



UNIVERSIDAD DE CHILE

# **Consecuencias fisiológicas de la variación en el uso de recursos marinos en dos especies de *Cinclodes*: un análisis desde la ecología isotópica**

**Tesis**

**Entregada a la Universidad de Chile**

**En cumplimiento parcial de los requisitos**

**Para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Lucas Navarrete Parra**

Director del Tesis: Pablo Sabat Kirkwood

Junio, 2022

Santiago – Chile

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**Lucas Navarrete Parra**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día .....

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

**Director de Tesis**

---

Dr. Seth Newsome

**Codirector de tesis**

---

**Comisión de Evaluación de tesis**

Dr. Claudio Veloso

---

Dra. Natalia Ramírez

---

## AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer al profesor Pablo Sabat por la confianza y el fraternalismo entregado desde el comienzo de mi trabajo en el laboratorio en 2018.

A todo el equipo del laboratorio: Gabriela, Nata, Karin, Isaac, Guido, que me ayudaron a cumplir distintos objetivos y a crecer como científico y profesional.

En particular a Andrés Sazo y Felipe Álvarez, inigualables compañeros de terreno que hicieron gran parte de este trabajo posible.

A mi familia Pilar, Meme, Diego y Simón, por su incondicional apoyo en todo momento de mi carrera universitaria.

Agradezco al Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) la oportunidad de realizar esta investigación; a ANID PIA/BASAL FB0002 y FONDECYT REGULAR N° 1200386 por el financiamiento.

## INDICE DE MATERIAS

Lista de tablas.....	5
Lista de figuras.....	6
Resumen.....	8
Abstract .....	10
Lista de abreviaturas.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Hipótesis.....	21
1.2. Objetivo General.....	22
1.3. Objetivos Específicos.....	22
2. METODOLOGÍA.....	23
2.1. Modelo de estudio.....	23
2.2. Captura de animales y toma de muestra.....	24
2.3. Análisis de isótopos estables.....	25
2.4. Tasa Metabólica Basal.....	28
2.5. Actividad enzimática y balance oxidativo.....	29
2.6 Análisis estadístico.....	30
3. RESULTADOS.....	32
3.1. Efecto de la estacionalidad sobre nicho isotópico de <i>C. nigrofumosus</i> .....	32
3.2. Composición isotópica en tejidos de <i>C. oustaleti</i> .....	34
3.3. Comparación interespecífica en invierno.....	36
3.4 Composición y proporción del agua corporal.....	38
3.5 Efecto de la estacionalidad sobre la fisiología de <i>C. nigrofumosus</i> .....	41
3.6 Comparación interespecífica de <i>Cinclodes</i> .....	42
4. DISCUSIÓN.....	46
4.1 Uso de recursos en <i>Cinclodes</i> .....	47
4.2 Ajustes fisiológicos asociados al uso de recursos.....	49
5. CONCLUSIONES.....	56
6. PROYECCIONES.....	57
6. REFERENCIAS.....	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación estacional de las diferentes métricas de la amplitud de nicho isotópico para *C. nigrofumosus* a partir de las proporciones de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en la sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEAc) y área Bayesiana de elipse estándar (SEAB) se presentan como  $\%^2$ . Se indica la probabilidad bayesiana (P) de que la amplitud de nicho en invierno sea menor a la de verano. ....32

Tabla 2. Comparación intraespecífica de las diferentes métricas de la amplitud de nicho isotópico para *C. oustaleti* estimados a partir de la proporción de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) en muestras de pluma y sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEAc) y área Bayesiana de elipse estándar (SEA<sub>B</sub>) se presentan como  $\%^2$ . Se indica la probabilidad (P) de que la amplitud de nicho en la época de muda (i.e. en pluma) sea menor a la de invierno (i.e. en sangre) .....33

Tabla 3. Comparación interespecífica de las métricas de amplitud del nicho isotópico para *C. nigrofumosus* (invierno y verano) y *C. oustaleti* (invierno) a partir de las proporciones de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en la sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEAc) y área Bayesiana de elipse estándar (SEA<sub>B</sub>) se presentan como  $\%^2$ . Se indica la probabilidad bayesiana (P) de que el área de *C. nigrofumosus* resultante de las extracciones posteriores de SEA<sub>B</sub> sea menor a la de *C. oustaleti*.....36

Tabla 4. Promedios ( $\pm$  DS) de las mediciones fisiológicas y bioquímicas de *C. nigrofumosus* en verano e invierno y para *C. oustaleti* de invierno. Diferencias significativas entre estaciones se marcan con letras; diferencias entre especies con asteriscos (ver texto para detalles y significancia estadística) ..... 42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Elipse estándar (SEAc) obtenida del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno del tejido sanguíneo en *C. nigrofumosus* de invierno (azul) y verano (naranja) que habitan la zona centro de Chile.....32

Figura 2. A) Elipse estándar (SEAc) obtenida del análisis de isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) del tejido sanguíneo (negro) y pluma (blanco) en *C. nigrofumosus* en invierno (círculos) y verano (cuadrados) que habitan la zona centro de Chile. B) Valores para un mismo individuo de  $\delta^2\text{H}$  en sangre y pluma en *C. nigrofumosus*. C) Elipses estándar (SEAc) obtenido del análisis  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  del tejido sanguíneo y pluma en *C. oustaleti* que habitan la zona costera central de Chile durante el invierno. D) Valores para un mismo individuo de  $\delta^2\text{H}$  en sangre y pluma de *C. oustaleti*. Líneas verticales discontinuas representan la media y las áreas sombreadas la desviación estándar de cada grupo de aves.....34

Figura 3. Elipses estándar (SEAc) obtenidas del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno del tejido sanguíneo en *C. nigrofumosus* (café) y *C. oustaleti* (azul) que habitan la zona central de Chile en invierno.....36

Figura 4. Valores promedio de  $\Delta^{17}\text{O}$  (eje y) y valores promedio de  $\delta^{18}\text{O}$  (eje x) del agua corporal usados para estimar el valor  $\delta^{18}\text{O}$  del agua preformada de Cinclodes silvestres. Los rangos de valores de  $\delta^{18}\text{O}$  para el agua potable y el agua de mar se muestran como barras sólidas en la parte superior del rango para las aguas meteóricas (área discontinua azul). Las líneas negras punteadas representan las soluciones de la ecuación 2 para cada grupo de aves. En rojo se presenta la contribución fraccional (FM) del agua metabólica al presupuesto total de agua.....38

Figura 5. a) Correlación positiva y significativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  de una muestra de sangre para las dos especies de *Cinclodes* pertenecientes al litoral central de Chile. b) Correlación negativa y significativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y la contribución de agua metabólica (FM) al presupuesto hídrico en dos especies de *Cinclodes*. En ambos paneles, la línea punteada representa el ajuste significativo para

ambas especies, mientras que la línea sólida representa el ajuste significativo sólo para *C. oustaleti*.....39

Figura 6. Promedios  $\pm$  desviación estándar de la pérdida total de agua por evaporación y consumo de oxígeno total para *C. oustaleti* y *C. nigrofumosus* de invierno y verano. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza al 95% de la regresión lineal para todo el grupo. En color rojo y azul se muestran los valores esperados según Williams & Tieleman (2002) para passeriformes de zonas áridas y mésicas respectivamente .....43

Figura 7. a) capacidad antioxidante total (TAC) y b) Peroxidación lipídica (TBARS) en el plasma de *C. oustaleti* y *C. nigrofumosus* en invierno y verano; barras de error representan desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ver texto para detalles) .....44

## RESUMEN

Mediante el análisis de isotopos estables (AIE) de dos especies de passeriformes, *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* de la zona central de Chile, se evaluó la proporción de uso de recursos marinos y la proporción del presupuesto hídrico proveniente de las diversas fuentes de agua (de mar, dulce y metabólica). Además, se estudiaron algunos de los ajustes fisiológicos y bioquímicos que estas aves emplean para mantener estable el presupuesto hídrico en un ambiente salobre y marcado por variaciones climáticas estacionales. No se encontró una variación estacional significativa en la amplitud del nicho trófico (isotópico) de *C. nigrofumosus* como tampoco entre especies. Se confirmó la existencia de patrones de migración altitudinal en *C. oustaleti*. El análisis de los tres isótopos de oxígeno ( $\delta^{16}\text{O}$ ,  $\delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$ ) en el plasma sanguíneo y la estimación obtenida a partir de las mediciones fisiológicas revelan que ambas especies estarían consumiendo una mezcla de agua marina y dulce, y produciendo un 23% de agua metabólica en promedio. La tasa metabólica (TMB) y la pérdida de agua por evaporación (PTAE) de *C. nigrofumosus* fueron mayores en verano que en invierno. No se encontró diferencias entre ambas especies durante el invierno, cuando se encuentran en condición de simpatria. Se encontró una correlación positiva entre TMB y PTAE utilizando ambas especies y estaciones. La conductancia térmica disminuyó significativamente en invierno (18%) en *C. nigrofumosus* y un 45% para *C. oustaleti*. La actividad enzimática en eritrocitos no reflejó el gasto energético a nivel corporal ni mostró variación entre especies o estaciones. El nivel de daño oxidativo se correlacionó positivamente con el gasto energético en la especie especialista marina *C. nigrofumosus* mientras que no se encontró una variación en la capacidad antioxidante total entre estaciones, ni entre especies. Contrario a lo esperado, la actividad enzimática

mitocondrial en eritrocitos no reflejó el aumento metabólico observado en verano en *C. nigrofumosus*, aun cuando el daño por peroxidación lipídica se encontró relacionado con el incremento metabólico en verano. Por último, los resultados obtenidos a partir de las mediciones de parámetros fisiológicos respaldan la utilización de isótopos estables para estimar la contribución del agua metabólica al presupuesto total de agua.

## ABSTRACT

Through stable isotope analysis (SIA) of two species of passerines, *C. nigrofumosus* and *C. oustaleti* from central Chile, the proportion of use of marine resources and the proportion of the water budget coming from the various sources of water (seawater, fresh water, and metabolic water) were evaluated. In addition, some of the physiological and biochemical adjustments that these birds use to maintain a stable water budget in a marine coastal environment marked by seasonal climatic variations were studied. No significant seasonal variation was found in the trophic (isotopic) niche width of *C. nigrofumosus*, nor between species. The existence of altitudinal migration patterns in *C. oustaleti* was confirmed. The triple-oxygen analysis ( $\delta^{16}\text{O}$ ,  $\delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$ ) in blood plasma and the estimates obtained from physiological measurements, revealed that both species would be using a mixture of marine and fresh water and producing 23% metabolic water on average. The basal metabolic rate (BMR) and the total evaporative water loss (TEWL) of *C. nigrofumosus* were higher in summer than in winter. No differences were found between both species during the winter when they are in sympatric condition. A positive correlation was found between BMR and TEWL using both species and seasons. Thermal conductance decreased significantly in winter (18%) for *C. nigrofumosus* and 45% for *C. oustaleti*. Enzymatic activity in erythrocytes did not reflect energy expenditure at the body level nor did it show variation between species or seasons. Level of oxidative damage was positively correlated with energy expenditure in the specialist marine species *C. nigrofumosus*, while no variation in total antioxidant capacity was found between seasons or between species. Contrary to expectations, the mitochondrial enzyme activity in erythrocytes did not reflect the metabolic increase observed in summer in *C. nigrofumosus*, even though lipid

peroxidation damage was found to be related to the metabolic increase in summer. Finally, the results obtained from the measurements of physiological parameters support the use of stable isotopes to estimate the contribution of metabolic water to the total water budget.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta^{13}\text{C}$ : Abundancia de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

$\delta^{15}\text{N}$ : Abundancia de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .

$\delta^2\text{H}$ : Abundancia de  $^2\text{H}/^1\text{H}$ .

$\delta^{18}\text{O}$ : Abundancia de  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

$\delta^{18}\text{O}_A$ : Marca isotópica del agua proveniente de los alimentos

$\Delta^{17}\text{O}$ : Residual de  $^{17}\text{O}$  respecto a la estrecha correlación de  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

SEA: Área de elipse estándar.

SEA<sub>C</sub>: Área de elipse corregida por el menor valor.

SEA<sub>B</sub>: Área de elipse bayesiana.

TA: área total del polígono convexo.

mb: masa corporal

TMB: Tasa metabólica basal.

TMB<sub>m</sub>: Tasa metabólica basal masa-específica

PTAE: Pérdida total de agua evaporativa.

PTAEm: Pérdida total de agua evaporativa masa-específica

F<sub>M</sub>: Contribución fraccional del agua metabólica al presupuesto de agua corporal.

A<sub>M</sub>: Producción de agua metabólica.

RPTAE: Pérdida relativa de agua evaporativa.

C: Conductancia térmica.

COX: Citocromo C Oxidasa.

TBARS: Concentración de ácido tiobarbitúrico, índice de estrés oxidativo.

TAC: Capacidad antioxidante total.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la frecuencia de eventos climáticos extremos tales como sequías, olas de calor y cambios en los patrones de temperatura y precipitación, han impactado significativamente algunos procesos ecológicos fundamentales, afectando -en algunos casos de manera irreversible- a especies endémicas y a la biodiversidad en su conjunto (McCarty, 2001; IPCC, 2014 Harris et al., 2018). En particular, estos cambios ocurren por un incremento en la frecuencia, duración y severidad de olas de calor en conjunto a la disminución de los eventos de frío (Walther et al., 2002; Albright et al., 2017). Se ha sugerido que el impacto del cambio climático a una escala local está determinado por la interacción entre la flexibilidad (plasticidad fenotípica) de los organismos y las características de los desafíos ambientales; mientras que las consecuencias finales probablemente dependerán de la tolerancia fisiológica de cada especie y/o individuo (Piersma & Gill, 1998). Los procesos metabólicos y funcionales que definen la vida están íntimamente conectados con la disponibilidad de agua y en cualquier circunstancia, los animales terrestres deben mantener el balance hídrico. Por lo tanto, comprender cómo los organismos regulan el presupuesto hídrico es central en estudios de fisiología, ecología y evolución (Whiteman et al., 2019) y tendrá mayor importancia a medida que la inminente variabilidad climática se agudice con el tiempo.

Dado su tamaño pequeño y su modo de vida (e.g., diurnos) las aves paseriformes son especialmente sensibles a estresores ambientales tales como la disponibilidad de agua, la variabilidad térmica y el aumento de la temperatura (Gardner et al., 2011). Está ampliamente documentado que el incremento de la temperatura, la disponibilidad hídrica y el consumo de sales, modifican la respuesta fisiológica de las aves, tales como la tasa metabólica (TMB), masa corporal (mb), tolerancia y conductancia térmicas, pérdida total de agua evaporativa (PTAE) y producción

de agua metabólica; sin embargo, aún son escasos los estudios que integren cómo las aves enfrentan estos desafíos en conjunto (Carmi et al. 1993; Sabat et al. 2006; Barceló et al. 2009; Maldonado et al., 2009; Gerson & Guglielmo, 2011, Smit & McKechnie, 2015). En particular, la deshidratación puede provocar un aumento en la concentración de ácido úrico y osmolalidad del plasma, hipovolemia y pérdida de masa corporal (mb), tanto por pérdida de agua evaporativa como por un aumento en el catabolismo de proteínas (Gerson y Guglielmo, 2011). Por otro lado, un estrés osmótico provocado por el consumo de sal produce un aumento en la producción y/o concentración de orina y puede provocar un incremento en la TMB asociado a la demanda osmorregulatoria de los órganos internos (Sabat et al., 2004; Gutiérrez et al 2011, Peña-Villalobos et al., 2013). Dado que la capacidad de concentración de la orina en aves es limitada (Goldstein & Skadhauge, 2000), estos ajustes fisiológicos podrían ser costosos (Sabat et al., 2006, 2009; Gardner et al., 2011; Noakes & McKechnie, 2020) y en conjunto, podrían modificar algunas características ecológicas y conductuales de las aves, afectando a la distribución, abundancia, las posibilidades de supervivencia y reproducción, es decir adecuación biológica (Albright et al., 2017). Paralelamente, se han descrito estrategias conductuales que emplean algunas especies desérticas de tamaño pequeño (e.g. *Taeonopygia guttata*) y que les permiten mantener constantes la mb y la tasa metabólica durante eventos climáticos extremos como olas de calor y sequía (Cooper et al. 2019). Además, varios autores (Tieleman & Williams, 2002; Tieleman et al., 2003; Smit & McKechnie, 2010;) han demostrado que aves de ambientes áridos que viven bajo regímenes de temperaturas extremas, escasa humedad relativa y precipitación se han especializado minimizando la TMB y la PTAE.

