

UCH-FC
Doc-EBE
C 382
C 1

**FLEXIBILIDAD FISIOLÓGICA Y PLASTICIDAD DEL DESARROLLO EN
Phyllotis darwini: EFECTO DE LA VARIABILIDAD CLIMÁTICA A LO LARGO
DE UN GRADIENTE DE LATITUDINAL**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de



Doctor en Ciencias con Mención en Ecología Y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Por
GRISEL CAVIERES PARADA

Septiembre, 2013

Director de Tesis: Dr. Pablo Sabat Kirkwood

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

GRISEL CAVIERES PARADA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 6 de Septiembre 2013

Director de Tesis:

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

.....



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals Lambarri

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop and a long horizontal stroke.

.....

Dr. Rodrigo Vásquez Salfate

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "R. Vásquez Salfate".

.....

Dr. Marco Lardies Carrasco

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marco Lardies Carrasco".

.....



*Dedicada a
Sandra y Jonathan*



Grisel nació en Santiago, Chile en Junio del año 1979. Ingresó a la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación en el año 1998 a la carrera de Licenciatura en Educación en Biología y Pedagogía en Biología y Ciencias Naturales. El año 2005, ingresó a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el año 2008 ingresó al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile, donde continuó trabajando en el laboratorio de Ecofisiología Animal realizando su tesis bajo la dirección del Dr. Pablo Sabat. Sus intereses se enfocan en el marco de la Fisiología Ecológica y Evolutiva, en los procesos de interacción organismo ambiente, específicamente los relacionados con las estrategias con que cuentan los organismos para enfrentar las demandas impuestas por las variables físicas. En este contexto su interés se centra particularmente en el estudio de patrones y mecanismos de variación fisiológica en gradientes ambientales, centrado en rasgos relacionados con la energética y osmorregulación, y en cómo el fenómeno de plasticidad fenotípica puede modular los límites de tolerancia de los organismos, y sus consecuencias ecológicas.

AGRADECIMIENTOS

A CONICYT por la "Beca de doctorado" D-21080094, y por el financiamiento al trabajo de tesis a través de la "Beca apoyo tesis doctoral" AT -24100135. A la Vicerrectora de Asuntos académicos de la Universidad de Chile, por la beca "Estadías cortas de investigación en el extranjero". A MECESUP, por la "Beca en el Extranjero para Doctorandos en Tesis". Al gobierno de Canadá, por su financiamiento para realización de estadía de investigación en Rimouski, a través del programa "Canadá-Chile Leadership Exchange Scholarship 2012-1013".

Agradezco en especial al Dr. Pablo Sabat por su confianza y apoyo durante estos años. También quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora de la Tesis, al Dr. Mauricio Canals, al Dr. Marco Lardies y al Dr. Rodrigo Vásquez por los valiosos comentarios a mi trabajo.

Mi agradecimiento a los integrantes del laboratorio de Ecofisiología Animal de la Universidad de Chile, en especial a Andrés Sazo, Sandra González, Natalia Ramírez, Fany Venegas y Karin Maldonado, también a Enrique Bazán-León, del laboratorio de Conducta de la Universidad de Chile y a Natalia López del Laboratorio de Ecofisiología Animal del la Universidad de la Serena, quienes colaboraron en el trabajo de campo y en procesamiento de las muestras. Muy especialmente, agradezco a Mónica Núñez, por su ayuda en el cuidado de los animales y en el trabajo de laboratorio. Al Dr. Claudio Veloso y al Dr. Hugo Torres, por sus comentarios y estímulo en la realización de este trabajo.

A María José Pérez, Daniel Aguilera, Angie Díaz, Paulina González, Carmen Gloria Ossa, Mariana Theniel, Daniela Figueroa, Carmen Alfaro y Jorge Soto por su apoyo durante este período.

A mi familia, en especial a Alicia Parada, María Alicia Cavieres y Freddy Cavieres por su incondicionalidad.

A todos cuantos me hicieron sentir su apoyo durante estos años.

