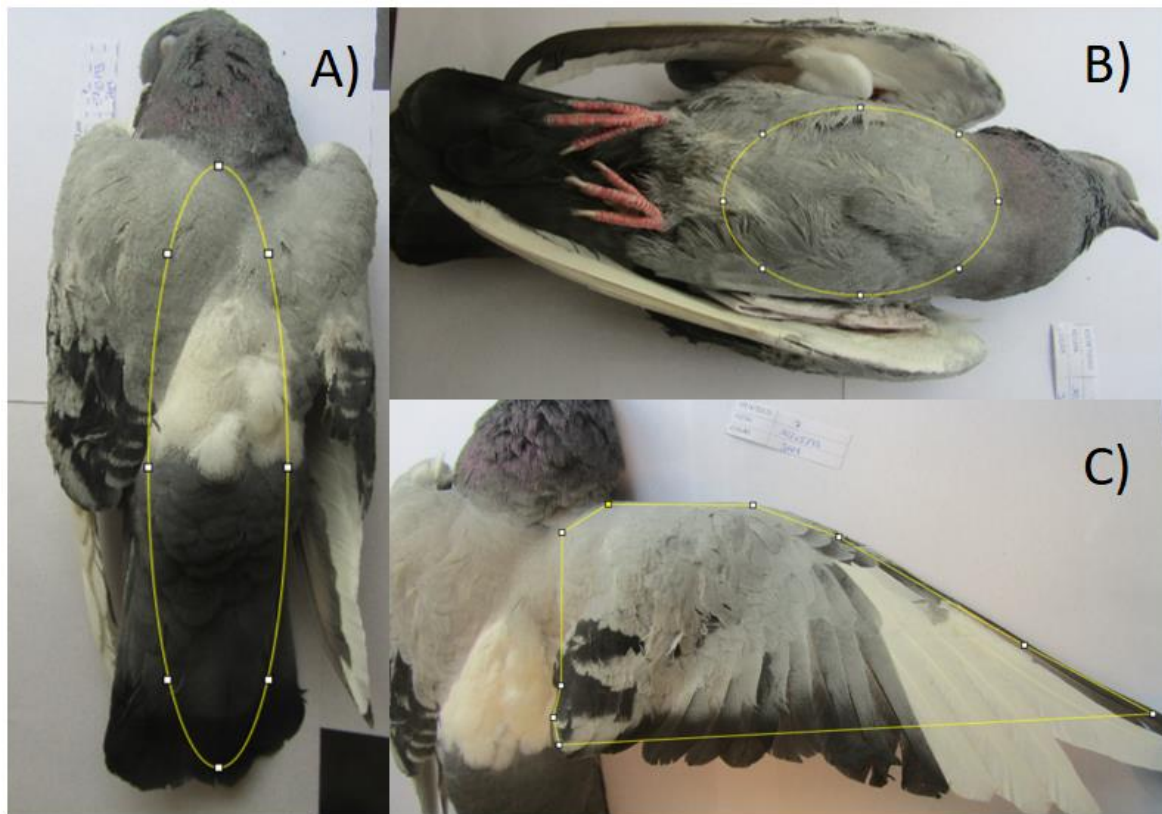
### 3.3. Análisis de fotos para caracterización fenotípica

El grado de melanismo se midió por individuo de manera digital analizando las fotos del ala derecha, pecho y espalda por medio del programa ImageJ. El programa mide el espectro de grises de cada píxel dentro de una zona determinada, asignando a cada píxel un valor desde el 0 (más oscuro, negro) al 255 (más claro, blanco), (ver Figura 6).



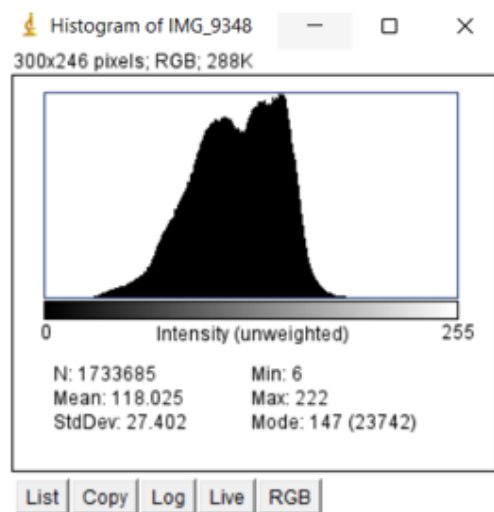
**Figura 6.** Índice de melanismo, corresponde al espectro de grises en el ImageJ. Valores más bajos indican un píxel más oscuro y está vinculado a palomas más melánicas, mientras que los valores altos indican un píxel más claro y una paloma menos melánica.

La combinación de estos píxeles otorga un valor en promedio de la sección medida. La zona por medir se determina dibujando óvalos sobre el pecho y la espalda, y un polígono en el ala, buscando abarcar la mayor cantidad de área sin incluir otras secciones del cuerpo, sombras ocasionadas por el plumaje o el fondo blanco de la foto (Figura 7).



**Figura 7.** Zonas de análisis de melanismo dibujadas en ImageJ en una paloma eutanasiada. A) Espalda, la zona de análisis va desde la base del cuello hasta la punta de la cola, se evitan las alas y el cuello. B) Pecho, la zona de análisis va desde la base del cuello hasta el plumaje de las patas, distintivo por la pérdida de uniformidad en el plumaje e incremento de sombras; se evita el cuello, las alas, y las patas. C) Ala, se dibuja un polígono desde la ubicación aproximada del inicio del húmero hasta la rémige primaria más lejana, se evita la espalda. En todos los casos, aparte de las otras secciones del cuerpo, también se busca evitar sombras y el fondo blanco de las fotos.

A partir de las secciones corporales, se obtuvo un histograma con la cantidad de píxeles en función de la escala de grises (0 a 255). El resultado de este análisis entregó el valor promedio de intensidad de píxeles el cual denominaremos como melanismo en los análisis, así como la desviación estándar. Con la combinación de los datos de estas tres secciones del cuerpo se calculó un promedio de melanismo del animal completo, desviación estándar (SD) y coeficiente de variabilidad (CV) (Figura 8). Tanto la desviación estándar como el coeficiente de variación miden la dispersión de valores en un conjunto de datos. La desviación estándar mide qué tan lejos se encuentran los valores respecto a la media. En cambio, el CV es la relación entre la desviación estándar y la media, y por ello permite comparar la variación relativa entre individuos o grupos, aunque tengan distintos valores promedio. Además, el CV provee la posibilidad de dimensionar la variabilidad en un objeto de estudio desconocido (ideal para nuestros valores de melanismo, cuya magnitud no nos es familiar).



**Figura 8.** Histograma producto de un análisis de la foto A en la Figura 7. El programa provee la media (Mean) de la intensidad de la zona, y su desviación estándar (StdDev).

### 3.4. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las palomas se cuantificó de dos maneras: 1) actividad antioxidante no enzimática o TAC mediante la concentración de compuestos fenólicos antioxidantes en el plasma, y 2) la actividad enzimática de la catalasa en los eritrocitos.

#### 3.4.1. TAC

La medición de TAC siguió el protocolo establecido por Apak et al. (2004), el estándar ocupado fue el compuesto fenólico trolox (equivalente hidrosoluble de la vitamina E) y las unidades de medición se expresan como equivalentes de Trolox (Trolox equivalents, TRE). Fracciones del plasma se diluyeron al 10% en 1x PBS, posteriormente se incubó 1 hora a 25 °C en un medio conteniendo 1 M acetato de amonio ( $\text{AcNH}_4$ ), 10 mM  $\text{CuCl}_2$ , Etanol 96% y 7,5 mM neocuproína. Finalmente, se midió 0,2 mL del medio de reacción en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO UV/VIS a 450 nm de longitud de onda.

Las unidades de medición finales se expresan como Trolox Equivalent (TRE) ( $\text{mM} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína).

#### 3.4.2. Catalasa

Para determinar la actividad antioxidante de la catalasa se usó el kit comercial “Catalase Activity Assay Kit (ab83464, Abcam plc. Cambridge, MA)”, mediante el método descrito en el protocolo del fabricante. Rápidamente se descongeló el pellet celular, y se masaron 0,2 gramos de eritrocitos en una balanza analítica para suspender y homogenizar en 0,2 mL del Buffer de Ensayo del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. El medio de reacción se realizó con la muestra, Buffer de Ensayo proporcionado por el kit, y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, se incubó a 25°C por 30 minutos donde paramos la reacción con una Stop Solution. Siguió se prepara una solución llamada Developer Mix conteniendo el Buffer de Ensayo para catalasa, OxiRed Probe, y peroxidasa de rábano (HRP), se mezcla esta solución con el medio de reacción conteniendo la Stop Solution con un volumen final de 0,136 mL, y se incubó a 25°C por 10 min protegido de la luz. Finalmente, la actividad de catalasa se midió con un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO UV/VIS a 570 nm de longitud de onda.

Las palomas de fenotipo white fueron excluidas de este ensayo debido a limitaciones en el número de ensayos proporcionado por el kit.

Las unidades de medición fueron Actividad de catalasa (nmol/min/mL). Después de ajustar por nivel de proteína las unidades finales de medición se expresan como Catalasa (mmol/min\*mg proteína).

### 3.5. Metabolismo mitocondrial

La medición de la actividad de la COX se realizó siguiendo el protocolo establecido por Navarrete et al. (2021). Brevemente, 0,2 gramos de pellet celular de glóbulos rojos fueron masados en una balanza analítica ( $\pm 0,0001$ ) y se homogenizaron en hielo en una solución de buffer fosfato 0,1 M y EDTA 2 mM (pH=7,3), considerando una relación de peso/volumen de 1:5. El homogenizado luego fue tratado con ultrasonido en hielo usando un 130 Watt Ultrasonic Processor (VCX 130) para deshacer las membranas mitocondriales. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante conteniendo las proteínas.

La actividad de COX se expresa en las unidades COX ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  proteína)

#### 3.5.1 Citocromo c oxidasa

La actividad de COX se cuantificó en un medio de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7), 120 mM KCl, 250 mM sacarosa y citocromo c reducido con DTT con un volumen final de 0,2 mL. Actividad de COX se evaluó con un coeficiente de extinción de  $21,84 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 550 nm debido a que esta es la longitud de onda donde se observa el pico de absorción del citocromo c reducido. Tal medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO UV/VIS.

### 3.6. Análisis estadístico

Para identificar diferencias en el melanismo, actividades enzimáticas y TAC con respecto al fenotipo de coloración y el ambiente térmico, se realizaron un análisis de varianza de una vía (One-Way ANOVA) y luego pruebas de Fisher *a posteriori*. Además, se evaluó el grado de asociación que posee el melanismo con las características fisiológicas medidas mediante

regresiones lineales de Pearson. No obstante, debido a su bajo número poblacional, las palomas del fenotipo white, fueron analizadas mediante correlaciones por permutación. Por último, para asociaciones encontradas entre dimensiones corporales y rasgos fisiológicos se emplearon residuales para sustraer el efecto que posee la masa de los individuos en las correlaciones. Los análisis estadísticos fueron realizados en STATISTICA® para Windows y en R (R Core Team, 2021).