El presupuesto hídrico en estado estacionario (entrada = salida), de un animal terrestre en homeostasis, que supone una cantidad constante de agua corporal total se describe por:

$$A_B + A_{PF} + A_M = A_C + A_R + A_O + A_F \text{ (ecuación 1)}$$

Donde  $A_B$  es el agua bebida,  $A_{PF}$  es el agua preformada en alimentos,  $A_M$  es producción de

agua metabólica,  $A_C$  pérdida de agua mediante la piel,  $A_R$  pérdida de agua a través de superficies respiratorias,  $A_O$  y  $A_F$  es el agua excretada a través de la orina y las heces, respectivamente (Sabat et al., 2021). Comúnmente para las aves, la PTAE corresponde a un 50%-80% del total de pérdidas de agua, dependiendo de las condiciones de hidratación, mientras que la proporción del agua perdida por la excreta oscila entre un 15%-30% del total de PTAE (MacMillen, 1990; Goldstein & Skadhauge, 2000).

Para mantener el presupuesto hídrico, las aves cuentan con tres fuentes de agua: (1) preformada (o meteórica) proveniente de las precipitaciones, (2) preformada proveniente de los alimentos y (3) agua metabólica (del oxígeno atmosférico) producida como un subproducto del metabolismo aeróbico (Lee & Schmidt-Nielsen, 1971). Aparentemente, el  $A_M$  por sí sola es insuficiente como para suplir el requerimiento de agua de la mayoría de los vertebrados (McNab, 2002), sin embargo, las especies que habitan ambientes áridos pueden sobrevivir utilizando sólo el agua metabólica bajo ciertas condiciones (Cortés et al., 2000; Bozinovic et al., 2007). Hace décadas, Bartholomew & Cade, (1963) observaron que la producción teórica de agua metabólica se acerca a la tasa de PTAE en aves cuyo peso corporal superaba los 60 g. Posteriormente, MacMillen (1990) sugirió que las aves más pequeñas (< 20g) podían mantener un balance hídrico positivo ( $A_M > PTAE$ ) bajo su temperatura crítica inferior ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) cuando se encontraban restringidas de agua. Paralelamente, existe evidencia de que la falta de agua para beber aumenta el catabolismo de ciertos nutrientes (e.g. grasa y/o proteínas) aumentando la  $A_M$  y se estima que la proporción en el presupuesto hídrico de aves puede variar de <10-15% en colibríes a un 80% en algunos passeriformes (MacMillen, 1990; Williams et al., 1993; Sabat et al., 2006b). Así, el balance hídrico de un organismo depende de la interacción entre las características ambientales y los mecanismos fisiológicos de conservación de agua, incluyendo la resistencia a la pérdida de agua, capacidad renal de concentrar orina, eficiencia de cornetes nasales y las tasas metabólicas (MacMillen, 1990; Gerson & Guglielmo, 2011; Rutkowska et al. 2016).

Numerosos estudios se han focalizado en los ajustes fisiológicos que previenen la pérdida

de agua, sin embargo, pocos estudios han examinado la variación en el uso de distintas fuentes de agua para mantener el equilibrio hídrico (Navarro et al., 2018, Smit et al., 2019, Sabat et al., 2021) y aún menos estudios que se centren en el papel del agua metabólica sobre los presupuestos del agua corporal de las aves en vida libre (MacMillen 1990, Williams & Tieleman, 2001, Giulivi & Ramsey 2015), pues medir la contribución de las distintas fuentes al presupuesto corporal de agua es costoso, especialmente en el campo (Whiteman et al., 2019). En síntesis, la contribución relativa de cada fuente de agua al presupuesto hídrico total dependería de las condiciones ambientales (i.e. temperatura, humedad relativa, disponibilidad de agua meteórica y preformada), el sustrato metabólico y la tasa de oxidación (carbohidrato, proteína o lípido) y características conductuales (e.g. diurnos o nocturnos) que favorecen o limitan los niveles de gasto de energía (Giulivi & Ramsey 2015, Nord & Nilsson 2019).

Como se mencionó, diversos estudios sugieren que el balance hídrico es particularmente costoso para aves paseriformes que habitan en ambientes deshidratantes, lo que se manifiesta en aumentos de la TMB en aves sometidas a estrés salino o a deshidratación en condiciones estivales (Smit & McKechnie, 2010). Esto último es comúnmente asumido como el costo de vivir en ambientes áridos y/o el consumir recursos hiperosmóticos (Arad et al., 1987). Sin embargo, lo que en principio se considera como el costo de osmorregulación por habitar tales ambientes, puede también considerarse como una respuesta adaptativa, ya que un incremento en la tasa metabólica podría resultar en el aumento de la  $A_M$  y así, reducir la dependencia de agua preformada y/o la necesidad de conservar agua (Whiteman et al., 2019). De hecho, algunas aves paseriformes, pueden variar las fuentes de obtención de alimento y agua entre ambientes terrestres y marinos e incluso, se ha descrito que son capaces de aumentar significativamente el aporte de agua metabólica al presupuesto hídrico en respuesta a una aclimatación a bajas temperaturas en condiciones controladas de laboratorio (Sabat et al., 2021). Sin embargo, aun se desconoce si este ajuste en la producción de  $A_M$  ocurre también en respuesta al consumo presas marinas o sólo en respuesta al descenso de la temperatura ambiente por efecto de la estacionalidad.

Por otro lado, el aumento en la producción de  $A_M$ , debido al aumento en el gasto energético puede provocar dos problemas potenciales. El primero es que un incremento de la tasa metabólica aumenta la pérdida de agua a través de la respiración y el segundo es que genera un aumento en la temperatura corporal, que es especialmente problemático en ambientes cálidos (Hillenius & Ruben, 2004; Sabat, et al., 2006a, Gavrillov 2017). Bajo este escenario, la capacidad de disipación o conductancia térmica (C) podrían desempeñar un papel crucial en la limitación del gasto de energía de un organismo y por lo tanto la contribución de  $A_M$  al presupuesto hídrico. Así, es posible predecir que la aislación (i.e., inverso de la conductancia) térmica puede limitar la intensidad metabólica de una especie, lo que a su vez podría limitar su capacidad de usar agua metabólica para mantener el equilibrio hídrico.

Adicionalmente, pareciera existir un costo asociado a la utilización de agua salada y la producción de agua mediante el metabolismo aeróbico. Efectivamente, varios estudios han documentado una relación funcional entre el consumo de sal, el aumento en la tasa metabólica y la producción de especies reactivas de oxígeno celular (ROS) (Sabat et al., 2017) y, por lo tanto, de las defensas antioxidantes necesarias (Ji, 1999, Tumminello & Fuller-Espie, 2013). Las ROS se producen principalmente en la mitocondria como subproductos de la cadena transportadora de electrones y otras reacciones redox pudiendo dañar moléculas, ADN, proteínas y la membrana lipídica (Srinivasan & Avadhani, 2012, Selman et al., 2012). Particularmente, respecto a los mecanismos bioquímicos involucrados en los procesos de cambios en el metabolismo a nivel del organismo, se ha descrito que la tasa metabólica se asocia positivamente con la actividad de enzimas metabólicas mitocondriales Citrato Sintasa (CS) y Citocromo C Oxidasa (COX) presentes en el músculo esquelético y en eritrocitos (Peña-Villalobos et al., 2014; Stier et al., 2017; Gutiérrez et al., 2019). Así, es posible que el metabolismo de las mitocondrias, y de la expresión de enzimas involucradas a nivel tisular y periférico, se encuentren asociadas a las modificaciones fisiológicas que ocurren en aves sometidas a distintos niveles de estrés hídrico. En resumen, existe escasa información acerca de las causas y consecuencias del uso de agua metabólica en aves respecto a los

factores bióticos a nivel fisiológico (e.g. C, bioquímica), como abióticos (variabilidad espacial y temporal de agua dulce) que facilitan o limitan la dependencia de agua metabólica en el presupuesto hídrico.

*Modelo de Estudio: especies del género Cinclodes*

Existe un grupo de aves passeriformes especialmente sensible al incremento de la temperatura ambiental, que habita un ambiente costero y en ocasiones no dispone de agua dulce. El género *Cinclodes* incluye una especie única entre passeriformes, el churrete costero o *Cinclodes nigrofumosus*. Es un forrajeador marino especialista de ambientes intermareales, endémico de la costa chilena que se alimenta exclusivamente de invertebrados marinos que contienen altas cargas osmóticas (Tapia-Monsalve et al., 2018). Debido a que las aves de esta familia carecen de la glándula de la sal, enfrentan el problema de conservar agua en un ambiente donde la disponibilidad espacial y temporal de agua dulce es limitada o escasa (Sabat et al., 2004). Además se han descrito diferencias interespecíficas en la capacidad de osmorregulación entre especies de este género. Por ejemplo, con la especie simpátrica *C. oustaleti*, que es un migrante estacional y durante los meses fríos de invierno migra desde la Cordillera de los Andes (en donde el agua dulce es ilimitada) hacia la costa del océano pacífico, alimentándose con recursos de la zona intermareal (Sabat et al. 2006a). Como *C. oustaleti* es más pequeño y presenta una mayor tasa metabólica masa-específica que su congénere, el aporte del agua metabólica al presupuesto hídrico podría ser mayor, lo que además es concordante con una mayor limitación en su capacidad de eliminar sales a través de la orina (Sabat et al., 2004) y los mayores niveles de estrés hídrico en comparación con *C. nigrofumosus* (Tapia-Monsalve et al., 2018).

Específicamente en *Cinclodes*, se ha descrito que la PTAE aumenta con la temperatura ambiental (Sabat et al., 2006a). Para compensar esta pérdida, los individuos son capaces de concentrar la orina, aumentar la producción de  $A_M$  y/o aumentar la ingesta de agua. Por otro lado, la  $A_M$  depende de las tasas de gasto energético, lo que a su vez aumenta la frecuencia respiratoria y en

principio aumenta las pérdidas de agua por evaporación. Una alternativa es aumentar el consumo de agua preformada, sin embargo, en ocasiones, la única fuente de agua preformada es el mar, lo que requiere la presencia de órganos osmorreguladores altamente eficientes, capaces de concentrar la orina por sobre  $\sim 1000 \text{ mOsm kg}^{-1}$ , que parece estar cerca del límite de algunas especies de *Cinclodes* (Sabat et al., 2004). Existe evidencia en paseriformes, de que los costos de mantención (e.g. TMB) aumentan con el consumo de sales y que esto dependería tanto de los costos del trabajo osmótico como de los aumentos en la actividad y masa del riñón (Peña-Villalobos et al., 2013, Sabat et al., 2019).

Por otro lado y desde una perspectiva ecológica, los ajustes fisiológicos previamente descritos pueden estar influenciados por variaciones en la dieta (y por lo tanto variación del nicho trófico), y como tal, es posible estudiarlo de manera mínimamente invasiva mediante el análisis de isótopos estables (Wunder et al., 2005, Sellick et al., 2009, Newsome et al., 2007, 2015, Graham et al., 2010). Por ejemplo, algunos estudios han explorado movimientos altitudinales en *Cinclodes oustaleti* mediante la composición isotópica del hidrógeno ( $\delta^2\text{H}$ ) en múltiples tejidos, ya que la abundancia de este isótopo varía predeciblemente con la altitud (Poage & Chamberlain 2001, Hobson et al., 2003, Newsome et al., 2015). En simultáneo, se ha descrito que la variación en la marca isotópica del nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) estaría relacionada con el nivel trófico y la composición de la dieta, mientras que la variación en la marca del carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), diferencia el uso de recursos terrestres y marinos (Sabat & Martínez del Río, 2002, Negrete et al., 2017, Tapia-Monsalve et al., 2018.). Además, utilizando la desviación (i.e., residual) de la estrecha correlación que existe naturalmente entre  $\delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  ( $\Delta^{17}\text{O}$ ), es posible conocer la contribución fraccional de agua metabólica al presupuesto total de agua, y mediante la abundancia relativa de isótopos de  $^{18}\text{O}$  ( $\delta^{18}\text{O}$ ) es posible estimar el uso de potenciales fuentes de agua meteórica (i.e., de mar o dulce). Mediante esta metodología, se ha demostrado que *C. nigrofumosus* de invierno estarían consumiendo agua de mar y que alrededor de un 25% del total de agua corporal sería producida metabólicamente (Sabat et al., 2021). Otros estudios hallaron que, en el extremo norte de su distribución en Chile, estas aves

dependen más de alimentos marinos que terrestres, mientras que aumentan el uso de fuentes terrestres en los márgenes sur de su distribución (Sabat et al. 2006a). Evidentemente, el aumento de la productividad terrestre aumenta la disponibilidad de invertebrados terrestres que, en parte, pueden explicar el patrón antes mencionado. A su vez, esto plantea la interrogante respecto de si los cambios potenciales de productividad en invierno y verano afecta el consumo de presas marinas y terrestres con el consiguiente efecto sobre las tasas de gasto de energía, la  $A_M$  y el balance hídrico. Las características de la historia de vida de las aves pertenecientes al género *Cinclodes*, ofrecen una oportunidad única para investigar estacionalmente la interacción entre la temperatura, la disponibilidad de agua dulce, la dieta con elevadas cargas osmóticas y la dependencia del agua metabólica. En resumen, en esta tesis se estudiaron los cambios estacionales de algunas características funcionales de *Cinclodes* a distintos niveles de organización biológica: desde la bioquímica (e.g., enzimas metabólicas), la fisiología orgánica (TMB, PTAE,  $A_M$ ) hasta los aspectos ecológicos, mediante el análisis del nicho trófico utilizando el análisis de isótopos estables.

## HIPÓTESIS

La utilización de recursos marinos y terrestres de las aves del género *Cinclodes* depende de la productividad primaria, y de las capacidades fisiológicas asociadas al balance hidro-salino, las que presentan ajustes relativos a los mecanismos de conservación y obtención de agua. Se predice que la especie especialista costera *C. nigrofumosus*, incremente el uso de recursos marinos en verano y que la especie generalista migrante *C. oustaleti* amplíe su nicho trófico (isotópico) durante el invierno asociado a la utilización de ambientes costeros, manteniendo así un adecuado equilibrio hídrico. Paralelamente, debido a cambios en la conductancia térmica sumados a la alta tolerancia osmótica presente en *C. nigrofumosus*, se predice un incremento en el gasto energético durante la temporada estival y por lo tanto una mayor contribución de agua metabólica al presupuesto hídrico total, pero, en consecuencia, una mayor exposición potencial a presentar daño oxidativo producto del aumento en la producción de ROS.

Específicamente, se predice que i) exista un incremento en la amplitud del nicho isotópico en *C. nigrofumosus* en verano y de *C. oustaleti* en invierno, ii) que exista mayor contribución del agua metabólica en *C. nigrofumosus* de verano en comparación a *C. nigrofumosus* de invierno y respecto de *C. oustaleti* iii) que la utilización de recursos marinos muestre una correlación positiva con la tasa metabólica masa-específica, la C y la intensidad metabólica mitocondrial en los glóbulos rojos (i.e. actividad de COX) y iv) que en ambas especies las variables asociadas al gasto de energía (BMR, COX) se correlacionen positivamente con TBARS y TAC.

## Objetivo General

Estimar y comparar intra e inter específicamente la variación estacional del nicho isotópico, mediante el análisis de dos tejidos de *Cinclodes nigrofumosus* y *Cinclodes oustaleti*, determinando los factores proximales (e.g. balance hídrico) que permiten a las aves obtener recursos en ambientes salinos con una marcada diferencia estacional en la disponibilidad de agua dulce.

