

UCH-FC
MA6-B
T 172
c.1

**EFFECTOS DE HABITAR AMBIENTES MARINOS
SOBRE LA TASA METABÓLICA BASAL Y EL
ESTADO OXIDATIVO EN TRES ESPECIES DEL
GÉNERO *CINCLODES* (AVES: FURNARIIDAE)**

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

Romina Belén Tapia Monsalve

Enero, 2018

Director de Tesis Dr: Pablo Sabat K.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata Romina Belén Tapia Monsalve

**EFFECTOS DE HABITAR AMBIENTES MARINOS SOBRE LA
TASA METABÓLICA BASAL Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
TOTAL EN TRES ESPECIES DEL GÉNERO CINCLODES
(AVES: FURNARIIDAE)**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 27 de diciembre de 2017

Director de Tesis:
Dr. Pablo Sabat

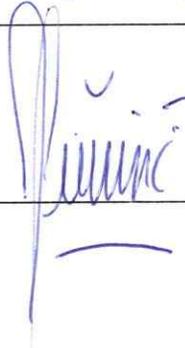


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vásquez



Dr. Francisco Bozinovic

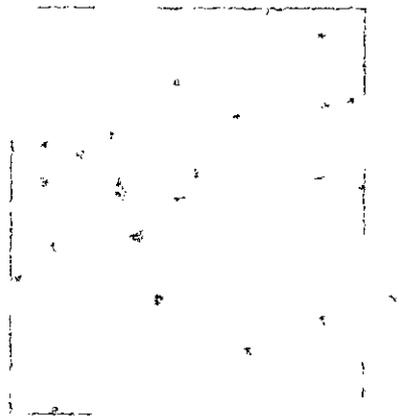


BIOGRAFIA



Romina nació en Concepción en junio de 1992. Su madre le inculcó, desde muy temprana edad, el gran interés por conocer nuevos lugares e interactuar con la naturaleza. Es por eso que el año 2010 ingresó a la Universidad de Concepción a la carrera de Biología, en donde descubrió que se dedicaría a las ciencias toda su vida. Posteriormente en el año 2015, y motivada por las ganas de continuar aprendiendo, ingresó al Programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile formando parte del Laboratorio de Ecofisiología Animal bajo la tutela del Dr. Pablo Sabat. Sus intereses están enfocados principalmente a las aves y en estudiar los mecanismos de respuesta de los animales a las variaciones ambientales cuya finalidad es aplicarlo en la conservación de especies.

PLATE I



Dedicada a Juan Pedro y Ayin

PLATE I
A faint, low-contrast image of a rectangular object, possibly a book cover or a page, with some illegible markings or text inside.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Pablo Sabat por permitirme ser parte del Laboratorio, por la confianza que ha depositado en mí y por el apoyo brindado desde el comienzo del Magíster.

A todos los compañeros de laboratorio, en especial a Cristóbal Narváz, quien me ayudó en el inicio de esta etapa. A Carolina Contreras y Natalia Ramírez por darse el tiempo de ayudarme a comprender los métodos utilizados y con los análisis. Agradezco de manera especial a Andrés Sazo por su colaboración, compañía y experiencia en la captura de las aves.

Agradezco a mi familia, porque han sido ellos los que me apoyaron cuando tomé la decisión de avanzar, y he sentido su amor y confianza, aunque incluso muchas veces no entiendan que es lo que hago. A Juan Pedro, por todo el amor, amistad, comprensión y apoyo en mi crecimiento profesional y personal, en mis buenos y malos momentos, y a Ayün, porque él es mi principal motor.

Esta tesis fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1160115.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Captura de aves.....	5
Toma y preparación de muestras.....	5
Mediciones de laboratorio.....	6
Análisis estadísticos.....	9
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	20

Diferencias en la incorporación de recursos: Especies especialistas y especies generalistas.....	20
Ajustes metabólicos asociados a la ingesta de sales.....	22
Estado oxidativo en aves silvestres.....	26
CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	35

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ obtenidos a partir del análisis de sangre y pluma.....13
- Figura 2.** Análisis de Capacidad Antioxidante Total y Peroxidación lipídica en el plasma de las tres especies del género *Cinclodes*.....17
- Figura 3.** Relación entre la Capacidad Antioxidante Total y $\delta^{13}\text{C}$ en sangre de individuos de tres especies de *Cinclodes*.....18
- Figura 4.** Relación entre Capacidad Antioxidante Total y Tasa metabólica basal masa específica de los individuos de tres especies de *Cinclodes*.....19

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de isótopos estables para dos tejidos en las tres especies de <i>Cinclodes</i>	12
Tabla 2. ANOVA de una vía para los diferentes tejidos e isótopos analizados, entre especies.....	12
Tabla 3. Métricas de nicho isotópico (TA, SEA, SEA _C y SEA _B).....	14
Tabla 4. Valores de Tasa metabólica basal (BMR), tasa metabólica masa-específica (BMRm), tasa metabólica basal corregida (BMRc) y masa (mb) de las tres especies de <i>Cinclodes</i>	15

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE: Análisis de Isótopos Estables

BMR: Tasa metabólica basal (siglas en inglés)

BMRc: Tasa metabólica basal corregida por la masa (promedio mínimos cuadrados)

BMRm: Tasa metabólica basal/ masa

TAC: Capacidad Antioxidante Total (siglas en inglés)

TBARS: Peroxidación Lipídica, especies reactivas al ácido triobarbitúrico (siglas en inglés)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)

mb: Masa corporal (siglas en inglés)

TA: Área total del polígono mínimo convexo

SEA: Área de la elipse estándar

SEA_C: Área de la elipse estándar corregido por tamaño de muestra más pequeño

SEA_B: Área de la elipse estándar Bayesiana

RESUMEN

La vida en ambientes salinos representa un desafío fisiológico para las aves, en particular para las especies del orden Paseriformes. La ausencia de una glándula nasal en este grupo explicaría la escasa presencia de paseriformes en ambientes marinos, sin embargo los potenciales costos energéticos, que a su vez incrementarían la producción de especies reactivas de oxígeno, podrían contribuir a explicar este patrón. En este estudio se realizaron mediciones de la tasa metabólica basal (BMR) y estimadores del estatus oxidativo en muestras de sangre de tres especies del género *Cinclodes* que habitan las costas marinas y aguas continentales en Chile. Además, se realizó un análisis de isótopos estables (AIE) de carbono y nitrógeno de plumas y sangre para estimar la contribución de presas marinas/terrestres a su dieta. Los resultados revelaron que *C. nigrofumosus* es la especie con mayor contribución marina a su dieta, a diferencia de *C. fuscus* con incorporación de recursos más terrestres. Por otro lado, *C. oustaleti* presenta mayores valores de BMR corregidos por la masa corporal y *C. fuscus* los mayores valores de capacidad antioxidante total. Los resultados sugieren que los individuos desarrollan mecanismos de ajuste metabólicos para lidiar con las exigencias osmorregulatorias, y que además existen diferencias entre especies en cuanto a

resistencia al estrés oxidativo, el cual no estaría inducido de una manera lineal por el consumo de recursos marinos. Este estudio presenta evidencia novedosa acerca de la existencia de un efecto de las características ecológicas de las especies de aves sobre su estatus oxidativo.

ABSTRACT

Life in saline environments represents a physiological challenge for birds, particularly for species of the order Passeriformes. The absence of a nasal gland in this group would explain the scarce presence of passerines in marine environments; however the potential energy costs, which in turn would increase the production of reactive oxygen species, could help explain this pattern. In this study, measurements of the basal metabolic rate (BMR) and oxidative status estimators were performed in blood samples from individuals of three species of the *Cinclodes* genus inhabiting marine and freshwater coastal areas in Chile. In addition, a stable isotope analysis (SIA) of carbon and nitrogen from feathers and blood was carried out to estimate the contribution of marine / terrestrial prey to their diet. The results revealed that *C. nigrofumosus* is the species with the highest marine contribution to its diet, whereas *C. fuscus* incorporated mainly terrestrial resources. On the other hand, *C. oustaleti* presents higher values of mass-corrected BMR and *C. fuscus* the highest values of total antioxidant capacity. The results suggest that individuals develop mechanisms of metabolic adjustment to deal with osmoregulatory requirements, and that there are also differences between species in terms of resistance to oxidative stress, which would not be induced in a straightforward

manner by the consumption of marine resources. This study presents novel evidence about the existence of an effect of ecological features of bird species on their oxidative status.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes costeros marinos y de salares representan hábitats estresantes desde el punto de vista osmorregulatorio para la mayoría de las aves, ya que la ingestión del agua como un gran número de presas disponibles, que se encuentran en equilibrio osmótico con el ambiente, produce una carga salina significativa (Sabat, 2000; Gutiérrez, 2014). Diversos estudios comparativos han documentado que el tamaño y función de la glándula nasal y los riñones son determinantes en el éxito de explotar hábitats salinos. En consecuencia, el tamaño y función de órganos osmorregulatorios en aves es afectado por la salinidad del hábitat, la carga salina, entre otros factores (Sabat & Martínez del Rio, 2002; Gutiérrez et al., 2012). Además, diversos autores sugieren que la ingesta de sales y compuestos osmóticos se traducirían en costos energéticos significativos, proponiendo que la función osmorregulatoria aumenta las tasas metabólicas en aves silvestres (Nehls, 1996; Gutiérrez et al., 2011) y en aquellas aclimatadas al consumo de sal (Peña-Villalobos et al. 2013). Por ejemplo, Gutierrez et al. (2012) encontraron que la tasa metabólica basal (BMR) es significativamente menor en playeros que poseen acceso a agua dulce en comparación con sus homólogos marinos. Sin embargo, es importante señalar que otros factores ecológicos que probablemente influyen en la BMR, como el

tipo de dieta, la disponibilidad de recursos y el clima (ej., temperatura y estacionalidad) también varían entre los hábitats (Tieleman & Williams, 2000; Tieleman et al., 2003; Cavieres & Sabat, 2008; Swanson, 2010). En ese sentido, obtener un indicador de la carga osmótica específica para cada caso de estudio (poblaciones o especies) resulta imprescindible para establecer los mecanismos que subyacen a los cambios metabólicos.