INDICE DE MATERIAS

| | |
|-----------------------|-----|
| Lista de tablas..... | vii |
| Lista de Figuras..... | xi |
| Resumen..... | xix |
| Summary..... | xxi |

| | |
|--------------------------|----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
|--------------------------|----------|

| | |
|--|----------|
| CAPITULO 1: Patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal: efecto de la variabilidad climática sobre la fisiología energética y osmorregulatoria de <i>Phyllotis darwini</i>..... | 6 |
| Resumen..... | 7 |
| Introducción..... | 8 |
| Hipótesis..... | 11 |
| Objetivo..... | 11 |
| Materiales y Métodos..... | 12 |
| Resultados..... | 20 |

| | |
|------------------|----|
| Discusión..... | 41 |
| Referencias..... | 46 |

CAPÍTULO 2: Mecanismos de variación fenotípica: asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática en un gradiente latitudinal.....52

| | |
|---------------------------|----|
| Resumen..... | 53 |
| Introducción..... | 55 |
| Hipótesis..... | 58 |
| Objetivo..... | 58 |
| Materiales y métodos..... | 59 |
| Resultados..... | 65 |
| Discusión..... | 86 |
| Referencias..... | 91 |

CAPÍTULO 3: Mecanismos de variación fenotípica: efecto de la experiencia térmica e hídrica durante el desarrollo sobre la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*.....95

| | |
|--------------|----|
| Resumen..... | 96 |
|--------------|----|

| | |
|---------------------------|------------|
| Introducción..... | 98 |
| Hipótesis..... | 102 |
| Objetivo..... | 103 |
| Materiales y métodos..... | 104 |
| Resultados..... | 111 |
| Discusión..... | 152 |
| Referencias..... | 159 |
| CONCLUSIONES..... | 166 |
| Referencias..... | 170 |

LISTA DE TABLAS

CAPITULO 1 “Patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal: efecto de la variabilidad climática sobre la fisiología energética y osmorregulatoria de *Phyllotis darwini*”.

| | |
|--|----|
| TABLA 1.1. Datos climáticos y origen geográfico para las cuatro poblaciones de <i>Phyllotis darwini</i> a lo largo de Chile..... | 16 |
| TABLA 1.2. Masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades a lo largo de un gradiente latitudinal..... | 21 |
| TABLA 1.3. Eje ACP derivado del análisis de caracteres morfométricos en <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 21 |
| TABLA 1.4. Masa corporal y masa de los órganos en <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 32 |
| TABLA 1.5. Actividad de Enzimas metabólicas en muestras de hígado de de <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 35 |
| TABLA 1.6. Ejes de ACP derivados del análisis de caracteres energéticos y osmorregulatorios en <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 39 |

CAPITULO 2 “Mecanismos de variación fenotípica: asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática en un gradiente latitudinal”

TABLA 2.1. Tasa metabólica basal, Pérdida total de agua evaporativa y Masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de finalizado el tratamiento de pre-aclimatación térmica.....66

TABLA 2.2. Osmolalidad de la orina (U) de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de finalizar los tratamientos 30°C-*agua ad libitum* y 30°C-Restricción hídrica.....85

CAPITULO 3 “Mecanismos de variación fenotípica: efecto de la experiencia térmica e hídrica durante el desarrollo sobre la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*”

| | |
|---|-----|
| TABLA 3.1. Masa de los órganos en <i>Phyllotis darwini</i> | 116 |
| TABLA 3.2. Matriz de correlación de los residuos de la masa de los órganos de individuos adultos de <i>Phyllotis darwini</i> que crecieron en diferentes tratamientos experimentales..... | 117 |
| TABLA 3.3. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de de <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro tratamientos experimentales durante el desarrollo..... | 119 |
| TABLA 3.4. Masa de los órganos en <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados a 15°C/agua <i>ad libitum</i> y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 30°C/ agua <i>ad libitum</i> y 30°C/ restricción hídrica..... | 125 |
| TABLA 3.5. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de de <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados 15°C/agua <i>ad libitum</i> y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30°C restricción hídrica..... | 127 |
| TABLA 3.6. Masa de los órganos en <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados 15°C/restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30°C restricción hídrica..... | 132 |
| TABLA 3.7. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de de <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados 15°C/restricción | |