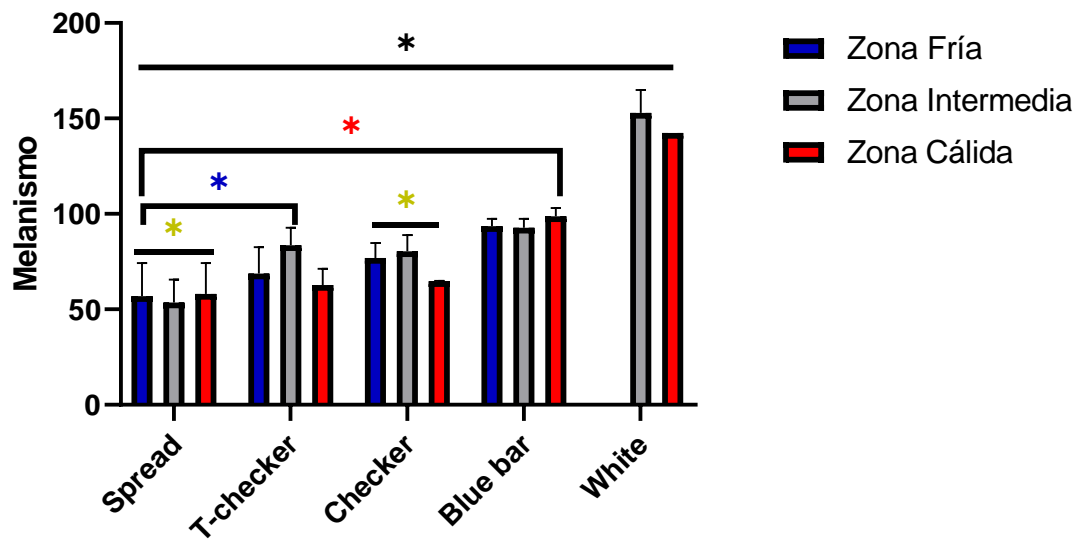
#### 4. Resultados

##### 4.1. Caracterización fenotípica

El análisis de las fotografías indica diferencias significativas entre cada fenotipo excepto entre los fenotipos checker y t-checker (ANOVA;  $F_{(4, 43)} = 67,197$   $p < 0,001$ ). Las aves white presentaron los valores más altos de nuestro índice de melanismo, por lo que son las más claras, seguidas por las blue bar, t-checker y checker, y por último las spread. El análisis mediante ANOVA no evidenció un efecto de la zona térmica de sobre el promedio de melanismo ( $F_{(2, 45)} = 0,865$   $p = 0,428$ ).

**Tabla 1.** Número de individuos capturados según fenotipo y ambiente térmico.

	<b>Spread</b>	<b>T-checker</b>	<b>Checker</b>	<b>Blue bar</b>	<b>White</b>	<b>Total</b>
<b>Zona Fría</b>	5	3	6	3	0	17
<b>Zona Intermedia</b>	3	5	2	4	3	17
<b>Zona Cálida</b>	3	4	2	4	1	14
<b>Total</b>	11	12	10	11	4	48

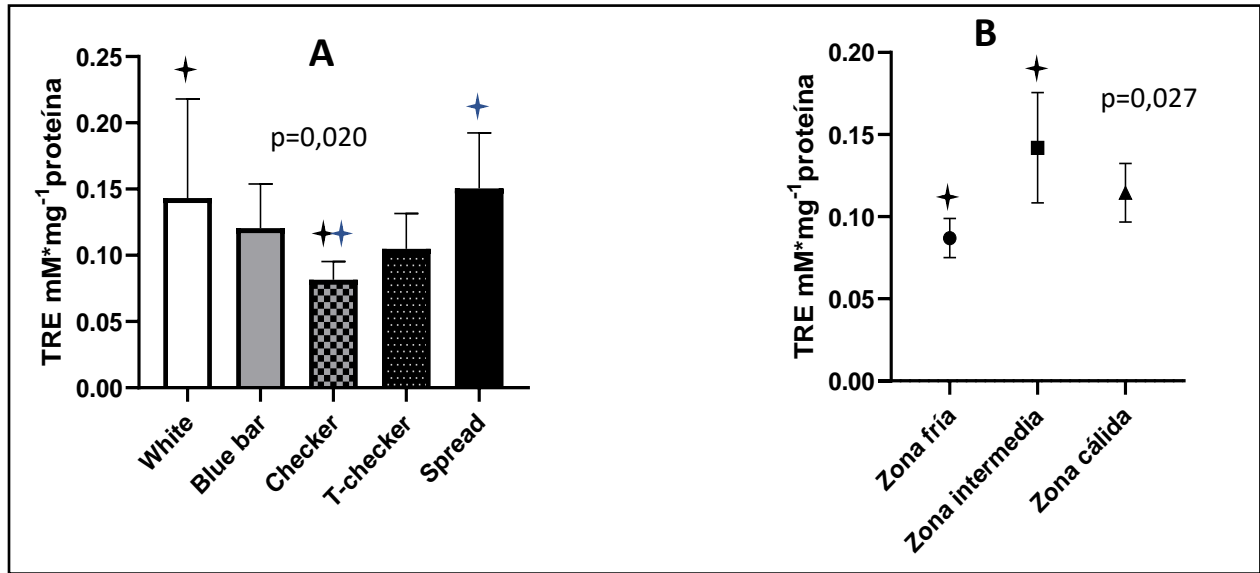


**Figura 9.** Medias de melanismo basado en los histogramas de intensidad de los píxeles calculado a través de ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre fenotipos calculado mediante One-Way ANOVA y una prueba de Fisher *a posteriori*. Estas mismas diferencias se presentan para todos los fenotipos excepto entre checker y t-checker.

**Tabla 2.** Valores de la media de melanismo por fenotipo y su desviación estándar.

	Spread	T-checker	Checker	Blue bar	White
<b>Media</b>	55,73	74,45	75,15	95,22	150,31
<b>SD</b>	27,06	26,64	26,62	27,60	30,42

#### 4.2. Actividad antioxidante total



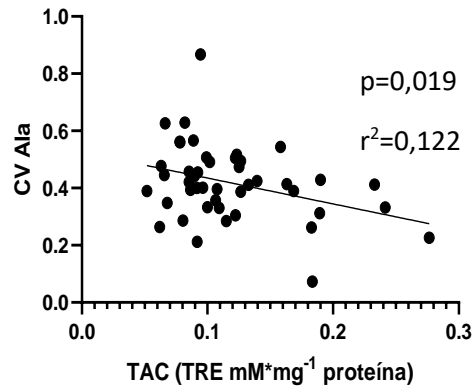
**Figura 10.** Niveles de TAC expresado en (TRE mM\*mg<sup>-1</sup> proteína) categorizado por fenotipo (A) y ambiente térmico (B). Los asteriscos corresponden a diferencias significativas, y las barras de error la desviación estándar. Diferencias significativas fueron probadas mediante One-Way ANOVA y una prueba de Fisher *a posteriori*.

Se encontró un efecto significativo del ambiente térmico, así como del fenotipo sobre la capacidad antioxidante total no enzimática de las palomas (ANOVA;  $F_{(2, 42)} = 3,926$   $p = 0,027$ ;  $F_{(4, 40)} = 3,288$   $p = 0,020$ , respectivamente, Figura 10). Específicamente, se encontraron mayores actividades antioxidantes en los fenotipos más extremos de coloración; las más oscuras (spread) y las más claras (white). Así, se identificaron diferencias significativas entre estos fenotipos con las aves checker, las cuales poseen una menor capacidad antioxidante. Por otra parte, la zona térmica intermedia, reportó los niveles más altos de TAC, presentando una diferencia significativa con la zona térmica fría. Considerando el pool de datos, se identificó una relación significativa respecto a la variabilidad del pigmento del ala, donde a menor variación en el plumaje dentro del ala, mayor TAC ( $p=0,019$ ;  $r^2=0,122$ , Figura 11).

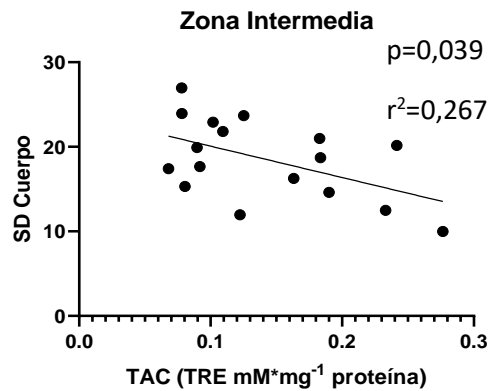
Una relación similar se determinó en la zona térmica intermedia. En efecto, palomas con un plumaje corporal más uniforme presentaron mayor TAC ( $p=0,039$ ;  $r^2=0,267$ ) (Figura 12). Sin embargo, esta es la única asociación que posee el TAC con el grado de melanismo en función de la zona térmica.



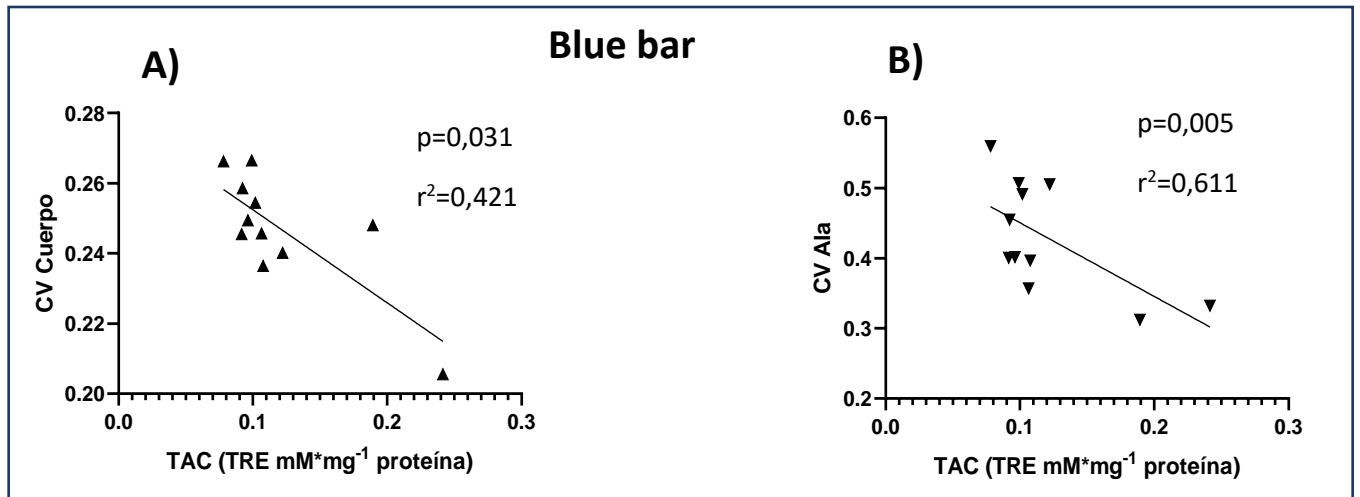
La evaluación de las relaciones TAC con la coloración, permitió identificar diversas correlaciones significativas (Figuras 13, 14 y 15). Así, en el fenotipo blue bar, se determinó que a mayor uniformidad del plumaje corporal y en particular del ala, se observa altas TAC. Sin embargo, lo contrario se manifestó en las palomas checker, las cuales ante plumajes heterogéneos se presentaron mayores TAC ( $p=0,002$ ;  $r^2=0,777$ ). Palomas checker con plumaje similar a t-checker presentan la menor desviación estándar.



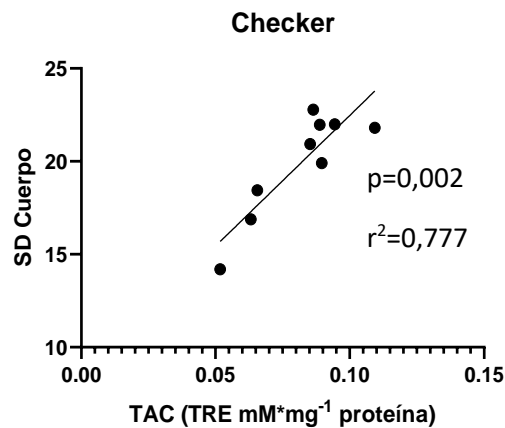
**Figura 11.** Concentración de TAC en el plasma de *Columba livia* en función de la variabilidad de melanismo en el plumaje del ala.