## Objetivos específicos

- a) Estimar y comparar la variación estacional en el nicho trófico de *Cinclodes nigrofumosus* mediante la caracterización isotópica (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) del tejido sanguíneo en aves capturadas en invierno y verano. Comparar la composición isotópica (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ) del tejido inerte (e.g. pluma) y sanguíneo en *Cinclodes oustaleti* capturadas en invierno en la costa de Chile central.
- b) Comparar el nicho isotópico de ambas especies de *Cinclodes* en condición de simpatria durante el invierno en la costa central de Chile mediante el análisis de isótopos de carbono y nitrógeno (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) en tejido sanguíneo.
- c) Estimar la contribución fraccional del agua metabólica, preformada y marina al presupuesto hídrico en ambas especies de *Cinclodes* en invierno y verano mediante la composición isotópica del oxígeno en plasma sanguíneo (i.e.,  $\Delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$ ).
- d) Determinar la TMB, la  $A_M$ , la PTAE, PTAE/ $A_M$  y C de *Cinclodes nigrofumosus* que habitan la zona central de Chile en verano e invierno y *Cinclodes oustaleti* en invierno.
- e) Determinar variables bioquímicas relacionadas a la producción de energía y balance redox, en particular i) actividad de la enzima metabólica COX en tejido sanguíneo y ii) evaluar marcadores de estrés oxidativo (e.g. marcadores de daño en membranas lipídicas y de capacidad antioxidante).

## METODOLOGÍA

### *Modelo de estudio*

Estudiaremos dos especies de passeriformes de América del Sur pertenecientes al género *Cinclodes*, que incluye una especie que presenta características poco comunes es el churrete costero (*Cinclodes nigrofumosus*), endémico de la costa chilena, un forrajeador marino obligado en ambientes intermareales único entre los passeriformes porque se alimenta de invertebrados marinos que contienen altas cargas osmóticas y habita una amplia franja costera latitudinal que abarca sitios desde las regiones costeras más húmedas del sur de Chile (Río Valdivia) a los sitios más áridos del mundo cerca de su límite norte, en la Región de Atacama, Chile (Sabat, 2000, Sabat & Martínez Del Rio, 2002, Sabat et al., 2006). Por otra parte, durante los meses más lluviosos de otoño e invierno, en la costa de Chile central, es posible observar a *Cinclodes oustaleti* en una condición de simpatria con *C. nigrofumosus*. Esta especie es un migrante estacional y durante el verano austral retorna hacia sitios de alta altitud en la Cordillera de Los Andes. En invierno, *C. nigrofumosus* suele utilizar más recursos marinos que *C. oustaleti*, y esta variación en la dependencia de la dieta marina está acompañada de diferencias en los rasgos osmorregulatorios. Por lo tanto, *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* representan una oportunidad única para investigar el efecto de la interacción entre la temperatura, la disponibilidad de agua dulce, una dieta salada osmóticamente desafiante, la  $A_M$  y la pérdida de agua por evaporación sobre la función osmorregulatoria, energética y fisiología del estrés en aves tanto a nivel inter como intraespecífico (Sabat et al., 2004, Newsome et al., 2015, Tapia-Monsalve et al., 2018).

### *Captura de animales y toma de muestras*

Entre julio de 2019 y septiembre de 2021 se capturaron un total de 16 individuos de *C. nigrofumosus* (invierno,  $n = 9$ ; verano,  $n = 7$ ) y 11 individuos de *C. oustaleti*, en las localidades de Algarrobo, Región de Valparaíso ( $33^{\circ} 22' S$ ,  $71^{\circ} 41' W$ ), zona central de Chile. Estos sitios presentan condiciones estacionalmente contrastantes de precipitación, temperatura y productividad (di Castri & Hajek, 1976). Para la captura se utilizaron 13 trampas de piso, cebadas con *Tenebrio molitor* y en promedio 6 redes niebla, colocándose en simultáneo entre las 8:00 y 16:00 h. Posterior a su captura, los individuos fueron llevados a cautiverio por no más de 24 h, donde se obtuvo una fracción de la novena pluma primaria y una muestra de sangre de la vena humeral utilizando capilares de hematocrito heparinizados (HIRSHMANN, Alemania). Luego, el contenido de un capilar ( $\sim 70 \mu L$ ) fue depositado sobre un portaobjeto y el resto de los capilares ( $\sim 100 \mu L$ ) fueron vaciados en tubos eppendorf heparinizados y se centrifugaron *in situ* a 6000 RPM (Centrífuga BELL, China). Luego se colectó por separado el plasma y los elementos figurados en un tanque de nitrógeno líquido para finalmente ser almacenadas a  $-80^{\circ}C$  en laboratorio. Posteriormente se realizaron las mediciones metabólicas (e.g. TMB, PTAE, véase abajo), y finalmente fueron liberados en el mismo sitio de su captura.

### *Análisis de isótopos estables*

Se ha descrito que la marca isotópica de los distintos tejidos representa la incorporación de los nutrientes a distintas escalas temporales, por ejemplo, los isótopos de carbono, nitrógeno e hidrógeno en la sangre de las aves representarían la dieta para un período de 1-2 meses anteriores a la captura (Martínez del Rio et al. 2009), mientras que las plumas representarían la información ecológica del verano anterior, momento en que las plumas primarias son mudadas (Bertolero and Zavalaga 2003). De esta manera, la marca isotópica de sangre nos permite caracterizar el uso de recursos de la temporada en que se capturan los animales (invierno o verano) mientras que la marca de la pluma, nos indica el uso de recursos de la temporada estival anterior, en el caso de aves capturadas en invierno. Todas las muestras de sangre depositadas en portaobjeto se secaron a 60°C por 48 h, luego fueron extraídas con la ayuda de un bisturí y se depositaron en tubos eppendorf. Las plumas se limpiaron con una solución disolvente de cloroformo:metanol 2:1 para eliminar contaminantes de la superficie. Posteriormente fueron procesadas siendo cortadas en trozos menores a un milímetro. Aproximadamente 0,5 mg de sangre entera seca o tejido de plumas se pesaron en cápsulas de estaño y se determinaron los valores de los isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en un espectrómetro de masas de razones isotópicas Thermo Scientific Delta V Plus. Los valores del isótopo de hidrógeno tisular ( $\delta^2\text{H}$ ) se midieron con un analizador elemental de conversión térmica (TCEA) Thermo Scientific acoplado a un espectrofotómetro de relación de masa isotópica Thermo Scientific Delta V Plus. Todas las mediciones de isótopos se realizaron en el Centro de Isótopos Estables de la Universidad de Nuevo México (Albuquerque, NM). Los datos de isótopos estables se expresan como valores delta ( $\delta$ ) en unidades per mil (‰) utilizando la siguiente ecuación:  $\delta X = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1] \times 1000$ , donde X es cualquier sistema isotópico de interés (e.g. H, C o N) y R corresponde a las proporciones del isótopo pesado a liviano (e.g.  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) para cada muestra y estándar, respectivamente (Boutton 1991, Unkovic et al., 2001). Los estándares de referencia utilizados en la comparación fue Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) para

$\delta^{13}\text{C}$  y nitrógeno atmosférico  $\delta^{15}\text{N}$  y Vienna Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) para  $\delta^2\text{H}$ . La precisión analítica ( $\pm 1$  SD) fue estimada en  $\pm 0,17\text{‰}$  y  $\pm 0,18\text{‰}$  para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , respectivamente y para  $\delta^2\text{H}$  de materiales orgánicos se determinó mediante el análisis de los materiales de referencia internos que se describen en Newsome et al. (2015).

La amplitud de nicho trófico fue estimada utilizando el área de nicho isotópico de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  para *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* en invierno y verano. El área de nicho isotópico fue estimada a través del área total del polígono convexo (TA), de la elipse estándar (SEA) y corregida para tamaños de muestra pequeños ( $\text{SEA}_C$ ) (Jackson et al., 2011).  $\text{SEA}_C$  es expresada en  $\text{‰}^2$  y corresponde a una medida promedio del nicho isotópico de la población en estudio. Además, se calculó la estimación Bayesiana de SEA ( $\text{SEA}_B$ ) para realizar comparaciones del nicho isotópico entre grupos. Para esto se utilizaron 10.000 iteraciones, las cuales permitieron estimar la probabilidad de que un área de nicho isotópico sea menor que otra (e.g.,  $\text{SEA}_B_{\text{invierno}} \leq \text{SEA}_B_{\text{verano}}$ ). Tanto  $\text{SEA}_C$  como  $\text{SEA}_B$  son independientes del tamaño de muestra, entregando una correcta descripción del nicho isotópico. Para la estimación de  $\text{SEA}_C$  y  $\text{SEA}_B$  se utilizó SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses) paquete complementario de R (R development Core Team 2013) (Jackson et al., 2011).

Para estimar la proporción de agua metabólica al pool de agua corporal, se aplicó un método que permite el uso de una sola muestra de sangre para estimar las contribuciones relativas de las fuentes de agua. Este método se basa en la medición de  $\Delta^{17}\text{O}$ , que es la desviación positiva o negativa de la estrecha correlación que existe naturalmente entre los valores de  $\delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  (Whiteman et al. 2019). El agua corporal (AC) se compone principalmente de 1) agua metabólica y 2) agua bebida y en alimentos (es decir, agua meteórica), que tienen valores de  $\Delta^{17}\text{O}$  entre  $-0,45\text{‰}$  (que refleja el oxígeno atmosférico inhalado, Liang et al. 2006) y  $\sim 0,03\text{‰}$  (independientemente de la fuente, Li et al. 2015, Sharp et al. 2018) respectivamente. Es importante destacar que estos valores son esencialmente constantes independientemente del fraccionamiento de  $\delta^{18}\text{O}$ , por lo que se puede utilizar un modelo lineal mixto para calcular la contribución proporcional de cada fuente

mediante la siguiente ecuación (Whiteman et al.2019):

$$\Delta^{17}O_{AC} = F_M \times (-0,45 \text{ ‰}) + (1 - F_M) \times (0,030 \text{ ‰}) \text{ (ecuación 2),}$$

en donde AC significa agua corporal,  $F_M$  representa la contribución fraccional al agua corporal del agua metabólica, y  $(1 - F_M)$  representa la contribución del agua bebida o en alimentos. Entonces, se determinó el  $\Delta^{17}O$  en agua destilada criogénicamente a partir de muestras de plasma sanguíneo de los individuos muestreados. En resumen, las muestras de agua (1 a 2  $\mu$ l) se fluoraron al vacío para generar  $O_2$ , que se purificó mediante un tamiz molecular y se analiza con un espectrofotómetro de masas de proporción de isótopos estables (IRMS) de doble entrada en el Centro de para Isótopos Estables (UNM-CSI, Albuquerque) la Universidad de Nuevo México. Los valores medidos de  $\delta^{17}O$  y  $\delta^{18}O$  se utilizaron para calcular  $\Delta^{17}O$ . Además de usar los valores de  $\Delta^{17}O$  para comprender la dependencia del agua metabólica, se utilizó la combinación de los valores de  $\Delta^{17}O$  y los valores de  $\delta^{18}O$  del agua corporal para calcular los valores de  $\delta^{18}O$  del agua preformada (meteórica) que consumen las aves mediante la ecuación:

$$\delta^{18}O_A = (\delta^{18}O_{AC} - (F_M) \times (\delta^{18}O_{aire})) / (1-F_M) \text{ (ecuación 3),}$$

en donde, A corresponde al agua bebida o ingerida en alimentos, AC el agua corporal. Aquí, asumimos que  $\delta^{18}O_{aire}$  es 17,8 ‰ debido a que las mediciones de  $\delta^{18}O$  realizadas en el aire exhalado indican que el oxígeno que se absorbe e incorpora al agua metabólica es aproximadamente 6% más bajo que el del oxígeno atmosférico (23.8 ‰) (Epstein & Zeiri 1988, Whiteman et al 2019).

### *Tasa Metabólica Basal*

La tasa metabólica se estimó mediante el consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) y la pérdida total de agua evaporativa utilizando un sistema estándar de respirometría de flujo abierto en cámaras metabólicas con temperatura controlada. La tasa metabólica (TMB) se midió a través de un sistema de respirometría de flujo continuo *Field Metabolic Systems* con higrómetro integrado (FMS, Sable Systems®, Nevada), siguiendo a Sabat et al. (2017). En breve, las aves fueron colocadas individualmente en la cámara metabólica, mantenidas a una temperatura constante ( $15^\circ\text{C}$  o  $30^\circ\text{C} \pm 0,5$ ) y recibiendo aire seco y sin  $\text{CO}_2$  que es removido previamente utilizando tubos con absorbente de  $\text{CO}_2$  (Baralime) y Drierita a un flujo de  $800 \text{ mL min}^{-1}$ . La concentración de  $\text{O}_2$  en la cámara se registró durante 8 h por individuo durante el período de inactividad entre las 20:00 y las 06:00. El aire exhalado pasa a través de un higrómetro de humedad relativa RH-200 (Sable Systems), luego a través de columnas de Drierita y gránulos absorbentes de  $\text{CO}_2$  de Baralime antes de pasar por el analizador de  $\text{O}_2$ , modelo FC-10A (Sable System). Debido a que el  $\text{CO}_2$  se elimina antes del lector de  $\text{O}_2$  consumo de oxígeno se calculó de acuerdo con la ecuación descrita en Lighton (2008):  $\text{VO}_2 = \text{FR} \times 60 \times (\text{FiO}_2 - \text{FeO}_2) / (1 - \text{FiO}_2)$ , donde FR es la tasa de flujo en  $\text{mL min}^{-1}$ , y  $\text{FiO}_2$  y  $\text{FeO}_2$  son las concentraciones fraccionales de entrada y salida de  $\text{O}_2$  en la cámara metabólica, respectivamente (como se indica en Tapia-Monsalve et al., 2018). La salida de los analizadores de  $\text{H}_2\text{O}$  (kPa) y oxígeno (%) se digitalizó utilizando una Interfaz Universal II (Sable Systems) y se registró en una computadora personal utilizando el software de adquisición de datos EXPEDATA (Sable Systems). La PTAE se calculó como  $\text{PTAE} = [(V_e \rho_{\text{out}} - V_i \rho_{\text{in}})]$  donde PTAE está en  $\text{mg mL}^{-1}$   $\rho_{\text{in}}$  y  $\rho_{\text{out}}$  son la humedad absoluta en  $\text{kg m}^{-3}$  del aire de entrada y el aire de salida respectivamente,  $V_i$  es el flujo del aire que entra en la cámara como lo indica el controlador de flujo másico ( $750 \text{ mL min}^{-1}$ ) y  $V_e$  es el flujo de aire que sale.  $V_e$  se calculará siguiendo a Williams y Tieleman (2000) como  $V_e = V_i - [\text{VO}_2 (1 - \text{RQ})] + \text{VH}_2\text{O}$ ; donde  $V_i$ , y  $\text{VO}_2$  ( $\text{mL min}^{-1}$ ) son conocidos. Se asume el coeficiente respiratorio (RQ) de 0,71 (como se indica en Sabat et al., 2006). Además, se estimó la  $A_M$  usando la

equivalencia de 0,567 mL H<sub>2</sub>O por litro de O<sub>2</sub> consumido (Schmidt-Nielsen, 1997) y luego se calculó y analizó la relación entre la A<sub>M</sub> y la PTAE (A<sub>M</sub>/PTAE). La C fue calculada a partir de la medición metabólica siguiendo la fórmula  $C = mb / (T_b - T_a)$  (Cal/g h °C), donde mb es el metabolismo, T<sub>b</sub> es la temperatura corporal del ave (cercana a 41°C) y T<sub>a</sub> es la temperatura a la cual se midió el metabolismo (15°C) (Novoa et al., 1994).