LISTADO DE FIGURAS

CAPITULO 1 “Patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal: efecto de la variabilidad climática sobre la fisiología energética y osmorregulatoria de *Phyllotis darwini*”

| | |
|--|----|
| FIGURA 1.1. Diseño experimental para estudiar la variabilidad fisiológica y morfológica a lo largo de un gradiente de aridez en <i>Phyllotis darwini</i> | 13 |
| FIGURA 1.2. Relación entre tasa metabólica basal, la Pérdida de agua evaporativa y la Masa corporal en <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 25 |
| FIGURA 1.3. Tasa Metabólica basal de <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile en función índice de aridez..... | 26 |
| FIGURA 1.4. Pérdida total de agua evaporativa de <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile en función de índice de aridez..... | 27 |
| FIGURA 1.5. Balance hídrico en <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile en relación a la Temperatura ambiental..... | 29 |
| FIGURA 1.6. Conductancia térmica <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile.... | 30 |
| FIGURA 1.7. Actividad enzimática de Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en función de la masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile..... | 34 |
| FIGURA 1.8. Grosor Medular Relativo (GMR) en relación a la masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de cuatro localidades de Chile..... | 32 |
| FIGURA 1.9. Grosor Medular Relativo de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile en relación al índice de aridez..... | 37 |

FIGURA 1.10.Grosor medular relativo de *Phyllotis darwini* en cuatro Localidades de Chile.....38

FIGURA 1.11.Espacio de ordenación de los componentes principales de caracteres energéticos y osmoregulatorios en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile.....40

CAPITULO 2 “Mecanismos de variación fenotípica: asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática en un gradiente latitudinal”

FIGURA 2.1. Diseño experimental para determinar la asociación entre Flexibilidad fenotípica y variabilidad climática a través de un gradiente latitudinal.....61

FIGURA 2.2. Masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica.....67

FIGURA 2.3. Tasa metabólica basal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica.....68

FIGURA 2.4. Asociación entre la Tasa metabólica basal y la masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica.....69

FIGURA 2.5. Residuos de la Tasa metabólica basal y la masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile.....70

FIGURA 2.6. Pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica.....71

FIGURA 2.7. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa y la masa corporal de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamiento de aclimatación térmica.....73

FIGURA 2.8. Asociación entre los residuos de la PTAE y de TMB con la masa corporal de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica.....74

| | |
|---|----|
| FIGURA 2.9. Masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica..... | 76 |
| FIGURA 2.10. Tasa metabólica basal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica..... | 77 |
| FIGURA 2.11. Asociación entre la tasa metabólica basal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego del experimento de aclimatación 30°C- restricción hídrica..... | 78 |
| FIGURA 2.12. Residuos de la tasa metabólica basal y la masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica..... | 79 |
| FIGURA 2.13. PTAE de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica..... | 80 |
| FIGURA 2.14. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego del experimento de aclimatación 30°C- Restricción Hídrica..... | 81 |
| FIGURA 2.15. Residuos de la Pérdida total de agua evaporativa y la Masa corporal de <i>Phyllotis darwini</i> de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica..... | 82 |
| FIGURA 2.16. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa y la tasa metabólica basal de <i>Phyllotis darwini</i> provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica a 30°C Restricción hídrica..... | 83 |

FIGURA 2.17.Osmolalidad de la Orina en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de aclimatación a 30°C- agua *Ad libitum* y 30°C restricción hídrica.....85

CAPITULO 3 “Mecanismos de variación fenotípica: efecto de la experiencia térmica e hídrica durante el desarrollo sobre la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*”

- FIGURA 3.1.** Diseño experimental para determinar si existe dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica en atributos energéticos y osmorregulatorios.....105
- FIGURA 3.2.** Relación entre la Tasa Metabólica Basal (TMB) y la Pérdida Total de Agua Evaporativa (PTAE) con la masa corporal (Mc) de *Phyllotis darwini* finalizados los 4 tratamientos experimentales durante su desarrollo.....112
- FIGURA 3.3** Relación entre los residuos de PTAE y la TMB con la masa corporal en *Phyllotis darwini* finalizado los tratamientos experimentales durante el desarrollo.....113
- FIGURA 3.4.** Pérdida total de agua evaporativa y tasa metabólica basal de *Phyllotis darwini* de cuatro tratamientos experimentales durante el desarrollo.....114
- FIGURA 3.5.** Actividad enzimática de Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en función de la masa corporal de *Phyllotis darwini*.....119
- FIGURA 3.6.** Asociación entre el Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón y la masa corporal de *Phyllotis darwini* finalizados los tratamientos experimentales durante el desarrollo.....121
- FIGURA 3.7.** Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo....121
- FIGURA 3.8.** Máxima capacidad de concentración de la orina de *Phyllotis darwini* finalizado el desarrollo.....121