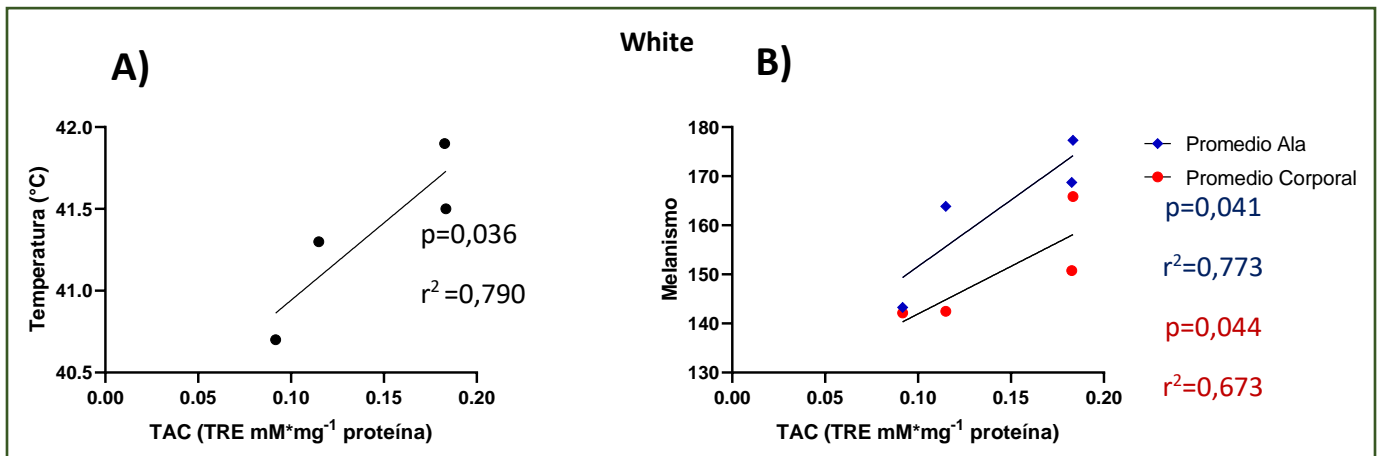
**Figura 12.** Efecto de una zona térmica intermedia en Santiago sobre la concentración de TAC en plasma de *Columba livia* en función de la variabilidad de melanismo en el plumaje corporal.



**Figura 13.** Concentración de TAC detectado en plasma del fenotipo blue bar en función de **(A)** variación en el plumaje del ala, y **(B)** plumaje a lo largo del cuerpo.



**Figura 14.** Concentración de TAC en plasma del fenotipo checker en función de la variabilidad en el plumaje corporal.

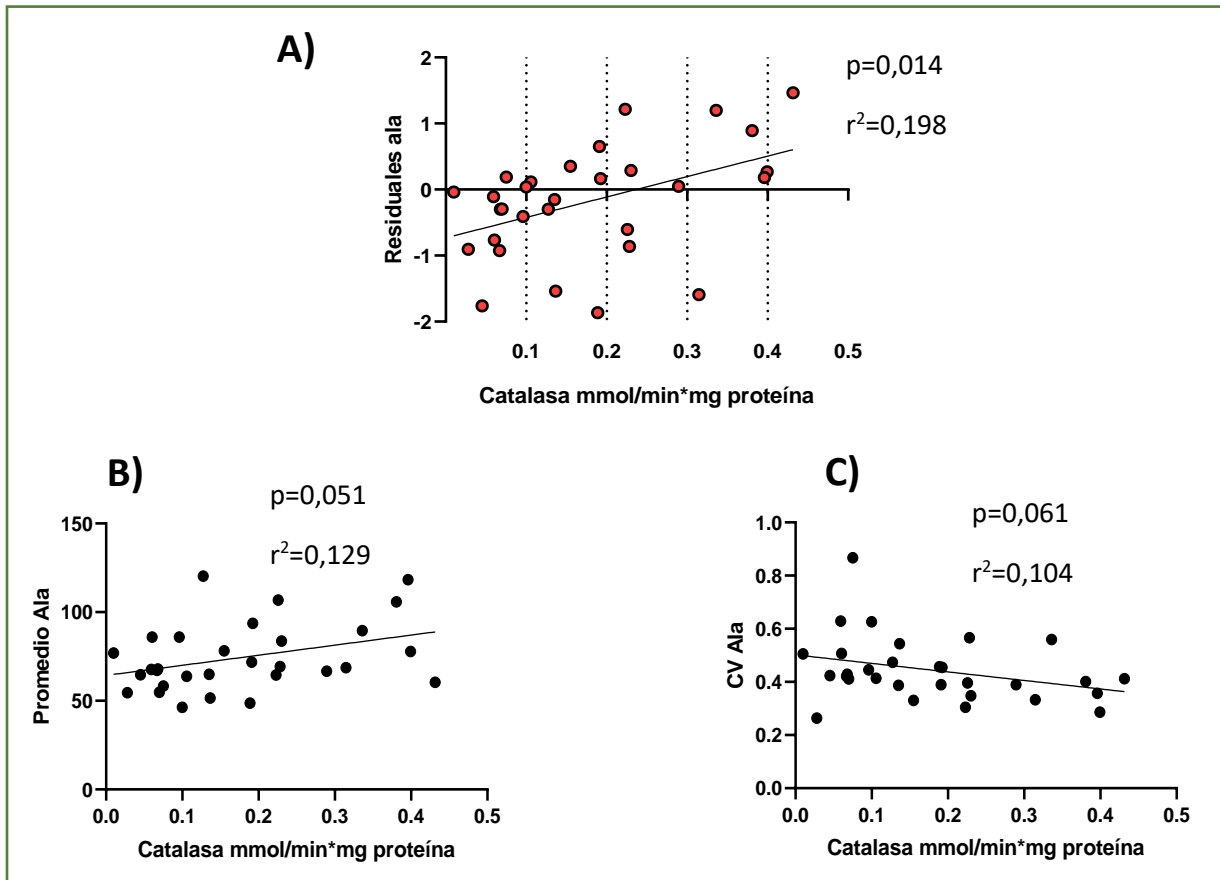


**Figura 15.** Concentración de TAC en plasma del fenotipo white en función de **(A)** temperatura corporal y **(B)** melanismo del ala (azul) y melanismo corporal (rojo)

Las palomas white presentaron relaciones significativas en los análisis de correlación, primero se distinguió un aumento de TAC directamente proporcional con la temperatura corporal ( $p=0,036$ ;  $r^2 = 0,790$ ), dicha relación se presentó respecto al melanismo del ala ( $p=0,041$ ;  $r^2=0,773$ ) y el plumaje del cuerpo ( $p=0,044$ ;  $r^2=0,673$ ).

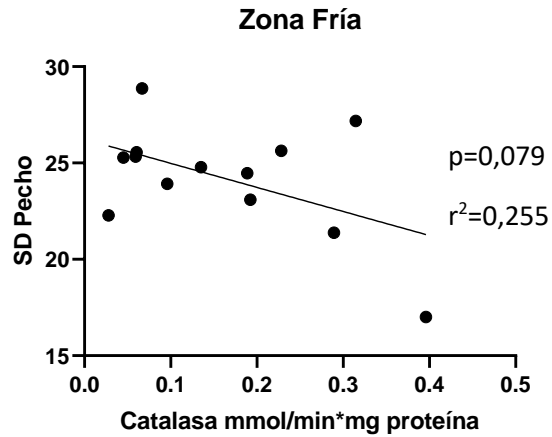
#### 4.3. Actividad de catalasa

La actividad enzimática de la catalasa no presentó diferencias significativas entre fenotipos o lugares térmicos (ANOVA,  $F_{(3, 26)} = 0,548$   $p = 0,653$ ;  $F_{(2, 27)} = 1,193$   $p = 0,319$  respectivamente). Sin embargo, se identificaron relaciones entre este indicador antioxidante y la coloración de las aves. Así, se registró en el conjunto de datos una tendencia de correlación positiva en aves con alas menos melánicas con la actividad de catalasa ( $p=0,051$ ;  $r^2=0,129$ , Figura 16B), y una tendencia de correlación negativa entre la variabilidad de coloración del ala con actividad de catalasa ( $p=0,061$ ;  $r^2=0,104$ , Figura 16C). Además, se identificó una relación positiva significativa que involucra la morfología y la catalasa, ya que esta misma se ve afectada por las dimensiones del ala, para descartar un efecto de la masa de los individuos se hizo uso de residuales del ala en función de la masa corporal ( $p=0,014$ ;  $r^2=0,198$ , Figura 16A).

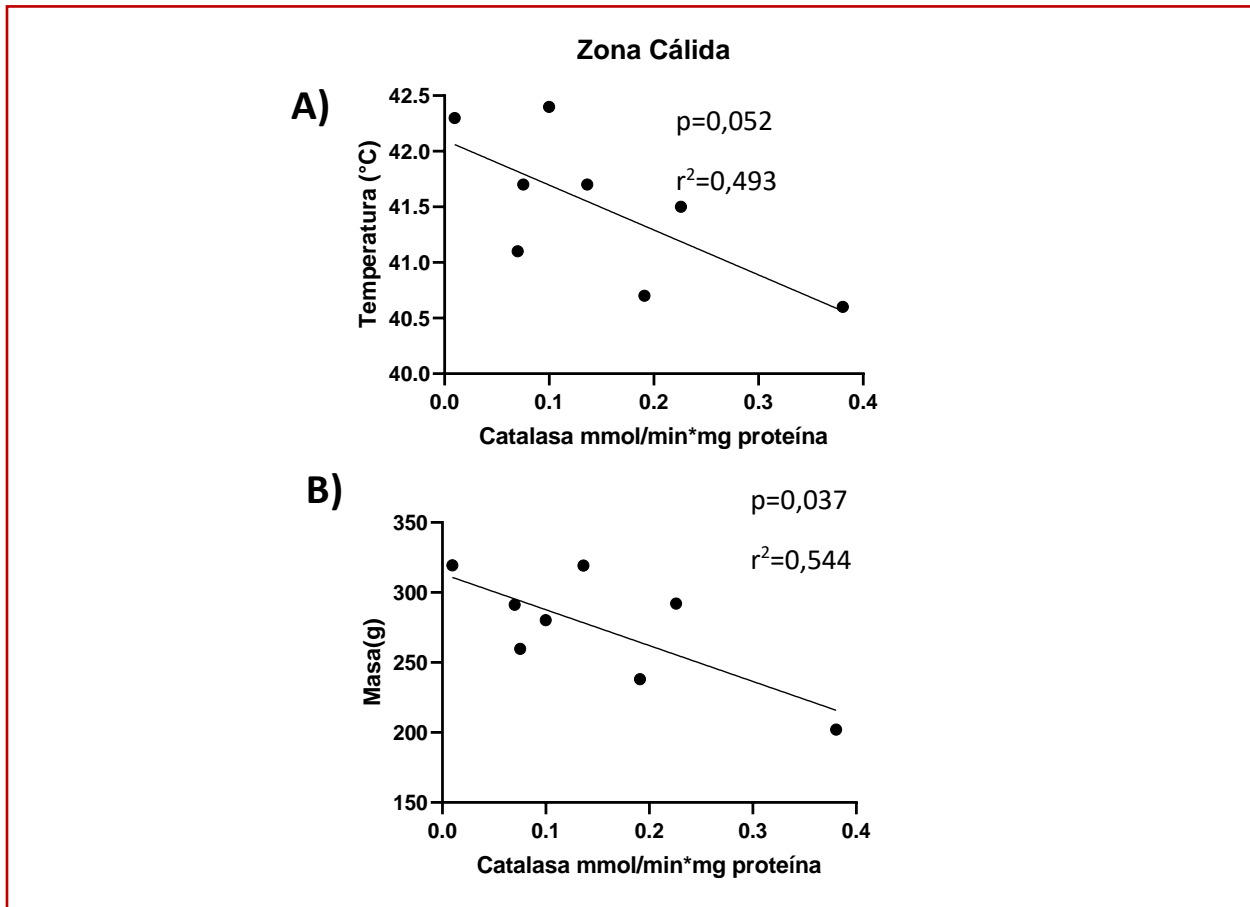


**Figura 16.** Actividad enzimática de catalasa en eritrocitos de *Columba livia* y su relación con el pool de datos de **(A)** residuales del largo del ala en función a la masa corporal, **(B)** melanismo del ala y **(C)** variabilidad de coloración.