#### *Actividad enzimática y balance oxidativo*

La actividad enzimática de COX (E.C. 1.9.3.1) se midió en la fracción celular del tejido sanguíneo (eritrocitos). Para ello, las células sanguíneas fueron masadas y homogenizadas en 4 volúmenes de 0,1 M de buffer de fosfato con 0,002 M EDTA (pH 7,3). Para liberar las enzimas insertas en la membrana mitocondrial, las muestras mantenidas en hielo fueron sonicadas a 130 W por 90 s en intervalos de 10 s usando un sonicador Ultrasonic Processor VCX-130 (Connecticut, USA). Luego se centrifugaron a 14000 g por 15 minutos a 4°C para finalmente utilizar el sobrenadante cuyo contenido proteico fue determinado mediante el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero de bovino como estándar. La actividad enzimática fue determinada a 25°C mediante colorimetría utilizando un espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA) siguiendo el protocolo de rutina utilizado anteriormente para estas enzimas (Sabat et al., 2017, 2019). Brevemente, se homogenizaron 5 uL de muestra en buffer 10mM Tris/HCl pH 7,0 que contiene 120 mM NaCl, 250 mM de sacarosa y luego se añade citocromo previamente reducido con ditiotreitól en un volumen final de 200 uL. La disminución en la densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 550 nm a 25°C. La actividad enzimática en unidad por gramo de muestra se calculó utilizando un coeficiente de extinción de 21,84 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 550 nm para citocromo, acorde a Peña-Villalobos et al. (2016).

El daño oxidativo se estimó midiendo el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como se indica en Ohkawa et al. (1979) en plasma, que indica una estimación de los niveles de peroxidación lipídica

(LPO) en el organismo y por ende el potencial daño en las membranas celulares. Además, con el fin de realizar una proporción entre los agentes prooxidantes y antioxidantes, se midió la capacidad antioxidante total (TAC) ocupando kits comerciales (Sigma Aldrich), siguiendo el protocolo que describe Apak et al., (2004).

### *Análisis estadístico*

Para establecer diferencias significativas entre estaciones para los valores isotópicos y las variables fisiológicas (energéticas y bioquímicas), primero se comprobó la distribución normal mediante una prueba de Shapiro-Wilk, y la homocedasticidad mediante una prueba de Levene. Luego de verificar los supuestos, un análisis de varianza multivariado (MANOVA) fue utilizado para evaluar posibles diferencias en los valores isotópicos entre *C. nigrofumosus* de diferentes épocas o entre ambas especies en invierno utilizando el paquete de R, “SIBER” (Parnell et al. 2010, R Development Core Team 2012). Mediante una matriz de correlación se buscaron posibles asociaciones funcionales entre los datos de isótopos. Los datos fisiológicos fueron comparados mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con el logaritmo de TMB o PTAE y el *log mb* como covariado y la estación o especie como factor fijo. Para el caso de la comparación interespecífica, las variables de estrés oxidativo (e.g. TBARS, TAC) no cumplieron con todos los supuestos de la estadística paramétrica (normalidad), por lo tanto, se utilizó la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney. Cuando los datos presentaron una distribución normal, se pudo realizar un ANOVA y una correlación entre el daño oxidativo y la TMB. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software STATISTICA (Dell, USA). Adicionalmente, se utilizaron como referencia (valores esperados) las ecuaciones alométricas para aves de zonas áridas y mésicas descritas por Tieleman (2002). El metabolismo esperado para aves de zonas áridas se estimó mediante la ecuación:  $\log TMB = 0,505 + 0,644 \log mb$  y para zonas mésicas con la ecuación:  $\log TMB = 0,584 + 0,644 \log mb$ . La PTAE esperada entre paseriformes de lugares áridos se estimó

mediante la ecuación:  $\log \text{PTAE} = -0,754 + 0,750 \log \text{mb}$  y para lugares mésicos  $\log \text{PTAE} = -0,438 + 0,661 \log \text{mb}$ . Además, se realizó un análisis de regresión lineal entre PTAE y TMB usando datos de todas las especies. Para evaluar diferencias en la conservación de agua inter o intraespecíficas, se calculó el cociente entre la PTAE y  $\text{VO}_2$  (RPTAE). En todas las pruebas, la significancia estadística se limitó a 95% (i.e.,  $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### *Efecto de la estacionalidad sobre nicho isotópico de Cinclodes nigrofumosus*

A continuación, se presenta la composición isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^2\text{H}$ ) de la sangre y pluma de *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti*. En primer lugar, se comparan estacionalmente las métricas obtenidas de *C. nigrofumosus*. En segundo lugar, se comparan las métricas obtenidas en sangre y pluma de *C. oustaleti* capturados en invierno. Y, en tercer lugar, se establece una comparación entre las métricas obtenidas a partir de la sangre de ambas especies en invierno (comparación interespecífica).

Las marcas isotópicas en la sangre de *Cinclodes nigrofumosus* ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) obtenidas de tejido sanguíneo no difieren significativamente entre invierno y verano (MANOVA, Tabla 1) y se encontraron valores entre -12‰ y -17‰ para  $\delta^{13}\text{C}$  y 16‰ a 18‰ para  $\delta^{15}\text{N}$  respectivamente. Al comparar estas marcas isotópicas por separado no se observaron diferencias significativas entre estaciones. El área estándar de las elipses ( $\text{SEA}_C$  y  $\text{SEA}$ ) para cada estación se presentan en la Tabla 1. Los análisis estadísticos de las elipses bayesianas ( $\text{SEA}_B$ ) revelaron que no existe diferencia en la amplitud de nicho isotópico entre estaciones ( $p = 0,617$ ; tabla 1). La superposición de las elipses fue de un 34,72% (figura 1). Los valores promedio de  $\delta^2\text{H}$  en ambos tejidos de *C. nigrofumosus* no variaron significativamente entre estaciones (ANOVA  $\delta^2\text{H}$  sangre:  $F_{(1,6)} = 0,010$ ,  $p = 0,923$ ,  $\bar{X}_{\text{sangre}} = -73,25 \pm 10,33\%$ ; ANOVA  $\delta^2\text{H}$  pluma:  $F_{(1,10)} = 0,006$ ,  $p = 0,940$ ,  $\bar{X}_{\text{pluma}} = -48,47 \pm 6,98\%$ ; Figura 2B).

Tabla 1. Comparación estacional de las diferentes métricas de la amplitud de nicho isotópico para *C. nigrofumosus* a partir de las proporciones de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en la sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEAc) y área Bayesiana de elipse estándar (SEAB) se encuentran presentadas como  $\%^2$ . Se indica la probabilidad bayesiana (P) de que la amplitud de nicho en invierno sea menor a la de verano.

	Invierno	Verano	<i>Wilks' λ</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	P
MANOVA						
<i>C. nigrofumosus</i>			0,79365	1,17	2, 9	0,3535
ANOVA						
$\delta^{13}\text{C}$ ( $\% \pm \text{SD}$ )	-14,999 $\pm$ 1,5	-14,964 $\pm$ 0,8		0,003	1, 10	0,960
$\delta^{15}\text{N}$ ( $\% \pm \text{SD}$ )	17,161 $\pm$ 0,5	17,804 $\pm$ 1,0		1,65	1, 10	0,228
SEA	1,161	1,782				
SEAc	1,549	2,138				
SEAB	2,106	2,372				0,617

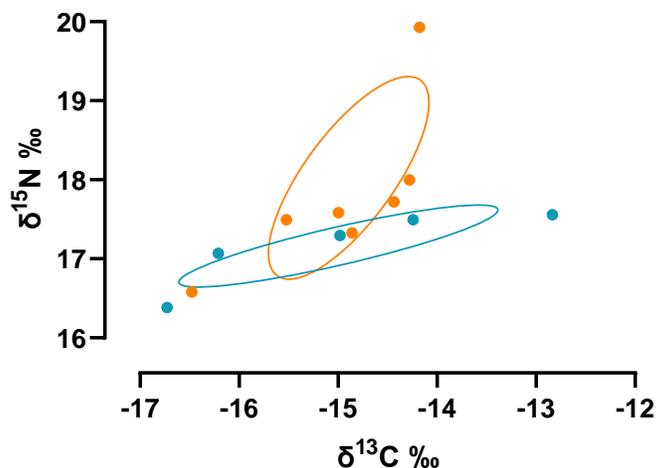


Figura 1. Elipses estándar (SEAc) obtenido del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno del tejido sanguíneo en *C. nigrofumosus* de invierno (azul) y verano (naranja) que habitan la zona centro de Chile.

*Composición isotópica en tejidos de C. oustaleti*

La composición isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^2\text{H}$ ) tanto de la sangre como de la pluma, obtenida para *C. oustaleti*, difiere significativamente (Tabla 2) entre ambos tejidos construidos en distintas épocas (i.e., sangre = invierno; plumas = verano). El área estándar de las elipses (SEAc y SEA, Figura 2) para cada tejido se presenta en la Tabla 2. El análisis de las elipses bayesianas (SEAB) mostró que no existe diferencia significativa entre la amplitud de nicho isotópico obtenido a partir del tejido sanguíneo respecto al obtenido a partir de las plumas. No hay superposición entre las elipses.

Tabla 2. Comparación intraespecífica de las diferentes métricas de la amplitud de nicho isotópico para *C. oustaleti* estimados a partir de la proporción de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) en muestras de pluma y sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEAc) y área Bayesiana de elipse estándar (SEAB) se encuentran presentadas como  $\%^2$ . Se indica la probabilidad (P) de que la amplitud de nicho en la época de muda (i.e. en pluma) sea menor a la de invierno (i.e. en sangre)

	<i>Sangre</i>	<i>Pluma</i>	<i>Wilks' λ</i>	<i>F</i>	<i>Df, e</i>	<i>P</i>
<b>MANOVA RM</b>						
Sangre x Pluma ( $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ )			<0,001	15914	4, 3	<0,001
<b>ANOVA RM</b>						
$\delta^{13}\text{C}$ ( $\% \pm \text{SE}$ )	-16,18 $\pm$ 0,57	-20,11 $\pm$ 0,66		15,903	1, 16	0,007
$\delta^{15}\text{N}$ ( $\% \pm \text{SE}$ )	16,17 $\pm$ 0,44	3,20 $\pm$ 0,66		331,82	1, 16	<0,001
$\delta^2\text{H}$ ( $\% \pm \text{SE}$ )	-65,23 $\pm$ 6,83	-104,75 $\pm$ 3,80		29,789	1, 14	<0,001
SEA	2,427	6,929				
SEAc	2,913	7,699				
SEAB	4,055	7,817				0,9095

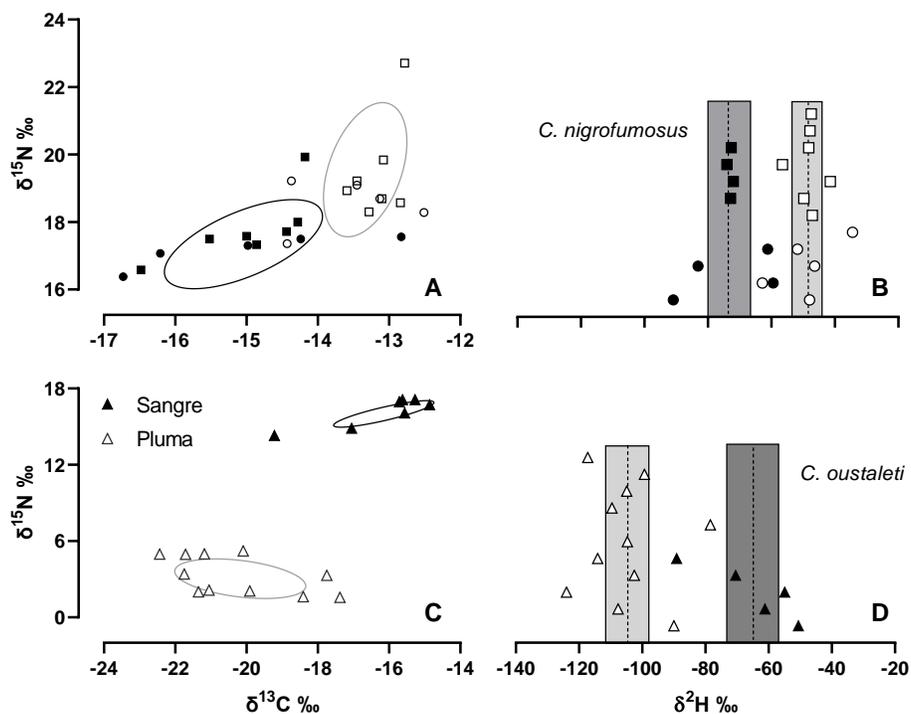


Figura 2. A) Elipse estándar (SEAc) obtenida del análisis de isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) del tejido sanguíneo (negro) y pluma (blanco) en *C. nigrofumosus* en invierno (círculos) y verano (cuadrados) que habitan la zona centro de Chile. B) Valores para un mismo individuo de  $\delta^2\text{H}$  en sangre y pluma en *C. nigrofumosus*. C) Elipses estándar (SEAc) obtenido del análisis  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  del tejido sanguíneo y pluma en *C. oustaleti* que habitan la zona costera central de Chile durante el invierno. D) Valores para un mismo individuo de  $\delta^2\text{H}$  en sangre y pluma de *C. oustaleti*. Líneas verticales discontinuas representan la media y las áreas sombreadas la desviación estándar de cada grupo de aves.

### *Comparación interespecífica en invierno*

No se encontraron diferencias significativas en las marcas isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , Tabla 3) del tejido sanguíneo de *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* en condición de simpatria durante el invierno (MANOVA: *Wilks's*  $\lambda = 0,750$ ,  $F_{(2, 9)} = 1,50$ ,  $p = 0,275$ ; ANOVA  $\delta^{13}\text{C}$ :  $F_{(1, 10)} = 1,77$ ,  $p = 0,213$ ; ANOVA  $\delta^{15}\text{N}$ :  $F_{(1, 10)} = 3,25$ ,  $p = 0,102$ ). Sin embargo, debido a que el análisis estacional previo realizado en la especie *C. nigrofumosus* no arrojó diferencias significativas para los centroides de las elipses (MANOVA; Tabla 1), se repitió el análisis incluyendo los datos de verano para el análisis interespecífico. Entonces, tras aumentar la robustez del análisis, se observaron diferencias significativas en la distribución de los centroides de las elipses en el plano y un aumento significativo de un 8% en la marca isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  para *C. nigrofumosus* (Tabla 3). El área de las elipses (SEAc y SEA) para cada especie se presentan en la tabla 3. El análisis bayesiano de las elipses mostró que existe un 73,8% de probabilidad de que la amplitud de nicho isotópico de *nigrofumosus* sea menor a la amplitud de nicho de *C. oustaleti* (Figura 3). La superposición de elipses fue de un 25,62%.

Tabla 3. Comparación interespecífica de las métricas de amplitud del nicho isotópico para *C. nigrofumosus* (invierno y verano) y *C. oustaleti* (invierno) a partir de las proporciones de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en la sangre. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar. Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña ( $\text{SEA}_C$ ) y área Bayesiana de elipse estándar ( $\text{SEA}_B$ ) se encuentran presentadas como  $\text{‰}^2$ . Se indica la probabilidad bayesiana (P) de que el área de *C. nigrofumosus* resultante de las extracciones posteriores de  $\text{SEA}_B$  sea menor a la de *C. oustaleti*.

	<i>C. nigrofumosus</i>	<i>C. oustaleti</i>	Wilks' $\lambda$	F	df	P
MANOVA						
<i>C. nigrofumosus</i> x <i>C. oustaleti</i>			0,6643	4,04	2, 16	0,038
ANOVA						
$\delta^{13}\text{C}$ ( $\text{‰} \pm \text{SD}$ )	-14,979 $\pm$ 1,1	-16,184 $\pm$ 1,5		4,01	1, 17	0,614
$\delta^{15}\text{N}$ ( $\text{‰} \pm \text{SD}$ )	17,537 $\pm$ 0,8	16,168 $\pm$ 1,1		8,54	1, 17	<0,01
SEA	2,498	2,428				
$\text{SEA}_C$	2,748	2,914				
$\text{SEA}_B$	2,843	4,032				0,738

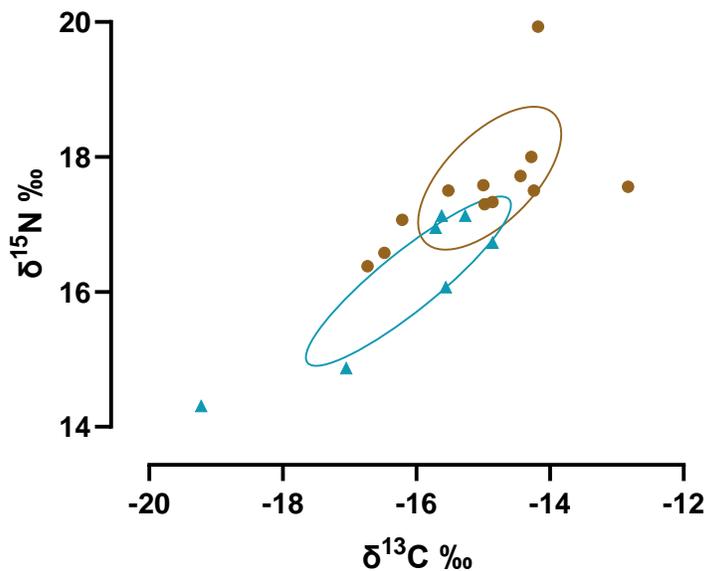


Figura 3. Elipses estándar (SEAc) obtenido del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno del tejido sanguíneo en *C. nigrofumosus* (café) y *C. oustaleti* (azul) que habitan la zona central de Chile en invierno.