| | |
|---|-----|
| FIGURA 3.9. TMB y PTAE de <i>Phyllotis darwini</i> mantenidos en una condición experimental 15°C/agua <i>ad libitum</i> desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 30°C/ agua <i>ad libitum</i> y 30°C/ restricción hídrica..... | 124 |
| FIGURA 3.10. Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón desarrollados 15°C/agua <i>ad libitum</i> y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30°C restricción hídrica..... | 128 |
| FIGURA 3.11 Osmolalidad de la orina (U _{max}) de <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados 15°C/agua <i>ad libitum</i> y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30°C restricción hídrica..... | 129 |
| FIGURA 3.12. TMB y PTAE de <i>Phyllotis darwini</i> mantenidos en una condición experimental 15°C/restricción hídrica desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 30°C/ agua <i>ad libitum</i> y 30°C/ restricción hídrica..... | 131 |
| FIGURA 3.13. Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de <i>Phyllotis darwini</i> luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (15°C / restricción hídrica) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30 °C restricción hídrica..... | 135 |
| FIGURA 3.14. Osmolalidad de la orina (U _{max}) de <i>Phyllotis darwini</i> desarrollados 15°C/restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua <i>ad libitum</i> y 30°C restricción hídrica..... | 136 |
| FIGURA 3.15. TMB y PTAE de <i>Phyllotis darwini</i> mantenidos en una condición experimental 30°C/agua <i>ad libitum</i> desde el destete a la adultez y re- | |

aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 15°C/ agua *ad libitum* y 15°C/ restricción hídrica.....138

FIGURA 3.36.Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (30°C / agua *ad libitum*) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 15°C agua *ad libitum* y 15 °C restricción hídrica.....142

FIGURA 3.17. Osmolalidad de la orina (*U_{max}*) de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C/agua *ad libitum* y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica.....43

FIGURA 3.18.TMB y PTAE de *Phyllotis darwini* mantenidos en una condición experimental 30°C/restricción hídrica desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 15°C/ agua *ad libitum* y 15°C/ restricción hídrica.....145

FIGURA 3.19.Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (15°C / restricción hídrica) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 30°C agua *ad libitum* y 30 °C restricción hídrica.....150

FIGURA 3.20.Osmolalidad de la orina (*U_{max}*) de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C/restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica.....151

Resumen

La plasticidad fenotípica¹, podría ser fundamental para la persistencia de las poblaciones y/o especies, especialmente cuando las condiciones ambientales cambian en el curso de vida de los organismos, y/o cuando los rangos de distribución son amplios. En esta tesis, se investigó a un nivel intra-específico, la existencia de patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal de temperaturas, precipitaciones, y productividad primaria, específicamente se puso a prueba la hipótesis de asociación funcional entre tasas de gasto energético y pérdida de agua con el índice de aridez. En adición, se evaluaron los mecanismos de variación fisiológica a un nivel inter-poblacional, se evaluó la hipótesis de asociación entre flexibilidad fisiológica de atributos relacionados con la energética y osmorregulación y variabilidad climática. Finalmente, se puso a prueba la hipótesis de dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica en relación al ambiente térmico e hídrico, en el roedor altricial, *Phyllotis darwini*, un múrido omnívoro con una amplia distribución en Chile. Los resultados revelaron, que a un nivel interpoblacional, *Phyllotis darwini* presentó variaciones en atributos energéticos y osmorregulatorios, en asociación con las características ambientales. Individuos provenientes de la localidad más árida, además de presentar una reducción significativa en la tasa metabólica basal (33% respecto de la localidad más húmeda de Quirihue) presentaron una disminución de la pérdida total de agua evaporativa y un incremento en la conductancia térmica. Adicionalmente, el grosor medular relativo (GMR) se asoció negativamente con el índice de aridez, individuos de las localidades áridas del norte de Chile (Copiapó y Vicuña) presentaron un incremento de 122

