

UCH-FC
MA6-B
P 349
C.1



**PLASTICIDAD EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS
CITRATO SINTASA Y CITOCROMO C OXIDASA Y SU
RELACIÓN CON LAS CAPACIDADES ENERGÉTICAS DE
ZONOTRICHIA CAPENSIS.**

**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

ISAAC PEÑA VILLALOBOS

JULIO, 2013

DIRECTOR DE TESIS DR.: PABLO SABAT KIRKWOOD

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

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

ISAAC PEÑA VILLALOBOS

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 7 de Junio de 2013.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PABLO SABAT KIRKWOOD



COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE LA TESIS:

DR. CLAUDIO VELOSO IRIARTE

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Claudio Veloso Iriarte', written over a horizontal line.

DR. MAURICIO CANALS LAMBARRI

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mauricio Canals Lambarri', written over a horizontal line.



Isaac Peña Villalobos

Nació en Santiago, Chile en 1989. Manifestó desde su infancia un interés particular por conocer y comprender su entorno natural, en particular la fauna. El gusto creciente por la biología fue gratamente nutrido durante su escolaridad, permitiéndole ingresar en 2008 a la Universidad de Chile. En esta casa de estudios obtiene el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología en 2011. En el transcurso de esos años, se integra al laboratorio de Ecofisiología animal, en donde decide cursar el programa de Magíster en Ciencias Biológicas bajo la tutoría del Dr. Pablo Sabat.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, Pablo Sabat por su confianza, apoyo, conocimientos y por brindarme la oportunidad de ser parte de su laboratorio.

También agradezco a aquellas personas que me permitieron realizar este trabajo, desde quienes participaron activamente en él, hasta los amigos que me brindaron alguna palabra de apoyo.

En particular agradezco la ayuda directa e invaluable de Mónica Núñez, Karin Maldonado, Geraldine Vásquez, Fernanda Valdés, Andrés Sazo, Jean Pierre Abrileaut, Juan Salazar y Mario Villena, tanto en los terrenos como en el laboratorio. Y agradezco la ayuda y consejo de todos mis amigos, profesores y compañeros de la U, en particular del dulce apoyo de Carolina Moreno durante este proceso.

En forma muy especial, doy gracias a mis padres por su esfuerzo incansable del día a día, que junto con permitirme concretar este trabajo, ha sido un ejemplo motivador y un orgullo para mí.

Esta tesis de postgrado fue financiada gracias al FONDECYT N° 1120276

Índice de materias



1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Ajustes estacionales asociados a la termorregulación en aves.....	1
1.2 Ajustes estacionales en Passeriformes.....	2
1.3 Citrato sintasa (CS): actividad y función fisiológica.....	4
1.4 Citocromo C oxidasa (COX): actividad y función fisiológica.....	5
1.5 Citrato sintasa y citocromo C oxidasa en estudios de capacidad aeróbica.....	6
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivos generales.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	8
3 MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Captura de individuos.....	9
3.2 Determinación de Tasa Metabólica Basal (BMR).....	11
3.3 Determinación de conductancia térmica.....	12
3.4 Reactivos.....	12
3.5 Determinación de actividades enzimáticas.....	13
3.6 Preparación de extractos de tejido.....	14
3.7 Actividad de citocromo C oxidasa.....	14
3.8 Actividad de citrato sintasa.....	15
3.9 Determinación del porcentaje de lípidos del tejido muscular y hepático.....	15
3.10 Análisis estadístico.....	16
4 RESULTADOS	
4.1 Aclimatización estacional.....	18
4.2 Aclimatación térmica.....	26
5 DISCUSIÓN	
5.1 Aclimatización estacional.....	37
5.2 Aclimatación térmica.....	41
6 CONCLUSIÓN.....	46
7 REFERENCIAS	47

Lista de Tablas

Tabla 1	
Masas de los órganos de individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatizados estacionalmente.....	19
Tabla 2	
Masas de los órganos de individuos de <i>Z. capensis</i> Aclimatados térmicamente a 15 °C y 30°C.....	26
Tabla 3	
Porcentaje de lípidos presentes en tejido muscular e hígado de individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatados térmicamente.....	28

Lista de Figuras

Figura 1	
Actividades enzimáticas de CS y COX de músculo pectoral e hígado de individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatizados estacionalmente.....	22
Figura 2	
Comparación del BMR total, entre individuos de <i>Z. capensis</i> colectados en invierno y verano.....	23
Figura 3	
Comparación del BMR masa-específica, entre individuos de <i>Z. capensis</i> colectados en invierno y verano.....	24
Figura 4	
Regresión lineal entre el BMR masa-específica y la masa relativa del músculo pectoral, en individuos aclimatizados estacionalmente.....	25
Figura 5	
Asociación entre la masa corporal total y la masa relativa del músculo pectoral, en individuos aclimatizados estacionalmente.....	25
Figura 6	
Actividades enzimáticas de CS y COX, en individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatados térmicamente a 15 y 30°C.....	28
Figura 7	
Razones de actividad enzimática de CS y COX, en individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatados térmicamente a 15 y 30°C.....	30
Figura 8	
Comparación de la tasa metabólica basal total entre dos grupos de individuos aclimatados a 15 y 30°C	31
Figura 9	
Comparación de la tasa metabólica basal masa-específica entre dos grupos de individuos aclimatados a 15 y 30°C.....	32

Figura 10	Comparación de la conductancia térmica entre dos grupos de individuos aclimatados a 15 y 30°C.....	32
Figura 11	Regresión lineal entre el BMR total y la actividad total de CS en músculo pectoral de individuos aclimatados a 15 y 30°C.....	33
Figura 12	Regresión lineal entre el BMR total y la proporción CSp/CSe (actividad total) de <i>Z. capensis</i> aclimatados a 15 y 30°C.....	34
Figura 13	Regresión lineal entre el BMR total y la proporción CSp/CSe (por mg de proteína) de <i>Z. capensis</i> aclimatados a 15 y 30°C.....	34
Figura 14	Correlación simple entre la conductancia térmica y la proporción CSp/CSe (actividad total), de <i>Z. capensis</i> aclimatados a 15 y 30°C.....	35
Figura 15	Conductancia térmica en función de la actividad enzimática de CS (por mg de proteína) en un homogenizado de músculos de extremidades inferiores, en individuos de <i>Z. capensis</i> aclimatados a 15 y 30°C.....	35
Figura 16	Asociación entre la actividad enzimática de CS y COX, del músculo pectoral de <i>Z. capensis</i> aclimatados a 15 y 30°C.....	36

RESUMEN

Las aves son homeotermos endotermos, dado que son organismos que regulan su temperatura corporal a través de la producción de calor endógeno mediante el metabolismo aeróbico. Estos procesos de generación y regulación del calor pueden ser ajustados dependiendo de los requerimientos térmicos impuestos por el medio ambiente, sin embargo, se desconoce una respuesta universal en Passeriformes a la aclimatación térmica y a la aclimatización estacional. En este estudio se evaluó la relación entre parámetros morfológicos, energéticos y la actividad de enzimas metabólicas (citrato sintasa y citocromo C oxidasa), en respuesta a la aclimatación térmica y la aclimatización estacional en el paseriforme omnívoro *Zonotrichia capensis*. Nuestros resultados indican una ausencia de ajustes estacionales en las variables fisiológicas analizadas, sin embargo, en los experimentos de aclimatación térmica en condición sedentaria, se observaron ajustes metabólicos coherentes con una mayor generación y conservación de calor en individuos aclimatados a 15 °C en comparación con los aclimatados a 30 °C. Estos cambios fisiológicos fueron observados a nivel bioquímico y orgánico, siendo los músculos pectorales y de las extremidades inferiores, los principales tejidos con actividad oxidativa asociada a la generación de calor.

ABSTRACT



Birds are endotherms animals, as they are organisms that regulate body temperature through endogenous heat production by aerobic metabolism. These regulatory processes and heat generation can be adjusted depending on the thermal requirements imposed by the environment, however it is unknown a universal response in Passeriformes. In this study we evaluated the relationship between morphological parameters, energetic and metabolic enzyme activity (citrate synthase and cytochrome oxidase), in response to thermal acclimation and seasonal acclimatization in the omnivore passerine, *Zonotrichia capensis*. Our results indicate a lack of seasonal adjustments physiological variables analyzed, however, in experiments of thermal acclimation with sedentary condition, metabolic adjustments were observed which were consistent with increased heat generation and maintenance in individuals acclimatized at 15 ° C compared to those acclimated to 30 ° C. These physiological changes were observed also at biochemical and organismal level, with the pectoral muscles and lower extremities the principal tissues with oxidative activity associated with heat generation.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Ajustes estacionales asociados a la termorregulación en aves.

Debido a su condición de homeotermos endotermos, las aves mantienen y regulan su temperatura corporal a través de la generación de calor mediada por procesos metabólicos como conductuales (McNab 2002). Por ello, son capaces de ocupar extremos en las dimensiones térmicas del ambiente y sobrevivir en regiones con variaciones estacionales extremas de temperatura (Antinuchi et al. 2003). Los mecanismos que poseen las aves para la generación y conservación del calor corporal han recibido considerable atención. Se ha discutido, que el principal mecanismo termogénico en aves se produce por la actividad muscular mecánica (West et al. 1968) y no a través del metabolismo de grasa parda (*non-shivering thermogenesis*) como ocurre en mamíferos. Sin embargo, existe evidencia en estudios fisiológicos y moleculares de que algunas aves podrían generar calor mediante proteínas desacoplantes a nivel mitocondrial, un tipo de termogénesis no tiritante (Barré et al. 1985, Saarela &

Heldmaier 1987, Duchamp et al. 1989, Saarela et al. 1995, Eduardo 1998, Marjoniemi & Hohtola 2000).

Debido a los diferentes requerimientos energéticos para termorregular, las aves a menudo presentan ajustes en las capacidades fisiológicas entre estaciones contrastantes (Swanson 2010, Liknes & Swanson 2011). Por ejemplo, se ha documentado en diferentes ordenes, ajustes estacionales asociados a la producción y conservación del calor, con el objeto de incrementar la generación de éste en períodos invernales o en aclimatación térmica, por medio de: 1) cambios en la tasa metabólica basal (BMR) (Weathers & Caccamise 1978), 2) aumento de la masa corporal en invierno (Marjoniemi & Hohtola 2000), 3) disminución de la conductancia térmica (Novoa et al. 1994, Saarela et al. 1989), 4) hipertrofia muscular (Swanson 1991, O'Connor 1995b, Cooper 2002), y 5) incrementos de la actividad de enzimas indicadoras de la capacidad aeróbica, tales como citocromo C oxidasa (COX) y citrato sintasa (CS) (Vittoria & Marsh 1996, Dawson & Olson 2003, Zheng et al. 2008, Liknes & Swanson 2011).

1.2 Ajustes estacionales en Passeriformes

El orden de los Passeriformes posee más de la mitad de las especies de esta clase, presentando 45 familias con un amplio rango de características ecológicas y diversas adaptaciones tróficas (Sibley & Monroe 1990). Este grupo se caracteriza por su pequeño tamaño (Ridgely et al., 1989), aspecto que desfavorece la conservación de calor, dada la

alta relación superficie/volumen que poseen (Hill, 1979). Hace mas de tres décadas, Weathers & Caccamise (1978) sugirieron que aves pequeñas (masa corporal <200 g) deberían presentar incrementos invernales del BMR. Posteriormente, los cambios en las tasas de consumo de energía han sido asociados con un aumento en la tolerancia al frio (Weathers & Caccamise 1978, Swanson 1991, Cooper & Swanson 1994, Liknes & Swanson 1996, Liknes et al. 2002).

A pesar del conocimiento de los ajustes estacionales asociados con la tolerancia a ambientes fríos, no existe una respuesta universal de estas aves ante la necesidad de incrementar la generación y mantención del calor corporal en su ambiente natural (Liknes & Swanson 2011). Estas diferentes respuestas que se han observado ante cambios en los requerimientos termorregulatorios, podrían tener origen en la multiplicidad de factores presentes en el ambiente y en la conducta del animal.

Varios estudios han evaluado la presencia de plasticidad estacional en la actividad de enzimas indicadoras de la capacidad aeróbica en tejidos de Passeriformes. Debido a los mayores requerimientos de energía de las aves en períodos invernales o de baja temperatura, se ha predicho que las actividades de estas enzimas (e.g., COX y CS) deberían incrementar en *tandem* con los aumentos en el gasto energético (e.g., BMR), asociado a la mayor actividad termogénica requerida en estos períodos (Vézina et al. 2006, Zheng et al. 2008, Liknes & Swanson 2011). No obstante, se ha observado un apoyo mixto a la hipótesis de aclimatización enzimática, el que dependería de la especie, el tejido (e.g., músculos específicos e hígado) y las enzimas involucradas (Marsh & Dawson 1982, Yacoe & Dawson 1983, Carey et al. 1988, 1989, O'Connor 1995, Liknes

2005, Zheng et al. 2008, Swanson 2010, Liknes & Swanson 2011). Además, se ha reportado que la actividad de estas enzimas puede variar en función de la exigencia locomotora a la que está sometido el organismo. Así, aves que deben desplazarse grandes distancias para forrajear, migrar o que han sido sometidas a actividad locomotora sostenida (e.g., *Treadmill training*) poseen mayores actividades enzimáticas en la musculatura esquelética asociada a la locomoción (Lundgren & Kiessling 1985, Lundgren 1988, Stevens 2004). Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen estudios en los que se haya evaluado el efecto de la temperatura sobre los niveles de actividad enzimática en aves paseriformes bajo control sedentario. Esto último impide determinar con exactitud si es este factor el responsable de la variación estacional documentada. Debido a lo anterior, no es posible establecer la importancia relativa de los factores mencionados sobre las tasas de actividad enzimática metabólica en aves, sin realizar experimentos que comparen la respuesta enzimática a la aclimatación térmica, mediante experimentos con control sedentario (véase Saarela & Hohtola 2003).