#### *Composición y proporción del agua corporal*

Se estimó que  $F_M$  comprende entre un 20% y un 25% del presupuesto de agua corporal para ambas especies ( $\Delta^{17}O_{AC}$ ). Esta proporción no varió estacionalmente para *C. nigrofumosus* (ANOVA  $F_{(1,7)} = 3,091$ ,  $p = 0,122$ ) ni al comparar ambas especies en condición de simpatria (ANOVA  $F_{(1,12)} = 0,426$ ,  $p = 0,527$ ) (véase porcentaje en rojo; Figura 4). La composición del agua meteórica consumida ( $\delta^{18}O$ ) fue similar entre *C. nigrofumosus* de invierno (-6,48‰) y verano (-8,08‰) (ANOVA  $F_{(1,7)} = 1,971$ ,  $p = 0,203$ ). El agua consumida por *C. oustaleti* tuvo un valor promedio de  $\delta^{18}O$  (-9,72‰) un 33% menor en comparación a *C. nigrofumosus* de invierno (ANOVA  $F_{(1,12)} = 4,677$ ,  $p = 0,050$ ) (Figura 4). Utilizando todo el conjunto de datos (i.e. ambas especies y estaciones) fue posible encontrar una correlación positiva y significativa entre  $\delta^{18}O$  y  $\delta^{15}N$  en sangre ( $r^2 = 0,269$ ,  $p = 0,048$ ). Sin embargo, al separar por cada especie, sólo *C. oustaleti* se observó una correlación significativa ( $r^2 = 0,714$ ,  $p = 0,034$ ) (Figura 5a). Paralelamente se observó una correlación negativa y significativa entre  $F_M$  y  $\delta^{15}N$  en sangre para ambas especies y estaciones ( $r^2 = 0,268$ ,  $p = 0,0483$ ), sin embargo, al excluir a *C. nigrofumosus* la correlación no fue más estrecha ( $r^2 = 0,439$ ,  $p = 0,1518$ ) (Figura 5b).

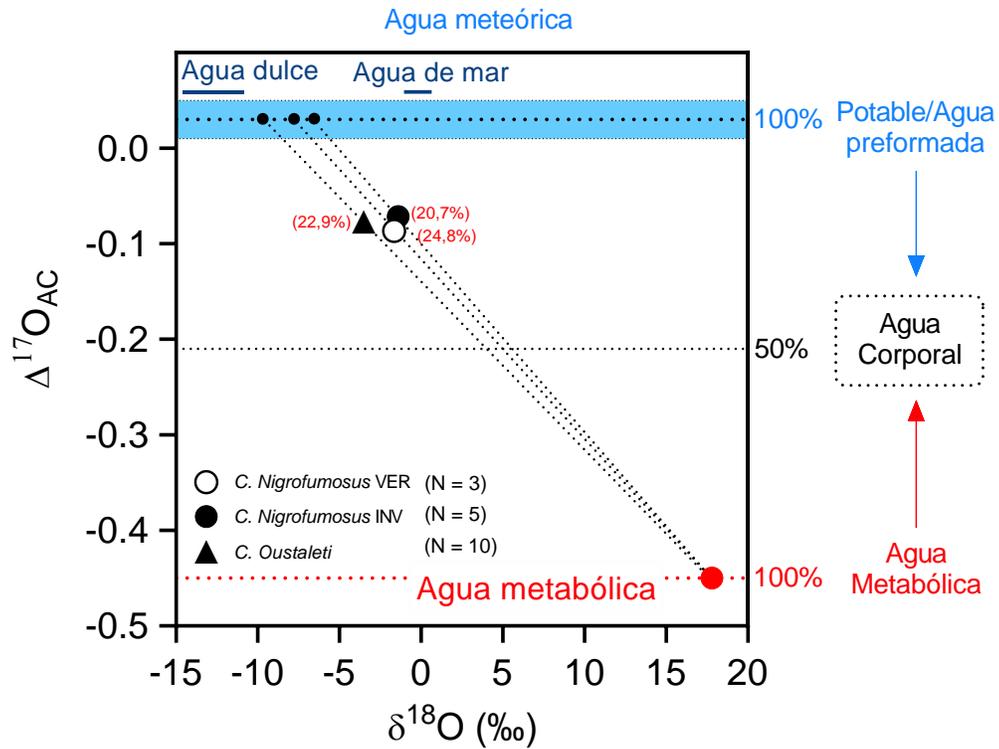


Figura 4. Valores promedio de  $\Delta^{17}\text{O}$  (eje y) y valores promedio de  $\delta^{18}\text{O}$  (eje x) del agua corporal usados para estimar el valor  $\delta^{18}\text{O}$  del agua preformada de *Cinclodes silvestres*. Los rangos de valores de  $\delta^{18}\text{O}$  para el agua potable y el agua de mar se muestran como barras sólidas en la parte superior del rango para las aguas meteóricas (área discontinua azul). Las líneas negras punteadas representan las soluciones de la ecuación 2 para cada grupo de aves. En rojo se presenta la contribución fraccional ( $F_M$ ) del agua metabólica al presupuesto total de agua.

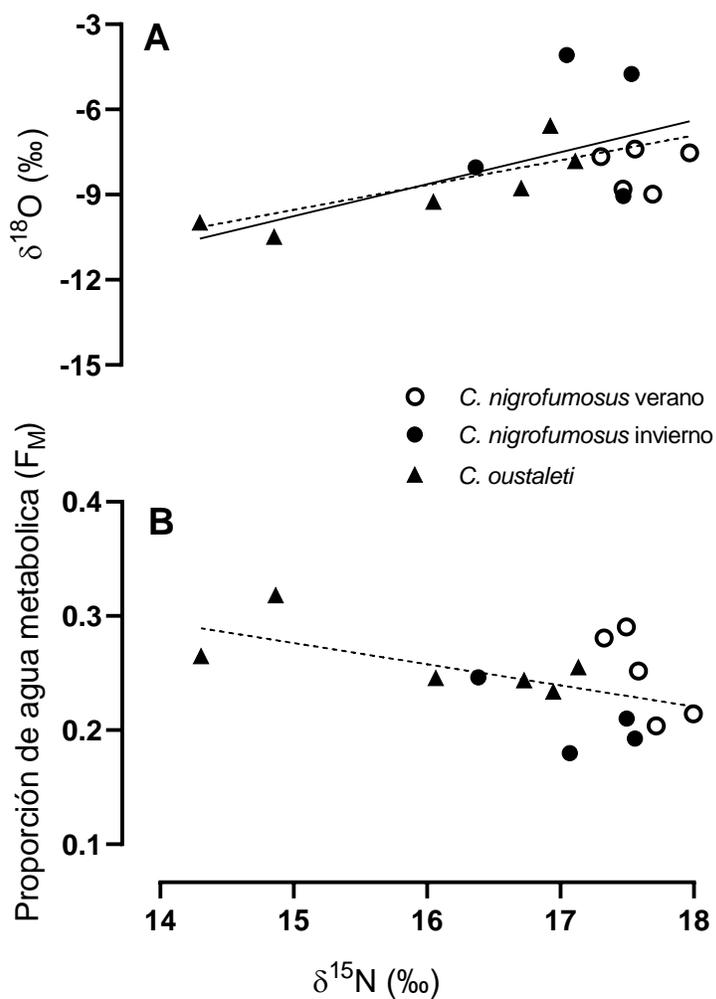


Figura 5. A) Correlación positiva y significativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  de una muestra de sangre para las dos especies de *Cinclodes* pertenecientes al litoral de Chile central. B) Correlación negativa y significativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y la contribución de agua metabólica ( $F_M$ ) al presupuesto hídrico en dos especies de *Cinclodes*. En ambos paneles, la línea punteada representa el ajuste significativo para ambas especies, mientras que la línea sólida representa el ajuste significativo sólo para *C. oustaleti*.

### *Efecto de la estacionalidad sobre la fisiología de C. nigrofumosus*

La mb de *Cinclodes nigrofumosus* no cambió significativamente entre estaciones (ANOVA  $F_{(1, 14)} = 1,48$ ;  $p = 0,243$ , tabla 4). El  $\log$  TMB y  $\log$  mb se relacionaron positiva y significativamente entre si ( $F_{(1, 14)} = 6,51$ ;  $r^2 = 0,317$ ,  $p = 0,023$ ). La TMB (ANOVA  $F_{(1, 14)} = 9,20$ ;  $p = 0,009$ ) y  $\log$  TMB ajustada con la masa como covariado (TMBm) (ANCOVA  $F_{(1, 13)} = 5,46$ ;  $p = 0,036$ ) incrementaron un 22,1% y un 3,3% respectivamente en el verano (tabla 4). No hubo efecto de la interacción entre  $\log$  mb y la estación (GLM  $F_{(1, 12)} = 1,01$ ;  $p = 0,334$ ).

Respecto a la evaporación de agua, la regresión lineal, mostró una falta de relación entre  $\log$  PTAE y  $\log$  mb ( $F_{(1, 14)} < 0,001$ ;  $r^2 < 0,001$   $p = 0,979$ ). La pérdida total de agua evaporativa (PTAE) (ANOVA  $F_{(1, 14)} = 5,548$ ;  $p = 0,034$ ) y  $\log$  PTAE con la mb como covariado (PTAEm) (ANCOVA  $F_{(1,13)} = 7,02$ ;  $p = 0,019$ ) incrementaron un 31,8% y un 7,42% en verano. No hubo efecto de la interacción entre  $\log$  mb y la estación (GLM  $F_{(1, 12)} = 1,33$ ;  $p = 0,271$ ). El balance hídrico ( $A_M/PTAE$ ) no mostró diferencias significativas entre estaciones (ANOVA  $F_{(1, 14)} = 1,84$ ;  $p = 0,196$ ). La regresión lineal reveló una relación positiva y significativa entre PTAE y TMB ( $r^2 = 0,249$ ;  $p = 0,049$ ). No se encontró una diferencia significativa en RPTAE (ANOVA  $F_{(1, 14)} = 0,41$ ;  $p = 0,532$ ). La C aumentó 7,2 cal h °C<sup>-1</sup> en verano (ANOVA:  $F_{(1, 14)} = 6,16$ ;  $p = 0,026$ ).

Respecto a las variables bioquímicas, no se observó efecto significativo de la estación sobre la actividad (U/mg prot<sup>-1</sup>) de la enzima metabólica COX (ANOVA  $F_{(1,10)} = 1,14$ ;  $p = 0,310$ ). La regresión lineal entre la mb y la actividad enzimática de COX mostró una tendencia negativa, pero no significativa ( $F_{(1, 10)} = 0,393$ ;  $p = 0,545$ ). El nivel de daño oxidativo (TBARS) en plasma fue un 16,74% menor en invierno en comparación a las aves de verano ( $F_{(1,10)} = 10,086$ ;  $p = 0,010$ ). Por su parte, la capacidad antioxidante en plasma (TAC) no mostró diferencias entre estaciones ( $F_{(1,8)} = 0,101$ ;  $p = 0,758$ ). El análisis de correlación arrojó una correlación positiva y marginalmente

significativa entre TBARS y TMB ( $r = 0,571$ ;  $p = 0,052$ ).

#### *Comparación interespecífica de Cinclodes*

Como se ha descrito, ambas especies de *Cinclodes* capturadas en invierno difieren significativamente en la mb (ANOVA  $F_{(1,18)} = 509,1$ ;  $p < 0,001$ ) y en la TMB (ANOVA  $F_{(1, 18)} = 58,21$ ;  $p < 0,001$ ), en ambos casos fue mayor en *C. nigrofumosus* en comparación con *C. oustaleti* (véase tabla 4). Se realizó un GLM con el  $\log$  mb como covariado y la especie como factor fijo para comparar  $\log$  TMB entre las dos especies y no se encontró un efecto significativo de la interacción entre  $\log$  mb y la especie (GLM  $F_{(1,16)} = 0,252$ ;  $p = 0,623$ ) ni efecto significativo de la especie sobre  $\log$  TMB con la mb como covariable (TMBm; ANCOVA  $F_{(1, 17)} = 0,019$ ;  $p = 0,891$ ). Misma tendencia siguió la PTAE, que fue un 55,5% mayor en *C. nigrofumosus* (ANOVA  $F_{(1,18)} = 16,60$ ;  $p = 0,001$ ). No se encontró un efecto significativo de la interacción entre el  $\log$  mb y la especie (GLM  $F_{(1,16)} = 0,002$ ;  $p = 0,963$ ) ni de la especie sobre el  $\log$  PTAE con la mb como covariado (PTAEm; ANCOVA  $F_{(1, 17)} = 1,53$ ;  $p = 0,232$ ).

El metabolismo observado en *C. nigrofumosus* fue significativamente mayor en relación con el promedio esperado según Tieleman (2002) para passeriformes de zonas áridas y mésicas (invierno: árido,  $p = 0,001$ ; mésico:  $p = 0,03$  y verano: árido;  $p < 0,001$ ; mésico:  $p = 0,003$ ). Sin embargo, los valores esperados para *C. oustaleti* (invierno) fueron similares con el promedio observado para zonas áridas ( $p = 0,075$ ) y mésicas ( $p = 0,762$ ). La PTAE esperada fue estadísticamente menor a la observada en *C. nigrofumosus* de invierno ( $p = 0,028$ ) y verano ( $p = 0,003$ ) para el ajuste de zonas áridas y la ecuación descrita para zonas mésicas predijo correctamente los valores observados para esta especie en invierno y verano, ( $p = 0,92$  y  $p = 0,325$ , respectivamente). Paralelamente, *C. oustaleti* arrojó un promedio similar al que entregó el ajuste alométrico teórico para zonas áridas y mésicas ( $p = 0,386$  y  $p = 0,426$ , respectivamente) (figura 6).

La C fue  $14,8 \text{ cal h } ^\circ\text{C}^{-1}$  significativamente mayor en *C. nigrofumosus* respecto de *C. oustaleti*

(ANOVA  $F_{(1,18)} = 50,14$ ;  $p < 0,001$ ). La razón entre la  $A_M$  y la PTAE ( $A_M/PTAE$ ) fue similar entre ambas especies (ANOVA  $F_{(1,18)} = 0,671$ ;  $p = 0,424$ ). Por último, el análisis del conjunto de datos de invierno mediante una regresión lineal mostró una correlación positiva y significativa entre  $\log$  TMB y  $\log$  PTAE ( $r^2 = 0,535$ ,  $p < 0,001$ ), sin embargo, no se encontró una diferencia significativa en RPTAE entre ambas especies ( $F_{(1,18)} = 0,055$ ,  $p = 0,818$ ).

Respecto a las variables bioquímicas, no hay efecto de la especie sobre la actividad (U/mg prot<sup>-1</sup>) de COX (ANOVA  $F_{(1,14)} = 0,273$ ,  $p = 0,610$ ). A pesar de que el promedio del valor del daño oxidativo (TBARS) en plasma fue aproximadamente un 3,6% mayor para la *C. oustaleti*, esta diferencia no es significativa ( $U = 21,0$ ,  $p = 0,496$ ). La capacidad antioxidante en plasma (TAC) no mostró diferencias entre estaciones ( $U = 11$ ,  $p < 0,712$ ).