¹ Plasticidad Fenotípica: habilidad de un organismo para reaccionar frente a una señal ambiental con cambios en forma, estado, movimiento o tasa de actividad (West-Eberhard, 2003).

y 36% en relación a Santiago y Quirihue. La asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática, fue dependiente del atributo fenotípico analizado y de la dirección de la señal ambiental (e.g. disminución de la temperatura), individuos provenientes de todas las localidades, presentaron flexibilidad fisiológica de las capacidades osmorregulatorias, en contraste, la flexibilidad de rasgos relacionados con la fisiología energética varió entre las localidades, sólo los individuos de la localidad austral de Quirihue mostraron flexibilidad fisiológica de la Masa corporal y la Tasa metabólica basal, posiblemente en respuesta a la experiencia térmica experimentada durante la ontogenia y al grado de variabilidad climáticas de las localidades de origen (estimada a través de la varianza del índice de aridez). Finalmente se observó, dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica, es decir, la historia térmica e hídrica experimentada durante etapas tempranas del desarrollo determinó las trayectorias fenotípicas y la capacidad de cambiar los atributos fenotípicos en respuesta a señales del ambiente. Además, la capacidad de cambio fisiológico, dependió no solo de la combinación de señales ambientales (e.g. térmicas, hídricas), sino también de la dirección de la señal ambiental y de posibles compromisos energéticos con otros rasgos, probablemente, en relación a los costos y desafíos que impliquen los nuevos escenarios ambientales.

Summary

Phenotypic plasticity² could be fundamental for populations and species survival, especially when environmental conditions change during the organism's life time or when the geographical distribution ranges are wide. In this thesis I studied at intra-specific level patterns of physiological variation in a latitudinal gradient of temperatures, precipitations and primary productivity. I tested at intra-specific level the hypothesis of functional association between rate of energy expenditure and water loss with the aridity index. In addition, I evaluated mechanisms of physiological variation among populations and I assessed the hypothesis of association between climatic variability and phenotypic flexibility of traits related with energetics and osmoregulation. Finally, I tested the hypothesis of ontogenetic dependence of phenotypic flexibility in relation to the thermal and hydric environment in the altricial rodent *Phyllotis darwini*, an omnivorous murid with a wide geographic distribution in Chile. I found that individuals coming from of the most arid locality presented a significant reduction in the metabolic rate (33% in comparison with the mesic locality Quirihue), a decrease in the evaporative water loss and an increase in the thermal conductivity. In addition, the relative medullary thickness (RMT) was negatively associated with the aridity index. Individuals of arid localities in the North of Chile, Copiapo y Vicuña, presented an increase of 122 and 36% respectively in relation to Santiago and Quirihue. The association between physiological flexibility and climatic variation was dependent of the phenotypic trait under analysis and of the direction of the environmental cue (e.g., decrease in ambient temperature). Individuals coming from all the

² Phenotypic plasticity: ability of an organism to react to an environmental input with a change in form, state, movement, or rate activity (West-Eberhard, 2003).

studied localities showed physiological flexibility of the osmoregulatory capacities, in contrast, the physiological flexibility of energetic traits was different among localities, only individuals of the austral locality of Quirihue showed physiological flexibility of body mass and basal metabolic rate, probably in response to the thermal experience faced during the ontogeny and to the degree of climatic variability at the place of origin (estimated through the variance of the aridity index). Finally, I observed ontogenetic dependence of phenotypic flexibility; that is the thermal conditions and the water availability experienced during early stages of the development influenced the phenotypic trajectories and the capability to change phenotypic traits in response to environmental cues. However, the capability of physiological change depended of the direction of environmental cues and energetic trade-offs, probably in relation with costs and challenges involved in novel environmental scenarios