Por otro lado, un incremento en la actividad metabólica traería consigo una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como subproducto de la formación de ATP (Costantini & Verhulst, 2009), cuya acumulación puede provocar daño celular, riesgo de enfermedades e incluso la muerte (Dowling & Simmons, 2009; Monaghan et al., 2009; van de Crommenacker et al., 2010; Selman et al., 2002). Sin embargo, las células cuentan con diversos mecanismos de protección y/o reparación del daño provocado por ROS. Uno de estos es contar con un sistema de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (glutatión, tocoferol, ácido úrico, carotenoides y vitamina E, entre otros) (Pamplona & Costantini, 2011). Un desequilibrio en los niveles de pro-oxidantes vs. antioxidantes puede conducir a un daño oxidativo, y por consiguiente incrementar el estatus oxidativo de un individuo (Sies, 1991; Halliwell & Gutteridge, 2007). Si bien se ha demostrado que el aumento de la función osmorreguladora se asocia positivamente con el estrés en invertebrados y peces (Martinez-Alvarez, 2002; Tremblay & Abele, 2015; Velez et al., 2016), son escasos los estudios que aborden cómo la ingesta de sal y los cambios en las condiciones osmóticas pueden aumentar la producción de ROS y causar daño oxidativo en las aves.

Recientemente Sabat et al. (2017) proponen que otro costo potencial de la función osmorregulatoria, mediante la aclimatación al consumo de sales, es el incremento de la capacidad antioxidante de algunos tejidos (hígado y plasma), y por ende del estatus oxidativo en aves.

Como señalan Beaulieu & Costantini (2014), diferentes especies de vertebrados pueden responder diferencialmente al estrés hídrico. Por lo tanto, una pregunta interesante que merece una mayor exploración es si existen diferencias en la capacidad de respuesta de la capacidad antioxidante de diferentes especies de aves (e individuos, ver Rainio et al., 2013), sometidas a diferentes usos de recursos salinos (por ejemplo, marinos).

Las condiciones de la vida en ambientes costeros y de salares representa un desafío adicional para las especies de aves pertenecientes al orden Passeriformes, dado que no poseen glándulas de la sal funcionales (Shoemaker, 1972), y la mayoría de estos posee una capacidad limitada de concentrar la orina (Goldstein & Skadhauge, 2000; Sabat & Martínez del Río, 2002; Sabat et al., 2006). Sólo un escaso número de passeriformes han colonizado de forma natural los ambientes costeros, entre ellos especies del género *Cinclodes* (Furnariidae). Especies pertenecientes a este grupo habitan las interfaces tierra-agua (por ejemplo, arroyos, praderas y playas), presentando variación inter e intraespecífica en cuanto al uso de hábitat en Chile (Sabat, 2000; Sabat & Martínez del Río, 2002). Por ejemplo, el churrete costero (*Cinclodes nigrofumosus*) es un habitante estricto de las playas del litoral chileno. Por su parte, sus congéneres, el churrete acanelado (*Cinclodes fuscus*) y el churrete chico (*Cinclodes oustaleti*) presentan una

gran variabilidad en el uso de recursos marinos, tanto a nivel temporal (estacional) como geográfico (Sielfeld et al., 1996; Jorge et al., 1998; Sabat, 2000). Dado esto, es posible esperar que presenten una capacidad de respuesta fisiológica diferencial frente a una variación en el uso de recursos marinos. Por lo tanto, el consumo de sal y el consiguiente aumento de la función osmorregulatoria conducirán a un aumento de la producción de radicales libres, traduciéndose en un aumento en los niveles de antioxidantes y/o un mayor daño oxidativo.

Considerando las características ecológicas de las especies de *Cinclodes* y su relación con la carga osmótica diferencial que éstas presentan en la naturaleza, es posible esperar que *C. nigrofumosus* presentará mayores valores de BMRc, dado por la alta carga osmótica asociada a la composición de su dieta, y a su vez esto conllevará a mayores valores de antioxidantes circundantes en el sangre que sus congéneres *C. fuscus* y *C. oustaleti*.

Los objetivos de esta tesis son: 1) determinar la incorporación relativa de fuentes marinas y terrestres a la dieta natural en cada especie, 2) evaluar los costos metabólicos asociados a la ingesta de sales y 3) determinar si existe una asociación entre el estado oxidativo y la función osmorregulatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Captura de aves.

Los animales fueron capturados con redes niebla y/o trampas de piso en la costa de Chile Central, en las localidades de Algarrobo ($33^{\circ}22'09''\text{S } 71^{\circ}40'05''\text{O}$), El Quisco ($33^{\circ}24'\text{S } 71^{\circ}42'\text{O}$), Los Molles ($32^{\circ}14'22''\text{S } 71^{\circ}30'54''\text{O}$) y en la Cordillera de los Andes, en Farellones ($33^{\circ}21'3''\text{S } 70^{\circ}18'50''\text{O}$) durante los periodos de mayo de 2016 a agosto de 2017.

2. Toma y preparación de muestras.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena humeral de cada ave inmediatamente después de su captura. Éstas fueron extraídas con capilares heparinizados y no heparinizados, y centrifugadas a 10,000 g por 10 minutos a 4°C . Finalmente se removió el plasma y se almacenó a -80°C para realizar los análisis bioquímicos.

3. Mediciones de laboratorio.

3.1. Medición de Tasa Metabólica Basal.

Los costos de energía de mantención (BMR) fueron determinados a través del consumo de oxígeno usando un sistema de respirometría de flujo continuo (FoxBox, Sable Systems®, Nevada). Las aves se ubicaron en cámaras metabólicas con temperatura controlada y recibiendo aire libre de agua y CO₂ (removido mediante columnas de Drierite y absorbente de CO₂), y con un flujo controlado a 750 mL/min. El flujo de aire fue mantenido a ± 1% por el controlador asociado al flujómetro de masa del sistema FoxBox. La concentración de O₂ se registró durante 8 horas por individuo durante el período de inactividad (entre 20:00-06:00). El consumo de oxígeno fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación de Lighton (2008):

$$VO_2 = FR \times 60 \times (F_i O_2 - F_e O_2) / (1 - F_i O_2)$$

En donde FR es el flujo en mL min⁻¹ y F_iO₂ and F_eO₂ son las concentraciones fraccionales del flujo de oxígeno de entrada y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

3.2 Análisis bioquímicos.

Los tejidos fueron descongelados y previamente diluidos 10x y homogeneizados con PBS 1x, para luego centrifugarlos a 10,000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue almacenado inmediatamente a -80°C hasta la medición de cada ensayo.

3.2.1 Capacidad Antioxidante Total (TAC).

Los niveles de antioxidantes totales se utilizan como indicadores de la integración de los niveles endógenos y exógenos presentes en un tejido para hacer frente a la producción de ROS. Para su determinación se utilizó el Método de CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) tal como lo describe Apak et al. (2004). El ensayo (Cell Biolabs #STA-360) se basa en la reducción de Cu^{+2} en Cu^{+} por antioxidantes como el ácido úrico. Una vez reducido el ión cobre reacciona con un reactivo cromógeno de acoplamiento que produce una coloración con una absorbancia máxima a 490nm. Los valores netos de absorbancia de los antioxidantes son comparados con una curva estándar de ácido úrico conocida.

3.2.2 Peroxidación lipídica (TBARS).

La peroxidación lipídica es un indicador de daño oxidativo en las membranas celulares y fue evaluada mediante la medición del ácido tiobarbitúrico descrito por Ohkawa et al.

(1979). El ensayo (Cell Biolabs OxiSelect™, San Diego, CA; # STA-330) evalúa un producto 1:2 formado entre Malondialdehído (MDA) y Ácido tiobarbitúrico (TBA); La combinación MDA-TBA es determinado por colorimetría con una absorbancia máxima de 532 nm.

3.3 Análisis de isótopos estables

Una submuestra de la sangre colectada fue secada a 80°C durante una semana. Además se colectaron plumas primarias de cada individuo, lo cual corresponde a los recursos asimilados durante el periodo de muda, lo cual ocurre durante el verano austral en *Cinclodes*. La composición isotópica de la sangre, corresponde a los recursos dietarios asimilados durante ~10–20 días previos a la captura.