Así, se registró una tendencia de correlación negativa en aves de la zona térmica fría con la variabilidad coloración del pecho ( $p=0,079$ ;  $r^2=0,255$ , Figura 17). Paralelamente, en la zona térmica intermedia no hubo tendencias o relaciones significativas, y en zona cálida se identificó una tendencia y una asociación significativa (Figura 18), en la cual a mayor actividad de catalasa la temperatura corporal del animal tiende a ser más baja ( $p=0,052$ ;  $r^2=0,493$ ). Así también, el peso corporal de los animales se relacionó con la actividad de catalasa, siendo mayor en individuos de menor masa ( $p=0,037$ ;  $r^2=0,544$ ).



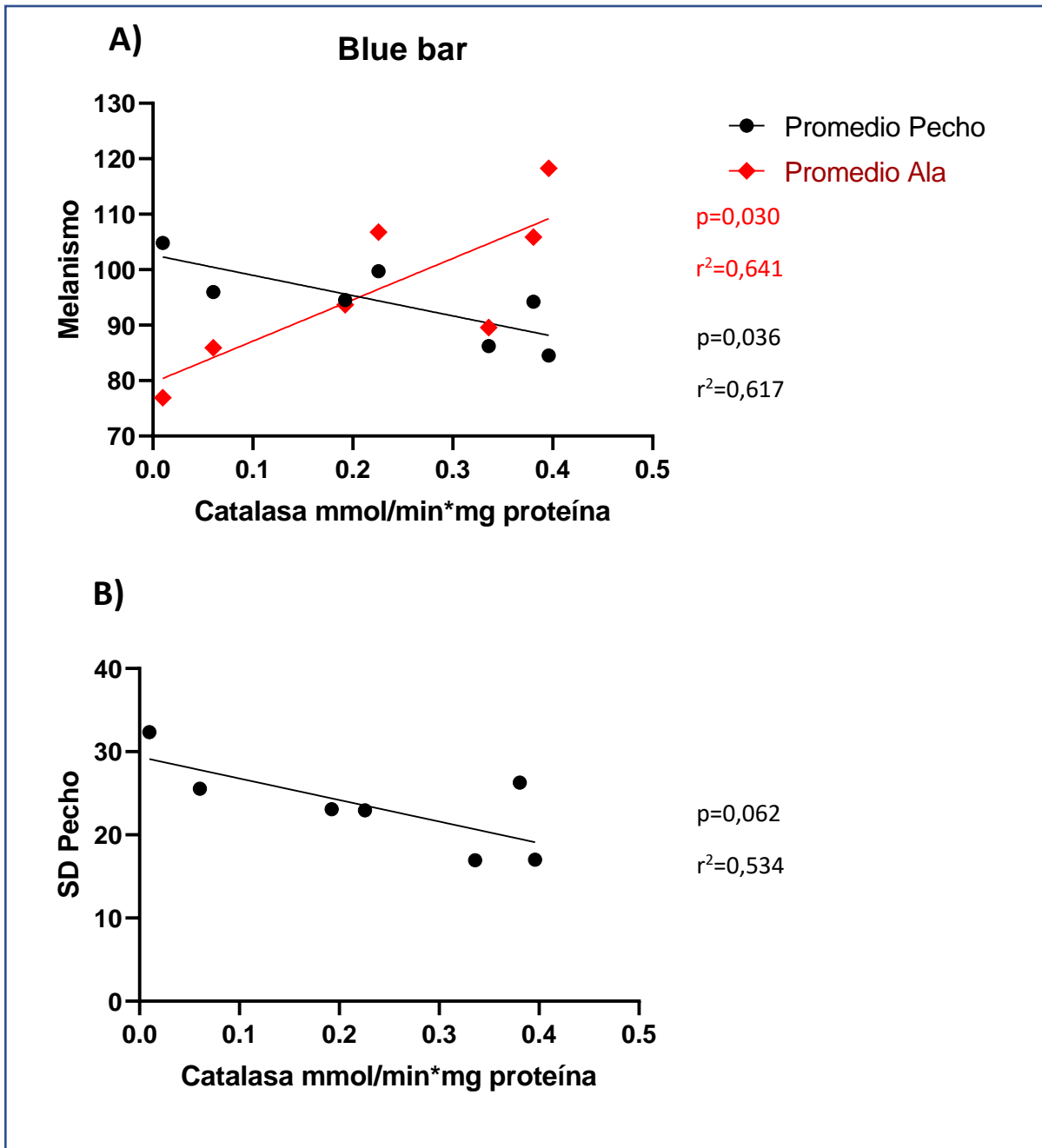
**Figura 17.** Correlación entre actividad de catalasa y variabilidad en el plumaje del pecho en un ambiente térmico frío en Santiago.



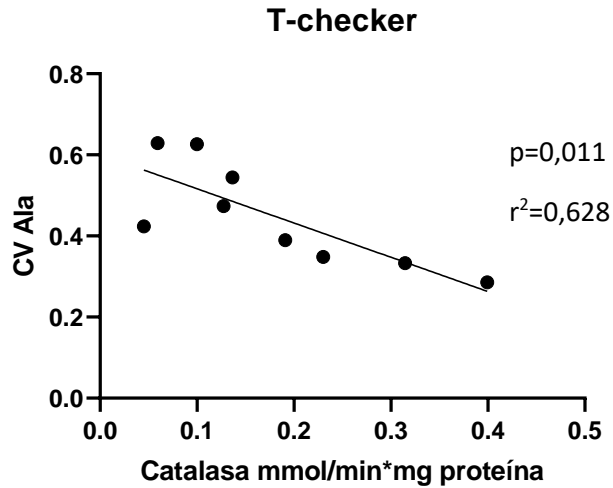
**Figura 18.** Efecto de una zona cálida en Santiago sobre la actividad de catalasa en función de la **(A)** masa y **(B)** temperatura del ave.

Al analizar la actividad de catalasa respecto al melanismo por fenotipo se encontraron asociaciones significativas, en particular concerniente al fenotipo ancestral (blue bar) (Figura 19). Así la variabilidad en la actividad de catalasa fue explicada en un 61% por el melanismo del pecho, siendo esta capacidad antioxidante mayor en individuos con pechos más melánicos ( $p=0,036$ ;  $r^2=0,617$ ). Por el contrario, la actividad de la catalasa aumentó en individuos con alas menos melánicas ( $p=0,030$ ;  $r^2=0,641$ ). Adicionalmente se halló una tendencia donde la actividad de catalasa aumentó mientras más uniforme es el pecho ( $p=0,062$ ;  $r^2 = 0,534$ ).

El otro fenotipo que presentó una relación significativa corresponde a las t-checker (Figura 20). Se observó una mayor actividad de catalasa en individuos con menor coeficiente de variación en el melanismo del ala ( $p=0,011$ ;  $r^2=0,628$ ).



**Figura 19.** Actividad enzimática de la catalasa en eritrocitos del fenotipo blue bar en función del **(A)** melanismo del pecho (negro) y ala (rojo), así como de **(B)** la variabilidad en el plumaje del pecho.

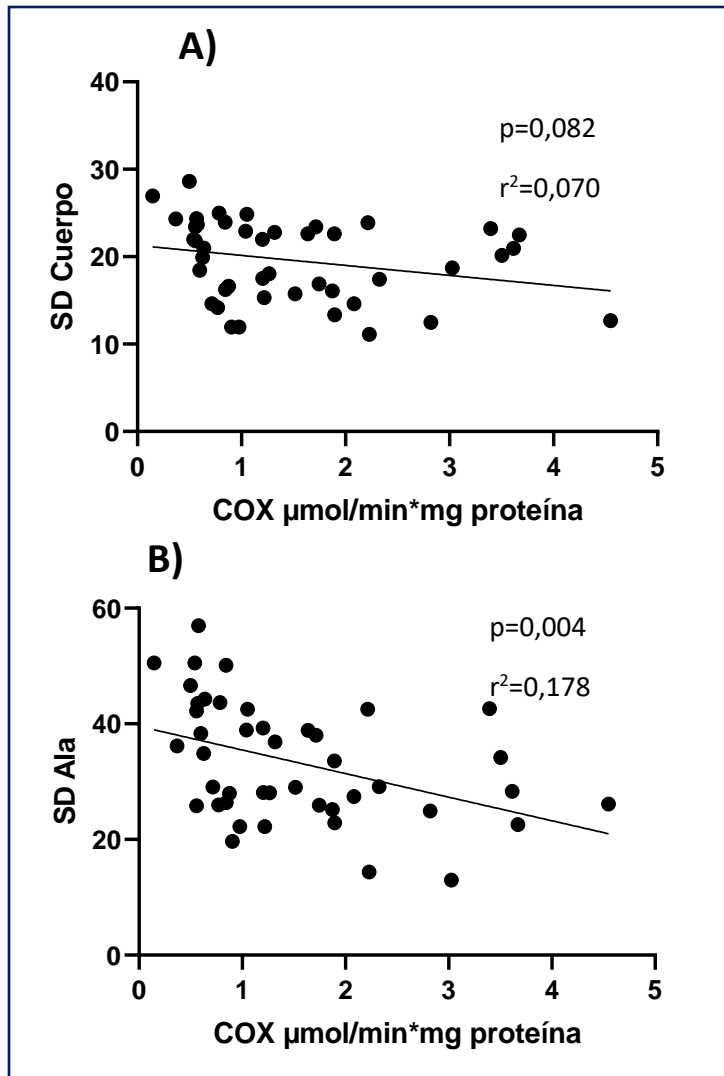


**Figura 20.** Actividad enzimática de la catalasa en eritrocitos del fenotipo t-checker en función de su variabilidad en el plumaje del ala.

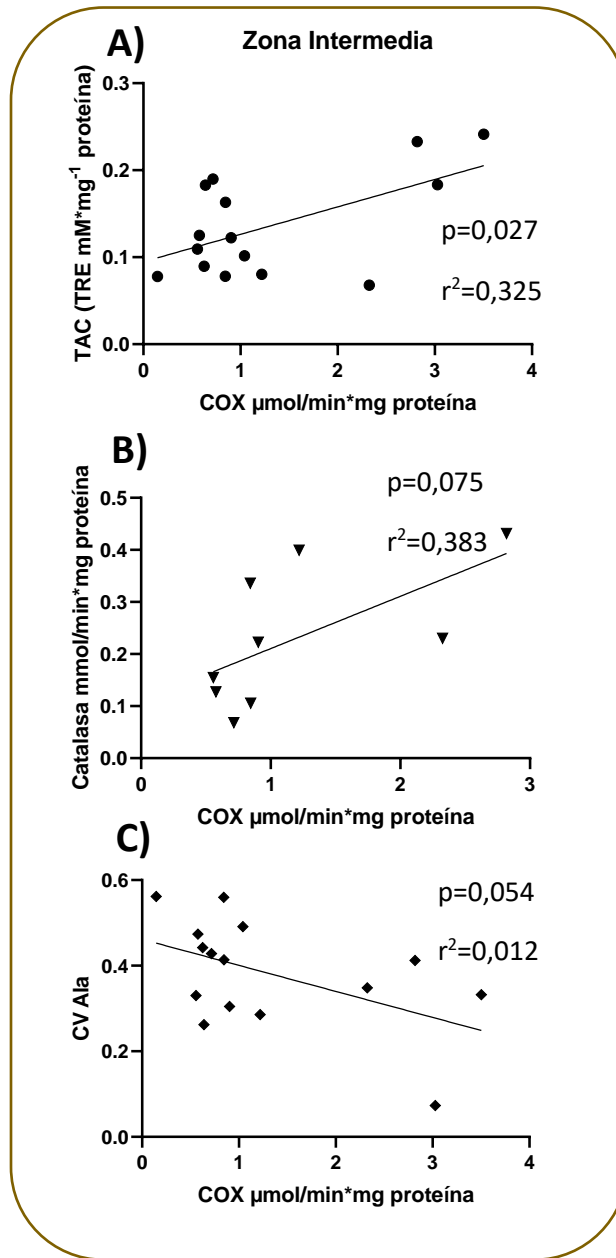
#### 4.4. Actividad citocromo c oxidasa

La actividad enzimática mitocondrial no se vio afectada por la zona térmica o por el fenotipo de la paloma (ANOVA;  $F_{(2, 41)} = 0,495$   $p = 0,613$ ;  $F_{(4, 39)} = 0,677$   $p = 0,612$  respectivamente). Sin embargo, cuando se analiza el conjunto de datos, la actividad de COX tiende a disminuir a mayor variabilidad del plumaje corporal ( $p=0,082$ ;  $r^2 = 0.070$ ) y del ala de manera significativa ( $p=0,004$ ;  $r^2 = 0.178$ ) (Figura 21).