Introducción

La Plasticidad fenotípica ha sido descrita como la habilidad de un organismo para reaccionar frente a una señal ambiental con cambios en forma, estado, movimiento o tasa de actividad (West-Eberhard, 2003). De tal manera, que el ambiente biótico y abiótico podría inducir cambios en la fisiología, estructuras morfológicas y en repertorios conductuales (Maldonado et al., 2012; Quispe et al., 2009; McKechnie et al., 2006; Arens & Cooper, 2005; Nespolo et al., 2002; Tracy & Walsberg, 2001; Oswald, 1998). Numerosos estudios han demostrado que especies y poblaciones de endotermos que habitan sectores áridos o semi-áridos presentarían diferencias fisiológicas, morfológicas y conductuales con aquellos que habitan ambientes másicos (Schmidt Nielsen, 1997, Al-Kahtani, 2004; Diaz et al., 2006; Hinsley et al., 1993; Williams & Tieleman, 2001; Menon et al., 1989). Estos ajustes podrían responder a la necesidad de reducir (i) las tasas de producción endógena de calor y de pérdida de agua evaporativa y excretada debido a la escasez de agua en el ambiente (McNab & Morrison, 1963; Dawson & Bennett, 1973; Sabat et al., 2006a) y (ii) los requerimientos y el gasto energético en ambientes en donde la productividad primaria es reducida (Bozinovic et al., 2009). Coleman & Downs (2009) evaluaron el efecto de la aridez del ambiente (medido a través del índice de aridez, *Q index*) sobre la estructura y función renal en tres poblaciones del roedor *Thallomys nigricauda*, encontrando que los rasgos analizados (masa renal, grosor medular relativo y capacidad máxima de concentrar la orina) no se diferenciaron entre las poblaciones, sugiriendo que la constancia en los parámetros osmorregulatorios respondería a restricciones genéticas. Sin embargo, el índice de aridez (*Qi*) de las localidades estudiadas fluctuaba entre 2.4 y 2.9 lo que es comparativamente bajo en relación con los reportados en estudios en que sí se ha

encontrado variación en rasgos fisiológicos en roedores y otros vertebrados (e.g., Bozinovic et al., 2009; Sabat et al., 2009), sugiriendo que la magnitud del gradiente ambiental es crítico para inducir cambios fenotípicos en individuos adultos. Por otra parte, la ausencia de variación fenotípica en adultos no sólo se puede explicar por bases genéticas, sino también por plasticidad del desarrollo (Tolosa & Diamon, 1990; Goldstein, 1991). En este sentido, es necesario establecer la contribución de la historia ontogenética sobre la capacidad de ajustar el fenotipo a las demandas ambientales, analizando, por ejemplo, la norma de reacción¹ de atributos relacionados con el balance hídrico y energético, en especies con amplios rangos de distribución y que experimenten variaciones significativas en las condiciones ambientales. Los organismos que crecen, se desarrollan y reproducen en ambientes temporal o espacialmente heterogéneos, podrían tener la habilidad de procesar la información ambiental y responder de manera beneficiosa a los cambios en las condiciones abióticas. Así el fenotipo que se observa podría ser el resultado, al menos parcialmente, de procesos del desarrollo determinados por la interacción entre un genotipo particular y su ambiente. A pesar de la gran cantidad de estudios que buscan esclarecer los patrones y mecanismos que subyacen a las variaciones fenotípicas en ambientes contrastantes, la mayoría se han realizado en individuos adultos, siendo escasos los que exploran el rol de la historia ontogenética sobre la expresión del fenotipo adulto. Aunque en el último tiempo han incrementado los estudios de plasticidad durante el desarrollo, son escasos los estudios que incorporen el impacto del desarrollo sobre el desempeño de adultos en poblaciones que habiten sectores con marcadas diferencias climáticas (e.g., temperatura, precipitaciones y

¹ Norma de Reacción es la función que relaciona los ambientes en que un genotipo particular es expuesto y los fenotipos que pueden ser producidos por ese genotipo (Pigliucci, 2001).

productividad primaria). En la presente investigación no solo se incorporó esta ventana temporal en el estudio de las respuestas fisiológicas y morfológicas en ambientes contrastantes, sino también se evaluó como la historia ontogenética puede modificar la magnitud de la flexibilidad fenotípica en individuos adultos. Además, este estudio evaluó la respuesta fenotípica a diversos niveles de organización biológica (sistémico a bioquímico) a las demandas ambientales y determinó el rol de la plasticidad fenotípica (del desarrollo y en adultos) sobre el fenotipo de individuos.