1.3 Citrato sintasa (CS): actividad y función fisiológica.

A nivel celular, entre el 85 a 90% del oxígeno es consumido por las mitocondrias en la medida que se sintetizan moléculas de ATP (Shigenaga et al., 1994). Este proceso de respiración celular tiene lugar en tres fases consecutivas (i) oxidación de nutrientes generando el grupo acetilo del acetil-coenzima A (acetil-CoA), luego (ii) ocurre la

incorporación de esta molécula en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo del ácido cítrico o de Krebs) en donde sucede el proceso enzimático de descarboxilación oxidativa con acumulación de energía en los transportadores de electrones NADH y FADH₂. Posteriormente, la energía presente en los transportadores de electrones, (iii) permite la generación un gradiente electroquímico de protones, mediante la acción de una cadena transportadora presente en la membrana mitocondrial interna. Finalmente, este gradiente permite la actividad de la ATPsintasa la cual cataliza la síntesis de ATP (Nelson et al. 2004). La enzima citrato sintasa (CS), presente en la segunda etapa de la respiración celular, realiza el primer paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, catalizando la condensación de Acetil-CoA con oxaloacetato generando citrato (Nelson et al. 2004).

1.4 Citocromo C oxidasa (COX): actividad y función fisiológica.

La tercera fase de la respiración celular, ocurre en la cadena transportadora de electrones. Esta cadena, está constituida por una serie de enzimas y complejos enzimáticos ubicados en la membrana interna mitocondrial, definiéndose 4 complejos: I) NADH deshidrogenasa, II) Succinato deshidrogenasa, III) Ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa y IV) Citocromo C oxidasa (COX) (Nelson et al. 2004). Este último complejo, está constituido por 13 subunidades en mamíferos y entre 10-12 en aves (Kadenbach et al. 1991, Little et al. 2010). En él, tres son de origen mitocondrial y el resto está codificado en genes nucleares. Esta estructura particular, se asociaría a una

gran complejidad regulatoria, puesta en evidencia al considerar que organismos microscópicos (e.g. levaduras y bacterias), poseen menos de once subunidades, llegando incluso a prescindir de aquellas codificadas por genes nucleares (Ludwig et al., 2001). Este complejo enzimático es el último de la cadena respiratoria, y cataliza el transporte de electrones desde el citocromo C (molécula que se desplaza entre los complejos III y IV, como una proteína soluble) al oxígeno molecular, reduciéndolo a H₂O.

1.5 Citrato sintasa y citocromo C oxidasa en estudios de capacidad aeróbica.

Diversos estudios consideran la actividad de CS como un indicador de la capacidad aeróbica de los tejidos (Hochachka et al. 1988). De este modo la actividad de esta enzima es comúnmente usada como un índice de máxima capacidad oxidativa (Emmett & Hochachka 1981; Hochachka et al. 1988; Liknes & Swanson 2011). Al igual que con CS, la actividad enzimática de la citocromo C oxidasa ha sido, aunque en menor medida, utilizada como un indicador de la capacidad aeróbica celular en tejido muscular esquelético, presentando un aumento de su actividad en algunos casos de aclimatización invernal (Liu et al., 2008; Zheng et al., 2008, 2010) y aclimatación al frío en Galliformes y Passeriformes (Marjoniemi & Hohtola 2000; Zheng et al. 2013).

Como se mencionó, los estudios de aclimatación térmica y aclimatización estacional han demostrado la ausencia de una respuesta universal en la modificación de las actividades de estas enzimas metabólicas, presentándose diversas respuestas

dependiendo de la especie, el tejido y enzima analizada. En este sentido, el análisis de un factor específico sobre la actividad de estas enzimas, es dificultado por las múltiples variables que inciden sobre su regulación. Así, se conoce que estas enzimas pueden variar su actividad en función del ejercicio (Butler & Turner, 1988; Hammond et al., 2000), actividad migratoria (Marsh 1981, Lundgren & Kiessling 1985, 1986, 1988; Guglielmo et al., 2002), aclimatación térmica (Barré et al. 1987, Vittoria & Marsh 1996) y aclimatización estacional (Carey et al., 1989, O'Connor, 1995b, Liu et al., 2008, Zheng et al., 2008; 2010).

2 Hipótesis

Los mayores niveles de gasto de energía en aves en la temporada de invierno se asocian a la mayor capacidad termogénica de los órganos internos y la musculatura esquelética, como consecuencia de la disminución de la temperatura ambiente y las necesidades termorregulatorias. Esta mayor capacidad se puede obtener mediante el aumento de las actividades bioquímicas de los tejidos como del tamaño de los órganos.

2.1 Objetivos

2.2 *Objetivos generales*

Determinar la capacidad de aclimatación térmica de la actividad de enzimas metabólicas, y como esta actividad enzimática se asocia a variables fisiológicas relacionadas con la generación y conservación de calor en diferentes tejidos.

Evaluar el potencial efecto de la estacionalidad térmica sobre la actividad de enzimas asociadas al catabolismo energético, y su posible relación con otras variables energéticas relacionadas con la generación y conservación de calor.

2.3 *Objetivos específicos:*

1. Determinar la plasticidad fenotípica de la actividad de las enzimas citocromo C oxidasa y citrato sintasa en el músculo pectoral e hígado de *Zonotrichia capensis*, en verano e invierno
- .2. Determinar la plasticidad fenotípica de las enzimas citocromo C oxidasa y citrato sintasa en el músculo pectoral, músculo de extremidades inferiores e hígado de *Z. capensis*, sometidos a aclimatación térmica bajo control sedentario.

3. Examinar el efecto de la aclimatación y aclimatización, sobre el tamaño de los órganos internos (corazón, hígado, molleja e intestinos), la tasa metabólica basal y la conductancia térmica de *Z. capensis*.

4. Identificar la relación y efecto de las características morfológicas (tamaño de órganos) y bioquímicas (actividad enzimática) sobre la capacidad termogénica (BMR) de *Z. capensis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La especie utilizada, *Zonotrichia capensis* (Passeriforme: Emberizidae) resulta un buen modelo de estudio de la flexibilidad bioquímica y metabólica al menos por dos razones. Primero, se ha documentado una variación interanual en la estacionalidad de BMR en esta especie (Novoa et al. 2006 y Maldonado et al. 2009) y segundo, esta especie muestra una notable capacidad de aclimatación térmica de BMR, particularmente en las poblaciones con mayor variabilidad ambiental (véase Cavieres & Sabat 2008, Barceló et al. 2009 y Maldonado et al. 2009).

3.1 *Captura de individuos*

Zonotrichia capensis es un Passeriforme que se distribuye entre el sur de México y el Cabo de Hornos en Sudamérica (Goodall et al. 1946). En Chile, esta ave omnívora se

encuentra prácticamente en todos los ambientes, habitando desde desiertos a bosques y desde el nivel del mar hasta sobre los 4000 m.s.n.m. (Araya & Millie 2005). Los individuos fueron capturados en la Estación Agronómica Experimental de la Universidad de Chile "Germán Greve Silva", en el sector de Quebrada de la Plata (33°30'S, 70°54'W), Chile central, una localidad caracterizada por un clima mediterráneo con inviernos fríos y húmedos y veranos relativamente secos y cálidos (Di Castri & Hajek 1976).

Para el análisis estacional, 10 individuos fueron capturados en el mes de febrero y 10 en julio de 2012, entre las 9:00 y las 14:00 horas empleando redes niebla. Posterior a la captura, las aves fueron transportadas al Laboratorio de Ecofisiología Animal de la Universidad de Chile (33° 27'S, 70° 42' W) donde se realizaron las mediciones energéticas y posterior disección de tejidos y órganos, para las determinaciones de las masas de órganos y actividades enzimáticas.

Para el experimento de aclimatación térmica, se capturaron 19 individuos durante el mes de Mayo en la misma localidad y empleando el método ya señalado. Estas aves fueron transportadas al laboratorio de Ecofisiología animal en donde se mantuvieron durante un mes en jaulas individuales (24 x 24 x 24 cm), con un foto período L:D 12:12 a 25°C. Tras el período de aclimatación al cautiverio, las aves fueron dispuestas al azar en dos grupos experimentales, uno de ellos destinado a aclimatación térmica en condición sedentaria a 15°C (n=9) y otro a 30°C (n=10), ambos con el mismo régimen alimentario: alpiste, larvas de *Tenebrio molitor*, huevo y agua *ad libitum*. Esta condición se mantuvo por 6 semanas.

3.2 Determinación de Tasa Metabólica Basal (BMR).

Las mediciones de Tasa Metabólica Basal (BMR) de las aves procedentes del experimento de aclimatación y de las utilizadas en el análisis estacional, fueron realizadas en estado post absortivo, durante la fase inactiva y dentro de la zona termoneutral, empleando un sistema estándar de respirometría abierta. En este procedimiento, las aves fueron pesadas empleando una balanza electrónica Shimadzu AUX220 ($\pm 0,001$ g) y puestas en cámaras metabólicas de acero oscuras (2 L); luego ubicadas en una cabina con temperatura controlada (Sable Systems, Henderson, Nevada) a temperatura constante ($T_a = 30 \pm 0,5$ °C). La cámara metabólica recibió aire seco a 500 mL min^{-1} . El aire excurrente fue pasado a través de columnas de Driedite y Baralyme (gránulos absorbentes de CO_2) antes de pasar a través de un analizador de O_2 (modelo FoxBox, Sable System, Henderson, Nevada) calibrado con una mezcla de oxígeno (20%) y nitrógeno (80%) que fue certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las mediciones y protocolos de calibración se realizaron siguiendo a Williams & Tieleman (2000). Debido a que el vapor de agua y el CO_2 fueron eliminados antes de ingresar al analizador de O_2 , el consumo de oxígeno fue calculado como [Withers (1977: p 122)]: $\text{VO}_2 = [\text{FR} * 60 * (\text{F}_i \text{O}_2 - \text{F}_e \text{O}_2)] / (1 - \text{F}_i \text{O}_2)$, donde FR es la tasa de flujo en ml/min, y F_i y F_e son las concentraciones fraccionales de O_2 que ingresan y salen de la cámara metabólica, respectivamente. La señal originada en el analizador de oxígeno (%) y el

flujómetro fue digitalizada empleando el sistema Universal Interface II (Sable Systems) y fue registrado en un computador personal empleando el software de adquisición de datos EXPEDATA (Sable Systems). El intervalo de muestreo fue de 5 s. Las aves fueron mantenidas en las cámaras toda la noche hasta alcanzar la condición de reposo, la cual ocurre típicamente después de 6-8 horas para pequeñas aves (Page et al. 2011) incluyendo *Z. capensis* (Sabat et al 2010).

3.3 Determinación de conductancia térmica

Empleando el mismo procedimiento de la determinación de BMR, se midió la conductancia térmica de cada individuo. Para esto, se determinó el consumo de oxígeno de las aves a dos temperaturas, 15°C y 20°C (Sabat et al. 2006); durante 90 minutos en cada ocasión. Con estos datos se calculó la pendiente entre ambos valores, consistente en la tasa de consumo de oxígeno por incremento en cada grado de temperatura por gramo de masa corporal; luego los valores se expresaron en calorías/hora gramo utilizando el equivalente calórico del oxígeno de 4,82 cal por mL O₂.

3.4 Reactivos

Los reactivos químicos que se utilizaron para los ensayos de COX y CS fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Santiago, Chile) y son los siguientes:

Empleados en soluciones amortiguadoras: Fosfato de potasio monobásico, Fosfato de potasio dibásico, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris). Reactivos empleados en el ensayo enzimático: DL-Dithiothreitol (DTT), Citocromo C de corazón equino, Acetil Coenzima A, 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), ácido oxaloacético.

3.5 Determinación de actividades enzimáticas

Las determinaciones de actividad enzimática, se realizaron con homogenizados de tejidos muscular y hepático. Para ello, inmediatamente después de su sacrificio, se disectaron en hielo ambos músculos pectorales y supracoracoideos de cada ave junto con los principales músculos de ambas extremidades inferiores (iliotibialis cranialis, iliotibialis lateralis, iliofibularis, femorotibialis externus, fibularis longus, tibialis cranialis, extensor digitorum longus y complejo gastrocnemius) (Liknes & Swanson, 2011). Para los análisis se consideraron homogenizados de (1) pectoral/supracoracoideo,

(2) conjunto de músculos de las extremidades inferiores e (3) hígado. Los tejidos fueron almacenados a -80°C , en espera de la realización de los ensayos enzimáticos.