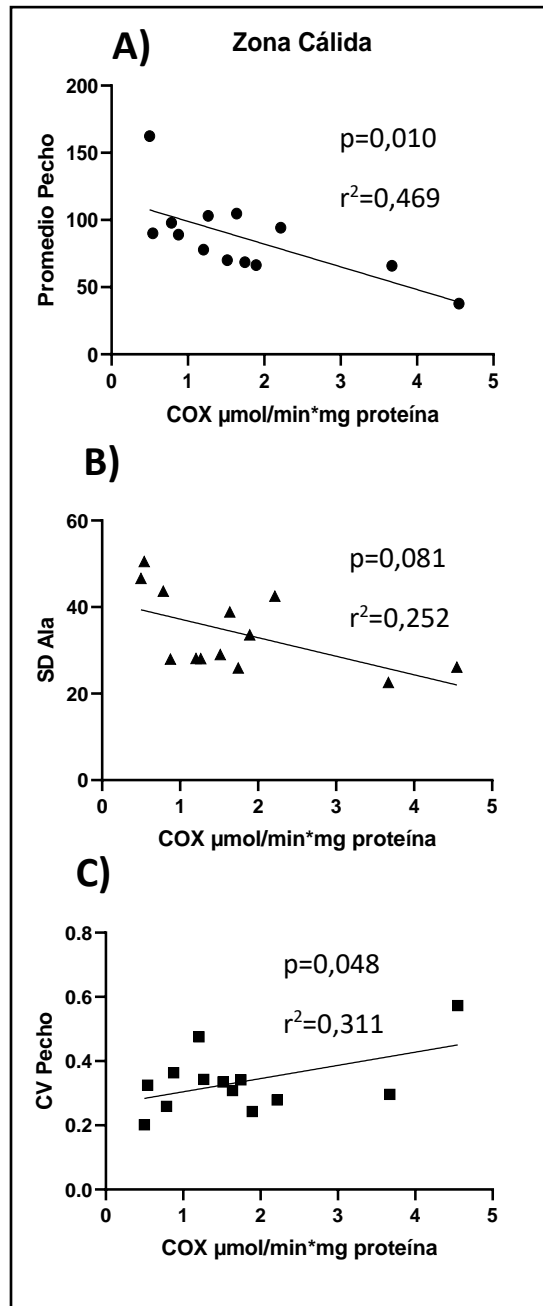




**Figura 21.** Actividad enzimática de COX y su relación con la variabilidad en el plumaje del **(A)** cuerpo y **(B)** ala en el pool de datos

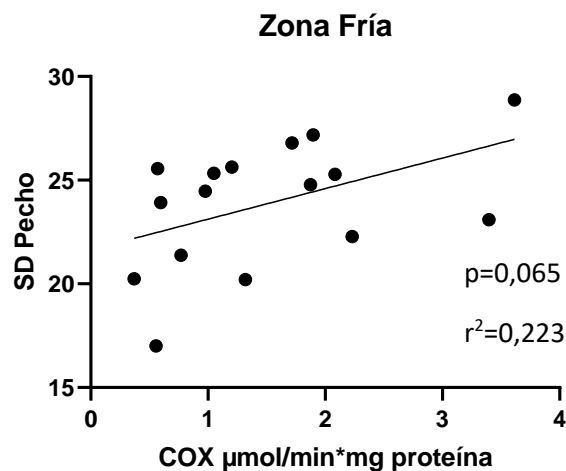


**Figura 22.** Actividad enzimática de COX en función de **(A)** concentración de TAC, **(B)** actividad enzimática de catalasa y **(C)** la variabilidad en el plumaje del ala en una zona térmica intermedia en Santiago.



**Figura 23.** Actividad enzimática de COX en función de **(A)** melanismo del pecho, **(B)** variación en el plumaje del ala y **(C)** variabilidad en el plumaje del pecho en una zona térmica cálida en Santiago.

En la zona térmica intermedia se presentaron correlaciones estadísticas entre COX y la capacidad antioxidante de la catalasa y TAC (Figura 22, A y B), en ambos casos una mayor actividad mitocondrial implica un aumento de la respuesta antioxidante, teniendo una correlación significativa con TAC ( $p=0,027$ ;  $r^2 = 0,325$ ) y una tendencia con la actividad de catalasa ( $p=0,075$ ;  $r^2 = 0,383$ ). En cuanto a cómo se relaciona el grado de melanismo con la actividad de COX, se identificó una tendencia en que esta enzima presenta menor actividad en aves con plumajes más heterogéneos en las alas (Figura 22C) ( $p=0,054$ ;  $r^2 = 0,012$ ).

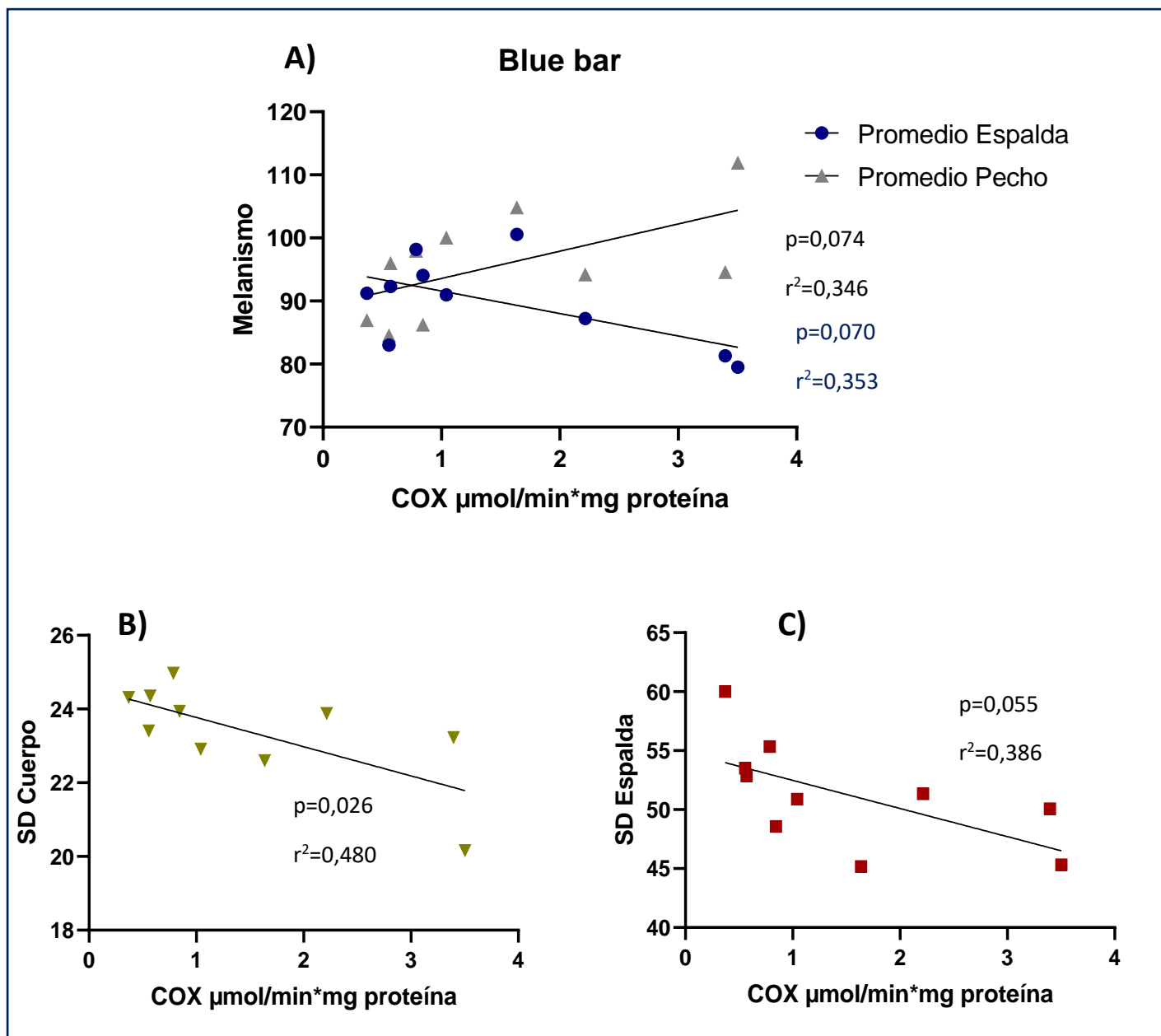


**Figura 24.** Actividad enzimática de COX y su relación con la variabilidad en el plumaje del pecho en una zona térmica fría de Santiago

Se encontró que las aves de la isla de calor tienen una relación más compleja entre melanismo y COX (Figura 23), ya que la variabilidad del ala se asoció negativamente con la actividad mitocondrial ( $p=0,081$ ;  $r^2 = 0,252$  Figura 21B), así como el grado de melanismo del plumaje del pecho ( $p=0,010$ ;  $r^2 = 0,469$  Figura 23A). Además, se identificó una correlación entre la actividad de COX y la variabilidad en el plumaje del pecho, sin embargo, esta relación no se sostiene sin el dato de COX más alto (Figura 23C). Finalmente, en la zona térmica fría la variabilidad en el plumaje del pecho tiene un efecto positivo en la actividad de COX (Figura 24) ( $p=0,065$ ;  $r^2 = 0,223$ ), sin embargo, tal como en la zona cálida, al excluir el punto más alto en COX que también es el más alto en la desviación estándar del pecho, el valor  $p$  aumenta sobre 0,1 y se pierde la relación.