Tabla 4. Promedios ( $\pm$  DS) de las mediciones fisiológicas y bioquímicas de *C. nigrofumosus* en verano e invierno y para *C. oustaleti* de invierno. Diferencias significativas entre estaciones se marcan con letras; diferencias entre especies con asteriscos (ver texto para detalles y significancia estadística).

	<i>Verano</i>	<i>Invierno</i>	<i>Invierno</i>
	<i>C. nigrofumosus</i>	<i>C. nigrofumosus</i>	<i>C. oustaleti</i>
n	7	9	11
TMB (mL O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> )	179,60 $\pm$ 18,16 <sup>a</sup>	145,28 $\pm$ 25,2 <sup>b*</sup>	66,15 $\pm$ 21,23 *
TMBm (mL O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	2,44 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	2,06 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	2,60 $\pm$ 0,89
PTAE (mg H <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> )	363,89 $\pm$ 72,3 <sup>a</sup>	255,76 $\pm$ 102,9 <sup>b*</sup>	113,94 $\pm$ 48,1 *
PTAEm (mg H <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	4,97 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	3,67 $\pm$ 1,55 <sup>b</sup>	4,50 $\pm$ 2,03
C (cal h °C <sup>-1</sup> )	39,40 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	32,20 $\pm$ 5,32 <sup>b*</sup>	17,44 $\pm$ 4,02 *
A <sub>M</sub> (mg H <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> )	101,83 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>	82,38 $\pm$ 14,3 <sup>b*</sup>	37,51 $\pm$ 12,04 *
A <sub>M</sub> /PTAE	0,28 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,12
RPTAE (mg H <sub>2</sub> O mL O <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	2,04 $\pm$ 0,43	1,77 $\pm$ 0,62	1,76 $\pm$ 0,61
COX (U/mg prot <sup>-1</sup> )	0,29 $\pm$ 0,23	0,43 $\pm$ 0,20	0,49 $\pm$ 0,21
Masa corporal (g)	73,67 $\pm$ 2,64	70,54 $\pm$ 6,3 *	25,55 $\pm$ 1,81 *

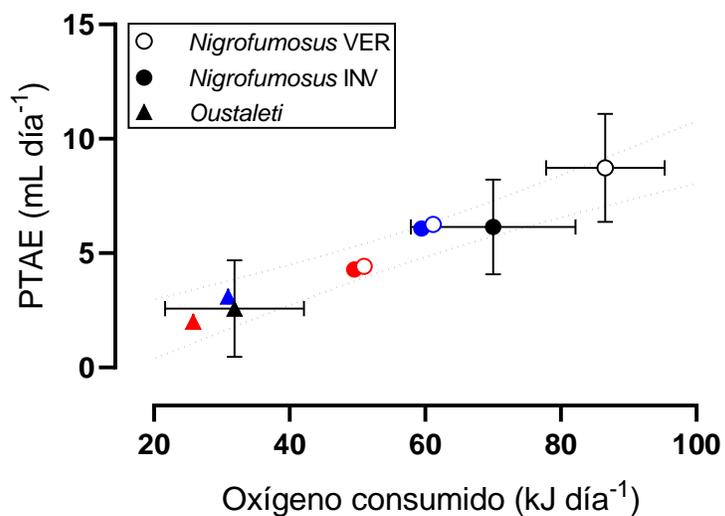


Figura 6. Promedios  $\pm$  desviación estándar de la pérdida total de agua por evaporación y consumo de oxígeno total para *C. oustaleti* y *C. nigrofumosus* de invierno y verano. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza al 95% de la regresión lineal para todo el grupo. En color rojo y azul se muestran los valores esperados según Williams & Tieleman (2002) para paseriformes de zonas áridas y méxicas respectivamente.

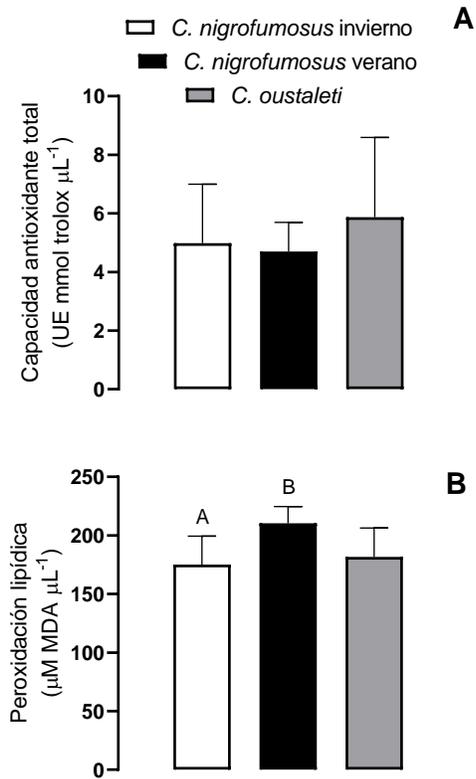


Figura 7. a) capacidad antioxidante total (TAC) y b) Peroxidación lipídica (TBARS) en el plasma de *C. oustaleti* y *C. nigrofumosus* en invierno y verano; barras de error representan desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos (ver texto para detalles).

## DISCUSIÓN

El análisis de la composición isotópica de carbono y nitrógeno ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en pluma y sangre, permitió caracterizar el uso de recursos (marinos y/o terrestres) y la amplitud del nicho isotópico en ambas especies de *Cinclodes*. Paralelamente, el análisis de la marca de  $\delta^2\text{H}$  en dos tejidos, permitió estudiar los patrones de migración altitudinal de individuos de *C. oustaleti* pertenecientes a la zona central de Chile (Schoeninger & DeNiro 1984; Hobson 1987, Hobson 2008). Además, mediante el análisis de isótopos estables de oxígeno ( $\Delta^{17}\text{O}$  y  $\delta^{18}\text{O}$ ) en el plasma sanguíneo, se estimó la proporción de agua metabólica en el cuerpo y la variabilidad en el uso de diferentes fuentes de agua; preformada e ingerida en alimentos, proveniente del mar y/o dulce. Luego, esta información se utilizó para estudiar la relación entre el uso de recursos marinos y variables fisiológicas tales como la tasa metabólica, la evaporación de agua, actividad de enzimas metabólicas en eritrocitos, capacidad antioxidante y peroxidación lipídica en plasma de aves en terreno (Tapia-Monsalve et al., 2018). La metodología de estos análisis ha sido aplicada por separado con éxito en numerosos estudios ecofisiológicos en *Cinclodes* (Sabat & Martínez del Río 2002, Martínez del Río et al., 2009, Newsome et al. 2015), sin embargo, esta es la primera vez que se utiliza el análisis de isótopos integrando el nicho trófico, movimientos migratorios y la composición del agua corporal en relación con la potencial variación en el uso de recursos y las consecuencias fisiológicas en *Cinclodes* de vida libre.

### *Uso de recursos en Cinclodes*

El nicho isotópico de *C. nigrofumosus* construido con los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  mostró una falta de variación en  $\text{SEA}_B$  (utilizada como una variable *proxy* de la amplitud de nicho trófico) y, además, estos valores de amplitud de nicho fueron similares a los observados en *C. oustaleti* de invierno (figura 1 y 3). Paralelamente, observando los valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en tejido sanguíneo (Tabla 1), se sugiere que *C. nigrofumosus* consume recursos tróficos similares entre estaciones y coinciden con la posición trófica reportada de consumidor secundario de pequeños moluscos y crustáceos dentro de la red trófica intermareal (ver Sabat, 2000., Sabat et al., 2006a, Martínez del Río et al., 2009). Sin embargo, este patrón contrasta con las predicciones iniciales, en el sentido que durante la estación seca (i.e., verano) las aves debieran aumentar la amplitud del nicho trófico consumiendo más recursos marinos, tal como ha sido descrito para la variación geográfica en el uso de recursos, en función de la disponibilidad ambiental (Sabat & Martínez del Río, 2002).

Por otro lado, los valores de  $\delta^2\text{H}$  en sangre y pluma sugieren apoyan el dato ecológico que *C. nigrofumosus* es una especie residente de la costa (no migrante) y la variación observada entre tejidos (cercana a un 25‰; véase Figura 2A, 2B) probablemente sea producto del distinto fraccionamiento isotópico ocurrido durante la biosíntesis de los diferentes tejidos, más que por causas ecológicas (Wolf et al., 2012). Es relevante destacar que el valor más negativo en sangre, en comparación a la pluma, es muy consistente con la variación reportada en aves, pero con otras magnitudes (Newsome et al., 2015, Poblete et al. 2018). Por el contrario, dada la composición isotópica de  $\delta^2\text{H}$  observada en plumas y sangre de *C. oustaleti*, es posible sugerir que esta especie sí presenta movimientos migratorios. Además, *C. oustaleti* presentó un incremento significativo en el consumo de recursos marinos en invierno (Tabla 2) y los valores de composición isotópica observados coinciden con los reportados para la misma especie por Martínez del Río et al. (2009). Además, la separación entre los centroides de las elipses (MANOVA, Tabla 2) de los nichos

isotópicos contruidos con las plumas (verano) y la sangre (invierno) para *C. oustaleti* (Figura 2C) sugiere que esta especie puede ser considerada como generalista isotópica (sensu Martínez del Río et al. 2009) y como tal, es capaz de variar la composición de la dieta durante el año y ocupar un amplio rango de altitud (~2500 m) (Figura 2D) (Newsome et al., 2015).

Se ha reportado que ambas especies habitan la costa chilena durante el invierno (Sabat et al., 2006a). Estudios de ecología trófica en esos sitios, han descrito una mayor presencia de presas marinas en *C. nigrofumosus* en comparación con el contenido estomacal de *C. oustaleti*, con un alto porcentaje de insectos terrestres para *C. oustaleti* y un aporte similar de moluscos a la dieta para ambas especies (Sabat et al., 2006a). Sin embargo, dada la falta de variación estacional en *C. nigrofumosus* (Tabla 1), fue posible integrar las marcas isotópicas provenientes de los individuos de *C. nigrofumosus* capturados en invierno y verano. Así, este análisis confirmó un mayor enriquecimiento de  $\delta^{15}\text{N}$  para *C. nigrofumosus*, y una diferencia significativa entre los centroides de las elipses de ambas especies (Figura 3). El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  y de la amplitud de nicho isotópico ( $\text{SEA}_B$ ) no cambiaron significativamente entre especies (Tabla 3) y los valores isotópicos promedios, levemente más empobrecido en  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C} = -16,8 \text{ ‰}$ ) en comparación a lo descrito en literatura (cercano a  $-14 \text{ ‰}$ ; Tapia-Monsalve et al., 2018, Martínez del Río et al., 2009), sugieren que *C. oustaleti* incluyen en su dieta una considerable proporción de invertebrados terrestres durante el invierno, probablemente producto de su condición de especie generalista que se ve reflejada en una variación significativa de su dieta (Martínez del Río et al., 2009).

Dada la clara preferencia por recursos marinos en ambas especies durante invierno, en principio se esperaba que ambas especies de *Cinclodes* tuvieran una marca isotópica de  $\delta^{18}\text{O}_A$  más cercana a  $0 \text{ ‰}$ , como el encontrado en el agua de mar. Sin embargo, se observaron valores más cercanos al  $-11 \text{ ‰}$ , consistente con los valores del agua dulce de las precipitaciones en Chile central (Iriarte et al., 2004). Este hallazgo difiere de lo descrito, para una localidad de Chile ubicada 200 km hacia el norte, donde se obtuvo una estimación de la marca isotópica del agua ingerida de entre  $0,2 \text{ ‰}$  y

-1,4‰ para *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* respectivamente (Sabat et al., 2021). Esta diferencia podría deberse a que en la localidad más nortina la productividad primaria podría ser menor, lo que llevaría a una mayor proporción de presas marinas aumentando la ingesta de agua marina (Sabat et al. 2006b). En este sentido, la correlación positiva encontrada entre  $\delta^{15}\text{N}$  de los tejidos y  $\delta^{18}\text{O}$  del plasma sanguíneo (figura 5a) apoyan la hipótesis que la incorporación de agua marina no necesariamente obedece al agua bebida, sino que probablemente al agua preformada que se encuentra en los tejidos de las presas que habitan el intermareal árido (Sabat et al., 2021). Futuros estudios que incluyan la evaluación de la composición de agua corporal en un gradiente de aridez y de disponibilidad de agua dulce, son cruciales para establecer la importancia relativa de los factores ecológicos (uso de recursos) y ambientales (temperatura y/o humedad) que influyen sobre el presupuesto de agua en *Cinclodes*.

#### *Ajustes fisiológicos asociados al uso de recursos*

Las aves que comúnmente beben agua de mar (e.g., aves marinas) tienen la capacidad de excretar un fluido concentrado ( $\gg 1000$  mOsm/Kg) mediante la glándula de la sal, (Gutiérrez et al., 2012), sin embargo, para las aves passeriformes la ocupación de ambientes marinos ocurre de manera muy ocasional (Shoemaker 1972, Goldstein & Skadhauge 2000, Sabat & Martínez del Río 2002). Con el objetivo de conocer los costos potenciales que enfrentan ambas especies de *Cinclodes* por habitar el intermareal y determinar los ajustes fisiológicos que estas aves exhiben, a continuación, se discuten los cambios observados sobre la TMB, evaporación de agua y  $A_M$  entre estaciones para *C. nigrofumosus* y las diferencias con *C. oustaleti* durante el invierno en la costa de Chile central. Además, se discuten las consecuencias sobre el metabolismo celular en eritrocitos y el balance oxidativo en el plasma sanguíneo.

Estudios recientes en paseriformes han descrito que el consumo de agua con una carga de sales moderada (ca. 40% el agua de mar) tiende a incrementar la osmolalidad de la orina y la TMB, mientras que la exposición a una deshidratación aguda podría reducir significativamente la masa corporal (Peña-Villalobos et al., 2014, Sabat et al., 2017, Navarrete et al., 2021). Otro factor que puede modificar las tasas de gasto energético es la temperatura ambiental. Por ejemplo, se ha descrito en *Z. capensis* que la exposición a bajas temperaturas (bajo la T° crítica inferior) en condiciones controladas de laboratorio, provoca un incremento de la TMB producto de la demanda en la producción de calor, mientras que, en vida libre estas aves no presentaron cambios estacionales significativos en la TMB (Maldonado et al., 2009). Curiosamente, no existe un patrón único en el efecto de la temperatura ambiental sobre la TMB, pues existen aves paseriformes subtropicales que han adaptado su metabolismo masa específico, reduciéndolo durante el invierno y favoreciendo la conservación de energía y/o agua en lugar de la producción de calor (Smit & McKechnie 2010). En particular, los ajustes observados en *Cinclodes* no siguen la tendencia vista en otros paseriformes, de hecho, el promedio de la mb de *C. nigrofumosus* no varió entre estaciones y fue relativamente menor a los valores descritos por Sabat & Martínez del Río (2005) para la misma localidad, mientras que la TMB y PTAE observadas en *C. nigrofumosus* fueron un 19,11% y un 29,72% menor en invierno en relación con las aves de verano respectivamente. La disminución de un 18,3% en la C de invierno sugiere que las aves podrían modificar la capacidad de perder calor por la necesidad de conservar energía durante el invierno, magnitud similar a la documentada en Novoa et al., (1994), para el paseriforme *Z. capensis* en ambas estaciones.

Considerando que las campañas de muestreo para la época estival comenzaron en el mes de noviembre, posiblemente exista influencia de la temporada reproductiva sobre la tasa de gasto energético y de evaporación de agua. De hecho, se encuentra ampliamente descrito que algunas conductas reproductivas en aves, como la construcción del nido, el cortejo y el apareamiento, así como los mecanismos subyacentes a la producción de huevos y el cuidado parental son rasgos

costosos de mantener y, por lo tanto, podrían afectar significativamente al presupuesto energético y al balance oxidativo de las aves (Wiersma et al., 2004, Mainwaring & Hartley 2013, Williams 2018).