Los valores de isótopos de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) fueron medidos con un analizador elemental Costech 4010 (Valencia, CA) en el Centro para Isótopos Estables de la Universidad de Nuevo México (Albuquerque, NM). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ son reportados usando notación delta estándar (δ) en partes por mil (‰) como:

$$\delta X = (R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}} - 1)$$

donde R_{muestra} y $R_{\text{estándar}}$ son las proporciones del isótopo pesado a ligero de la muestra y la referencia, respectivamente. La precisión analítica (SD) de mediciones en tejidos proteicos animales para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ es de $\pm 0,2\%$.

4. Análisis estadísticos.

Para determinar si existen diferencias significativas entre tejidos y la composición de cada isótopo entre las especies, se realizaron ANOVAs de una vía entre especies. Para determinar diferencias en la tasa metabólica basal se realizó una ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable, luego de transformar los valores mediante \log_{10} . Además se estimó la asociación entre variables mediante análisis de regresión lineal simple, desarrollado con el paquete STATISTICA (StatSoft Inc., 2004). Los niveles de antioxidantes totales (TAC) y daño por peroxidación lipídica (TBARS) fueron analizados mediante pruebas de varias muestras, arrojando valores de permutación debido al bajo número de muestra en el programa PAST (Hammer et al., 2001). Las diferencias entre especies, tejidos e isótopos fueron determinadas mediante test a posteriori de Tukey sobre los valores absolutos y sobre las medias de mínimos cuadrados (i.e., valores después de la corrección por la masa) para el caso de BMRC.

La amplitud de nicho isotópico de las especies de *Cinclodes* fue estimada a partir de las áreas totales del polígono mínimo convexo (TA), y a partir de las áreas de las elipses estándar (SEA) basada en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (véase Jackson et al., 2011). Para realizar comparaciones estadísticas de la amplitud de nicho isotópico, se utilizó una aproximación Bayesiana (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R: Jackson et al. 2011 [SIBER]) para construir el área de la elipse estándar Bayesiana (SEA_B). Este método utiliza simulaciones de cadena Markov Monte Carlo (MCMC) con 10,000 interacciones para SEA_B , permitiéndonos calcular la probabilidad de que un grupo particular tiene una

menor amplitud de nicho isotópico que otro grupo (Jackson et al. 2011). Para las representaciones graficas se utilizaron los valores de $\dot{S}EA_C$, la que incorpora una corrección para tamaños muestrales pequeños. Estos análisis fueron realizados utilizando el paquete SIAR en R (Parnell et al. 2010; R Development Core Team, 2012).

RESULTADOS

Uso de recursos: Ecología Isotópica

Los resultados del ANOVA revelaron que para ambos tejidos las marcas isotópicas de carbono, nitrógeno e hidrógeno, presentaron diferencias significativas entre las especies (véase Tabla 1 para los valores promedio y Tabla 2 para estadística). Específicamente, los resultados indican que *Cinclodes nigrofumosus* es la especie con mayor incorporación de fuentes marinas a su dieta y *Cinclodes fuscus* con mayor incorporación de fuentes terrestres. Por otro lado, *Cinclodes oustaleti* presentó valores enriquecidos en ^{13}C (valores más positivos de $\delta^{13}\text{C}$) en la sangre, sugiriendo una mayor incorporación de fuentes marinas a su dieta, sin embargo, la composición isotópica de la pluma refleja uso de recursos mayoritariamente terrestres (más negativos en $\delta^{13}\text{C}$).

Tabla 1. Valores de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^2\text{H} \pm \text{SD}$) para dos tejidos en las tres especies de *Cinclodes* (promedio \pm desviación estándar). Letras diferentes representan diferencias isotópicas entre especies y asteriscos diferencias isotópicas entre tejidos.

	Sangre	Pluma
<i>C. nigrofumosus</i> (n = 8)		
$\delta^{13}\text{C}$	$-14,4 \pm 2,1^a$	$-14,1 \pm 1,3^a$
$\delta^{15}\text{N}$	$16,5 \pm 1^a$	18 ± 1^a
$\delta^2\text{H}$	$-69,5 \pm 15,6^a$	$-53,5 \pm 15,6^a$
<i>C. fuscus</i> (n = 16)		
$\delta^{13}\text{C}$	$-22,2 \pm 3,3^b$	$-22,4 \pm 2,3^b$
$\delta^{15}\text{N}$	$8 \pm 3,7^b$	$6,1 \pm 2,9^b$
$\delta^2\text{H}$	$-104,2 \pm 13,9^b$	$-92,9 \pm 16,2^b$
<i>C. oustaleti</i> (n = 11)		
$\delta^{13}\text{C}$	$-16,8 \pm 4^a$	$-21,2 \pm 2^{b*}$
$\delta^{15}\text{N}$	$12,3 \pm 4^a$	$4,9 \pm 2,6^{b*}$
$\delta^2\text{H}$	$-98,8 \pm 12,4^{ab}$	$-122 \pm 15,9^{c*}$

Tabla 2. ANOVA de una vía para los diferentes tejidos e isótopos analizados, entre especies.

	F	df	P
Sangre			
$\delta^{13}\text{C}$	16.852	2, 26	0,00002
$\delta^{15}\text{N}$	15.342	2, 25	0,00005
$\delta^2\text{H}$	8.893	2, 11	0,005
Pluma			
$\delta^{13}\text{C}$	47.806	2, 28	<0,05
$\delta^{15}\text{N}$	73.914	2, 28	<0,05
$\delta^2\text{H}$	23.231	2, 18	0,00001

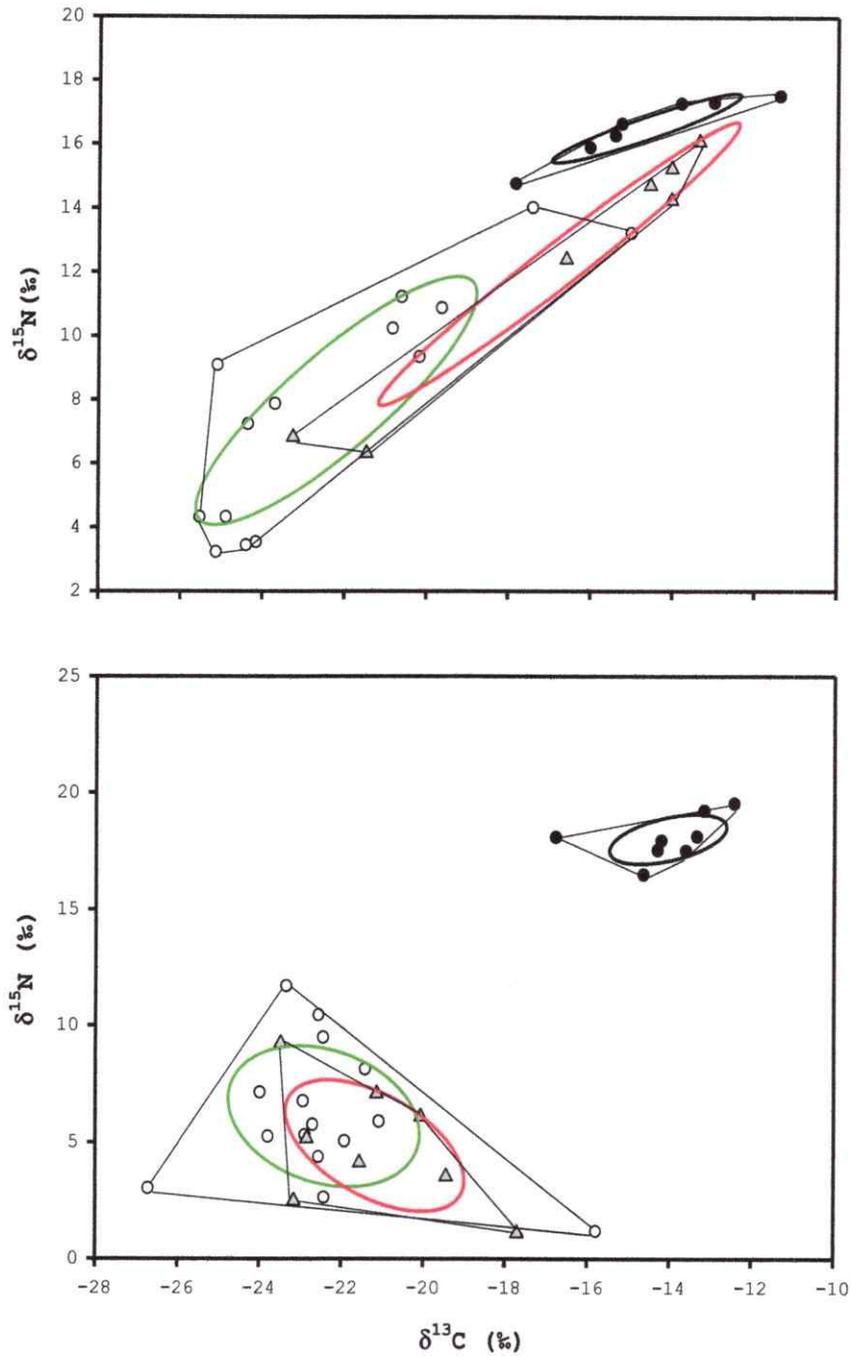


Figura 1. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ obtenidos a partir del análisis de sangre (panel superior) y pluma (panel inferior). Los símbolos representan la composición isotópica de cada individuo de *C. nigrofumosus* (círculos cerrados), *C. fuscus* (círculos abiertos) y *C. oustaleti* (triángulos), para cada tejido. Las elipses (negro, verde y rojo, respectivamente) fueron incluidas para estimar el nicho isotópico de cada especie.