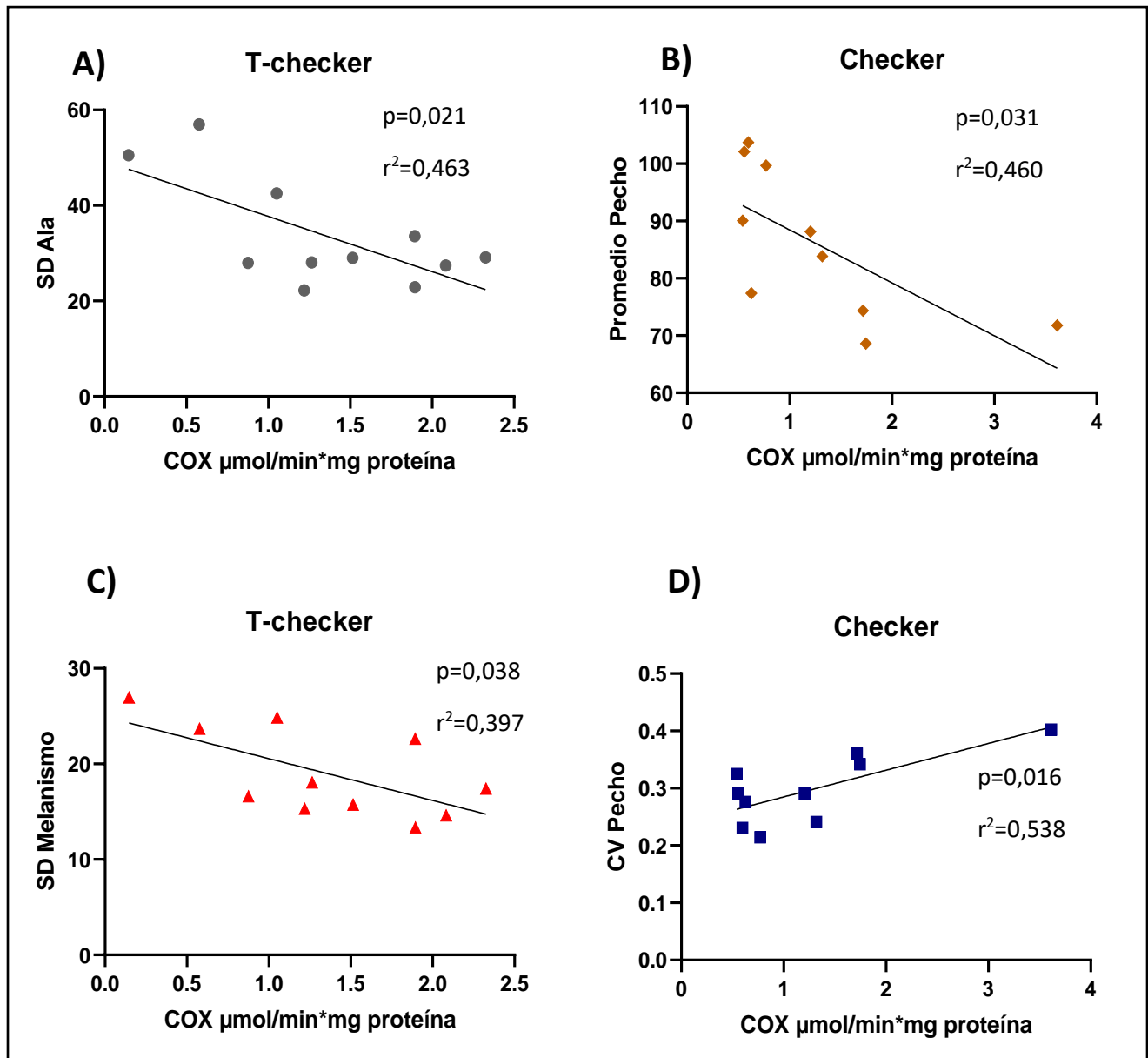
El metabolismo mitocondrial presentó asociaciones con el melanismo en los fenotipos blue bar, checker y t-checker. En blue bar se encontraron dos tendencias respecto al melanismo de la espalda y del pecho (Figura 25A), mientras la actividad de COX aumentó conforme la espalda fue más oscura ( $p=0,070$ ;  $r^2 = 0,353$ ), esta misma disminuye a medida que fue más claro el pecho

( $p=0,074$ ;  $r^2 = 0,346$ ). En contraste, las palomas checker presentaron pechos más oscuros en concordancia con altas actividades de COX (Figura 26B) ( $p=0,031$ ;  $r^2 = 0,460$ ). La variabilidad del plumaje en blue bar también se asoció a la actividad de COX; así plumajes más uniformes se correlacionaron significativamente con COX (Figura 25B) ( $p=0,026$ ;  $r^2 = 0,480$ ). De igual manera, se identificó una tendencia en la desviación estándar del plumaje de la espalda (Figura 25C) ( $p=0,055$ ;  $r^2 = 0,386$ ).



**Figura 25.** Actividad enzimática de COX en eritrocitos del fenotipo blue bar y su correlación con **(A)** melanismo de la espalda (azul) y pecho (gris), **(B)** variabilidad en el plumaje del cuerpo y **(C)** espalda.

Se registró también una tendencia en las palomas checker, en que una mayor variabilidad en el pecho se relacionó con mayor actividad de COX (Figura 26D),  $p=0,016$ ;  $r^2 = 0,538$ ). Finalmente, en las palomas t-checker se encontró una relación inversa significativa entre COX y la variabilidad del plumaje corporal ( $p=0,038$ ;  $r^2 = 0,397$ ) y en especial en las alas ( $p=0,021$ ;  $r^2 = 0,463$ ) (Figuras 26A y 26B respectivamente).



**Figura 26.** Correlación en el fenotipo t-checker entre COX y, **(A)** variabilidad en el plumaje del ala y **(C)** variabilidad en el plumaje del pecho, como también la correlación en el fenotipo checker entre COX y, **(B)** melanismo del pecho y **(D)** variabilidad del plumaje en el pecho.

## 5. Discusión

### 5.1. Caracterización fenotípica

Mediante el análisis de imágenes se logró caracterizar fenotípicamente a las palomas en base a su melanismo. Este análisis permitió identificar que cada categoría de fenotipo presentó valores promedios distintivos (véase Tabla 2 y Figura 10). La validación de este método se basa en la consistente asociación entre los valores obtenidos y la descripción de cada categoría según otros autores (Čanády y Mošanský, 2013). Por ejemplo, las white y las spread, siendo los fenotipos extremos del gradiente de melanismo poseen los valores de intensidad más claros y más oscuros, en ese mismo orden, difiriendo de manera significativa. No obstante, los promedios de melanismo para el fenotipo t-checker y checker fueron los únicos que no difirieron de manera significativa entre ellos. Al respecto, según la descripción hecha por Čanády y Mošanský (2013) se espera que las t-checker posean una mayor intensidad en el melanismo debido a su plumaje siendo un intermedio entre el fenotipo spread y checker, sin embargo, las t-checker capturadas poseían parches blancos en zonas aleatorias alrededor de su cuerpo que fueron también consideradas dentro de las zonas de medición. Debido a esto, los valores promedios de melanismo para las aves t-checker no se distinguieron de las checker. Otro factor para considerar también puede ser la leve disimilitud entre la pigmentación entre ambos fenotipos, lo que podría conducir a una catalogación ambigua de individuos. Los criterios que distingue a ambos fenotipos son difusos y no existe un análisis más detallado en la literatura que dilucide rasgos diagnósticos, por lo que la subjetividad del observador puede sesgar al momento de clasificar.

Las palomas tienen una gran variedad en sus patrones de plumaje no necesariamente definidas por su fenotipo de patrón alar, y se puede dar hasta de forma asimétrica y aleatoria. No fue inusual encontrar hasta dos rémiges primarias (plumas de vuelo alar) blancas en una spread, o una mancha blanca en la cabeza de una blue bar, y ninguna de las palomas white capturadas fueron en su totalidad blancas, poseyendo múltiples manchas de tonalidades grises y negras. Esto se evidencia por su dispersión estadística, la mayor entre los cinco fenotipos estudiados (Tabla 2).

Respecto al efecto que pueda tener el estrés térmico sobre el melanismo de las palomas a través del análisis de una vía no se observó diferencias significativas entre ambientes térmicos, dicho esto, los fenotipos no varían la intensidad de su melanismo respecto al estrés térmico del hábitat, pero si presentan una alta variabilidad entre individuos incluso en un mismo fenotipo de patrón alar. En conclusión, el melanismo depende del fenotipo aparente y puede tener variación interindividual, por lo que el uso de nuestro protocolo pareciera ser una herramienta útil de clasificación fenotípica para palomas eumelánicas, por ejemplo, según la Tabla 2 las palomas white presentan valores aproximados de intensidad de píxel de  $150 \pm 30$ , contrastando enormemente con las palomas spread que poseen valores de  $55 \pm 27$  aproximadamente.

## 5.2. Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos de la medición de TAC y actividad enzimática de la catalasa sugieren una relación consistente con el melanismo de los individuos, así como un efecto de la temperatura ambiental en la respuesta antioxidante de estas aves. Esta correlación es particularmente notoria al analizar los niveles de TAC plasmático, donde se evidencia una relación del tipo horméisis (*U-shape*) entre fenotipos (Figura 10A), donde los individuos más melánicos y menos melánicos presentan los mayores valores de TAC y el fenotipo intermedio los menores valores. De la misma forma, se presenta una diferencia significativa entre la zona térmica intermedia y la zona térmica fría.

La actividad de catalasa no difirió significativamente entre fenotipos o ambientes térmicos, lo que podría estar asociado a la presencia de distintos grados de contaminación de las localidades de captura, siendo que el punto frío constituía un área residencial, el punto de calor una zona industrial y el punto intermedio una zona de alto tráfico de vehículos, lo que afectaría los niveles de estrés oxidativo (Kurhalyuk et al., 2009). A pesar de esto, se presentaron diferencias interindividuales en un mismo fenotipo y asociaciones dependientes de zonas térmicas. Como variable explicativa a la variabilidad observada, se destacan los mayores niveles de catalasa en individuos de menor masa corporal y con menor temperatura corporal en la isla de calor, esto último es interesante puesto que una mayor temperatura corporal se asocia con un mayor metabolismo, lo que equivale a una mayor producción de ROS (Cohen et al., 2008), contrario a los resultados de este estudio. Por otra parte, las palomas white evidencian un aumento de TAC junto a su temperatura corporal explicado en un 79%.



Interesantemente, la actividad antioxidante correlacionó negativamente con la variabilidad en el plumaje, principalmente en el ala (Figura 11, 13A, 16C y 19) y en menor grado con el pecho (Figura 16 y 18B). Esta relación también se presentó al analizar el plumaje en la zona térmica intermedia y fría para los niveles de TAC y actividad de catalasa, respectivamente. Considerando que la actividad de catalasa puede ser afectada por la temperatura, nuestros datos sugieren que el mecanismo de defensa principal contra ROS podría transitar de catalasa a TAC, conforme aumenta la temperatura ambiental y en función a la variación del grado de melanismo.

Respecto a los fenotipos de coloración y sus respuestas a las ROS, en las palomas blue bar la actividad antioxidante se correlacionó negativamente con la variabilidad de coloración (Figura 13A, 13B y 19B) y también con el grado melanismo del pecho (Figura 19A). Estos resultados apoyan lo indicado por Roulin & Ducrest (2011), un mayor melanismo implica una mayor defensa antioxidante, y además se explica indirectamente por la asociación positiva que posee la catalasa con la unión de  $\alpha$ -MSH a MC1R (Maresca et al., 2010). Sin embargo, se encontraron resultados inesperados; mientras la actividad de catalasa aumenta conforme es más oscuro el pecho, esta también incrementa a medida que es más clara el ala en blue bar (Figura 19A). Esta relación, que ocurre también en el conjunto total de palomas analizadas, es contraintuitiva puesto que la radiación UV es un gran estimulante de  $\alpha$ -MSH (Böhm et al., 2004), por lo tanto, debería inducir melanogénesis y actividad de catalasa, considerando que la espalda y las alas son los mayores receptores de esta radiación (Ducrest et al., 2008; Maresca et al., 2010). Una posible explicación a este fenómeno es que la mayor actividad de catalasa actúe como compensadora en dos posibles situaciones. La primera puede ser la falta de melanina en relación con la mayor producción de ROS a causa de mayor incidencia de radiación. La segunda situación puede ser que ya que los niveles de GSH pueden condicionar patrones de pigmentación y afectar la intensidad del plumaje independiente de la edad del ave (Galván & Alonso-Álvarez 2008; Hůrak et al., 2010), y que un plumaje más claro significa un nivel más alto de GSH y menor nivel de TAC (Galván & Alonso-Álvarez 2008) se necesita la catalasa para compensar el menor TAC. Las palomas white por otra parte, muestran esta misma relación de forma altamente significativa con TAC respecto al melanismo de sus alas y cuerpo en general (Figura 15B), siendo el melanismo un factor explicativo en un 77% del nivel de TAC para el ala y en un 67% para el cuerpo en general. Dicho esto, se debate la variación interespecífica del sistema de melanocortina entre animales ya que va en desacuerdo que variados grupos de mamíferos, reptiles y aves más melánicos poseen mayor capacidad antioxidante, según lo expuesto en Ducrest et al. (2008) y Roulin & Ducrest (2011). Las palomas t-checker y checker, siendo fenotipos muy similares, muestran una asociación con relación a TAC y catalasa muy distintos. En efecto, a medida que

las t-checker aumentan sus niveles de catalasa baja su variabilidad en el ala (Figura 20), mientras que en las palomas checker aumentan su nivel de TAC a mayor variabilidad en una correlación muy significativa (Figura 14). Una explicación de esto puede deberse a que una menor variabilidad en el color en t-checker corresponde a que el ave es más oscura ósea la proporción de colores grises o blancos respecto al negro, va disminuyendo, asemejándose más en apariencia a una spread, un fenotipo muy homogéneo en su coloración. Por otra parte, las checker es lo inverso, puesto que ambos son fenotipos que muestran un patrón de “tablero de dama” uno teniendo mayor proporción de negro y el otro mayor proporción en grises (Figura 1), significa que una menor variabilidad en el color de una checker corresponde a una proporción mayor de color gris y una mayor variabilidad en el color indica un aumento de manchas negras en el animal. Esto iría de mano con la premisa de que, a mayor melanismo, mayor capacidad antioxidante.