A pesar de que una parte del incremento en TMB pueda ser explicado por la temporada reproductiva, tal incremento metabólico también puede ser considerado como una respuesta adaptativa que permitiría aumentar la producción de agua metabólica ( $A_M$ ) (Whiteman et al., 2019). Esta hipótesis puede ser controversial, ya que por un lado se ha descrito que  $A_M$  por sí sola, sería incapaz de suplir los requerimientos hídricos de la mayoría de los endotermos (McNab, 2002). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que algunas aves granívoras de ambientes áridos podrían mantener el presupuesto hídrico estable dependiendo exclusivamente de la  $A_M$  bajo situaciones ambientales particulares (e.g., a bajas temperaturas, MacMillen 1990). Recientemente se documentó que el passeriforme *Z. capensis* aclimatado a 15°C aumentó aproximadamente un 24% su tasa metabólica en comparación con aquellas aves aclimatadas a 30°C, y concomitante con el aumento metabólico, la producción de agua también incrementó llegando a contribuir aproximadamente con un 22,8% al presupuesto de agua corporal total, en comparación al aporte de las aves a 30°C que fue de un 14% (Sabat et al. 2021). A pesar de que estas estimaciones corresponden para aves en cautiverio y que los mecanismos que conducen el aumento del metabolismo son distintos a los observados en aves de vida libre, tales experimentos pueden entregar una referencia de la plasticidad que pueden presentar tales rasgos en passeriformes. Por otro lado, nuestros resultados también pueden ser comparados con los ajustes fisiológicos descritos en Tieleman & Williams (2000), que mediante la utilización de la técnica de agua doblemente marcada (DLW) determinaron que aves de ambientes desérticos tienen menor TMB y menor tasa metabólica de campo en comparación a los de hábitats mésicos. Dada esta reducción en las tasas de gasto energético, las aves desérticas mantendrían un menor flujo hídrico en comparación a las aves no desérticas. Pareciera que un ambiente desértico favorece la conservación de agua y energía durante períodos cálidos en lugar de aumentar la producción de agua metabólica mediante el incremento metabólico.

Respecto a  $F_M$  en *Cinclodes* (Figura 4), los resultados del análisis de tres isotopos de oxígeno ( $\Delta^{17}O$ ) revelaron que la contribución de agua metabólica al presupuesto de agua total en *C. nigrofumosus* (invierno: 20,7%; verano: 24,8%), se acercan a lo documentado anteriormente para esta misma especie (27,7%), mientras que para *C. oustaleti*, el aporte estimado de agua metabólica fue de un 22.9% y coincide con la estimación (23%) documentada previamente (Sabat et al., 2021). Otros estudios en diamantes (*Taeniopygia guttata*), determinaron que la  $A_M$  supliría el 20% de la demanda de agua durante períodos cálidos y el 32% en los días fríos (Cooper et al., 2019), lo que es consistente con lo encontrado en las especies de *Cinclodes*.

Finalmente, existe un probable efecto del tipo de sustrato utilizado para el metabolismo aeróbico que influye sobre la  $A_M$ . Por ejemplo, el catabolismo de grasa corporal puede aumentar el rendimiento del agua metabólica por unidad de masa, pero el balance de producción de agua en función del calor producido disminuye. Paralelamente, estudios en gorriones (*Passer domesticus*) han sugerido que el catabolismo de proteínas durante la deshidratación podría favorecer la liberación de moléculas de agua preformadas que se encuentran unidas al tejido proteico (Gerson & Guglielmo, 2001, Giulivi & Ramsey, 2015). Considerando que *Cinclodes* consume preferentemente una dieta compuesta de invertebrados, es posible proponer que esta ave metaboliza preferentemente proteína para suplir sus requerimientos energéticos, y probablemente el catabolismo de proteína sea el responsable del porcentaje de  $F_M$ .

La correlación negativa entre  $F_M$  y  $\delta^{15}N$  (figura 5b) probablemente se debe a que los individuos más grandes (i.e., *C. nigrofumosus*) tuvieron un mayor enriquecimiento de  $\delta^{15}N$  (tabla 3) y con menor tasa metabólica masa-específica y, por lo tanto, una menor proporción de agua metabólica en el presupuesto total de agua en comparación a *C. oustaleti* de menor tamaño. Estos resultados concuerdan en parte con las estimaciones obtenidas con el modelo  $A_M/PTAE$  que predijeron una proporción entre un 28% y un 33% (véase tabla 4) de agua producida en relación con agua evaporada. Si bien ambas aproximaciones son útiles para determinar el balance hídrico de las aves,

el análisis isotópico permite estimar  $F_M$  en terreno, mientras que el cociente  $A_M/PTAE$  refleja el balance hídrico bajo las condiciones particulares y controladas en el laboratorio. No obstante, los resultados indican que ambas especies de aves podrían estar reduciendo la necesidad de conservación y/o la dependencia de agua preformada y que, para el caso de *C. nigrofumosus* en particular, esta necesidad cambiaría estacionalmente.

Es conocido que las tasas fisiológicas (e.g., TMB, PTAE) siguen relaciones alométricas predecibles (véase por ejemplo McNab 2002), de modo que era esperable que la especie migratoria *C. oustaleti* -significativamente más pequeña- presentara una tendencia a una mayor TMBm, PTAE y RPTAE que *C. nigrofumosus* de invierno, sin embargo, éstas no cambiaron significativamente entre especies (véase Tapia-Monsalve et al., 2018 y Sabat et al., 2004). Para determinar si las tasas fisiológicas observadas en ambas especies se ajustan a las estimaciones para aves del desierto o a las aves de zonas méxicas, se utilizó la masa corporal observada para estimar un valor de TMB y PTAE en base a un modelo alométrico descrito por Tieleman (2002) para aves de zonas áridas y méxicas (Figura 6). Considerando que el hábitat marino puede ser comparable a un desierto desde el punto de vista fisiológico (Sabat, 2000), se esperaba que el ajuste más cercano fuera el de zonas áridas, sin embargo, los valores obtenidos de TMB y PTAE para *C. oustaleti* en particular, fueron estadísticamente similares a lo predicho por las ecuaciones alométricas para ambas zonas. Por otro lado, la TMB observada en *C. nigrofumosus* de verano fue distinta a los valores predichos por ambas ecuaciones y para ambas estaciones estudiadas, mientras que la PTAE predicha para las aves de zonas méxicas fue la más similar a lo encontrado en *C. nigrofumosus* de invierno.

El gasto metabólico en las aves depende del tamaño de los órganos internos y de la actividad de los tejidos metabólicamente activos, incluyendo la sangre (Daan et al., 1990, Vézina & Williams 2005, Stier et al., 2013). Un aumento en la intensidad metabólica puede deberse a cambios en la densidad mitocondrial o directamente por un aumento de la actividad de enzimas metabólicas (e.g. COX o CS) que se encuentran en la mitocondria. En respuesta al estrés osmótico (e.g. deshidratación,

consumo de sales) y ante cambios en la osmolalidad del plasma las células sanguíneas tienden a encogerse y los eritrocitos deben mantener constante el volumen celular, esto lo llevan a cabo mediante mecanismos de regulación de iónica (Hoffmann et al., 2009, Gerson & Guglielmo, 2011). Las aves cuentan con mitocondrias funcionales en sus eritrocitos, y sus enzimas podrían proveer energía inmediata para las proteínas transportadoras de iones (Moritz et al., 1997, Stier et al., 2013). En particular, se esperaba que *C. nigrofumosus* de verano tuviera un mayor consumo de sal y que se viera reflejado en una mayor actividad de COX en comparación a las aves de invierno, sin embargo, no hubo diferencias significativas en la actividad enzimática entre estaciones. Probablemente, se deba a que los individuos están consumiendo recursos con similar carga salina en ambas épocas estudiadas, por lo tanto, no sería posible visualizar el costo de la mantención del volumen celular o del balance iónico entre los eritrocitos y el plasma (Hunter & Hunter, 1957, Hoffmann et al., 2009). Paralelamente y de acuerdo con lo esperado, el promedio de la actividad enzimática en *C. oustaleti*, pareciera ser mayor ( $p > 0,05$ ) que en *C. nigrofumosus*, principalmente por ser esta última una especie de mayor tamaño y presentar menor metabolismo masa-específico. Se ha descrito que un incremento metabólico aumenta la producción de radicales libres ROS, como subproducto de la formación de ATP (Costantini & Verhulst, 2009, Srinivasan y Avadhani, 2012) y, en consecuencia, podría aumentar el daño oxidativo en algunos tejidos y/o membranas celulares. Esto es consistente con el aumento en la concentración de malondialdehído por peroxidación lipídica (TBARS) en el plasma de *C. nigrofumosus* en verano. Junto con ello, la similitud en la capacidad antioxidante (TAC) entre ambas estaciones, sugiere que *C. nigrofumosus* estaría expuesto a mayores niveles de ROS durante la época estival que no son capaces de compensar. Curiosamente, el aumento en TBARS no se vio acompañado de un aumento en la intensidad metabólica (COX) en las mitocondrias del tejido sanguíneo. Este resultado concuerda parcialmente con lo esperado, en base a estudios recientes en laboratorio que han documentado una falta de variación en la capacidad antioxidante y el daño oxidativo en plasma del passeriforme *Z. capensis* aclimatado al consumo de agua salada por 30 días (Sabat et al., 2017). A diferencia de la mayoría de los passeriformes, algunas

especies del género *Cinclodes* se han especializado en habitar ambientes salinos cubriendo el costo oxidativo que esto implica, y en particular para este género, se ha reportado una asociación negativa entre el nivel de antioxidantes (TAC) en plasma y el consumo de presas marinas. Sin embargo, la falta de correlación entre TAC y  $\delta^{13}\text{C}$  ( $r = -0,309$ ;  $p = 0,227$ ) no apoyarían esta asociación descrita anteriormente (Tapia-Monsalve et al., 2018). Por el contrario, la correlación positiva entre TBARS y TMB observada en *C. nigrofumosus* (Figura 7) apoyaría la existencia de una relación funcional entre el incremento metabólico y el estado oxidativo (Williams et al., 2010). Estudios anteriores han informado resultados antagónicos respecto a la asociación funcional entre la tasa metabólica y la producción de ROS en condiciones controladas de laboratorio y desafortunadamente no existe un consenso sobre lo que ocurre en endotermos (Hermes-Lima & Storey, 1998, Salin et al., 2015, Zhang and Wong, 2021).

## CONCLUSIONES

El presente estudio reveló que el nicho trófico de *C. nigrofumosus* no cambió estacionalmente ni en relación con el de *C. oustaleti* de invierno. Los valores de  $\delta^{18}\text{O}$  más altos (mas cercanos a los del agua de mar) observados se encontraron en aves de invierno, contrario a lo que se esperaba, sin embargo, los valores más bajos, si fueron en la especie migratoria. Se sugiere que tal enriquecimiento isotópico de oxígeno probablemente provenga de las presas marinas que contienen agua de mar en su interior. La variación en la TMB y PTAE entre invierno y verano para *C. nigrofumosus* dan cuenta del efecto de la estacionalidad sobre las tasas de gasto energético, sin embargo, parte de esta variación significativa podría deberse a que los individuos de verano se encontraban en temporada reproductiva. La disminución significativa de la C de invierno tanto en *C. nigrofumosus* como en *C. oustaleti*, sugiere que estas aves podrían estar empleando un mecanismo de termorregulación que favorecería la conservación de energía. Mediante el modelo teórico  $A_M/PTAE$  fue posible determinar un aporte de agua metabólica similar al estimado con el análisis isotópico. De acuerdo con lo observado, el valor de  $\Delta^{17}\text{O}$  sugiere que el aporte de agua metabólica se encuentra cercano al 25% del presupuesto hídrico total, y que aumenta en verano en relación con el aumento del metabolismo. Nuestros resultados obtenidos a partir de las mediciones fisiológicas respaldan la utilidad de este método. La cantidad de agua evaporada en relación con el oxígeno consumido fue eficazmente predicha por el modelo alométrico teórico de Tieleman (2002) a partir de la mb para *C. oustaleti*. Sin embargo, para el caso particular de *C. nigrofumosus*, sólo la ecuación descrita para ambientes méxicos predijo correctamente a los valores observados para las aves de invierno. La actividad enzimática mitocondrial en eritrocitos no reflejó el aumento metabólico a nivel organismo observado en verano. La capacidad de estas células para representar la variación en la tasa metabólica aún debe ser estudiada para determinar su efectividad como un método no invasivo para estudiar las capacidades de enzimas metabólicas en aves. El daño por

peroxidación lipídica se encontró relacionado con el incremento metabólico en verano y la capacidad antioxidante no varió entre estaciones ni especies.

## PROYECCIONES

En este estudio se integró la medición de isótopos estables en varios tejidos para determinar la variación estacional e interespecífica del uso de recursos, el movimiento migratorio y la  $A_M$  en asociación con la variación natural del gasto energético y su potencial efecto sobre el balance oxidativo en dos especies de *Cinclodes* en estado silvestre en la costa de Chile central. Estudios previos que utilizaron el análisis de isótopos estables en *Cinclodes*, han explorado la utilización de recursos marinos, la amplitud de nicho trófico y potenciales fuentes de obtención de agua, sin embargo, la mayoría de los estudios que han estudiado la variabilidad en los rasgos fisiológicos suelen desarrollarse en condiciones experimentales de laboratorio, siendo escasos los intentos por entender los patrones de variación en poblaciones de vida silvestre (Broggi et al., 2007). Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que las variaciones observadas en la fisiología de *C. nigrofumosus* no se correlaciona con una variación en la utilización de recursos, ya que estas aves estarían consumiendo recursos marinos indistintamente a la época. La falta de variación y amplitud estacional en el nicho isotópico en relación con las tasas de gasto energético, dejan abierta la puerta a futuros estudios que ayuden a clarificar el costo potencial que tiene habitar ambientes salinos para aves paseriformes durante todo el año. Como proyección, se sugiere comparar poblaciones de zonas costeras con distinto índice de aridez y mantener un muestreo continuo en el tiempo para conocer cómo varía la dieta durante años más secos (Tieleman et al., 2002) y centrarse en el papel del agua de mar sobre el balance hídrico y la variación isotópica en *Cinclodes* o bien utilizando muestras de tejidos de museo (Negrete et al 2017) que puedan entregar información histórica sobre la utilización de recursos en distintas épocas.