Tabla 3. Área total del polígono convexo mínimo (TA), área de la elipse estándar (SEA), área de la elipse estándar corregida por el tamaño de muestra más pequeño (SEA_C) y área de la elipse estándar Bayesiana (SEA_B más el intervalo de confianza al 95% en paréntesis). La probabilidad resultante de la proporción de extracciones posteriores de SEA_B para un grupo (CN, CF o CO) fue menor que la del otro grupo y se muestra para la comparación estadística de las amplitudes de nicho isotópicos. Diferencias estadísticas entre grupos fueron denotadas por “*”.

Tejido/Especie	TA	SEA	SEA _C	SEA _B (CI)	<CN	<CF	<CO
Sangre							
<i>C. nigrofumosus</i>	3,14	2,22	2,66	4,5 (2,2 - 9,2)	-	0,99*	0,98*
<i>C. fuscus</i>	43,43	19,38	20,99	19,2 (11,4 - 32,1)	-	-	0,16
<i>C. oustaleti</i>	15,20	9,64	11,56	12,8 (6,3 - 25,6)	-	-	-
Pluma							
<i>C. nigrofumosus</i>	5,51	3,57	4,16	4,2 (2,1 - 8,1)	-	0,99*	0,99*
<i>C. fuscus</i>	50,48	19,86	21,39	19,2 (11,6 - 31,7)	-	-	0,18
<i>C. oustaleti</i>	23,15	14,09	16,45	13,4 (6,8 - 25,7)	-	-	-

Energética y masa corporal

Los análisis de ANCOVA sobre los valores de \log_{10} de BMRc arrojaron diferencias significativas entre las especies (Tabla 4). El análisis a posteriori reveló que los valores corregidos por la masa (media de mínimos cuadrados) fueron mayores en *C. oustaleti* que en *C. nigrofumosus* ($p = 0,004$) y que en *C. fuscus* ($p = 0,001$). Los valores de BMRc de *C. nigrofumosus* y *C. fuscus* presentaron diferencias que se encuentran en el límite de la significancia ($p = 0,07$).

Tabla 4. Valores de Tasa metabólica basal (BMR), tasa metabólica masa-especifica (BMRm), tasa metabólica basal corregida (BMRc) y masa (mb) de las tres especies de *Cinclodes* (promedio \pm desviación o error estándar). Letras diferentes representan diferencias significativas entre especies.

	BMR (ml O ₂ h ⁻¹)	BMRm (ml O ₂ h ⁻¹ g ⁻¹)	mb (g)	BMRc
<i>C. nigrofumosus</i> (n=8)	147,1 \pm 9,15 ^a	1,94 \pm 0,23 ^a	74,9 \pm 1,8	28,84 \pm 1,69 ^a
<i>C. fuscus</i> (n=16)	83,9 \pm 6,28 ^b	2,72 \pm 0,16 ^b	32,2 \pm 1,3	77,62 \pm 1,07 ^a
<i>C. oustaleti</i> (n=11)	69,9 \pm 7,81 ^b	2,78 \pm 0,20 ^b	24,9 \pm 1,6	223,87 \pm 1,48 ^b

Estrés oxidativo

Los valores de Capacidad Antioxidante Total presentaron diferencias significativas entre las especies ($F_{(2,15)} = 6,67; p = 0,008$) (Figura 2), en donde *C. fuscus* presentó mayores niveles de TAC plasmáticos que sus congéneres *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti*. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de Peroxidación lipídica entre las especies ($F_{(2,8)} = 0,33; p = 0,73$).

Por último, a partir de un análisis de regresión, se obtuvo una asociación negativa ($r = -0,64; F_{(1,12)} = 8,25; p = 0,014$) entre los niveles de antioxidantes totales y los valores de $\delta^{13}\text{C}$ cuando se consideran todos los individuos en su conjunto (Figura 3). Este resultado indica que individuos con dietas de origen más terrestre poseen mayores niveles de antioxidantes totales. Por otro lado, se obtuvo una asociación positiva ($r = 0,54; F_{(1,16)} = 6,58; p = 0,021$) entre los niveles de antioxidantes totales y la tasa metabólica basal masa específica de cada especie, en donde especies con mayor BMR masa-específico presentan mayores niveles de TAC (Figura 4).

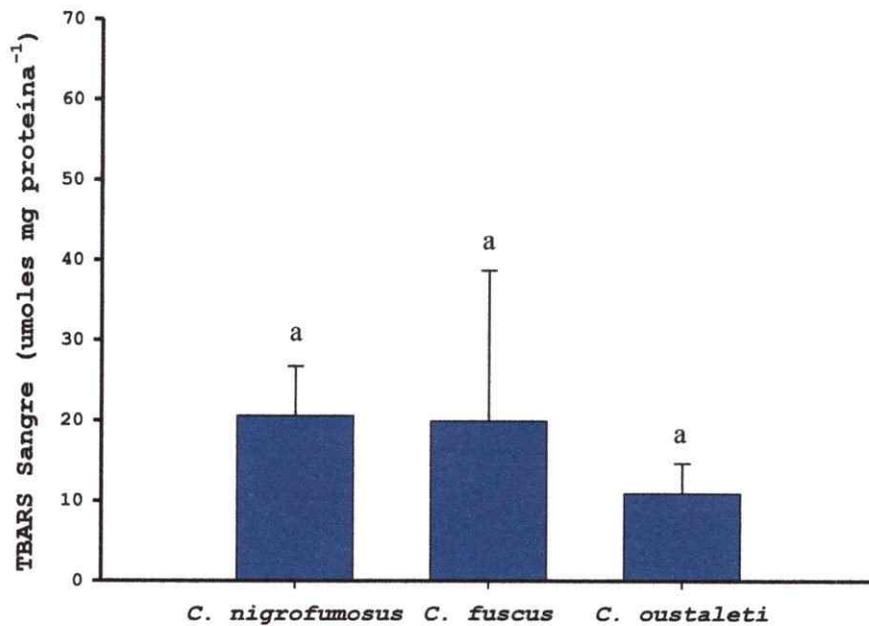
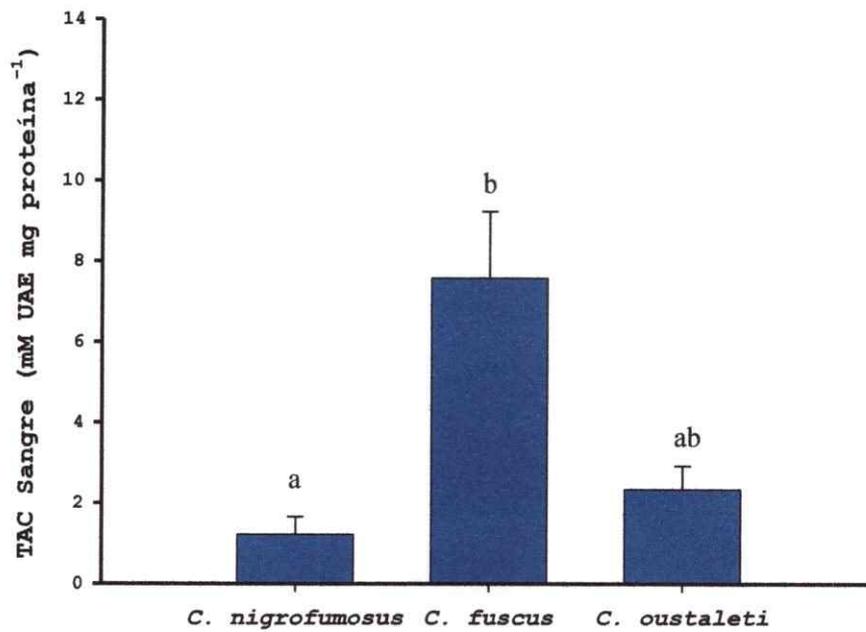


Figura 2. Análisis de Capacidad Antioxidante Total (superior) y Peroxidación lipídica (inferior) en las tres especies del género *Cinclodes*. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