3.6 Preparación de extractos de tejido

Una porción de tejido a analizar fue diluida 10 veces en una solución amortiguadora (Buffer fosfato 0,1 M y EDTA 0,002 M). Luego, estas se homogeneizaron empleando un homogeneizador Ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel) a 20000 rpm. Para acceder a las proteínas presentes en la membrana mitocondrial interna, el homogeneizado resultante fue tratado con ultra sonido en un sonicador Sonics (Vibra cell) con una configuración de 20 segundos on, 30 segundos off y una amplitud del 40%, posteriormente se separó una fase acuosa de otra sólida empleando una centrífuga (Bodeco M-240R) a una temperatura de 4°C a 14000 rpm durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se colectó el sobrenadante, el cual se almacenó en hielo hasta la realización de los ensayos enzimáticos.

3.7 Actividad de citocromo C oxidasa

La actividad de la enzima citocromo C oxidasa fue determinada colorimétricamente a 550 nm de acuerdo a Berry & Trupower (1987). Los ensayos fueron realizados en un

volumen final de 200 μ l a 25°C, empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO, en un medio de reacción que contenía buffer enzima (Tris-HCl 10 mM pH=7, sacarosa 250 mM), buffer de ensayo (Tris-HCl 10 mM pH=7, NaCl 120 mM) y muestra. La reacción enzimática se inició tras agregar citocromo C reducido con DTT (Dithiothreitol).

3.8 Actividad de citrato sintasa

La actividad de citrato sintasa fue determinada colorimétricamente a 412 nm (Srere, 1969). Los ensayos fueron realizados en un volumen final de 200 μ l a 25°C, empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO, en un medio de reacción que contenía buffer Tris-HCl 0,1 M pH=8, oxaloacetato, DTNB y muestra. La reacción enzimática se inició tras agregar acetyl CoA.

3.9 Determinación del porcentaje de lípidos del tejido muscular y hepático

En aves del experimento de aclimatación térmica, se determinó la cantidad de agua presente en tejido pectoral, en una mezcla de músculos de las extremidades inferiores e hígado, por medio del cálculo de la diferencia de la masa de muestras húmedas y secadas en una estufa durante 7 días a 60°C. Estas muestras secadas, posteriormente

fueron molidas y desengrasadas durante una hora, utilizando un aparato de extracción (Soxhlet) empleando como solvente apolar, éter de petróleo. Finalmente, por medio de la diferencia en masa entre las muestras secas iniciales y posteriormente desengrasadas, se determinó el porcentaje de lípidos de los diferentes tejidos.

3.10 *Análisis estadístico*

Para comprobar si la distribución de los datos se ajustó a una distribución normal, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, seguida de la prueba de Lilliefors, además de la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas. En los casos que no se obtuvo normalidad de una variable (y), se empleó la transformación $\ln(y)$ o $\ln(y+1)$.

Antes de analizar las diferentes variables, se evaluó la relación entre la masa corporal de las aves y las variables fisiológicas. Cuando esta relación fue significativa, se obtuvieron los residuos de la regresión lineal y con estos se realizaron los análisis estadísticos. En cada tratamiento se evaluó la existencia de asociaciones entre variables relacionadas con la producción/conservación de energía térmica (BMR total, BMR masa específico y conductancia térmica) y la actividad enzimática (total, masa específica y por milígramo de proteína) de CS y COX de cada tejido a través de correlaciones simples y regresiones lineales. Además, para CS y COX se calcularon las proporciones; Actividad enzimática de músculos pectorales/ Actividad enzimática de músculos de extremidades inferiores (en adelante CSp/CSe y COXp/COXe, respectivamente), que posteriormente

fueron comparados entre los tratamientos experimentales y se realizaron análisis de correlación simple con el BMR (total y masa-específico) y la conductancia térmica. También se examinó la asociación entre las actividades de CS y COX en un mismo tejido, y se evaluó la asociación de cada una con el porcentaje de lípidos de cada tejido. Para comparar diferentes variables entre tratamientos de temperatura o estaciones, se empleó ANOVA de una vía y ANOVA de medidas repetidas. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados utilizando los programas Statistica 7.0 y SigmaPlot 11.0, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Aclimatización estacional

Nuestros resultados revelaron la presencia de cambios estacionales significativos en la masa húmeda y relativa (% de masa corporal) del intestino delgado, molleja y músculo pectoral. En el intestino delgado y molleja se encontró un incremento significativo durante el invierno, en cambio el aumento en el músculo pectoral se observó en verano. Las masas relativas de hígado, intestino grueso, cloaca, riñón y corazón no presentaron diferencias entre estaciones. En la tabla 1 se presentan los valores promedio de las masas húmedas de los órganos y las masas relativas a la masa corporal total, junto con el resultado del análisis comparativo entre estaciones mediante ANOVA de una vía.

Tabla 1: Resumen de las masas húmedas y relativas de los órganos de *Z. capensis* aclimatizados estacionalmente. MP= Músculo pectoral, EE= Error estándar.

Variables	Verano		Invierno		ANOVA		
	N	Promedio ± EE	N	Promedio ± EE	F	gl	p
Masa corporal total	10	18,614 ± 0,626	10	19,374 ± 0,576	0,798	1,18	0,383
Hígado	10	0,539 ± 0,036	10	0,635 ± 0,064	0,663	1,18	0,213
Intestino delgado	10	0,498 ± 0,028	10	0,638 ± 0,041	7,753	1,18	0,012
Intestino grueso	10	0,041 ± 0,005	10	0,14 ± 0,077	1,639	1,18	0,217
Cloaca	10	0,06 ± 0,006	10	0,074 ± 0,008	2,114	1,18	0,163
Riñón	10	0,251 ± 0,005	8	0,257 ± 0,009	0,400	1,16	0,536
Molleja	10	0,737 ± 0,030	10	0,948 ± 0,064	8,839	1,18	0,008
Corazón	10	0,23 ± 0,011	10	0,22 ± 0,015	0,298	1,18	0,592
MP	9	1,664 ± 0,119	10	1,271 ± 0,127	4,998	1,17	0,039
% Hígado	10	2,891 ± 0,163	10	3,26 ± 0,281	1,290	1,18	0,271
% I. Delgado	10	2,666 ± 0,107	10	3,292 ± 0,189	8,300	1,18	0,010
% I. Grueso	10	0,22 ± 0,022	10	0,678 ± 0,348	1,735	1,18	0,204
% Cloaca	10	0,319 ± 0,025	10	0,38 ± 0,037	1,864	1,18	0,189
% Riñón	10	1,354 ± 0,032	8	1,368 ± 0,039	0,083	1,16	0,777
% Molleja	10	3,969 ± 0,123	10	4,872 ± 0,265	9,040	1,18	0,008
% Corazón	10	1,24 ± 0,059	10	1,13 ± 0,054	1,902	1,18	0,185
% MP	9	9,087 ± 0,556	10	6,596 ± 0,650	8,297	1,17	0,010

No se encontraron diferencias estacionales en las actividades enzimáticas empleando ANOVA de medidas repetidas; actividad total de CS ($F_{(1,15)}=0,105$; $p=0,750$; $F_{(1,15)}=22,652$; $p=0,0002$; $F_{(1,15)}=0,543$, $p=0,473$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente), actividad masa específica de CS ($F_{(1,15)}=0,308$, $p=0,587$; $F_{(1,15)}=3,818$, $p=0,070$; $F_{(1,15)}=0,150$, $p=0,704$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente), actividad de CS estandarizada por mg de proteína ($F_{(1,15)}=0,807$, $p=0,383$; $F_{(1,15)}=0,046$, $p=0,834$; $F_{(1,15)}=0,787$, $p=0,389$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente), actividad total de COX ($F_{(1,14)}=0,008$, $p=0,928$; $F_{(1,14)}=11,526$, $p=0,004$; $F_{(1,14)}=0,232$, $p=0,637$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente) actividad masa específica de COX ($F_{(1,14)}=0,00001$, $p=0,997$; $F_{(1,14)}=0,998$, $p=0,335$; $F_{(1,14)}=1,457$, $p=0,247$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente) actividad de COX estandarizada por mg de proteína ($F_{(1,13)}=0,071$, $p=0,795$; $F_{(1,13)}=1,736$, $p=0,210$; $F_{(1,13)}=0,003$, $p=0,957$ entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente). En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas.

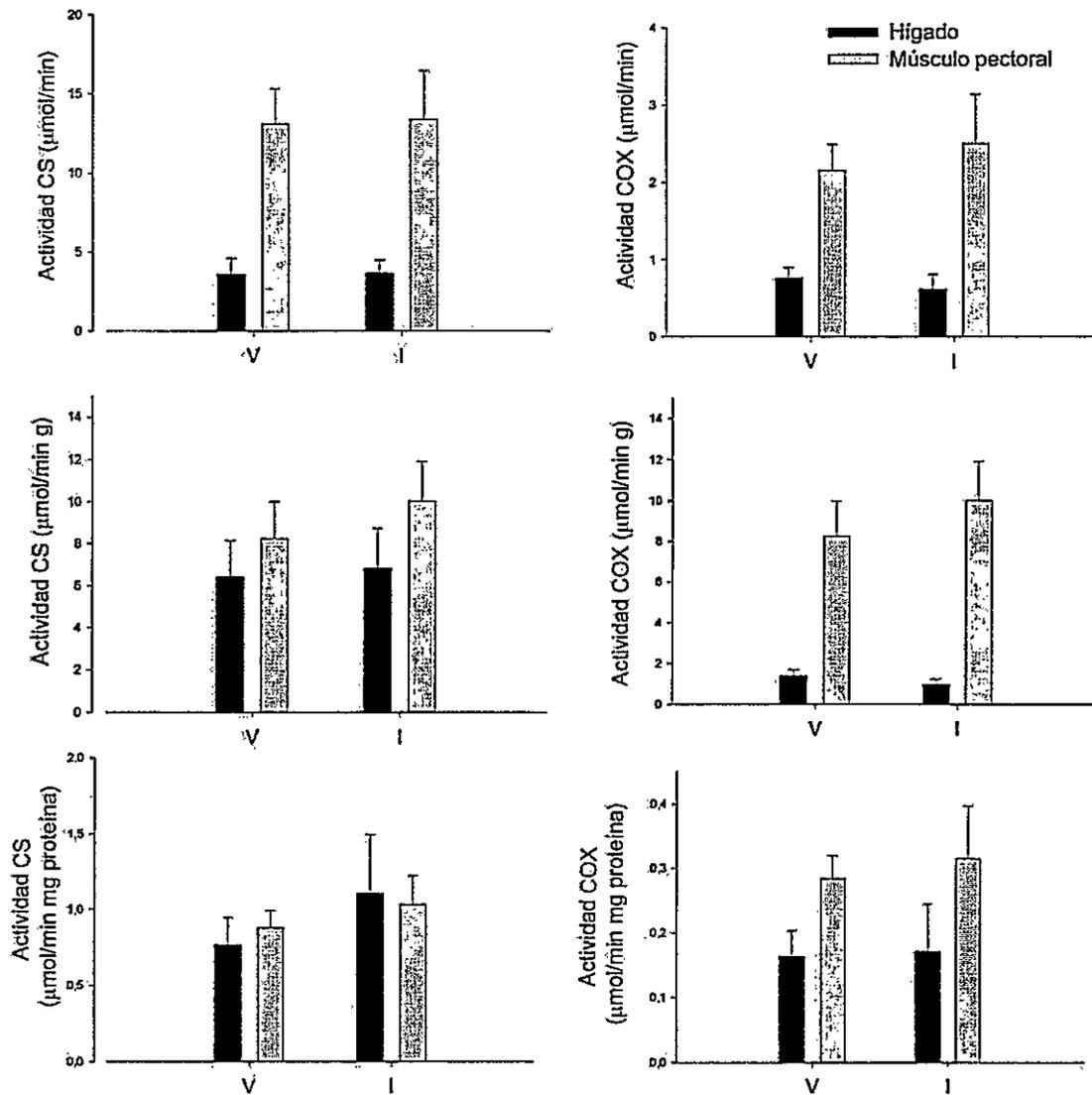


Figura 1: Actividades enzimáticas de citrato sintasa y citocromo C oxidasa del músculo pectoral e hígado de individuos de *Z. capensis* aclimatizados estacionalmente.

No se encontró un efecto significativo de la estación sobre el BMR total ($F_{(1,17)}= 3,285$; $p=0,087$; figura 2) ni sobre el BMR masa-específico ($F_{(1,17)}=3,578$; $p= 0,075$; figura 3). Tampoco se encontró diferencias estacionales en la conductancia térmica ($F_{(1,6)}= 0,116$; $p= 0,745$), ni asociación entre las actividades de COX y CS dentro de un mismo tejido.