## REFERENCIAS

- Albright, T. P., Mutiibwa, D., Gerson, A. R., Smith, E. K., Talbot, W. A., O'Neill, J. J., McKechnie, A. E., & Wolf, B. O. (2017). Mapping evaporative water loss in desert passerines reveals an expanding threat of lethal dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(9), 2283–2288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613625114>
- Aldea, P., & Sabat, P. (2007). Osmoregulatory responses to dietary protein and water intake in the granivorous *Zonotrichia capensis* (Passerine, Emberizidae). *Revista Chilena de historia Natural*, *80*(4), 447-454.
- Arad, Z., Gavrieli-Levin, I., Eylath, U., & Marder, J. (1987). Effect of Dehydration on Cutaneous Water Evaporation in Heat-Exposed Pigeons (*Columba livia*). *Physiological Zoology*, *60*(6), 623–630. <https://doi.org/10.1086/physzool.60.6.30159978>
- Barceló, G., Salinas, J., Cavieres, G., Canals, M., & Sabat, P. (2009). Thermal history can affect the short-term thermal acclimation of basal metabolic rate in the passerine *Zonotrichia capensis*. *Journal of Thermal Biology*, *34*(8), 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.06.008>
- Bartholomew, G. A., & Cade, T. J. (1963). The Water Economy of Land Birds. *The Auk*, *80*(4), 504–539. <https://doi.org/10.2307/4082856>
- Bozinovic, F., Cruz-Neto, A. P., Cortés, A., Diaz, G. B., Ojeda, R. A., & Giannoni, S. M. (2007). Physiological diversity in tolerance to water deprivation among species of South American desert rodents. *Journal of Arid Environments*, *70*(3), 427–442. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.01.003>
- Broggi, J., Hohtola, E., Koivula, K., Orell, M., Thomson, R. L., & Nilsson, J. Å. (2007). Sources of variation in winter basal metabolic rate in the great tit. *Functional Ecology*, *528*-533.
- Brzęk, P., Książek, A., Ołdakowski, Ł., & Konarzewski, M. (2014). High basal metabolic rate does not elevate oxidative stress during reproduction in laboratory mice. *Journal of Experimental Biology*, *217*(9), 1504-1509.
- Carmi, N., Pinshow, B., Horowitz, M., & Bernstein, M. H. (1993). Birds Conserve Plasma Volume during Thermal and Flight-Induced Dehydration. *Physiological Zoology*, *66*(5), 829–846. <https://doi.org/10.1086/physzool.66.5.30163826>

- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichefet, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W. J., Johns, T., Krinner, G., Shongwe, M., Tebaldi, C., Weaver, A. J., Wehner, M. F., Allen, M. R., Andrews, T., Beyerle, U., Bitz, C. M., Bony, S., & Booth, B. B. B. (2013). *Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility* (pp. 1029–1136). Cambridge University Press. <https://research.monash.edu/en/publications/long-term-climate-change-projections-commitments-and-irreversibil>
- Cooper, C. E., Withers, P. C., Hurley, L. L., & Griffith, S. C. (2019). The Field Metabolic Rate, Water Turnover, and Feeding and Drinking Behavior of a Small Avian Desert Granivore During a Summer Heatwave. *Frontiers in Physiology*, *10*(November). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01405>
- Costantini, D. & Verhulst, S. (2009) Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Funct Ecol* *23*:506–509
- Cortés, A., Rosenmann, M., & Bozinovic, F. (2000). Water economy in rodents: evaporative water loss and metabolic water production. In *Revista chilena de historia natural* (Vol. 73, Issue 2). <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2000000200006>
- Daan, S., Masman, D., & Groenewold, A. (1990). Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *259*(2), R333-R340.
- De La Maza, M., Lima, M., Meserve, P. L., Gutierrez, J. R., & Jaksic, F. M. (2009). Primary production dynamics and climate variability: ecological consequences in semiarid Chile. *Global Change Biology*, *15*(5), 1116-1126.
- Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: A third universal response to warming? *Trends in Ecology and Evolution*, *26*(6), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.005>
- Gerson, A. R., & Guglielmo, C. G. (2011). House sparrows (*Passer domesticus*) increase protein catabolism in response to water restriction. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *300*(4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00701.2010>
- Gavrilov, V. M. (2017). Total evaporative water loss in birds at different ambient temperatures: Allometric and stoichiometric approaches. *Zoological studies*, *56*.
- Giulivi, C., & Ramsey, J. (2015). On fuel choice and water balance during migratory bird flights.

- International biology review, 2015(1).
- Goldstein, D. L., & Skadhauge, E. (2000). Renal and Extrarenal Regulation of Body Fluid Composition. In *Sturkie's Avian Physiology* (Fifth Edit, Issue 1981). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-012747605-6/50012-2>
- Gutiérrez, J. S., Masero, J. A., Abad-Gómez, J. M., Villegas, A., & Sánchez-Guzmán, J. M. (2011). Understanding the energetic costs of living in saline environments: Effects of salinity on basal metabolic rate, body mass and daily energy consumption of a long-distance migratory shorebird. *Journal of Experimental Biology*, 214(5), 829–835.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.048223>
- Gutiérrez, J. S., Sabat, P., Castañeda, L. E., Contreras, C., Navarrete, L., Peña-Villalobos, I., & Navedo, J. G. (2019). Oxidative status and metabolic profile in a long-lived bird preparing for extreme endurance migration. *Scientific Reports*, 9(1), 17616. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54057-6>
- Harris, R. M. B., Beaumont, L. J., Vance, T. R., Tozer, C. R., Remenyi, T. A., Perkins-Kirkpatrick, S. E., Mitchell, P. J., Nicotra, A. B., McGregor, S., Andrew, N. R., Letnic, M., Kearney, M. R., Wernberg, T., Hutley, L. B., Chambers, L. E., Fletcher, M. S., Keatley, M. R., Woodward, C. A., Williamson, G., Bowman, D. M. J. S. (2018). Biological responses to the press and pulse of climate trends and extreme events. *Nature Climate Change*, 8(7), 579–587.  
<https://doi.org/10.1038/s41558-018-0187-9>
- Hermes-Lima, M., & Storey, K. B. (1998). Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Molecular and cellular biochemistry*, 189(1), 79-89.
- Hillenius, W. J., & Ruben, J. A. (2004). The evolution of endothermy in terrestrial vertebrates: Who? When? Why?. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(6), 1019-1042.
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., and Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 89, 193–277. doi: 10.1152/physrev.00037.2007
- Hunter, A. S., and Hunter, F. (1957). A comparative study of erythrocyte metabolism. *J. Cell. Physiol.* 49, 479–502. doi: 10.1002/jcp.1030490307
- IPCC (2014). *Climate change 2014. Synthesis report*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Iriarte, S., Tore, C., Pardo, M., Aguirre, E., and Aravena, E. R. (2004). Use of environmental

- isotopes to evaluate natural and antropic sources of groundwater in an area with multiple land uses, Santiago norte basin, Chile. *Isot. Hydrol. Integr. Water Resour. Manage.*, 165–167
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Exp. Biol. Med.* 222, 283–292. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-145.x
- Lee, P., & Schmidt-Nielsen, K. (1971). Respiratory and cutaneous evaporation in the zebra finch: effect on water balance. *The American Journal of Physiology*, 220(6), 1598–1605. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.6.1598>
- MacMillen, R. E. (1990). Water Economy of Granivorous Birds: A Predictive Model. *The Condor*, 92(2), 379. <https://doi.org/10.2307/1368235>
- Maldonado, K. E., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M., & Sabat, P. (2009). Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal acclimatization. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 179(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0317-1>
- Martínez del Rio, C., Sabat, P., Anderson-Sprecher, R., & Gonzalez, S. P. (2009). Dietary and isotopic specialization: the isotopic niche of three Cinclodes ovenbirds. *Oecologia*, 161(1), 149-159.
- McCarty, J. P. (2001). Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology*, 15(2), 320–331. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015002320.x>
- McNab, B. K. (2002). Short-term energy conservation in endotherms in relation to body mass, habits, and environment. *Journal of Thermal Biology*, 27(6), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00016-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00016-5)
- Moritz, K., Lim, G. B., and Wintour, E. (1997). Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273, R1829–R1844. doi: 10.1152/ajpregu.1997.273.6. R1829
- Muñoz-García, A., & Williams, J. B. (2005). Cutaneous water loss and lipids of the stratum corneum in house sparrows *Passer domesticus* from arid and mesic environments. *Journal of Experimental Biology*, 208(19), 3689-3700.
- Munoz-Garcia, A., Cox, R. M., & Williams, J. B. (2008). Phenotypic flexibility in cutaneous water loss and lipids of the stratum corneum in house sparrows (*Passer domesticus*) following acclimation to high and low humidity. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(1), 87-96.

- Navarro, R. A., Meijer, H. A. J., Underhill, L. G., & Mullers, R. H. E. (2018). Extreme water efficiency of cape gannet *Morus capensis* chicks as an adaptation to water scarcity and heat stress in the breeding colony. *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 51(1), 30-43.
- Negrete, P., Sallaberry, M., Barceló, G. et al. Temporal variation in isotopic composition of *Pygoscelis* penguins at Ardley Island, Antarctic: Are foraging habits impacted by environmental change?. *Polar Biol* 40, 903–916 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00300-016-2017-8>
- Newsome, S. D., Martínez del Rio, C., Bearhop, S., & Phillips, D. L. (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(8), 429-436.
- Newsome, S. D., Sabat, P., Wolf, N., Rader, J. A., Del Rio, C. M., & Peters, D. P. C. (2015). Multi-tissue  $\delta^2\text{H}$  analysis reveals altitudinal migration and tissue-specific discrimination patterns in *Cinclodes*. *Ecosphere*, 6(11). <https://doi.org/10.1890/ES15-00086.1>
- Noakes, M. J., & McKechnie, A. E. (2020). Seasonal Metabolic Acclimatization Varies in Direction and Magnitude among Years in Two Arid-Zone Passerines. *Physiological and Biochemical Zoology*, 93(2), 140–152. <https://doi.org/10.1086/707679>
- Nord, A., & Nilsson, J. Å. (2019). Heat dissipation rate constrains reproductive investment in a wild bird. *Functional Ecology*, 33(2), 250-259.
- Nord, A., Metcalfe, N. B., Page, J. L., Huxtable, A., McCafferty, D. J., and Dawson, N. J. (2021). Avian red blood cell mitochondria produce more heat in winter than in autumn. *FASEB J*. 35:e21490. doi: 10.1096/fj.202100107R
- Novoa, F. F., Bozinovic, F., & Rosenmann, M. (1994). Seasonal changes of thermal conductance in *Zonotrichia capensis* (Emberizidae), from central Chile: the role of plumage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 107(2), 297-300.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL (2013) SIAR: stable isotope analysis in R. <https://cran.rproject.org/web/packages/siar/index.html>
- Peña-Villalobos, I., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F., & Sabat, P. (2014). Metabolic enzymes in seasonally acclimatized and cold acclimated rufous-collared sparrow inhabiting a Chilean Mediterranean environment. In *Current Zoology* (Vol. 60, Issue 3, pp. 338–350). <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.3.338>
- Peña-Villalobos, I., Valdes-Ferranty, F., & Sabat, P. (2013). *Osmoregulatory and metabolic costs of*

*salt excretion in the Rufous-collared sparrow Zonotrichia capensis.*

Piersma, T., & Gill, R. E. (1998). Guts Don ' T Fly: Small Digestive Organs in Obese Godwits. *The Auk*, 115(1), 196–203.

Poblete, Y., Gutiérrez, V., Cid, V., Newsome, S. D., Sabat, P., & Vasquez, R. A. (2018). Intraspecific variation in exploratory behavior and elevational affinity in a widely distributed songbird. *Oecologia*, 186(4), 931-938.

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Comput- ing, Wien, O` sterreich. <http://www.R-project.org>

Rutkowska, J., Sadowska, E. T., Cichon, M., & Bauchinger, U. (2016). Increased fat catabolism sustains water balance during fasting in zebra finches. *Journal of Experimental Biology*, 219(17), 2623–2628. <https://doi.org/10.1242/jeb.138966>

Sabat, P. (2000). Birds in marine and saline environments: living in dry habitats. In *Revista chilena de historia natural* (Vol. 73, Issue 3). <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2000000300004>

Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C., & Canals, M. (2006a). Water and energy economy of an omnivorous bird: Population differences in the Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(4), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.016>

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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.003>

Sabat, P., Maldonado, K., Fariña, J. M., & Del Rio, C. M. (2006b). Osmoregulatory capacity and the ability to use marine food sources in two coastal songbirds (Cinclodes: Furnariidae) along a latitudinal gradient. *Oecologia*, 148(2), 250–257. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0377-4>

Sabat, P., Maldonado, K., Rivera-Hutinel, A., & Farfan, G. (2004). Coping with salt without salt glands: Osmoregulatory plasticity in three species of coastal songbirds (ovenbirds) of the genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 174(5), 415–420. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0428-2>

Sabat, P., & Martínez Del Rio, C. (2002). Inter- and intraspecific variation in the use of marine food

- resources by three Cinclodes (Furnariidae, Aves) species: Carbon isotopes and osmoregulatory physiology. *Zoology*, 105(3), 247–256. <https://doi.org/10.1078/0944-2006-00078>
- Sabat, P., Narváez, C., Peña-Villalobos, I., Contreras, C., Maldonado, K., Sanchez-Hernandez, J. C., Newsome, S. D., Nespolo, R., & Bozinovic, F. (2017). Coping with salt water habitats: Metabolic and oxidative responses to salt intake in the rufous-collared sparrow. *Frontiers in Physiology*, 8(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00654>
- Sabat, P., Nespolo, R. F., & Bozinovic, F. (2004). Water economy of three Cinclodes (Furnariidae) species inhabiting marine and freshwater ecosystems. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77(2), 219–225. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2004000200001>
- Sabat, P., Newsome, S. D., Pinochet, S., Nespolo, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Maldonado, K., ... & Whiteman, J. P. (2021). Triple Oxygen Isotope Measurements ( $\Delta^{17}\text{O}$ ) of Body Water Reflect Water Intake, Metabolism, and  $\delta^{18}\text{O}$  of Ingested Water in Passerines. *Frontiers in physiology*, 1423.
- Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Cairns, A. G., Mullen, W., et al. (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biol. Lett.* 11:20150538. doi: 10.1098/rsbl.2015.0538
- Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., and Speakman, J. R. (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends Ecol. Evol.* 27, 570–577. doi: 10.1016/j.tree.2012.06.006
- Smit, B., & McKechnie, A. E. (2010). Avian seasonal metabolic variation in a subtropical desert: Basal metabolic rates are lower in winter than in summer. *Functional Ecology*, 24(2), 330–339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01646.x>
- Smit, B., Woodborne, S., Wolf, B. O., & McKechnie, A. E. (2019). Differences in the use of surface water resources by desert birds are revealed using isotopic tracers. *The Auk*, 136(1), uky005.
- Smit, B., & McKechnie, A. E. (2015). Water and energy fluxes during summer in an arid-zone passerine bird. *Ibis*, 157(4), 774–786. <https://doi.org/10.1111/ibi.12284>
- Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(6), 1252–1263. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021>

- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Gros, F., Royer, C., Massemin, S. & Criscuolo, F. (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in zoology*, 10(1), 1-9.
- Stier, A., Romestaing, C., Schull, Q., Lefol, E., Robin, J. P., Roussel, D., & Bize, P. (2017). How to measure mitochondrial function in birds using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1172–1182. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12724>
- Tapia-Monsalve, R., Seth, M., Juan, D. N., Hernandez, C. S., Bozinovic, F., Nespolo, R., & Sabat, P. (2018). Terrestrial birds in coastal environments : metabolic rate and oxidative status varies with the use of marine resources. *Oecologia*, 188(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4181-8>
- Tieleman, B. I., & Williams, J. B. (2000). The adjustment of avian metabolic rates and water fluxes to desert environments. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73(4), 461-479.
- Tieleman, B. I., & Williams, J. B. (2002). Cutaneous and respiratory water loss in larks from arid and mesic environments. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(6), 590–599. <https://doi.org/10.1086/344491>
- Tieleman, B. I. (2002). Avian adaptation along an aridity gradient. Physiology, behavior, and life history. PhD thesis, University of Groningen. Tieleman, BI, JB Williams & ME Buschur, 305-313.
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., & Bloomer, P. (2003). Adaptation of metabolism and evaporative water loss along an aridity gradient. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1511), 207–214. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2205>
- Tumminello, R. A., & Fuller-Espie, S. L. (2013). Heat stress induces ROS production and histone phosphorylation in celomocytes of *Eisenia hortensis*. *Invertebrate Survival Journal*, 10, 50–57.
- Vézina, F., & Williams, T. D. (2005). Interaction between organ mass and citrate synthase activity as an indicator of tissue maximal oxidative capacity in breeding European starlings: implications for metabolic rate and organ mass relationships. *Functional Ecology*, 119-128.
- Walther, G., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J., I, O.

- H., & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, *416*, 389–395. <https://doi.org/10.1038/416389a>
- Williams, J. B., Siegfried, W. R., Milton, S. J., Adams, N. J., Dean, W. R. J., du Plessis, M. A., & Jackson, S. (1993). Field Metabolism, Water Requirements, and Foraging Behavior of Wild Ostriches in the Namib. *Ecology*, *74*(2), 390–404. <https://doi.org/10.2307/1939301>
- Williams, J. B., Miller, R. A., Harper, J. M., & Wiersma, P. (2010). Functional linkages for the pace of life, life-history, and environment in birds. *Integrative and comparative biology*, *50*(5), 855–868.
- Williams, J. B., & Tieleman, B. I. (2001). Physiological ecology and behavior of desert birds. In *Current ornithology* (pp. 299–353). Springer, Boston, MA.
- Wolf, N., Newsome, S. D., Fogel, M. L., & del Rio, C. M. (2012). An experimental exploration of the incorporation of hydrogen isotopes from dietary sources into avian tissues. *Journal of Experimental Biology*, *215*(11), 1915–1922.
- Zhang, Y., & Wong, H. S. (2021). Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells? *Journal of Experimental Biology*, *224*(5), jeb221606.