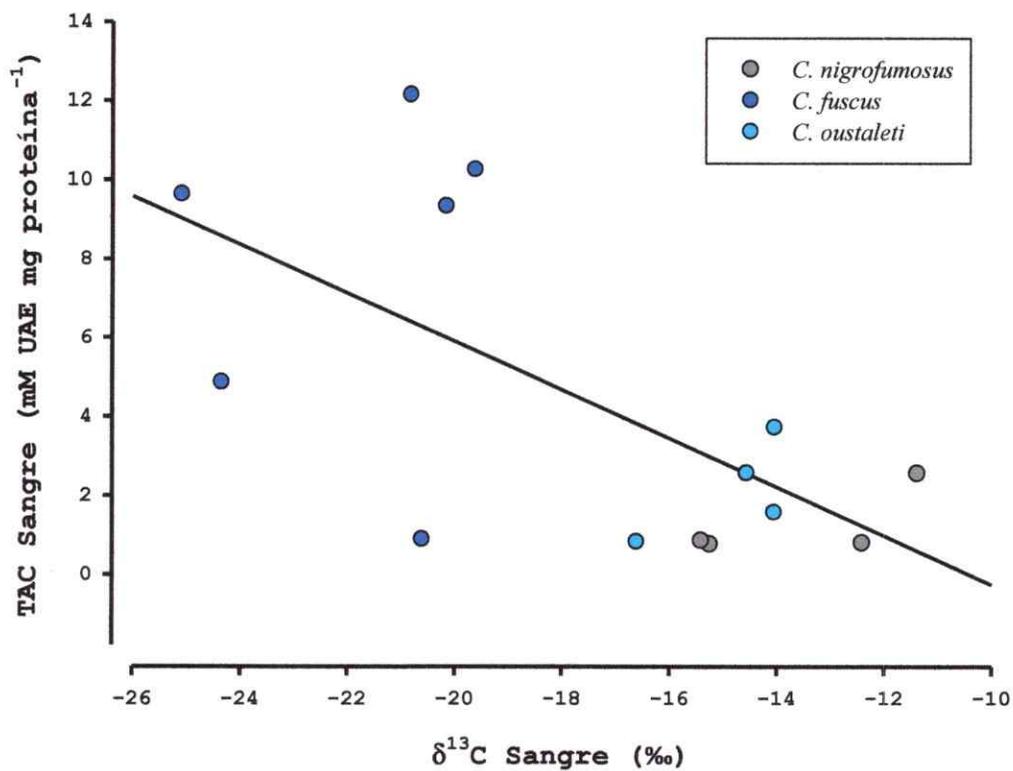


Figura 3. Relación entre la Capacidad Antioxidante Total y $\delta^{13}\text{C}$ sangre ($p = 0,014$) de individuos de tres especies de *Cinclodes*.

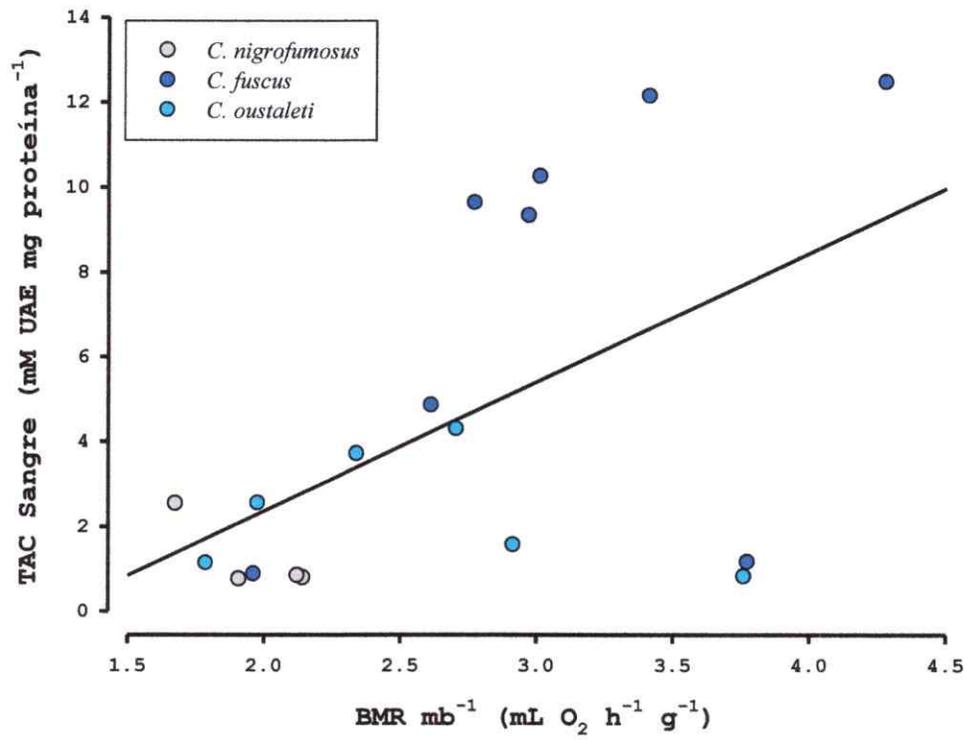


Figura 4. Relación entre Capacidad Antioxidante Total y Tasa metabólica basal masa específica ($p = 0,02$) de los individuos de tres especies de *Cinclodes*.

DISCUSIÓN

Diferencias en la incorporación de recursos: Especies especialistas y especies generalistas

Los isótopos estables han sido ampliamente utilizados en ecología ya que proveen de información que permite explorar, entre otros, el uso de recursos (nicho isotópico) de especies y poblaciones y la estructura trófica de comunidades (Bearhop et al., 2004; Layman et al., 2007; Schmidt et al., 2007). Su aplicación incluye variables directamente relacionadas con el uso de recursos marinos, lo que permite entender los posibles efectos de la salinidad sobre la fisiología de las aves (Sabat et al., 2006; Masero et al., 2017).

La composición isotópica presente en cada tejido depende del tipo de alimento (Hobson & Clark, 1992) y de la tasa de incorporación de proteínas en los tejidos. La sangre es un tejido con altas tasas de recambio de proteínas, reflejando la composición isotópica de los alimentos que fueron ingeridos en un corto periodo de tiempo (e.g., días). Por otro lado, tejidos con tasas relativamente bajas de recambio, como las plumas, retienen la composición isotópica de los alimentos ingeridos durante la época de muda (Martínez del Río et al., 2009; Sabat et al., 2006). Así, al comparar la composición isotópica de

tejidos con diferentes tasas de recambio es posible identificar individuos/poblaciones que cambian sus dietas en algunos periodos del año de individuos con dietas relativamente constantes. De acuerdo a los AIE, *C. nigrofumosus* es la especie que ingiere alimentos más enriquecidos en ^{13}C , tiene un nicho isotópico estrecho y no presenta variaciones en la composición isotópica de sus tejidos, por lo que mantendría una dieta marina constante a lo largo del año. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en esta especie concuerda con lo reportado anteriormente ya que es un ave especialista y habitante de las costas marinas (Couve et al., 2016) y que se alimenta principalmente de invertebrados bentónicos, tales como moluscos y crustáceos (Sabat et al., 2006). En las zonas intermareales los productores (algas) tienden a presentar mayores valores de $\delta^{13}\text{C}$, luego estos son consumidos por invertebrados marinos y estos a su vez por otras especies del intermareal, conservando la marca isotópica de lo que consumieron (Wang & Yeh, 2003; Martínez del Río et al., 2009).

A su vez, la diferencia en la composición isotópica entre la sangre y plumas de *C. oustaleti* dan cuenta de cambios estacionales en su dieta. Esta especie es migratoria altitudinal (Sabat & Martínez del Río, 2002) y los cambios en su dieta responderían a los cambios en la disponibilidad de recursos y a la variación en el uso de ambientes de alta y baja altitud (Newsome et al., 2015). La amplitud de nicho isotópico de esta especie es relativamente amplio, pero no es significativamente distinto del nicho isotópico de *C. fuscus*, quien por su parte no presentó variación isotópica entre los tejidos y su dieta está basada principalmente en recursos terrestres relativamente empobrecidos en ^{13}C (valores

de $\delta^{13}\text{C}$ más negativos). La amplitud de su nicho isotópico (ver Figura 1 y Tabla 3) estaría reflejando diferencias intraespecíficas en cuanto a la selección de recursos, dado que hay individuos que presentan una alta incorporación de fuentes marinas a su dieta. De acuerdo a diversos autores, *C. fuscus* habita las costas de Chile durante invierno y zonas de mayor altitud en épocas de verano (Simeone et al., 2008; Newsome et al., 2015; Couve et al., 2017). Previamente Bletzer (1997) determinó una dieta bentófaga para esta especie, luego Meerhoff et al. (2013) comprobaría que *C. fuscus* se alimenta de gastrópodos intermareales.

En resumen, y siguiendo la nomenclatura sugerida por Martínez del Río et al. (2009) los análisis de nicho isotópico revelan que *C. nigrofumosus* es la especie especialista isotópico y dietario, *C. oustaleti* es generalista isotópico y dietario y por último que *C. fuscus* es una especie especialista isotópico, pero generalista dietario.

Ajustes metabólicos asociados a la ingesta de sales

Diversos autores han determinado que la ingesta de sales representaría un costo energético significativo para las aves, limitando su distribución y colonización de los distintos ambientes (Nehls, 1996; Gutiérrez et al., 2011). Al mismo tiempo, el consumo de sales o productos con alta carga salina incrementaría las tasas metabólicas de los individuos (Gutiérrez et al., 2012; Peña-Villalobos et al., 2014). Sin embargo, es

importante considerar que existen diversos factores que influenciarían las tasas metabólicas, como la predictibilidad de recursos y el clima (e.g., temperatura y estacionalidad) (Tieleman & Williams, 2000; Tieleman et al., 2003; Cavieres & Sabat, 2008; Swanson, 2010). En este sentido el presente estudio difiere de los anteriores dado que nosotros estimamos la carga osmótica relativa a través de los datos isotópicos, lo que surge de la correlación entre la concentración de sales en el contenido estomacal y el $\delta^{13}\text{C}$ de ese contenido (Figura 3, Sabat & Martínez del Río, 2002). De esta manera, el presente estudio permite utilizar la marca isotópica de los tejidos para estimar el uso de recursos marinos/terrestres e indirectamente la carga osmótica a la cual están sometidos los animales.