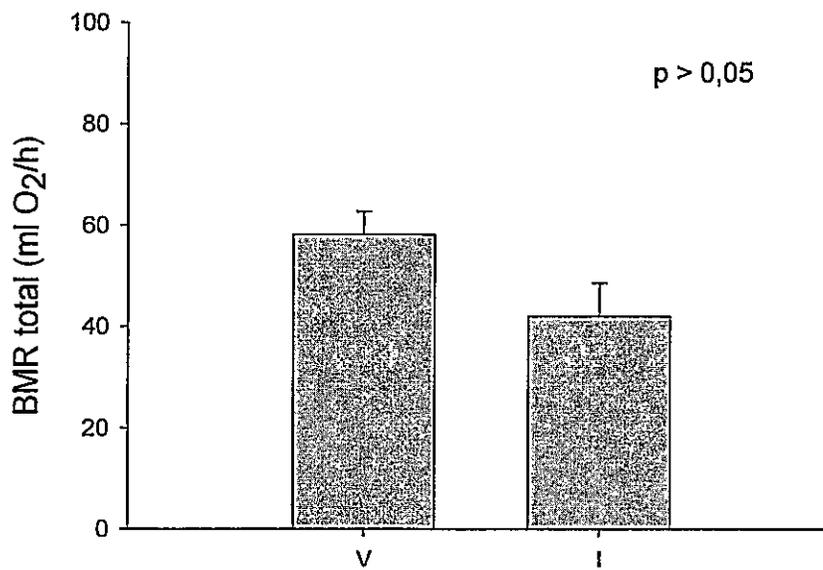


Figura 2: Comparación de la tasa metabólica basal total, entre individuos de *Z. capensis* colectados en invierno (I) y verano (V).

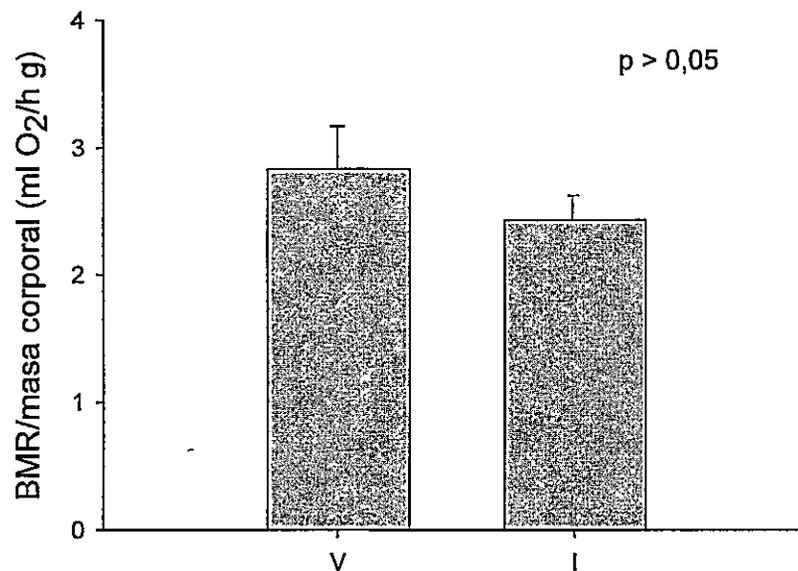


Figura 3: Comparación de la tasa metabólica basal masa-específica, entre individuos de *Z. capensis* colectados en invierno (I) y verano (V).

El análisis de regresión lineal reveló que la masa relativa (% de masa corporal) del músculo pectoral se asoció positivamente con el BMR masa-específico ($r^2=0,319$; $p=0,015$; figura 4), y negativamente con la masa corporal total ($r= -0,580$; $p= 0,009$; figura 5).

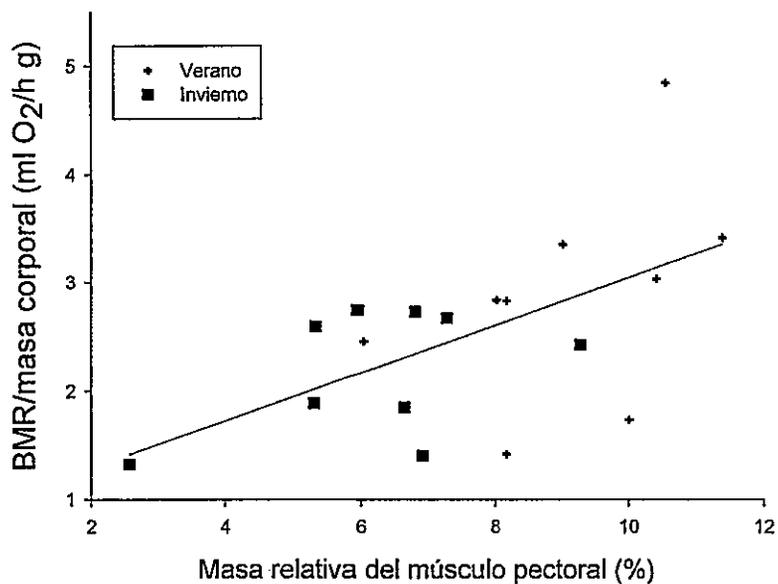


Figura 4: Regresión lineal entre la tasa metabólica masa-específica y la masa relativa del músculo pectoral (porcentaje de este con respecto a la masa corporal total), en individuos de *Z. capensis* aclimatizados estacionalmente.

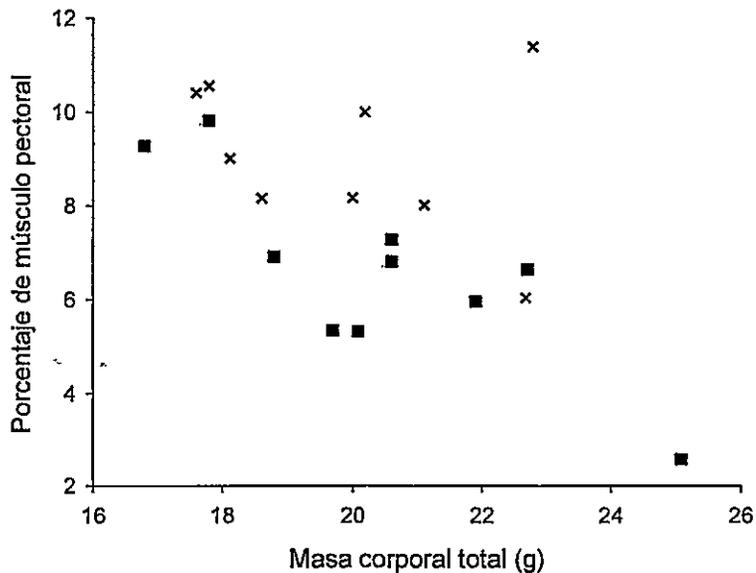


Figura 5: Asociación entre la masa corporal total y la masa relativa del músculo pectoral (porcentaje de este con respecto a la masa corporal total), en individuos de *Z. capensis* aclimatizados estacionalmente.

4.2 Aclimatación térmica

Luego de la aclimatación térmica, no se observaron diferencias en las masas húmedas de los órganos, ni en las masas relativas a la masa corporal total. La tabla 2 resume los valores promedios de cada órgano y los resultados de las comparaciones entre las aves aclimatadas a 15 °C y 30 °C.

Tabla 2: Resumen de las masas totales y relativas de los órganos de *Z. capensis* aclimatados térmicamente a 15 °C y 30 °C. MP= Músculo pectoral, EE= Error estándar.

Variables	30°C		15°C		ANOVA		
	N	promedio ± EE	N	promedio ± EE	F	gl	p
Masa corporal total	10	18,16 ± 0,501	9	17,822 ± 0,418	0,261	1,17	0,616
Hígado	10	0,61 ± 0,029	9	0,59 ± 0,035	0,186	1,17	0,672
Intestino delgado	10	0,615 ± 0,026	9	0,57 ± 0,045	0,877	1,17	0,362
Intestino grueso	10	0,05 ± 0,005	9	0,048 ± 0,004	0,084	1,17	0,775
Cloaca	10	0,081 ± 0,006	9	0,074 ± 0,007	0,627	1,17	0,439
Riñón	9	0,197 ± 0,008	8	0,214 ± 0,007	2,541	1,15	0,132
Molleja	10	0,714 ± 0,023	9	0,792 ± 0,048	2,248	1,17	0,152
Corazón	10	0,233 ± 0,009	9	0,262 ± 0,030	0,924	1,17	0,350
MP	10	1,755 ± 0,150	9	1,753 ± 0,085	<0,001	1,17	0,993
ME	10	1,343 ± 0,061	9	1,231 ± 0,080	1,273	1,17	0,275
% Hígado	10	3,359 ± 0,137	9	3,329 ± 0,212	0,058	1,17	0,812
% I. Delgado	10	3,405 ± 0,148	9	3,197 ± 0,235	0,586	1,17	0,454
% I. Grueso	10	0,276 ± 0,027	9	0,267 ± 0,021	0,067	1,17	0,799
% Cloaca	10	0,444 ± 0,025	9	0,413 ± 0,040	0,454	1,17	0,509
% Riñón	9	1,098 ± 0,038	8	1,186 ± 0,027	3,354	1,15	0,087
% Molleja	10	3,944 ± 0,108	9	4,444 ± 0,248	3,670	1,17	0,072
% Corazón	10	1,284 ± 0,030	9	1,485 ± 0,194	1,152	1,17	0,298
% MP	10	7,374 ± 0,177	9	6,871 ± 0,336	0,117	1,17	0,737
% ME	10	9,5711 ± 0,641	9	9,84 ± 0,425	1,858	1,17	0,190

A través de ANOVA de medidas repetidas, se observó interacción significativa entre los tratamientos y las actividades enzimáticas en la actividad enzimática total de CS ($F_{(1,17)}=1,705$, $p=0,209$; $F_{(2,34)}=33,184$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=5,062$, $p=0,012$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente) y diferencias significativas en la actividad enzimática del músculo pectoral (test *a posteriori* de Fisher $p=0,008$). También se identificó una interacción significativa entre los tratamientos y las actividades enzimáticas masa- específica de CS ($F_{(1,17)}=1,753$, $p=0,203$; $F_{(2,34)}=16,307$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=4,824$, $p=0,014$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente) y diferencias significativas en la actividad enzimática del músculo pectoral (test *a posteriori* de Fisher $p=0,007$). En el resto de las comparaciones no se encontraron diferencias significativas; actividad de CS estandarizada por mg de proteína ($F_{(1,17)}=0,213$, $p=0,650$; $F_{(2,34)}=16,339$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=1,296$, $p=0,287$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente), actividad total de COX ($F_{(1,17)}=1,813$, $p=0,196$; $F_{(2,34)}=72,486$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=1,732$, $p=0,192$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente), actividad masa específica de COX ($F_{(1,17)}=0,490$, $p=0,493$; $F_{(2,34)}=26,586$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=0,320$, $p=0,728$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente) y actividad de COX estandarizada por mg de proteína ($F_{(1,17)}=1,800$, $p=0,197$; $F_{(2,34)}=25,904$, $p<0,001$; $F_{(2,34)}=0,771$, $p=0,471$, entre tratamientos, tejidos y la interacción respectivamente). En la figura 6 se presentan los valores promedio de las actividades enzimáticas de COX y CS (total, masa-específica y estandarizada por milígramo de proteína) del músculo pectoral, músculo de las extremidades inferiores e hígado.

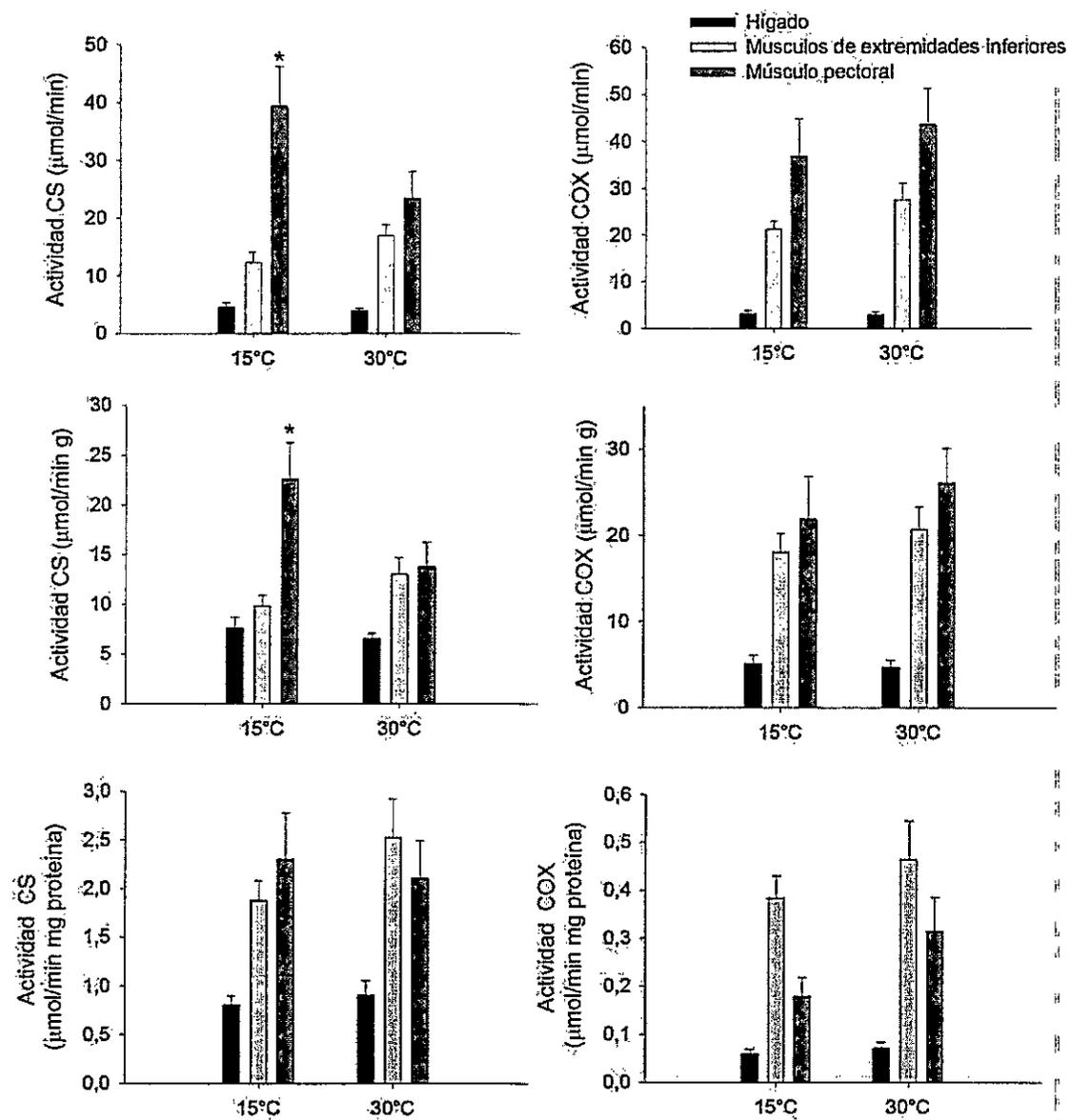


Figura 6. Actividades enzimáticas de CS y COX de tres tejidos diferentes, en individuos de *Z. capensis* aclimatados térmicamente a 15 y 30°C. El asterisco (*) indica $p < 0,05$.