Por último, se destaca una correlación entre la capacidad antioxidante y el largo del ala. Mientras es una tendencia respecto a TAC, es una asociación significativa con relación a la actividad de catalasa, descartando la influencia de la masa corporal (Figura 16A). No obstante, esta relación podría estar condicionada por el largo de las plumas o la longitud de la extremidad. Siendo el último caso, es interesante analizar una posible relación entre el sistema de melanocortina y la morfogénesis dado que ya se sabe de una interacción indirecta entre los factores de transcripción BMP y MC1R en el folículo de pelo (Sharov et al., 2005). Alternativamente se puede especular si la longitud de la extremidad impone un estrés oxidativo mayor que requiera mayor TAC y catalasa.

Finalmente, los resultados sugieren una relación entre melanismo y actividad antioxidante en palomas. En este sentido, la intensidad de la pigmentación posee efectos mixtos sobre la actividad antioxidante dependiendo del fenotipo, y generalmente, individuos más uniformes en su coloración serían capaces de soportar mayor estrés oxidativo, con un alto grado de dependencia de la zona térmica en la que habitan. Cabe mencionar que muchos componentes antioxidantes no enzimáticos son dietarios y no determinados por genes (Landete, 2013), la dieta de los animales puede ser un factor incidente en los resultados, la alimentación de las palomas suele constituirse mayormente en sobras y basura humana a lo largo de las urbe. Además del pan, siendo una importante y común fuente de alimento (Przybylska et al., 2012), su dieta puede ser muy variada, por lo que para un reporte más detallado es importante tomar en consideración la nutrición de la paloma y como afecta los niveles de TAC según su melanismo.

### 5.3. Actividad enzimática mitocondrial

La actividad de COX, así como la catalasa y TAC, presentaron correlaciones negativas con la variabilidad de coloración del plumaje (e.g., Figuras 21 a 26), en particular en las alas. Respecto a las zonas térmicas se encontraron tendencias de relaciones inversas entre variabilidad de coloración del ala y actividad de COX en la isla de calor (Figura 23B). Se debe considerar que la actividad de COX se relaciona con el estado oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidantes como lo son TAC y catalasa, por la producción de ROS (Srinivasan & Avadhani, 2012; Sabat et al., 2017). Sin embargo, la actividad de catalasa puede activarse mediante otros mecanismos como la estimulación de MC1R y procesos fisiológicos como la melanogénesis, protección contra contaminantes y radiación UV (Böhm et al., 2004; Ducrest et al., 2008; Maresca et al., 2010) y, además algunos componentes de TAC se obtienen a través de la dieta como la vitamina A y E (Biesalski et al., 2007; Fritsche et al., 2017).

Resulta interesante que la variabilidad de coloración del pecho en la zona cálida y zona fría, incrementaron en concordancia con la actividad de COX (Figura 23C y 24). Sin embargo, al eliminar en ambos análisis el dato con mayor nivel de COX que también posee la mayor variabilidad en las dos zonas, se pierde la relación por lo que hay que considerar estos datos con algo de precaución. Continuando, se observa en la Figura 23A la primera correlación entre una zona térmica y la intensidad del plumaje respecto a un rasgo fisiológico, evidenciando el efecto del estrés térmico sobre la fisiología animal y como esta respuesta varía según su melanismo. Según Cone (2006), este aumento en metabolismo se debería a la mayor producción de hormonas tiroideas por acción de las melanocortinas, y se exagera por el gasto de energía a través de la termogénesis inducida por alimentación, también estimulado por melanocortinas (Fan et al., 2005).

Curiosamente, en las palomas blue bar se encontraron asociaciones entre metabolismo y coloración, en concordancia con lo reportado acá para el estrés oxidativo (Figura 25). Específicamente, la uniformidad en el plumaje corporal y en particular en la espalda, se correlacionó positivamente con su actividad enzimática mitocondrial, resultado consistente con la variabilidad del pecho y su efecto sobre la actividad de catalasa (Figura 19B). Esta misma relación se mantiene comparando el melanismo de la espalda y COX (Figura 25A) con el melanismo del pecho y la catalasa (Figura 19A) en donde la espalda y pecho presentan mayores niveles de COX y catalasa correspondientemente. Así mismo, también se da un resultado sorpresivo y paradójico para el melanismo del pecho en blue bar y su metabolismo, el cual

presenta una tendencia a aumentar mientras más claro el pecho (Figura 20A), señalando de manera implícita una relación inversa entre catalasa y COX en relación con el pecho.

Las palomas t-checker por otra parte presentaron mayor actividad de COX mientras más uniforme era su plumaje (Figura 26A y 26C), siendo consistentes con lo mostrado en la Figura 19, donde existe esta misma relación con la actividad de catalasa, por lo que una mayor actividad de COX en individuos t-checker más uniformes requiere más catalasa para compensar la incrementada producción de ROS. Finalmente, las palomas checker, presentaron un mayor metabolismo conforme más oscuro y variable era el pecho (Figura 26B y 26C), no obstante, en este último caso al remover el punto más alto en COX se pierde esta relación.

Un efecto adicional del estrés térmico sobre la actividad de COX a considerar es el balance hídrico del animal, puesto que el estrés osmorregulatorio está vinculado con la aridez del hábitat y abundancia de fuentes de agua (Sabat et al., 2009). Santiago es un clima mediterráneo bajo la clasificación Köppen-Geiger, con una media histórica de precipitación de 341,9 mm por año concentrándose principalmente en la estación de invierno, sin embargo, para el año de este estudio la acumulación de precipitación es mucho menor al esperado en un año normal (Dirección Meteorológica de Chile, 2022). Considerando esto y una posible pérdida de agua por evaporación causada por la isla de calor, las palomas podrían responder a este estrés osmorregulatorio aumentando su actividad enzimática mitocondrial, ya que para mantener su homeostasis osmótica ciertas aves aumentan la actividad de enzimas mitocondriales (Navarrete et al., 2021) así como un aumento en masa relativa al cuerpo del riñón y corazón (Peña-Villalobos et al., 2013; Navarrete et al., 2021). Sin embargo, en el contexto de este estudio no se diseccionaron los individuos, ni se realizaron estudios de estrés hídrico (e.g., mediante hematocritos o concentración plasmática), por lo que el efecto del estrés térmico y estado de hidratación son factores que deben ser abordados a futuro.

En síntesis, la actividad de la enzima mitocondrial COX se correlaciona fuertemente junto con la actividad antioxidante, y la variabilidad del plumaje. En general, una alta actividad mitocondrial se asociaría con coloraciones más uniformes así mismo con la intensidad de la pigmentación. Finalmente, el efecto de la variabilidad del plumaje sobre COX parece estar dada por variaciones interindividuales y no parece depender del ambiente térmico habitado o fenotipo.

## 6. Conclusiones

- Nuestros resultados no apoyan que la intensidad del melanismo dentro de una población o fenotipo sea dependiente de la temperatura ambiental en el rango de las microislas urbanas.
- El melanismo posee múltiples correlaciones entre rasgos fisiológicos de las palomas, las capacidades antioxidantes y el metabolismo mitocondrial de glóbulos rojos. Así, la actividad de COX, así como la actividad antioxidante son favorecidos en individuos más uniformes en su coloración.
- Finalmente, presiones selectivas de origen antropogénico, evidenciados por la existencia de heterogeneidad térmica urbana, incidirían principalmente en la actividad antioxidante de las palomas. Así, la temperatura ambiental se asociaría directamente con mecanismos de defensa antioxidante, donde prevalecen compuestos fenólicos a temperaturas más bajas y la catalasa en zonas más cálidas.

## 7. Referencias

Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. WW Norton & Company.

Angelier, F., Parenteau, C., Trouvé, C., & Angelier, N. (2018). The behavioural and physiological stress responses are linked to plumage coloration in the rock pigeon (*Columba livia*). *Physiology & behavior*, *184*, 261-267.

Angelier, F. (2020). Pigeons in the sun: Thermal constraints of eumelanin plumage in the rock pigeon (*Columba livia*). *Journal of Thermal Biology*, *90*, 102601.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(26), 7970-7981.

Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Côme, D., & Corbineau, F. (2004). Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of experimental botany*, *55*(396), 475-483.

Biesalski, H. K., Chichili, G. R., Frank, J., Von Lintig, J., & Nohr, D. (2007). Conversion of  $\beta$ -carotene to retinal pigment. *Vitamins & hormones*, *75*, 117-130.

- Bornstein, R. D. (1968). Observations of the urban heat island effect in New York City. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 7(4), 575-582.
- Böhm, M., Wolff, I., Scholzen, T. E., Robinson, S. J., Healy, E., Luger, T. A., ... & Schwarz, A. (2005).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5795-5802.
- Botni, P., & Williamson, K. (1949). Polymorphism and breeding of the Rock Dove in the Faeroe Islands. *Ibis*, 91(1), 17-23.
- Bradford, N. J. A. B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. *Anal. Biochem*, 72(248), e254.
- Breton-Gorius, J., & Guichard, J. (1975). Fine structural and cytochemical identification of microperoxisomes in developing human erythrocytic cells. *The American Journal of Pathology*, 79(3), 523.
- Čanády, A., & Mošanský, L. (2013). Population size and plumage polymorphism of feral pigeon (*Columba livia* forma urbana) from urban environment of Košice city (Slovakia). *Zoology and Ecology*, 23(2), 104-110.
- Cone, R. D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine reviews*, 27(7), 736-749.
- Cohen, A., Hau, M., & Wikelski, M. (2008). Stress, metabolism, and antioxidants in two wild passerine bird species. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(4), 463-472.
- Des Roches, S., Brans, K. I., Lambert, M. R., Rivkin, L. R., Savage, A. M., Schell, C. J., ... & Alberti, M. (2021). Socio-eco-evolutionary dynamics in cities. *Evolutionary Applications*, 14(1), 248-267.
- Driscoll, C. A., Macdonald, D. W., & O'Brien, S. J. (2009). From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(supplement\_1), 9971-9978.
- Ducrest, A. L., Keller, L., & Roulin, A. (2008). Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends in ecology & evolution*, 23(9), 502-510.
- Eberle, A. N. (1988). The melanotropins; chemistry, physiology and mechanisms of action. *S. Kar.*

- Emaresi, G., Ducrest, A. L., Bize, P., Richter, H., Simon, C., & Roulin, A. (2013). Pleiotropy in the melanocortin system: expression levels of this system are associated with melanogenesis and pigmentation in the tawny owl (*Strix aluco*). *Molecular ecology*, 22(19), 4915-4930.
- Fan, W., Voss-Andreae, A., Cao, W. H., & Morrison, S. F.. (2005). Regulation of thermogenesis by the central melanocortin system. *Peptides*, 26(10), 1800-1813.
- Feigin, C. Y., & Mallarino, R. (2018). Phenotypic Diversity: Setting the bar. *Elife*, 7, e39068.
- França, M. B., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2005). The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell stress & chaperones*, 10(3), 167.
- Fritsche, S., Wang, X., & Jung, C. (2017). Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. *Antioxidants*, 6(4), 99.
- Galván, I., & Alonso-Alvarez, C. (2008). An intracellular antioxidant determines the expression of a melanin-based signal in a bird. *PLoS One*, 3(10), e3335.
- Galván, I., & Solano, F. (2015). Melanin chemistry and the ecology of stress. *Physiological and Biochemical Zoology*, 88(3), 352-355.
- Geschwind II, Huseby RA, Nishioka R (1972) The effect of melanocytestimulating hormone on coat color in the mouse. *Recent Progress Hormone Res* 28:91–130
- Goodwin, D. (1960). Comparative ecology of pigeons in inner London. *British Birds*, 53(5), 201-212.
- Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 281(1-2), 9-19.
- Hermes-Lima, M., & Zenteno-Savín, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 537-556.
- Hörak, P., Sild, E., Soomets, U., Sepp, T., & Kilk, K. (2010). Oxidative stress and information content of black and yellow plumage coloration: an experiment with greenfinches. *Journal of Experimental Biology*, 213(13), 2225-2233.
- Ito, S. (2003). A chemist's view of melanogenesis. *Pigment cell research*, 16(3), 230-236.

- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(1), 61-67.
- Jokimaki, J. & Suhonen, J. (1998) Distribution and habitat selection of wintering birds in urban environments. *Landscape and Urban Planning*, 39, 253–263.
- Kaiser, A., Merckx, T., & Van Dyck, H. (2016). The Urban Heat Island and its spatial scale dependent impact on survival and development in butterflies of different thermal sensitivity. *Ecology and Evolution*, 6(12), 4129-4140.
- Kling, K. J., Yaeger, K., & Wright, P. C. (2020). Trends in forest fragment research in Madagascar: Documented responses by lemurs and other taxa. *American Journal of Primatology*, 82(4), e23092.
- Kurhalyuk, N., Hetmanski, T., Antonowicz, J., & Tkachenko, H. (2009). Oxidative stress and protein oxidation affected by toxic metals in feral pigeon (*Columba livia*) from Northern Poland. *Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline*, 13.
- Landete, J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706-721.
- Lefebvre, L. & Giraldeau, L.A. (1984) Daily feeding site use of urban pigeons. *Canadian Journal of Zoology*, 62, 1425–1428.
- Lewis, S. L., & Maslin, M. A. (2015). Defining the anthropocene. *Nature*, 519(7542), 171-180.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 1-19.
- Li, Z. L., Tang, B. H., Wu, H., Ren, H., Yan, G., Wan, Z., ... & Sobrino, J. A. (2013). Satellite-derived land surface temperature: Current status and perspectives. *Remote sensing of environment*, 131, 14-37.
- Maclary, E. T., Phillips, B., Wauer, R., Boer, E. F., Bruders, R., Gilvarry, T., ... & Shapiro, M. D. (2021). Two genomic loci control three eye colors in the domestic pigeon (*Columba livia*). *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5376-5390.



- Manoli, G., Fatichi, S., Schläpfer, M., Yu, K., Crowther, T. W., Meili, N., ... & Bou-Zeid, E. (2019). Magnitude of urban heat islands largely explained by climate and population. *Nature*, 573(7772), 55-60.
- Maresca, V., Flori, E., Bellei, B., Aspite, N., Kovacs, D., & Picardo, M. (2010). MC1R stimulation by  $\alpha$ -MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites. *Pigment cell & melanoma research*, 23(2), 263-275.
- Mason, H. S. (1948). "The chemistry of melanin. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase". *Journal of Biological Chemistry*. **172** (1): 83–99.
- Miller, M. W., Duhl, D. M., Vrieling, H., Cordes, S. P., Ollmann, M. M., Winkes, B. M., & Barsh, G. S. (1993). Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes & development*, 7(3), 454-467.
- Montaner-Fernández, D., Morales-Salinas, L., Rodríguez, J. S., Cárdenas-Jirón, L., Huete, A., Fuentes-Jaque, G., ... & Cabezas, J. (2020). Spatio-Temporal variation of the urban heat island in Santiago, Chile during summers 2005–2017. *Remote Sensing*, 12(20), 3345.
- Morgan, C., Thomas, R. E., Ma, W., Novotny, M. V., & Cone, R. D. (2004). Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice. *Chemical senses*, 29(2), 111-115.
- Moye, J. K., Perez, C. R., & Pritsos, C. A. (2016). Effects of parental and direct methylmercury exposure on flight activity in young homing pigeons (*Columba livia*). *Environ Pollut*, 5, 23-30.
- Mundy, N. I. (2005). A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1573), 1633-1640.
- Murton, R. K., & Westwood, N. J. (1966). The foods of the rock dove and feral pigeon. *Bird Study*, 13(2), 130-146.
- Murton, R. K., Thearle, R. J. P., & Coombs, C. F. B. (1974). Ecological studies of the feral pigeon *Columba livia* var. III. Reproduction and plumage polymorphism. *Journal of Applied Ecology*, 841-854.

- Navarrete, L., Bozinovic, F., Peña-Villalobos, I., Contreras-Ramos, C., Sanchez-Hernandez, J. C., D Newsome, S., ... & Sabat, P. (2021). Integrative Physiological Responses to Acute Dehydration in the Rufous-Collared Sparrow: Metabolic, Enzymatic, and Oxidative Traits.
- Neubert, D., Wojtczak, A. B., & Lehninger, A. L. (1962). Purification and enzymatic identity of mitochondrial contraction-factors I and II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(9), 1651-1658.
- Obukhova, N. Y. (2007). Polymorphism and phene geography of the blue rock pigeon in Europe. *Russian Journal of Genetics*, 43(5), 492-501
- “Paloma bravía”. Sociedad Española de Ornitología. <https://seo.org/ave/paloma-bravia/>. Revisado el 11 de noviembre, 2022.
- Parolini, M., Iacobuzio, R., Bassano, B., Pennati, R., & Saino, N. (2018). Melanin-based skin coloration predicts antioxidant capacity in the brown trout (*Salmo trutta*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 91(5), 1026-1035.
- Peña-Villalobos, I., Valdés-Ferranty, F., & Sabat, P. (2013). Osmoregulatory and metabolic costs of salt excretion in the Rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(2), 314-318.
- Prota, G. (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *Journal of investigative dermatology*, 75(1), 122-127.
- Przybylska, K., Haidt, A., Myczko, Ł., Ekner-Grzyb, A., Rosin, Z. M., Kwieciński, Z., ... & Skórka, P. (2012). Local and landscape-level factors affecting the density and distribution of the Feral Pigeon *Columba livia* var. *domestica* in an urban environment. *Acta Ornithologica*, 47(1), 37-45.
- “Quinta Normal, Santiago. Precipitación Reciente e Histórica de la Estación en milímetros”. Dirección Metereológica de Chile - Servicios Climáticos. <https://climatologia.meteochile.gob.cl/>. Revisado el 1 de diciembre, 2022.
- Racca, S., Spaccamiglio, A., Esculapio, P., Abbadessa, G., Cangemi, L., DiCarlo, F., & Portaleone, P. (2005). Effects of swim stress and  $\alpha$ -MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(4), 894-900.

- Radespiel, U., & Bruford, M. W. (2014). Fragmentation genetics of rainforest animals: insights from recent studies. *Conservation Genetics*, 15(2), 245-260.
- Rosenzweig, C., Solecki, W., & Slosberg, R. (2006). Mitigating New York City's heat island with urban forestry, living roofs, and light surfaces. *A report to the New York State Energy Research and Development Authority*.
- Rees, J. L. (2000). The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Research*, 13(3), 135-140.
- Roulin, A., & Ducrest, A. L. (2011). Association between melanism, physiology and behaviour: a role for the melanocortin system. *European journal of pharmacology*, 660(1), 226-233.
- Sabat, P., Gonzalez-Vejares, S., & Maldonado, K. (2009). Diet and habitat aridity affect osmoregulatory physiology: An intraspecific field study along environmental gradients in the Rufous-collared sparrow. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(3), 322-326.
- Sabat, P., Narváez, C., Peña-Villalobos, I., Contreras, C., Maldonado, K., Sanchez-Hernandez, J. C., ... & Bozinovic, F. (2017). Coping with salt water habitats: metabolic and oxidative responses to salt intake in the rufous-collared sparrow. *Frontiers in physiology*, 8, 654.
- Sarricolea Espinoza, P., & Martín-Vide, J. (2014). El estudio de la isla de calor urbana de superficie del área metropolitana de santiago de chile con imágenes terra-MODIS y análisis de componentes principales. *Revista de Geografía Norte Grande*, (57), 123-141.
- Senger, P. L. (1997). Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd..
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, 215(2), 213-219.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.
- Scherer, D., & Kumar, R. (2010). Genetics of pigmentation in skin cancer—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(2), 141-153.

- Schiöth, H. B., Raudsepp, T., Ringholm, A., Fredriksson, R., Takeuchi, S., Larhammar, D., & Chowdhary, B. P. (2003). Remarkable synteny conservation of melanocortin receptors in chicken, human, and other vertebrates. *Genomics*, *81*(5), 504-509.
- Schiöth, H. B., Haitina, T., Ling, M. K., Ringholm, A., Fredriksson, R., Cerdá-Reverter, J. M., & Klovins, J. (2005). Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. *Peptides*, *26*(10), 1886-1900.
- Shallu, N. K. (2020). Breeding biology of feral pigeon in and around Ludhiana (*Columba livia domestica*).
- Sol, D., Santos, D.M., García, J. & Cuadrado, M. (1998) Competition for food in urban pigeons: the cost of being juvenile. *Condor*, *100*(298–304).
- Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(6), 1252-1263.
- Stringham, S. A., Mulroy, E. E., Xing, J., Record, D., Guernsey, M. W., Aldenhoven, J. T., ... & Shapiro, M. D. (2012). Divergence, convergence, and the ancestry of feral populations in the domestic rock pigeon. *Current Biology*, *22*(4), 302-308.
- Taha, H. (1997). Urban climates and heat islands: albedo, evapotranspiration, and anthropogenic heat. *Energy and buildings*, *25*(2), 99-103.
- Team, R. C. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.
- Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *140*, 5-12.
- Tsahar, E., Arad, Z., Izhaki, I., & Guglielmo, C. G. (2006). The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds. *Journal of comparative physiology B*, *176*(7), 653-661.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, *10*(14), 1677-1694.

- Vickrey, A. I., Bruders, R., Kronenberg, Z., Mackey, E., Bohlender, R. J., Maclary, E. T., ... & Shapiro, M. D. (2018). Introgression of regulatory alleles and a missense coding mutation drive plumage pattern diversity in the rock pigeon. *Elife*, 7, e34803.
- Wang, W., Qiao, Y., Li, S., Pan, W., & Yao, M. (2017). Low genetic diversity and strong population structure shaped by anthropogenic habitat fragmentation in a critically endangered primate, *Trachypithecus leucocephalus*. *Heredity*, 118(6), 542-553.
- Wendell, L. (1977). *The Pigeon*. Sumter, SC.
- Wright, P. A. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *The Journal of experimental biology*, 198(2), 273-281.
- Yasumoto, K. I., Mahalingam, H., Suzuki, H., Yoshizawa, M., Yokoyama, K., & Shibahara, S. (1995). Transcriptional activation of the melanocyte-specific genes by the human homolog of the mouse *Microphthalmia* protein. *The journal of biochemistry*, 118(5), 874-881.