Contrario a lo esperado, la mayor tasa metabólica (corregida por la masa) no está presente en la especie especialista marina. En efecto, la mayor BMRC fue encontrada en *C. oustaleti* la que exhibe una variación estacional significativa en el uso de recursos marinos (i.e., una diferencia entre tejidos, $\delta^{13}\text{C}_{\text{pluma}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{sangre}} = 4,4 \text{ ‰}$, comparado con el 0,2 y 0,3 presentado por *C. fuscus* y *C. nigrofumosus*, respectivamente). Además, el análisis de $\delta^2\text{H}$ en ambos tejidos revela que *C. oustaleti* es una especie que presenta una variación inter-tejidos importante, lo que no ocurre en las restantes especies. Estos resultados permiten inferir que las tres especies presentan estrategias migratorias altitudinales diferentes. Aplicando una corrección del 17% dada por la diferencias de los factores de discriminación tejido-específica de $\delta^2\text{H}$ entre pluma y músculo en *Cinclodes* (véase Newsome et al., 2015) y una tasa de caída altitudinal del $\delta^2\text{H}$ en las

precipitaciones de 8-10% / 500 m (Hardesty & Fraser, 2010), permiten estimar altitudes en la época de muda entre 2000 y 2500 m.s.n.m. para los individuos de *C. oustaleti* de la zona central de Chile. Estos valores se corresponden con lo encontrado previamente por Newsome et al. (2015). De esta manera, *C. oustaleti* presenta una migración altitudinal considerable, lo que conlleva un cambio de dieta terrestre a marina de manera estacional.

Entonces, los mayores niveles de gasto energético de reposo encontrados en *C. oustaleti* y menores en *C. nigrofumosus* y *C. fuscus*, podría explicarse por dos hipótesis no excluyentes. Primero el menor BMRc de la especie especialista marina *C. nigrofumosus* podría ser el resultado de ajustes fisiológicos en una escala evolutiva lo que permitiría compensar las demandas energéticas osmorregulatorias observadas en aves sometidas a un estrés osmótico agudo (i.e., aclimatación y carga salina; véase Gutierrez et al., 2012; Sabat et al., 2017). En paralelo, se ha documentado que los animales del centro de Chile pueden mostrar respuestas funcionales a ambientes áridos. Por ejemplo, las aves y los roedores de las zonas áridas poseen una menor pérdida de agua por evaporación, lo que se logra reduciendo la permeabilidad de la piel (Muñoz-García & Williams, 2005) pero además el poseer tasas metabólicas más bajas (Bozinovic & Contreras, 1990; Cortés et al., 2000; Sabat et al., 2006), las que se ven favorecidos en ambientes áridos porque la producción de calor endógeno es menor y por lo tanto los requerimientos de agua para el enfriamiento por evaporación se reducen (Maloney, 2008; Williams, 1996). En este sentido, para la mayoría de las aves y otros vertebrados terrestres, los ambientes marinos y salinos son esencialmente secos. Esto es así porque las aves en general solo disponen

de agua salada para beber, y casi todas las presas disponibles (especialmente invertebrados) están en equilibrio osmótico con el ambiente. De esta manera, el menor BMRC encontrado en *C. nigrofumosus* es probablemente una consecuencia de la explotación de presas cargadas de sal con altas cargas osmóticas, que, a su vez, pueden imponer la necesidad de la conservación del agua (véase Sabat et al., 2004b). Para el caso de *C. fuscus*, el consumo de presas mayoritariamente terrestres redundaría en una menor necesidad de conservación de agua y por lo tanto un relajo en las presiones selectivas por una tasa metabólica menor, lo que explicaría los valores intermedios de BMRC.

Alternativamente, los mayores valores de BMRC en *C. oustaleti* podría asociarse a su modo de vida generalista. Así, *C. oustaleti* presenta cambios estacionales en la carga osmótica de sus presas, la que es enfrentada mediante modificaciones plásticas de su fenotipo renal (Sabat et al., 2004a). Sin embargo, los cambios mediante aclimatación en la fisiología y la morfología pueden ser una tarea costosa, que a su vez puede aumentar las tasas metabólicas. Tales "costos de plasticidad fenotípica" (ver Pigliucci, 2001) pueden deberse a modificaciones en la masa de órganos y cambios en los niveles de enzimas y aumentos en las concentraciones séricas de hormonas tiroideas como se ha demostrado en aves (Krebs, 1950; Williams & Tieleman, 2000; Vezina & Williams, 2005; Swanson & Thomas, 2007; Sabat et al., 2017). Finalmente, los cambios estacionales en la dieta de *C. oustaleti*, evidenciados por el AIE también revela que esta especie presenta una migración altitudinal importante. En este sentido, se ha

documentado que aves migratorias poseen tasas metabólicas mayores que los no migratorios (Masero et al., 2017) después de corregir incluso por filogenia. (véase Figura 1, Jetz et al., 2008).

Estado oxidativo en aves silvestres

Beaulieu & Costantini (2014), sugieren que los vertebrados presentan respuestas especie-específicas frente al estrés hídrico. Por su parte, los invertebrados marinos también mostrarían respuestas diferenciales frente al estrés salino (Freire et al., 2011; Tremblay & Abele, 2015). Sin embargo, la capacidad de respuesta antioxidante de las especies de aves que utilizan diferentes proporciones de recursos salinos (marinos) ha sido poco explorada (Rainio et al., 2013). Uno de los objetivos de esta investigación fue determinar si existe una asociación entre el estado oxidativo y la función osmorregulatoria en especies de aves que utilizan diferencialmente recursos de ambientes costeros marinos y de agua dulce.

Nuestro estudio reveló una asociación negativa entre la actividad antioxidante del plasma y la carga salina a la que están sometidos. Específicamente, aquellas especies con mayor consumo de presas marinas (*C. nigrofumosus* y *C. oustaleti*) presentan baja capacidad antioxidante total (TAC), en comparación a *C. fuscus* que consumen presas más terrestres (i.e., empobrecidas en ^{13}C con valores más negativos de $\delta^{13}\text{C}$) y que

presentaron los mayores valores de TAC (Figura 2). Este patrón se ve apoyado además por el hecho de que al analizar los datos individuales en su conjunto (esto es agrupando todos los individuos de las tres especies) se da una correlación negativa entre los niveles de TAC en el plasma y la marca isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 3).

Las moléculas antioxidantes son sintetizadas (o consumidas) con el propósito de proteger al organismo, evitando que altos niveles de prooxidantes conduzcan al daño oxidativo (Costantini & Verhulst, 2009). En ese sentido, la ausencia de diferencias entre las especies en los valores de peroxidación lipídica del plasma más los resultados de capacidad antioxidante, revela que las tres especies estarían sometidas a diferentes niveles de prooxidantes, pero que los antioxidantes cumplirían su función compensatoria.

Estos resultados, sin embargo, difieren de lo esperado, ya que recientemente Sabat et al. (2017) documentaron que la aclimatación al consumo de sales incrementa las defensas antioxidantes, modificando así el estatus oxidativo del paseriforme *Zonotrichia capensis*. A partir de esto se esperaba encontrar altos valores de antioxidantes en *C. nigrofumosus*, la especie marina y niveles menores en las especies más generalistas. Sin embargo, esto supone que la respuesta a una aclimatación aguda (en el laboratorio) debiera ser similar, sino en magnitud al menos en el sentido del cambio, a la aclimatización o adaptación evolutiva a ciertas condiciones ambientales, en este caso, al consumo de sales.

Desde este punto de vista, *C. nigrofumosus* y *C. oustaleti* son especies especializadas en la utilización de recursos marinos, ya sea de forma constante o estacional. En el caso de *C. nigrofumosus*, adaptado a habitar zonas costeras, es que ha desarrollado una fisiología inusual dentro del orden Passeriformes, presentando grandes tamaños renales y una alta proporción de médula renal, lo que le permite concentrar la orina de una manera inusual en aves (Sabat, 2000). En paralelo esta especie presenta en términos comparativos, una baja pérdida de agua evaporativa (TEWL) lo que le permite lidiar con las altas cargas salinas y la deshidratación a la vez (Sabat et al., 2004b). Por otro lado, se ha encontrado una alta plasticidad fenotípica en la morfología y función de los riñones de *C. oustaleti*, presentando características similares a *C. nigrofumosus* al exponerse a altas cargas salinas (e.g., aumento en tamaño de riñones y proporción de médula renal; Sabat et al., 2004a). Esta habilidad facilitaría el movimiento estacional entre ambientes marinos y de agua fresca en esta especie (Martínez del Río et al., 2009) sin conferirle costos significativos desde el punto de vista del estrés salino. En este sentido, la mayor capacidad de evitar la deshidratación de *C. nigrofumosus* y de presentar ajustes fenotípicos en *C. oustaleti* podrían explicar el menor efecto de la carga salina en estas especies sobre la expresión de antioxidantes. En definitiva, debido a la menor capacidad de lidiar con una carga osmótica significativa en *C. fuscus*, proponemos que la inclusión de una baja proporción de presas marinas bastaría para producir una respuesta significativa en los niveles de estrés, lo que a su vez produciría un aumento en los niveles de antioxidantes totales. En este sentido, futuros estudios debieran incluir

experimentos de aclimatación aguda a diferentes niveles de carga osmótica en distintas especies de aves de modo de complementar los resultados de campo.