Se encontró una variación significativa en la razón de actividades totales CSp/CSe entre ambos grupos experimentales, con un incremento de esta razón en las aves aclimatadas a 15°C ($F_{(1,17)}=13,093$, $p=0,002$) y en la razón de actividades masa-específica ($F_{(1,17)}=6,072$, $p=0,025$). Sin embargo, no se observaron diferencias en las razones de actividad enzimática de CS estandarizada por mg de proteína ($F_{(1,17)}=1,606$, $p=0,222$), ni en las razones de actividad de COX ($F_{(1,17)}=0,236$, $p=0,634$; $F_{(1,17)}=0,037$, $p=0,851$; $F_{(1,17)}=0,236$, $p=0,633$, en actividad total, masa-específica y estandarizada por mg de proteína respectivamente). En la figura 7 se presentan los valores promedio de las razones de actividad enzimática de COX y CS (total, masa-específica y estandarizada por milígramo de proteína). El porcentaje de lípidos presente en cada tejido, junto con el resultado del análisis comparativo entre tratamientos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de lípidos presentes en tejido muscular e hígado de individuos de *Z. capensis* aclimatados térmicamente. ME= músculos de extremidades inferiores, MP= músculo pectoral.

Variables	Tratamientos				ANOVA		
	n	30°C Promedio ± EE	n	15°C Promedio ± EE	F	gl	p
ME	8	7,345 ± 0,880	9	6,103 ± 1,462	0,497	1,15	0,492
Hígado	10	21,502 ± 2,372	9	17,669 ± 1,928	1,529	1,17	0,233
MP	10	11,992 ± 1,607	9	9,576 ± 1,873	0,969	1,17	0,339

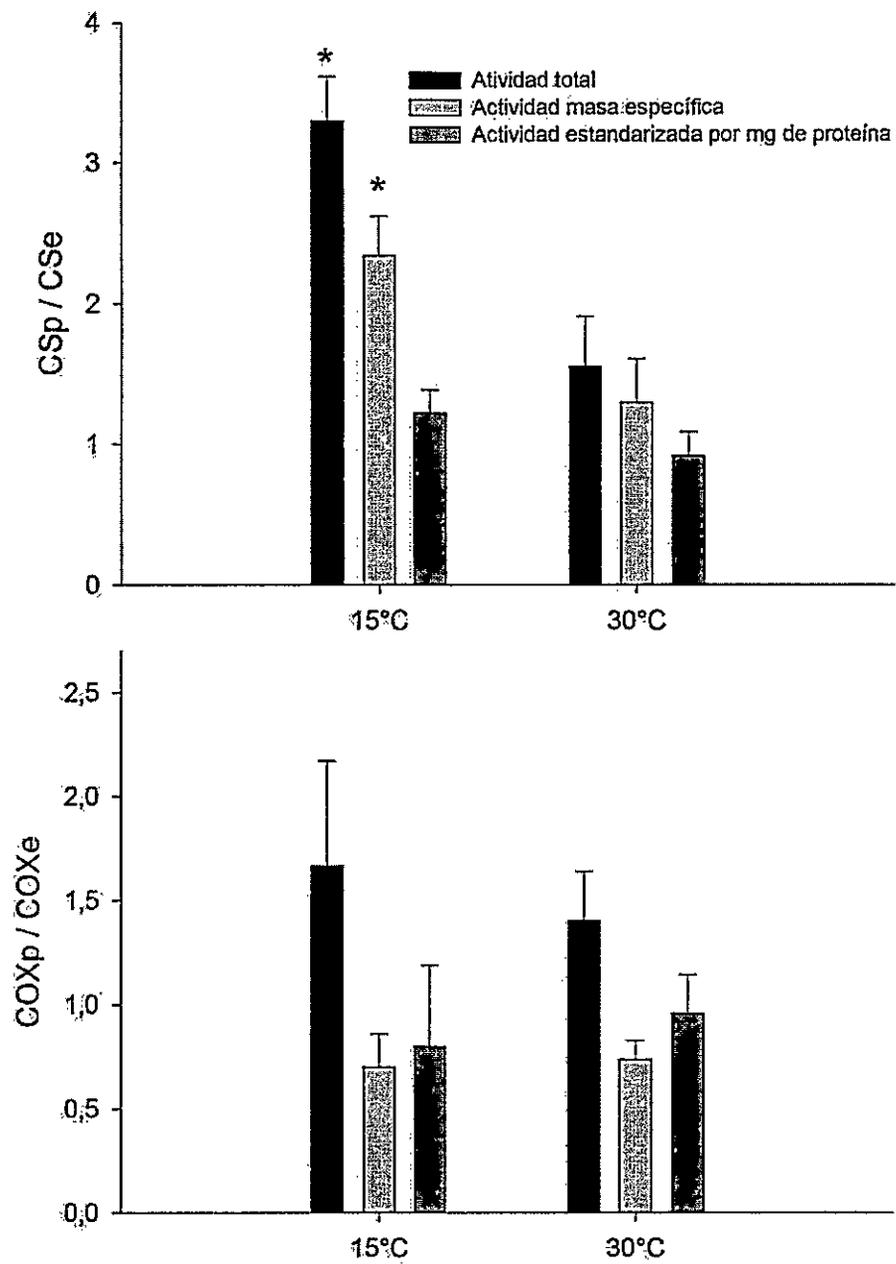


Figura 7. Razones de actividad enzimática entre músculo pectoral y músculos de extremidades inferiores de las enzimas CS y COX, en individuos de *Z. capensis* aclimatados térmicamente.

Luego del período de aclimatación, encontramos diferencias significativas en la tasa metabólica basal total ($F_{(1,17)}=9,516$; $p=0,007$; figura 8) y en BMR masa-específico ($F_{(1,17)}=7,226$; $p=0,016$; figura 9), presentándose en ambos casos un incremento en animales aclimatados a 15°C. Además, se determinó un aumento significativo de la conductancia térmica en los animales aclimatados a 30°C ($F_{(1,15)}=12,638$; $p=0,003$; figura 10).

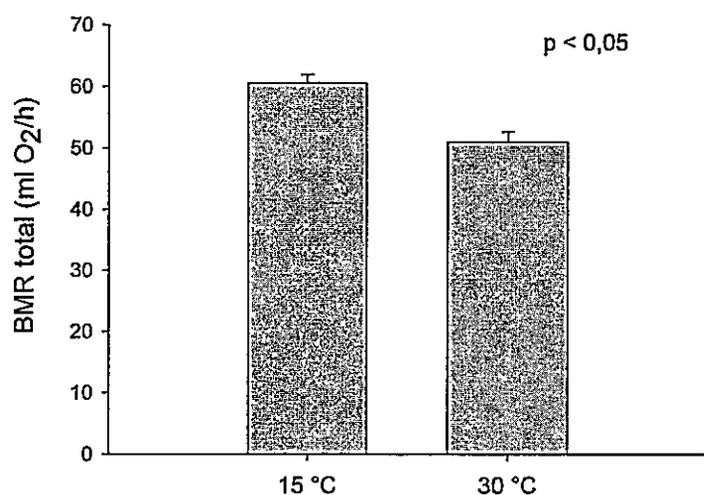


Figura 8: Comparación de la tasa metabólica basal total entre dos grupos de individuos de *Z. capensis*, aclimatados a 15 y 30°C durante seis semanas.

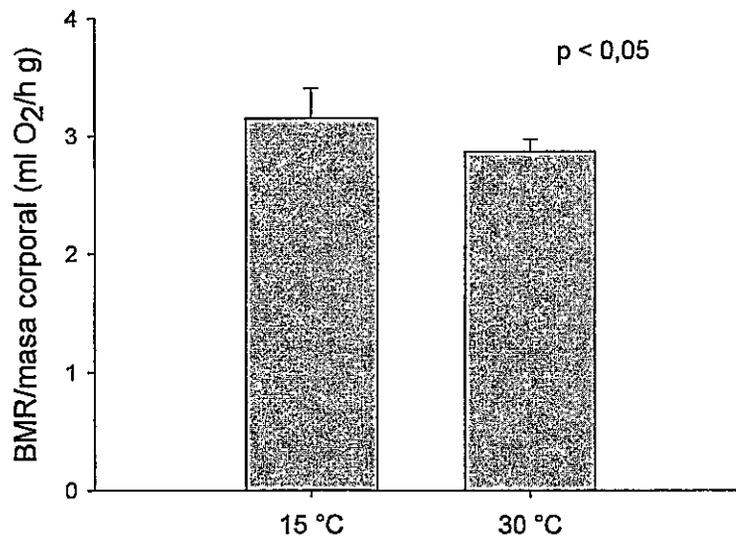


Figura 9: Comparación de la tasa metabólica basal masa-específica entre dos grupos de individuos de *Z. capensis*, aclimatados a 15 y 30°C durante seis semanas.

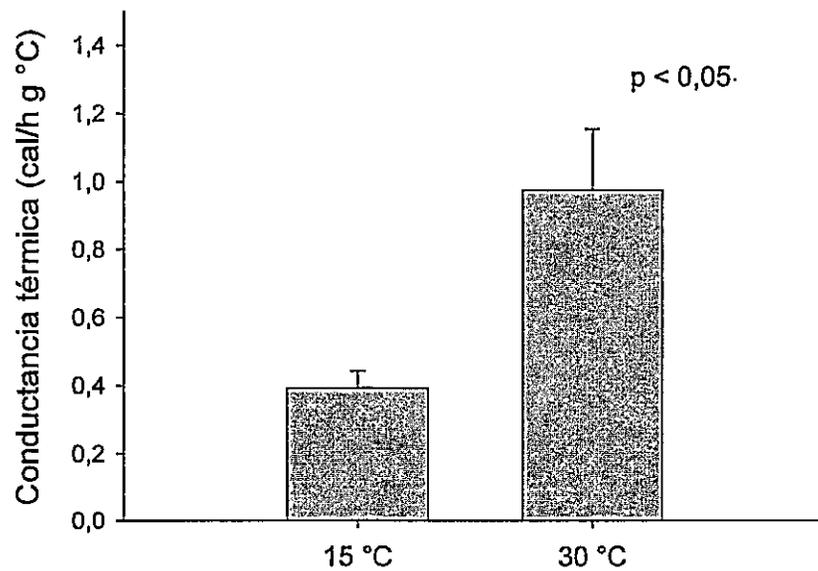


Figura 10: Comparación de la conductancia térmica entre dos grupos de individuos de *Z. capensis*, aclimatados a 15 y 30°C durante seis semanas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis de regresión lineal reveló que el BMR total se asoció positivamente con la actividad total de CS en el músculo pectoral ($r^2=0,217$; $p=0,044$; figura 11) y con la proporción CSp/CSe de actividades totales y estandarizada por milígramo de proteína ($r^2=0,290$; $p= 0,0174$; figura 12 y $r^2= 0,249$; $p=0,023$; figura 13, respectivamente). Además, se observó que la conductancia térmica se correlacionó negativamente con la razón de actividades totales CSp/CSe ($r=0,536$; $p=0,026$; figura 14), y se asoció positivamente con la actividad de CS estandarizada por milígramo de proteína de las extremidades inferiores ($r=0,516$; $p=0,034$; figura 15).