Por otro lado, los altos niveles de antioxidantes totales encontrados en *C. fuscus* podrían ser explicados por diferencias en la actividad metabólica de los tejidos (y su relación con la masa corporal) y/o a diferencias en la composición de la dieta. Es ampliamente conocido que la tasa metabólica masa-específica sigue una relación alométrica negativa con la masa corporal. Así, animales más pequeños consumen mayores volúmenes de oxígeno por unidad de gramo (Wang et al., 2011), teniendo mayor actividad metabólica a nivel celular que individuos de gran tamaño. Nuestros resultados muestran una asociación positiva y significativa entre los niveles de TAC y la tasa metabólica masa-específica (Figura 4). Si bien, la tasa metabólica masa-específica de *C. fuscus* no difiere de la de *C. oustaleti* (Tabla 4), esta sí podría implicar costos energéticos para la especie, los que podría contribuir a los mayores niveles de antioxidantes. A su vez, Buttemer et al. (2010) propone que el potencial de estrés oxidativo es mayor en animales con menor tamaño corporal, que en aquellos de gran tamaño. Esto debido a que la fuga de protones de la membrana mitocondrial (proton-leak) está inversamente relacionada con la masa corporal (Porter et al., 1996; Brand et al., 2003). La filtración de la membrana mitocondrial influye fuertemente en el gradiente de protones y, por lo tanto, en la tasa de formación de ROS y los niveles de antioxidantes.

Por otro lado, las dietas hiper-calóricas, es decir, con alto contenido proteico y de grasas (en particular aquellas con una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados),

incrementan el daño oxidativo y por lo tanto aumentan la capacidad antioxidante en aves (Alan & McWilliams, 2013). Bletzer (1997), y posteriormente Meerhoff et al. (2013) determinaron que *C. fuscus* se alimenta de invertebrados bentónicos, moluscos intermareales, pero principalmente de insectos. El contenido nutricional de estos últimos está compuesto principalmente de proteínas y grasas (Van Huis, 2011). Si bien, se ha descrito que todas las especies del género *Cinclodes* son insectívoras, es probable que *C. fuscus*, siendo el más terrestre, se alimente mayoritariamente de insectos en comparación a sus congéneres. Al mismo tiempo, es posible encontrar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) en insectos acuáticos, pero no en aquellos que son terrestres (Hixson et al., 2015). En este sentido, Twining et al. (2016) demostraron que aves en crecimiento suplementadas con este tipo de grasa presentan bajas tasas metabólicas. Esto sugiere que especies de aves con dietas más terrestres (pobres en LCPUFA) presentarían mayores tasas metabólicas. En esta tesis se encontró que *C. fuscus* es la especie más terrestre, dado por los valores más negativos en $\delta^{13}\text{C}$ en sus tejidos. Por lo tanto, su dieta estimularía un aumento en sus tasas metabólicas, lo que incrementaría la formación de ROS, y por consiguiente los niveles de TAC.

Por último, podría argumentarse que las diferencias interespecíficas en caracteres fisiológicos, y/o morfológicos asociadas al consumo de presas marinas podrían ser el resultado o ser afectados por el origen filogenético. Sin embargo, este efecto podría verse minimizado toda vez que se han comparado especies cuyas diferencias ecológicas son claras y evidentes (véase Schmidt-Nielsen, 1997; Sabat et al., 2006), que además son

filogenéticamente cercanas (e.g., congénicas) y representarían un ejemplo de radiación adaptativa mediada por las características osmorregulatorias (Sabat et al., 2006).

En resumen, los resultados obtenidos para las especies de aves de este estudio evidenciarían que la función osmorregulatoria, dada por el consumo de recursos marinos, no influiría de una manera simple o predecible sobre los niveles de antioxidantes totales. Por otro lado, se sugiere que existen diferencias interespecíficas en cuanto a resistencia al estrés oxidativo y probablemente en la respuesta inmediata al consumo de sales.

Además y debido a que los distintos tejidos pueden mostrar respuestas diferentes a los factores que regulan los antioxidantes, futuros estudios debieran en lo posible aumentar el número de tejidos o fluidos, tales como orina y fecas. Además se debiera incorporar una aproximación que incluya la evaluación de distintos indicadores de estrés oxidativo a la vez, lo que permitiría acercarnos de una mejor manera a la respuesta integrada del estado oxidativo en aves.

Finalmente, y en su conjunto, la discrepancia entre el presente estudio y los que han abordado el efecto de consumo de sales sobre el estrés oxidativo en aves (i.e., Sabat et al., 2017), puede revelar una diferencia substancial entre el análisis a nivel intraespecífico (o de aclimatación) y a un nivel inter-específico (adaptación evolutiva). La disparidad entre estos dos niveles de análisis refleja nuestro pobre entendimiento de

cómo la necesidad de eliminar sales y conservar agua influye en los niveles de estrés oxidativo en aves.

CONCLUSIONES

Los análisis de isótopos estables en sangre y plumas permitieron discriminar individuos/poblaciones que cambian sus dietas de manera estacional de aquellas que las mantienen relativamente constantes. Los valores isotópicos de sangre y pluma sugieren un uso diferencial de los recursos en respuesta a los requerimientos nutricionales y a las variaciones ambientales experimentadas por cada especie, siendo *C. oustaleti* la especie más generalista y *C. nigrofumosus* el especialista marino.

Contrario a lo reportado a un nivel intraespecífico, los niveles de gasto de energía entre las especies de *Cinclodes* no parecen responder de manera directa al consumo de recursos marinos. Aparentemente, los menores niveles de BMRc observados en la especie marina se atribuirían a la necesidad de disminuir la producción endógena de calor y así conservar agua. Al mismo tiempo, la estacionalidad en el uso de estos ambientes, así como el esfuerzo energético que supone la migración, podrían explicar las diferencias en las tasas de gasto de energía en *Cinclodes*.

Los aportes realizados por este estudio evidenciarían que la función osmorregulatoria, dada por el consumo de recursos marinos, no influiría de una manera simple o

predecible sobre los niveles de gasto de energía y del estado oxidativo en *Cinclodes*. Por otro lado, se sugiere que existen diferencias interespecíficas en cuanto a resistencia al estrés oxidativo y probablemente en la respuesta inmediata al consumo de sales. Además la ausencia de diferencias entre especies en los valores de peroxidación lipídica del plasma más los resultados de capacidad antioxidante, revelan que las tres especies estarían sometidas a diferentes niveles de prooxidantes, pero que los antioxidantes cumplirían su función compensatoria.

Finalmente, el contraste entre los resultados encontrados a niveles de análisis intra e inter específico requiere de futuros esfuerzos de investigación para un mejor entendimiento de cómo las restricciones fisiológicas pueden explicar los patrones ecológicos de uso de recursos y hábitat marinos en aves.

BIBLIOGRAFÍA

- Apak, R., Gülclüç, K. G., Özyürek, M. y S.E. Karademir. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 7970-7981.
- Alan, R. y S. McWilliams. 2013. Oxidative stress, circulating antioxidants and dietary preferences in songbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 164: 185-193.
- Bearhop, S., Adams, C., Waldron, S., Fuller, R. y H. Macleod. 2004. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *J Anim Ecol* 73:1007–1012.
- Beaulieu, M., y Costantini, D. 2014. Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*, 2(1), cou014.
- Bletzer, A. 1997. *Cinclodes fuscus* (Aves: Furnariidae) A benthophagus bird in the Parana River Floodplain, Argentina. *Natura Neotropicalis* 28(2): 85 – 93.
- Bozinovic, F. y L. C. Contreras. 1990. Basal rate of metabolism and temperature regulation of 2 deserte herbivorous Octodontid Rodents, *Octomys mimax* and *Tympanoctomys barrerae*. *Oecologia.* 84:567-570.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L. y Hulbert, A.J. 2003. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochemical Journal.* 376: 741–748.
- Buttemer, W., Abele, D. y D. Costantini. 2010. From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology.* 24: 971-983.
- Cavieres, G. y P. Sabat. 2008. Geographic variation in the response to thermal acclimation in rufous-collared sparrows: are physiological flexibility and environmental heterogeneity correlated?. *Functional Ecology.* 22: 509-515.
- Cortes, A., M. Rosenmann y F. Bozinovic. 2000. Water economy in rodents: evaporative water loss and metabolic water production. *Revista Chilena de Historia Natural.* 73:311-321.

Costantini, D. y Verhulst, S. 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress?. *Functional Ecology*. 23(3): 506-509.

Couve, E., Vidal, C. F. y J. Ruiz. 2016. *Aves de Chile sus Islas Oceánicas y Península Antártica*. FS Editorial. Chile.

Dowling, D. K. y L. W. Simmons. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life history evolution. *Proc. Roy. Soc. B* 276: 1737–1745.

Freire, C. A., Togni, V. G. y M. Hermes-Lima. 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 160, 291-300.

Goldstein, D. L. y E. Skadhauge. 2000. Renal and extrarenal regulation of body fluid composition. In: Whittow, G.C. (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press, San Diego, pp. 265–297.

Gutiérrez, J. S. 2014. Living in environments with contrasting salinities: a review of physiological and behavioural responses in waterbirds. *Ardeola* 61: 233-256

Gutiérrez, J. S., Abad-Gómez, J. M., Sánchez-Guzmán, J. M., Navedo, J. G. y J. A. Masero. 2012. Avian BMR in Marine and Non-Marine Habitats: A Test Using Shorebirds. *PLoS ONE* 7(7): e42206.

Gutiérrez, J. S., Masero, J. A., Abad-Gómez, J. M., Villegas, A. y J. M. Sánchez-Guzmán. 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. *J Exp Biol* 214: 829–835.

Halliwell, B. H. y J. M. C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn Oxford University Press, Oxford.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp

Hardesty, J. L. y K. C. Fraser. 2010. Using deuterium to examine altitudinal migration by Andean birds. *Journal of Field Ornithology*. 83(1): 83–91.

Hixson, S. M., Sharma, B., Kainz, M. J., Wacker, A. y Arts, M. T. 2015. Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: A fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Environ Rev.* 23(4): 414–424.

Hobson, K. y R. Clark. 1992. Assessing avian diets using stable isotopes: I. Turnover of ^{13}C in tissues. *Condor* 94:181–188.

Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A.C. y Bearhop, S. 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER—Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *J Anim Ecol* 80:595–602

Jetz, W., Freckleton, R. P. y A. E. McKechnie. 2008. Environment, Migratory Tendency, Phylogeny and Basal Metabolic Rate in Birds. *PLOS ONE* 3(9): e3261.

Jorge, R., Tabilo-Valdivieso, E. y V. Mondaca. 1998. Avifauna de la bahía de Coquimbo, Chile. *Boletín Chileno de Ornitología (Chile)* 5: 2-9.

Krebs, H. A. 1950. Body size and tissue respiration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 249–269.

Layman, C., Arrington, D. A., Montaña, C. y D. Post. 2007. Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology* 88:42–48.

Lighton, J. R. B. 2008. *Measuring Metabolic Rates: a Manual for Scientists*. Oxford: Oxford University Press.

Maloney, S. K. 2008. Thermoregulation in ratites: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48:1293-1301.

Martínez-Álvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Morales, A. E., García-Gallego, M. y A. Sanz. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 205, 3699–3706.

Martínez del Río, C., Sabat, P., Anderson-Sprecher, R. y S. Gonzalez. 2009. Dietary and isotopic specialization: the isotopic niche of three *Cinclodes* ovenbirds. *Oecologia* 161:149–159.

Masero, J., Abad-Gómez, J. M., Gutiérrez, J. S., Santiago-Quesada, F., Senner, N. R., Sánchez-Guzmán, J. M., Piersma, T., Schroeder, J., Amat, J. A. y Villegas, A. 2017. Wetland salinity induces sex-dependent carry-over effects on the individual performance of a long-distance migrant. *Scientific Reports*.

Meerhoff, E. I., Rodríguez-Gallego, L. R. y S. Claramunt. 2013. Dieta de ocho especies de aves costeras en la barra de laguna de Rocha, Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 22(1): 12-22.

Monaghan, P., Metcalfe, N. B. y R. Torres. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 12, 75-92.

Nehls, G. 1996. Low costs of salt turnover in common eiders *Somateria mollissima*. *Ardea* 84, 23–30.

Muñoz-García, A. y J. B. Williams. 2005. Cutaneous water loss and lipids of the stratum corneum in house sparrows *Passer domesticus* from arid and mesic environments. *Journal of Experimental Biology*. 208:3689–3700.

Newsome, S. D., Sabat, P., Wolf, N., Rader, J. A. y C. Martínez del Río. 2015. Multi-tissue $\delta^2\text{H}$ analysis reveals altitudinal migration and tissue-specific discrimination patterns in *Cinclodes*. *Ecosphere* 6: 1–18.

Ohkawa, H., Ohishi, N. y K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 351–358.

Pamplona, R. y Costantini, D. 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301: 843–863.

Parnell, A. C., Inger, R., Bearhop, S. y A. L. Jackson. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS ONE* 5:e9672.

Peña-Villalobos, I., Valdés-Ferranty, F., y Sabat, P. 2013. Osmoregulatory and metabolic costs of salt excretion in the rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis*. *Comp. Biochem. A Physiol.* 164, 314–318.

Pigliucci, M. 2001. *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Porter, R. K., Hulbert, A. J. y Brand, M. D. 1996. Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *American Journal of Physiology*. 271: 1550–1560.

R Development Core Team. 2012. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich.

Rainio, M. J., Kanerva, M., Salminen, J. P., Nikinmaa, M. y Eeva, T. 2013. Oxidative status in nestlings of three small passerine species exposed to metal pollution. *Sci. Tot. Environ.* 454, 466–473.

Sabat, P. 2000. Birds in marine and saline environments: living in dry habitats. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 401–410.

Sabat, P. & Martínez del Río, C. 2002. Inter- and intra-specific variation in the use of marine food resources by three *Cinclodes* (Furnariidae, Aves) species: carbon isotopes and osmoregulatory physiology. *Zoology* 105:247–256.

Sabat, P., Maldonado, K., Rivera-Hutinel, A. y Farfan, G. 2004a. Coping with salt without salt-glands: osmoregulatory plasticity in three species of coastal songbirds (ovenbirds) of the genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *J Comp Physiol B* 174:415–420.

Sabat, P., Nespolo, R. y Bozinovic, F., 2004b. Water economy of three *Cinclodes* (Furnariidae) species inhabiting marine and freshwater ecosystems. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77, 219-225.

Sabat, P., Maldonado, K., Canals, M. y Martínez del Río, C. 2006. Osmoregulation and adaptive radiation in the ovenbird genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *Funct. Ecol.* 20:799–805.

Sabat, P., Narvaez, C., Pena-Villalobos, I., Contreras, C., Maldonado, K., Sanchez-Hernandez, JC., Newsome, SD., Nespolo, R. y Bozinovic, F. 2017. Coping with Salt Water Habitats: Metabolic and Oxidative Responses to Salt Intake in the Rufous-Collared Sparrow. *Front. Physiol.* 8:654.

Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press.

Schmidt, S. N., Olden, J. L, Solomon, C. T. y Vander Zanden, M. J. 2007 Quantitative approaches to the analysis of stable isotope foodweb data. *Ecology* 88:2793–2802.

Selman, C., Grune, T., Stolzing, A., Jakstadt, M., McLaren, J.S y Speakman J.R. 2002. The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis*. *Free Radic. Biol. Med.* 33:259–265.

Shoemaker, V. 1972 Osmoregulation and excretion in birds. In:Farner DS, King J, Parkes K (eds).*Avian biology*. Academic, New York.

Sielfeld, W., Amado, N., Herreros, J., Peredo, R. y Rebolledo, A. 1996. La avifauna del salar de Huasco: I Región, Chile. *Boletín Chileno de Ornitología (Chile)* 3: 17-24.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31–38.

Simeone, A., E Oviedo, M Bernal y M Flores. 2008. Las aves del Humedal de Mantagua: riqueza de especies, amenazas y necesidades de conservación. *Boletín Chileno de Orni- tología* 14: 22–35.

Swanson, D. L. 2010. Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. *Curr Ornithol* 17: 75-129.

- Swanson, D. L. y Thomas, N. E. 2007. The relationship of plasma indicators of lipid metabolism and muscle damage to overnight temperature in winteracclimatized small birds. *J. Comp. Physiol. A* 146, 87-94.
- Tieleman, B. I. y J. B. Williams. 2000. The adjustment of avian metabolic rates and water fluxes to desert environments. *Physiol Biochem Zool* 73: 461-479.
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., Buschur, M. E. y C. R. Brown. 2003. Phenotypic variation of larks along an aridity gradient: are desert birds more flexible? *Ecology* 84:1800-1815.
- Tremblay, N. y Abele, D. 2016. Response of three krill species to hypoxia and warming: an experimental approach to oxygen minimum zones expansion in coastal ecosystems. *Marine Ecol.* 37: 179-199.
- Twining, C. W., et al. 2016. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid support aerial insectivore performance more than food quantity. *Proc Natl Acad Sci.* 113: 10920-10925.
- van de Crommenacker, J. N., P. C. Horrocks, M. A. Versteegh, J. Komdeur, B. I. Tieleman y K. D. Matson. 2010. Effects of immune supplementation and immune challenge on oxidative status and physiology in a model bird: implications for ecologists. *J of Exp. Biol.* 213: 3527-3535.
- Van Huis, A. 2011. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*, 58(1).
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. V. M. y Freitas, R. 2016. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Sci. Total Environ.* 566-567, 260-268.
- Vezina, F. y 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*, 19, 119-128.
- Wang, W. y Yeh, H. 2003. $\delta^{13}\text{C}$ values of marine macroalgae from Taiwan. *Bot Bull Acad Sin* 44:107-112.
- Wang, Z., Bosy-Westphal, A., Schautz, B., y Müller, M. 2011. Mechanistic model of mass-specific basal metabolic rate: evaluation in healthy young adults. *International Journal of Body Composition Research.* 9(4): 147-.
- Williams, J. B. 1996. A phylogenetic perspective of evaporative water loss in birds. *Auk* 113, 457-472.

Williams, J. B. y Tieleman, B. I. 2000. Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among Hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 203, 3153– 3159.