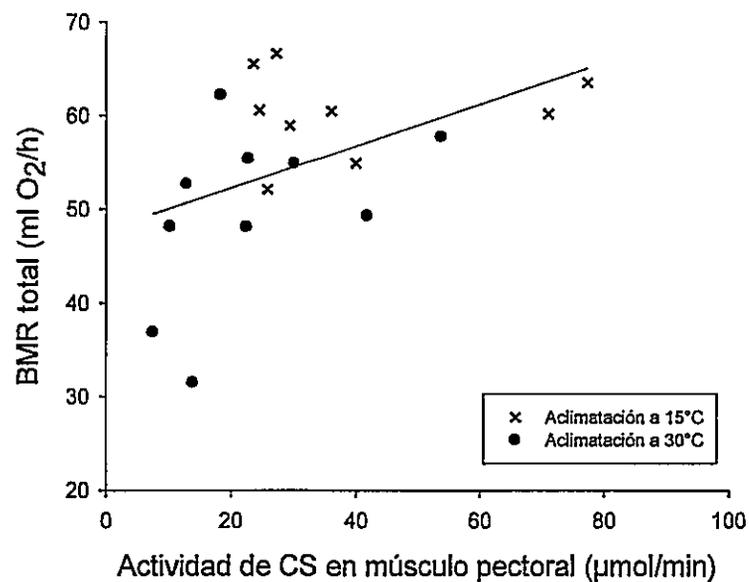


Figura 11: Regresión lineal entre la tasa metabólica basal total y la actividad total de CS en músculo pectoral de individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

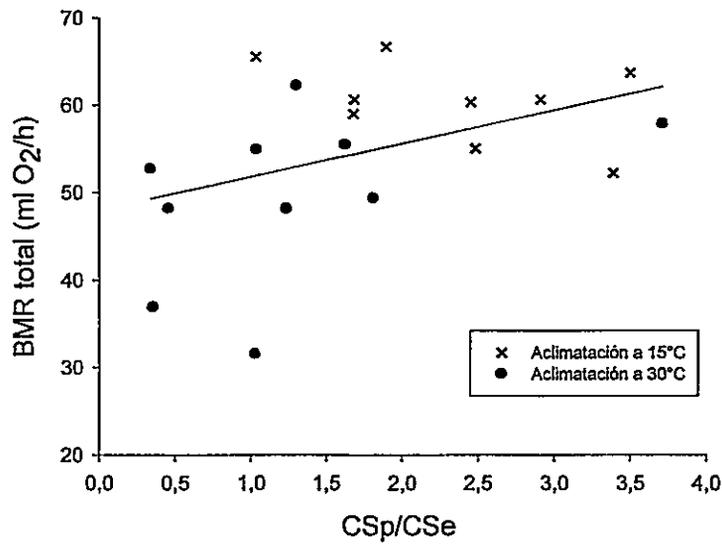


Figura 12: Regresión lineal entre la tasa metabólica basal total y la proporción CSp/CSe (considerando la actividad total) en individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

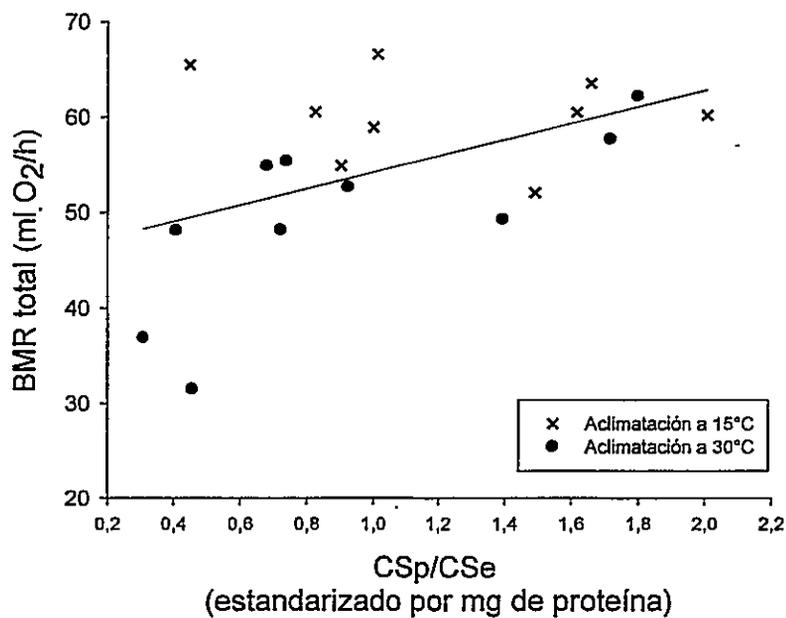


Figura 13: Regresión lineal entre la tasa metabólica basal total y la proporción CSp/CSe (estandarizado por milígramo de proteína) en individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

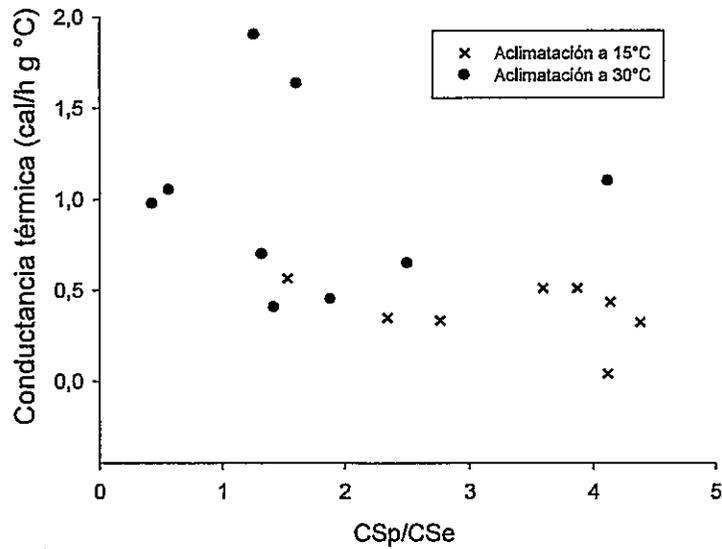


Figura 14: Correlación simple entre la conductancia térmica y la proporción CSp/CSe (considerando la actividad total), en individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

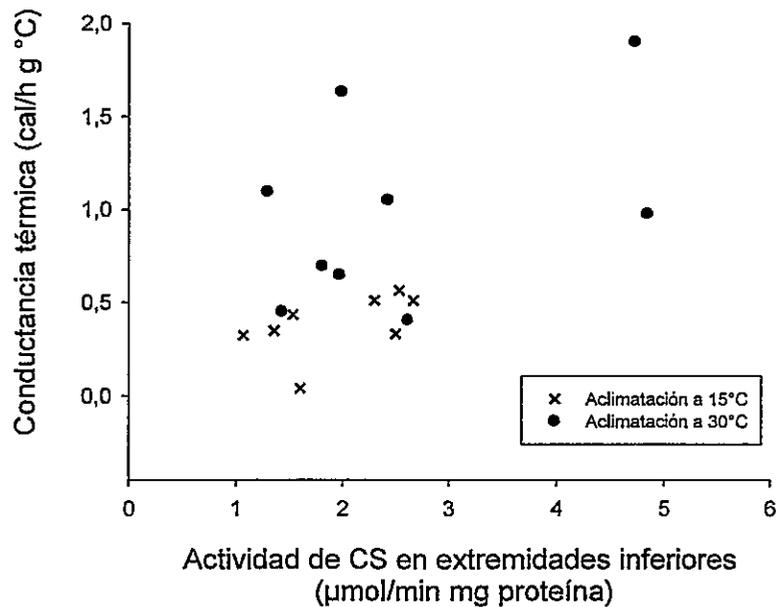


Figura 15. Conductancia térmica en función de la actividad enzimática de citrato sintasa (por milígramo de proteína) en un homogenizado de músculos de extremidades inferiores, en individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

Finalmente, no se encontró asociación entre las actividades enzimáticas de COX y CS y el porcentaje de lípidos en un mismo tejido, no obstante, se determinó una asociación positiva entre las actividades enzimáticas de COX y CS (estandarizadas por milígramo de proteína) del músculo pectoral ($r=0,553$; $p = 0,014$; figura 16).

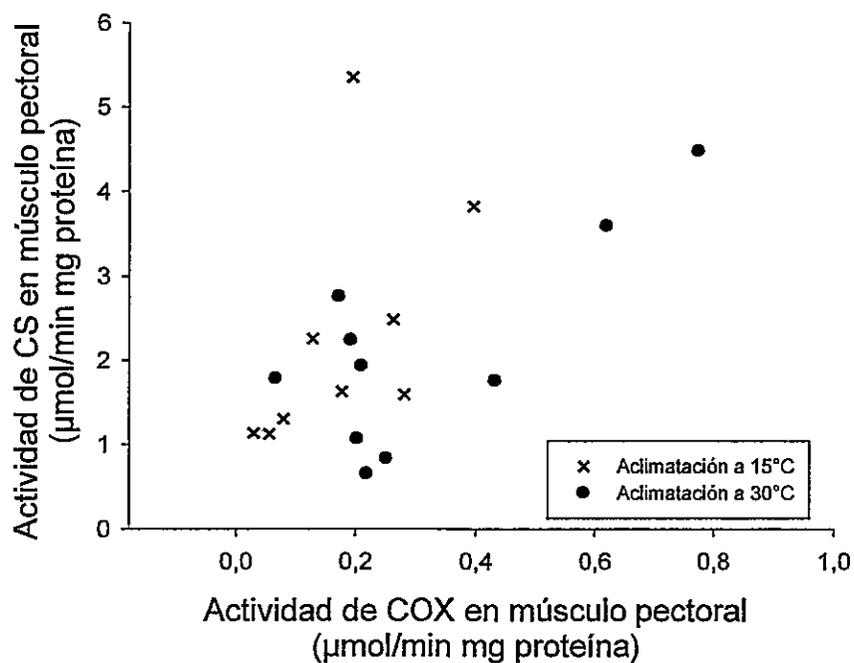


Figura 16: Asociación entre la actividad enzimática de CS y COX, del músculo pectoral de individuos de *Z. capensis* aclimatados a 15 y 30°C por seis semanas.

5 DISCUSIÓN

5.1 Aclimatización estacional

Los resultados indican la ausencia de variación estacional en los rasgos fisiológicos que fueron analizados. De este modo, no se reportaron cambios entre los meses de febrero y julio en las tasas basales de producción de energía, ni en la actividad de enzimas asociadas al metabolismo aeróbico. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los datos presentados por Novoa (1993) en donde se analizó la variación mensual del gasto energético de *Z. capensis*, identificándose sólo un incremento significativo de este (a través de la comparación del BMR) en los meses de enero y noviembre, no existiendo cambios atribuibles a la termorregulación. Resultados similares han sido presentados por Maldonado et al. (2009), quienes han identificado de igual modo la ausencia de variación estacional en las tasas de gasto de energía. Diversos estudios han sugerido que

un aumento en las tasas de consumo y gasto de energía en épocas frías no serían universales y que también podría ocurrir una disminución o estabilización estacional del gasto de energía (Gelineo 1969, Lustick et al. 1982, Dawson et al. 1983, Dawson & O'Connor 1996, McKechnie 2008). De este modo, el incremento invernal del BMR no sería un requisito para la sobrevivencia estacional en ambientes fríos, siendo la aclimatización del BMR una respuesta variable y especie-específica (Novoa 1993, Swanson 2010).

Un argumento que explicaría la ausencia de cambios estacionales en el BMR, es la evidencia que sugiere que las tasas metabólicas son mayores durante la actividad locomotora que durante la termogénesis en aves (Marsh & Swanson 1989, Wiersma et al. 2007, Swanson 2010). Así, es posible que la capacidad aeróbica desarrollada durante la locomoción en los músculos asociados al vuelo, provean de suficiente capacidad termogénica en todas las estaciones, sin la necesidad de ajustes específicos a bajas temperaturas (Liknes & Swanson 2011). Por otra parte, en el contexto de la zona de estudio, Maldonado et al. (2009) sugieren considerar que la moderada diferencia en las temperaturas mínimas entre estaciones no sería suficiente para desencadenar ajustes estacionales en la tasa metabólica basal de *Z. capensis*.

Con respecto a la plasticidad estacional en la actividad de enzimas metabólicas, no se observaron diferencias entre las estaciones en ninguno de los tejidos ni enzimas. Al respecto, la literatura presenta apoyo mixto a la hipótesis de plasticidad estacional de la actividad de CS en Passeriformes, encontrándose para músculo pectoral estabilidad estacional en la actividad masa-específica de CS (Marsh & Dawson 1982, Yacoe &

Dawson 1983, Carey et al 1989, O'Connor 1995, Liknes & Swanson 2011, este trabajo) y casos de variación entre estaciones (Liu et al. 2008, Zheng et al. 2008, 2010, Liknes & Swanson 2011). Como se mencionó, estas diferencias en la respuesta estacional de las enzimas metabólicas, dependerían de la especie, tejido y enzima, pero además, podrían tener relación con otros factores no relacionados directamente con la termorregulación, como lo es la actividad contráctil del músculo esquelético en ejercicio o la conducta migratoria (Butler & Turner, 1988; Hammond et al., 2000 Marsh 1981, Lundgren & Kiessling 1985, 1986, 1988). De este modo, de existir diferencias estacionales en la intensidad de la actividad locomotora de ciertos músculos, se esperaría que esta variación influya sobre los procesos aeróbicos del tejido, pudiendo eventualmente, tener un mayor efecto sobre la actividad oxidativa que el generado por actividad tiritante termogénica.

Además, en el estudio estacional se observó una compensación entre el tamaño del músculo pectoral y la actividad de CS, dado que este músculo incrementó significativamente su tamaño en verano; no obstante presentó una tendencia a la disminución de su actividad enzimática masa-específica en este período, resultando en una constancia en la actividad total de CS entre estaciones. Este incremento en la masa de un órgano, asociado con la aparente disminución de la actividad masa-específica de CS, que resulta en la constancia de la actividad oxidativa, ha sido documentado en aves entre etapas de cría (Vézina & Williams 2005). Así, a pesar que no se ha indagado el mecanismo que subyace a este fenómeno, se corroboraría que la variación de la actividad oxidativa puede ser independiente de la masa del órgano analizado.

En la comparación estacional de las masas de órganos internos, se encontró incrementos significativos en la masa relativa del intestino delgado y la molleja, posiblemente asociados a cambios en la composición de la dieta. Estos resultados concuerdan con lo observado por Novoa (1993), quien propone la existencia de hipertrofia e hiperplasia estacional en el tracto digestivo de *Z. capensis*, en función de la dieta natural. De este modo, un incremento en la masa de la molleja podría ser el resultado del desarrollo de musculatura, asociado a una mayor ingesta de alimento (o de alimentos mas duros, véase Dekinga et al. 2001) y actividad contráctil. En relación con el intestino, el incremento estacional en la masa, podría estar relacionado con aumento en la musculatura, junto con el tamaño del lumen y el número de vellosidades (Novoa 1993, Brugger 1991). Este tipo de incremento invernal en la masa del intestino es común entre las aves, y estaría asociado a cambios en el tipo de dieta, específicamente con el consumo de alimentos con baja digestibilidad (Karasov 1990). Al igual que en lo reportado por Maldonado et al. (2009) las aves aclimatizadas estacionalmente no presentaron diferencias en la masa húmeda de hígado, riñón y corazón.

5.2 Aclimatación térmica

Curiosamente, no se encontraron ajustes en la proporción de lípidos presentes en los tejidos ni en las masas de órganos internos, a diferencia de los resultados presentados por Maldonado et al. (2009). Estos autores observaron diferencias en las masas del

hígado, corazón y riñón, con incrementos en todos los casos en las aves aclimatadas a 15°C. Estas diferencias en relación al trabajo de Maldonado et al. (2009), podrían tener origen en el período del año en que fueron capturados los animales. Así, en el estudio de Maldonado et al. (2009) los animales se capturaron en Septiembre, mientras que en el presente estudio en Mayo de 2012. Así las aves podrían presentar una respuesta diferencial a la aclimatación térmica, en función de la historia térmica de los animales (Barceló et al. 2009), su estado fisiológico (e.g., reproductivo) o los cambios en la dieta entre el hábitat natural y la dieta experimental.

Diversos experimentos de aclimatación térmica han demostrado que la temperatura puede influir sobre el BMR en aves, con incrementos de esta variable en exposición a un ambiente frío y una disminución ante aclimatación a altas temperaturas (Gelineo 1964, McKechnie 2008). Concordantemente, nuestros resultados indican plasticidad en el BMR, observándose un incremento del 17,7% en la tasa de consumo de oxígeno en las aves que permanecieron a 15°C con respecto a las de 30 °C. Estos resultados son similares a los presentados por Maldonado et al. (2009), en donde se observa un incremento significativo de un 19% en individuos de *Z. capensis* expuestos al frío, encontrándose ambos valores, dentro del rango que se ha mencionado para cambios en el BMR ante la aclimatación térmica, los cuales varían desde el 5 al 42% en aves (McKechnie 2008).

Recientemente, Swanson (2010) ha sugerido que alzas en las tasas de consumo de oxígeno, podrían ocurrir a través de variación a nivel celular o tisular, tal como la hipertrofia o cambios en la densidad capilar de músculos o incremento en las actividades

de enzimas catabólicas, que podrían complementarse con ajustes a nivel de los órganos para mejorar capacidades metabólicas. De este modo, nuestros resultados apoyan en parte la noción de que cambios en la actividad oxidativa en tejidos con actividad termogénica, pueden generar cambios en las tasas de consumo de energía del organismo completo. El incremento la actividad de CS en músculo pectoral de aves aclimatadas a 15°C, es coherente con los resultados reportados por Liknes & Swanson (2011), que han encontrado en aves aclimatizadas incrementos significativos de la actividad oxidativa de CS en músculo pectoral durante períodos invernales. Recientemente Zheng et al. (2013) reportaron en *Sinensis pycnonotus* mayores actividades COX tanto en el hígado y músculo pectoral después de haber sido aclimatados durante 4 semanas a 30 °C en comparación con individuos aclimatados a 10 °C. Estos autores encontraron además que el BMR se correlacionó positivamente con la actividad de COX en ambos tejidos. Aunque en el presente trabajo se encontró una correlación positiva y significativa entre la COX y CS en la actividad del músculo pectoral de las aves aclimatadas, los grupos experimentales presentaron actividades de COX similares entre los tratamientos. Por otra parte, se encontró una relación significativa y positiva entre BMR y la actividad de CS en pectoral (Figura 16). Desafortunadamente, el estudio de Zheng et al. (2013) no informa de la actividad CS, lo que impide una comparación adecuada entre los dos estudios. Sin embargo, los resultados este trabajo sugieren que incluso cuando la respuesta del BMR para aclimatación térmica podría ser universal, los mecanismos bioquímicos implicados en la generación de energía podrían diferir entre especies.

Cuando se analizan las aves experimentales, el consumo de oxígeno se correlaciona positivamente con la actividad de CS del músculo pectoral y la proporción

CSp/CSe. Así, se observa que aves que poseen mayores tasas de consumo de energía, presentan mayor actividad oxidativa en los músculos pectorales, que en los músculos de las extremidades inferiores, sugiriendo la existencia de modulación de los flujos catabólicos dentro de un mismo individuo, en función de los requerimientos termorregulatorios. De este modo, en *Zonotrichia capensis* es posible atribuir a los músculos pectorales, el papel de principal centro termogénico, al tiempo que los músculos que se ubican más distales al centro del cuerpo (e.g., complejo gastrocnemius), pierden actividad oxidativa, lo que indicaría la capacidad de regular la actividad catabólica y la generación de energía entre los distintos tejidos.

La mayoría de los estudios que han cuantificado la actividad de enzimas metabólicas en Passeriformes reportan la actividad enzimática de músculo pectoral e hígado, y en menores ocasiones la actividad oxidativa de musculatura de extremidades inferiores (Marsh & Wickler 1982, Marsh & Dawson 1982, Carey et al. 1989, Choi et al. 1993, Olson 2001, Dawson & Olson 2003, Liknes & Swanson 2011). Aquellos estudios que han determinado la actividad de estos dos grupos musculares, han cuantificado la proporción CSp/CSe, encontrando un valor promedio cercano a 3 en aves aclimatizadas a diferentes condiciones climáticas (Marsh & Wickler 1982, Marsh & Dawson 1982, Carey et al. 1989, Choi et al. 1993, Olson 2001, Dawson & Olson 2003). En este estudio, se encontró un valor promedio de 3,3 en aves aclimatadas a 15 °C y de 1,5 en aves expuestas a una temperatura dentro de la zona termoneutral. Estos resultados sugieren que el costo termorregulatorio, manifestado a través de termogénesis tiritante en la musculatura pectoral, pudo compensar el efecto del sedentarismo en las aves de 15 °C.

Por otro lado, nuestros resultados revelaron una asociación negativa entre la conductancia térmica y la proporción CSp/CSe y una relación positiva entre la conductancia con la actividad enzimática de CS de los músculos de extremidades inferiores. Esto indicaría, que aquellas aves que no tuvieron altos requerimientos termorregulatorios (dentro de la zona termoneutral), presentaron una mayor actividad oxidativa en los músculos apendiculares, en donde posiblemente dada la ubicación distal, ocurre mayor disipación no activa de calor corporal. Algunos autores (e.g., Carey et al. 1989, Olson 1994, Dawson & Olson 2003), han sugerido que los músculos de las extremidades inferiores sólo podrían ser reclutados secundariamente ante requerimientos termogénicos en aves, sin embargo, otros estudios sostienen que tanto los músculos asociados al vuelo (pectoral mayor y supracoracoideo) y la musculatura apendicular inferior podrían ser determinantes para la termogénesis tiritante en ciertas especies (Vittoria & Marsh 1996, Duchamp & Barre 1993, Marsh & Dawson 1989, Carey et al. 1989, Aulie & Tøien 1988). Nosotros proponemos que la actividad oxidativa de las extremidades inferiores en una condición sedentaria, participaría activamente del proceso termorregulatorio. De este modo, si el ave se sitúa bajo la temperatura crítica inferior de la zona termoneutral, se esperaría en la musculatura de las extremidades inferiores una disminución de sus flujos catabólicos en favor de la musculatura pectoral, lo que permitiría la generación de calor en una amplia zona del cuerpo, adecuadamente aislada y cercana a los órganos internos. Además, la disminución relativa de la actividad oxidativa en los apéndices inferiores, gatillada por la baja temperatura, generaría una disminución de la disipación de calor generado metabólicamente por la musculatura en la zona apendicular, reduciendo la conductancia térmica. La existencia de un gradiente

térmico en los apéndices carentes de adecuada aislación térmica, estaría respaldada por estudios que sugieren la presencia de heterotermia regional en aves expuestas a ambientes fríos (Chatfield et al., 1953), generada por mecanismos de contracorriente vascular. Según (Collins 1979) este mecanismo, conllevaría tres consecuencias directas sobre la termorregulación, siendo ellas: la conservación del calor corporal, evitar el flujo de sangre fría al interior del cuerpo y mantener la periferia bajo termorregulación, evitando el enfriamiento excesivo de los miembros que podría ocurrir con la simple disminución del flujo sanguíneo. Luego, la heterotermia regional en los miembros inferiores, podría ser producto de la disminución del gradiente de calor corporal generado por el sistema de contracorriente, pero además, podría ser producto de una disminución de la actividad metabólica oxidativa *in situ*.

6 CONCLUSIÓN

Este estudio revela la inexistencia de ajustes metabólicos entre invierno y verano en la especie *Z. capensis*, tanto a nivel orgánico (BMR) como bioquímico (CS y COX), a pesar de la existencia de cambios en las masas de tejido muscular y de órganos del tracto digestivo. Considerando esta evidencia, se infiere que esta especie probablemente emplee principalmente mecanismos conductuales de termorregulación (uso de microambientes, actividad locomotora, piloerección, etc.) no requiriendo en ellos ajustes fisiológicos frente a cambios moderados en las condiciones ambientales.

A pesar de no existir ajustes estacionales en la actividad metabólica de esta especie, se encontró que en condiciones de aclimatación térmica y bajo control sedentario, *Z. capensis* presenta ajustes metabólicos coherentes con una mayor generación y conservación de calor, en individuos aclimatados a 15 °C en comparación con aquellos aclimatados a 30 °C. Estos cambios fisiológicos, se observaron a nivel orgánico y bioquímico, siendo la musculatura pectoral y apendicular inferior los principales tejidos con actividad oxidativa asociada a la generación y conservación de calor.

7 REFERENCIAS.

Antinuchi, C., Cutrera, A., Luna, F. Y Zenuto, R. 2003. Animales y temperatura: estrategias termorregulatorias durante la ontogenia. En Francisco Bozinovic (Ed), Fisiología Ecológica & Evolutiva. pp 399-420. Ediciones Universidad Católica de Chile, Chile,

Aulie, A. Tøien O. 1988. Threshold for shivering in aerobic and anaerobic muscles in bantam cocks and incubating hens. *J Comp Physiol B* 158:431-435.

Barceló, G., Salinas, J., Cavieres, G., Canals Y 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: 415-419.

Barré, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. Y Rouanet, J-L. 1985. Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated Muscovy duckling. *American Journal of Physiology*. 249: R533-R538.

Barré, H., Bailly, L. Y Rouanet JL. 1987. Increased oxidative capacity in skeletal muscles from cold acclimated ducklings: a comparison with rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 88B:519-522.

Berner, N.J. Y Bessay, E.P. 2006. Correlation of seasonal acclimatization in metabolic enzyme activity with preferred body temperature in the Eastern red spotted newt (*Notophthalmus viridescens viridescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 144: 429-436.

Berry, E.A Y Trumpower, B.L. 1987. Simultaneous determination of hemes a,b and c from pyridine hemochrome spectra. *Analytical Biochemistry*. 161: 1-15.

Brugger, K.E. 1991. Anatomical adaptation of the gut to diet in Red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Auk*. 108: 562-567.

Butler, P.J. Y Turner, D.L. 1988. Effect of training on maximal oxygen uptake and aerobic capacity of locomotory muscles in tufted ducks *Aythya fuligula*. *Journal of Physiology* (London). 401: 347-359.

Carey, C., Marsh, R.L., Bekoff, A., Johnston, R.M. Y Olin, A.M. 1989. Enzyme activities in muscles of seasonally acclimatized House Finches. En: Bech C, Reinertsen RE (eds) *Physiology of cold adaptation in birds*. pp 95-104. Plenum Life Sciences, New York.

Carey C., Marsh R.L., Bekoff A., Johnston R.M. & Olin A.M. 1988. Enzyme activities in muscles of seasonally acclimatized house finches. *Physiology of Cold Adaptation in Birds* (eds C. Bech & R.E. Reinertsen), pp. 95-104. Plenum Press, New York.

Cavieres, G. Y Sabat, P. 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.

Chatfield, P.O., C.P. Lyman Y L. Irving. 1953. Physiological adaptation to cold of the peripheral nerve in the leg of the Herring Gull (*Larus argentatus*). *American Journal of Physiology*. 172: 639-644.

Choi, I.-H., Ricklefs, R.E., Shea, R.E. 1993. Skeletal muscle growth, enzyme activities, and the development of thermogenesis: a comparison between altricial and precocial birds. *Physiological Zoology*. 66: 455-473.

Collins, P.T. 1989. Surviving the Winter: The Physiology of Thermoregulation in Winter Birds. En: Stanley A. (ed.). *The passenger pigeon*. pp. 315-320. Vol. 51, No. 4 Temple.

Cooper, S.J. 2002. Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiological and Biochemical Zoology*. 75: 386-395.

Cooper, S.J. Y Swanson, D.L. 1994. Seasonal acclimatization of thermoregulation in the Black-capped Chickadee. *Condor*. 96:638-646.

Dawson, W.R. Y Olson, J.M. 2003. Thermogenic capacity and enzymatic activities in the winter-acclimatized dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *Journal of Thermal Biology* 28: 497-508.

Dekinga, A., Dietz, M.W., Koolhaas, A. Y Piersma, T. 2001. Time course and reversibility of changes in the gizzards of red knots alternately eating hard and soft food. *The Journal of Experimental Biology*. 204: 2167-2173.

Di Castri, F. Y Hajek, E. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Bicerrectoría Académica Universidad Católica de Chile.

Drahota, Z., Milerova, M., Stieglerova, A., Houstek, J. Y Ostadal, B. 2004. Developmental changes of Cytochrome c oxidase and citrate synthase in rat heart homogenate. *Physiological Research*. 53: 119-122.

Duchamp, C., Barré, H., Delage, D., Rouanet, J-L., Cohen-Adad, F. Y Minaire, Y. 1989. Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *American Journal of Physiology*. 257: R744-R751.

Eduardo, J., Bicudo, P.W. Y Chaud-Berlinck, J.C. 1998. Review: locomotion and thermogenesis in hummingbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120B: 27-33.

Emmett, B. Y Hochachka, P.W. 1981. Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respiration Physiology*. 45: 261-272.

Gelineo, S. 1964. Organ systems in adaptation: the temperature regulating system. En: Dill DB (ed) *Handbook of physiology*. pp 259-282. Section 4, adaptation to the environment. American Physiological Society, Washington, D.C.

Goodall, J.D., Jonhson, A.W. Y Philippi, R.A. 1946. Las Aves de Chile, su conocimiento y sus costumbres. Tomo 1. Platt Establecimientos Gráficos. Buenos Aires.

Guglielmo, C.G., Haunerland, N.H., Hochachka, P.W. Y Williams, T.D. 2002. Seasonal dynamics of flight muscle fatty acid binding protein and catabolic enzymes in a migratory shorebird. *American Journal of Physiology*. 282:R1405–R1413.

Hammond, K.A., Chappell, M.A., Cardullo, R.A., Lin, R-I. Y Johnsen, T.S. 2000. The mechanistic basis of aerobic performance variation in red junglefowl. *The Journal of Experimental Biology*. 203:2053–2064.

Hill, R.W. 1979. *Fisiología animal comparada: un enfoque ambiental*. Reverte.

Hochachka, P.W., Emmett, B., Y Suarez, R.K. 1988. Limits and constraints of scaling of oxidative and glycolytic enzymes in homeotherms. *Canadian Journal of Zoology*. 66:1128-1138.

Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F.J., Reimann, A. Y Steverding, D. 1991. Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 23:321–334.

Karasov, W.H. 1990. Digestion in birds: chemical and physiological determinants and ecological implications. En: Morrison M.L. Ralph C. J, Verner J. & Jehl J. R. (Eds) *Avian foraging: theory, methodology and applications*. 391-415 pp. *Studies in Avian Biology* 13. Ed Cooper Ornithological Society, Kansas.

Liknes, E.T., Scott, S.M. Y Swanson, D.L. 2002. Seasonal Acclimatization in the American goldfinch revisited: to what extent do metabolic rates vary seasonally. *The Condor*. 104:548–557.

Liknes, E.T. 2005. Seasonal acclimatization patterns and mechanisms in small, temperate-resident passerines: phenotypic flexibility of complex traits. Ph.D. dissertation, University of South Dakota, Vermillion.

Liknes, E.T. Y Swanson, D.L. 1996. Seasonal variation in cold tolerance, basal metabolic rate, and maximal capacity for thermogenesis in White-breasted Nuthatches *Sitta carolinensis* and Downy Woodpeckers *Picoides pubescens*, two unrelated arboreal temperate residents. *Journal of Avian Biology*. 27:279–288.

Liknes, E.T. Y Swanson, D.L. 2011. Phenotypic flexibility in passerine birds: Seasonal variation of aerobic enzyme activities in skeletal muscle. *Journal of Thermal Biology*. 36: 430–436.

Little, A.G., Kocha, K.M., Lougheed, S.C. Y Moyes, C.D. 2010. Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates. *Physiological Genomics*. 42:76–84.

Liu, J.-S., Li, M., Shao, S.L. 2008. Seasonal changes in thermogenic properties of liver and muscle in tree sparrows *Passer montanus*. *Acta Zoologica Sinica*. 54: 777–784.

Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Hüttemann, M., Lee, I. Y Kadenbach, B. 2001. Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation. *Chembiochem*. 2: 392-403.

Lundgren, B.O., Kiessling, K-H. 1985. Seasonal variation in catabolic enzyme activities in breast muscle of some migratory birds. *Oecologia* 66:468–471.

Lundgren, B.O., Kiessling, K-H. 1986. Catabolic enzyme activities in the pectoralis muscle of Premigratory and migratory juvenile Reed Warblers *Acrocephalus scirpaceus* (Herm.). *Oecologia* 68:529–532.

Lundgren, B.O., Kiessling, K-H. 1988. Comparative aspects of fibre types, areas, and capillary supply in the pectoralis muscle of some passerine birds with differing migratory behavior. *Journal of Comparative Physiology B*. 158:165-173.

Lundgren, B.O. 1988. Catabolic enzyme activities in the pectoralis muscle of migratory and non-migratory Goldcrests, Great Tits, and Yellowhammers. *Ornis Scandinavica* 19:190-194.

Marjoniemi, K. Y Hohtola, E. 2000. Does cold acclimation induce nonshivering thermogenesis in juvenile birds? Experiments with Pekin ducklings and Japanese quail chicks. *Journal of Comparative Physiology*. 170: 537-543.

Maldonado, K., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M. Y. Sabat, P. 2009. Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal acclimatization. *Journal of comparative physiology B*. 179: 335-343.

Marsh, R.L. 1981. Catabolic enzyme activities in relation to premigratory fattening and muscle hypertrophy in the Gray Catbird (*Dumetella carolinensis*). *Journal of comparative physiology*. 141:417-423.

Marsh, R.L. Y Dawson, W.R. 1982. Substrate metabolism in seasonally acclimatized American goldfinches. *American Journal of Physiology*. 11: R563-R569.

Marsh, R.L. Y Dawson, W.R. 1989. Avian adjustments to cold En: Wang, L. (Ed.), *Advances in Environmental and Comparative Physiology*. 205-253 pp. *Animal Adaptation to Cold*, Vol. 4. Springer, Berlin.

Marsh, R.L. Y Wickler, S.J. 1982. The role of muscle development in the transition to endothermy in nestling bank swallows, *Riparia riparia*. *Journal of comparative physiology B*. 149: 99-105.

Mcnab, B.K. 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates. A view from energetics*. Cornell University Press, Ithaca and London, 575 pp.

McKechnie, A.E. 2008. Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review. *Journal of comparative physiology B*. 178:235–247.

Nelson, D.L., Osgood, M., Cox M.M. Y Ocorr, K. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan Higher Education.

Novoa, F.F. 1993. *Ecofisiología de Zonotrichia capensis: cambios estacionales en el gasto y adquisición de energía*. Tesis doctoral. Universidad de Chile.

Novoa, F.F., Bozinovic, F. Y 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: (297–300).

Novoa, F.F. Y Rosenmann, M. 1996. Seasonal changes in energetic capabilities of *Zonotrichia capensis* (Emberizidae) in central Chile. *Revista chilena de historia natural*. 69: 379–385.

O'Connor, T.P. 1995a. Seasonal acclimatization of lipid mobilization and catabolism in House Finches (*Carpodacus mexicanus*). *Physiological Zoology*. 68:985–1005.

O'Connor, T.P. 1995b. Metabolic characteristics and body composition in house finches: effects of seasonal acclimatization. *Journal of Comparative Physiology B*. 165: 298–305.

Olson, J.M., 2001. Ontogeny of catabolic and morphological properties of skeletal muscle of the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *Journal of Comparative Physiology B*. 171: 527–542.

Olson, J.M., 1994. The ontogeny of shivering thermogenesis in the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *The Journal of Experimental Biology*. 191: 59–88.

Page, A.J., Cooper, C.E. Y Withers, P.C., 2011. Effects of experiment start time and duration on measurement of standard physiological variables. *Journal of Comparative Physiology B*. 181: 657–665.

Ridgely, R.S., Tudor, G. Y Brown, W.L. 1989. *The Birds of South America: The Suboscine Passerines*. University of Texas Press.

Saarela, S. Heldmaier G. 1987. Effect of photoperiod and melatonin on cold resistance, thermoregulation and shivering/non shivering thermogenesis in adult Japanese quail. *Journal of Comparative Physiology*. 157B: 625-633.

Saarela, S., Klapper, B. Y Heldmaier, G. 1989. Thermogenic capacity of greenfinches and silkiness in winter and summer. En Bech C. & Reinertsen R. E. (Eds) *Physiology in cold adaptation in birds*. 115-122 pp. Plenum Publishing Corporation, New York.

Saarela, S., Klapper, B. Y Heldmaier, G. 1995. Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some European winter-or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures. *Journal of Comparative Physiology B*. 165: 366-376.

Saarela, S. Y Hohtola, E. 2003. Seasonal thermal acclimatization in sedentary and active pigeons. *Israel Journal of Zoology*. 49: 185–193.

Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C. Y Canals, M. 2006. 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.

Sabat, P., Ramirez-Otarola, N., Barceló, G., Salinas, J. Y Bozinovic, F., 2010. Comparative basal metabolic rate among passerines and the food habit hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 157: 35–40.

Shigenaga, M. K., T.M. Hagen, Y B.N. Ames, 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. PNAS. USA 91: 10771–10778.

Sibley, C. Y Monroe, B. 1990. Distribution and Taxonomy of Birds of the World. Yale University Press.

Srere, P.A. 1969. Citrate Synthase. Methods in Enzimology. 132-3-11.

Stevens, L. 2004. Avian Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press.

Swanson, D.L. 1991. Substrate metabolism under cold stress in seasonally acclimatized dark-eyed juncos. Physiological Zoology. 64: 1578–1592.

Swanson, D.L. 2010. Seasonal Metabolic Variation in Birds: Functional and Mechanistic Correlates. En Thompson C. F. (Ed.). Current Ornithology. pp 75-129. Springer Science.

Vézina, 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.

Vézina, F., Jalvingh, K.M., Dekinga, A. Y Piersma, T. 2006. Acclimation to different thermal conditions in a northerly wintering shorebird is driven by body mass-related changes in organ size. The Journal of Experimental Biology. 209: 3141-3154.

Vittoria, J.C. Y Marsh, R.L. 1996. Cold-acclimated ducklings shiver when exposed to cold. American Zoologist. 36:66.

Wakshlag, J.J., Cooper, B.J., Wakshlag, R.R., Kallfelz, F.A., Barr, S.C., Nydam, D.V. & Dimauro, S. 2004. Biochemical evaluation of mitochondrial respiratory chain enzymes in canine skeletal muscle. *American Journal of Veterinary Research*. 65: 480-484.

Weathers, W.W., Caccamise, D.R. 1978. Seasonal acclimatization to temperature in Monk Parakeets. *Oecologia*. 35:173-183.

West, G.C., Funke, E. & Hart, J.S. 1968. Power spectral density and probability analysis of electromyograms in shivering birds. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 46: 703-706.

Wiersma, P., Chappell, M.A. & Williams, J.B. 2007b. Cold-and exercise-induced peak metabolic rates in tropical birds. *PNAS*. 104:20866-20871.

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

Withers, P.C. 1977. Respiration, metabolism, and heat exchange of euthennic and torpid poorwills and hummingbirds. *Physiological Zoology*. 50:43.

Yacoe, M.E. & Dawson, W.R. 1983. Seasonal acclimatization in American goldfinches: the role of the pectoralis muscle. *American Journal of Physiology*. 245:R265-R271.

Zheng, W-H., Li, M., Liu, J-S., Shao, S-L. 2008. Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian Tree Sparrows (*Passer montanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 151(4):519-25.

Zheng, W-H., Fang, Y-Y., Jiang, X-H., Zhang, G-K., Liu, J-S. 2010. Comparison of thermogenic character of liver and muscle in Chinese bulbul *Pycnonotus sinensis* between summer and winter. *International Journal of Zoological Research*. 31: 319-327.

Zheng W-H., Lin L., Jin-Song L., Hao p., Meng-Ting C. & Yi-Lin H. 2013. Physiological and biochemical thermoregulatory responses of Chinese bulbuls *Pycnonotus sinensis* to warm temperature: Phenotypic flexibility in a small passerine. *Journal of Thermal Biology* 38: 240–246.