De esta forma, se evaluó a un nivel interpoblacional (i) la diversidad fisiológica en relación al balance hídrico y energético en un gradiente de aridez (ii) la contribución de la flexibilidad fenotípica en rasgos relacionados con el balance hídrico y energético en asociación con la variabilidad climática (iii) la dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica en respuesta a aclimatación térmica (bajas temperaturas) e hídrica (escasez de agua) en una población de un ambiente climáticamente heterogéneo (e.g., temperatura, precipitaciones y productividad primaria). En esta tesis se abordaron estas preguntas desde una perspectiva experimental (e.g. aclimatación a un “jardín común”) y de campo en *Phyllotis darwini*, probablemente es uno de los mamíferos más estudiados en Chile (Jaksic, 1997). *Phyllotis darwini*, es un múrido omnívoro con una amplia distribución en Chile que abarca desde Paposo (II Región) hasta Malleco (IX Región) desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm (Iriarte, 2008) y cuyas poblaciones enfrentan situaciones climáticas contrastantes, lo que debiera traducirse en la presencia de ajustes morfológicos y/o fisiológicos que le permitan mantener un adecuado balance hídrico y energético. Estudios genéticos y biogeográficos en este roedor han revelado, la existencia de dos clados, uno fundamentalmente andino y un clado andino-costero a partir del cual se produjo la

migración de los roedores hacia sectores de baja altitud a lo largo de Chile, lo que apoya la hipótesis de descenso y refugio altitudinal en zonas costeras durante los periodos glaciares, y el retroceso durante los interglaciares del Pleistoceno (Palma et al., 2005; González et al., 2010). Por otra parte, estudios en el campo de la fisiología evolutiva en *Phyllotis darwini*, han revelado la potencial respuesta evolutiva a la selección en rasgos relacionados con la producción de calor (Nespolo et al., 2003). Este autor encontró que rasgos termogénicos en *Phyllotis darwini*, presentan una baja heredabilidad, sugiriendo, que las variaciones fenotípicas encontradas en estos rasgos responden mayoritariamente al ambiente. Considerando la hipótesis de variabilidad climática² (Jansen, 1967), es esperable que roedores habitantes de sectores altamente heterogéneos (mayores latitudes) presenten mayor flexibilidad fenotípica que los que habitan en sectores estables. Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen estudios que hayan puesto a prueba esta hipótesis en mamíferos (ver Cavieres & Sabat, 2008 para un estudio en aves). Por otra parte la magnitud de la respuesta plástica en adultos también podría depender de la historia ontogenética y en este sentido tampoco existen estudios en animales que pongan a prueba la existencia de dependencia ontogenética de la plasticidad fenotípica en adultos. Considerando la amplia distribución que presenta a lo largo de Chile, y la amplia gama de estudios ecofisiológicos y evolutivos desarrollados en este roedor hacen de *Phyllotis darwini* un buen modelo para responder las preguntas centrales de este proyecto.

² La hipótesis de variabilidad climática (HVC, Janzen 1967) propone que debido a que el rango de fluctuación climática experimentada por animales terrestres incrementa con la latitud (o altitud), los individuos que habitan mayores latitudes (o altitudes) requieren mayores rangos de tolerancias y habilidades de aclimatación que quienes habitan menores latitudes.

Esta tesis se divide en tres capítulos, el primero de ellos es sobre patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal, específicamente, como las diferencias climáticas entre localidades pueden asociarse con cambios en la fisiología energética y osmorregulatoria de *Phyllotis darwini*, el segundo capítulo, trata sobre los mecanismos de variación fisiológica a través de un gradiente latitudinal, particularmente, es sobre la relación entre la flexibilidad fisiológica y la variabilidad climática, evaluando atributos energéticos y osmorregulatorios, y en el tercer capítulo, continuando con los mecanismos de variación fenotípica, se evalúa la asociación entre la historia térmica e hídrica durante el desarrollo y la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*. Aun cuando cada uno de ellos podría constituir un estudio independiente y con un valor explicativo propio, finalmente se integran en una discusión general.

CAPITULO 1

Patrones de variación fisiológica en un gradiente latitudinal: efecto de la variabilidad climática sobre la fisiología energética y osmorregulatoria de *Phyllotis darwini*.

Resumen

Se investigó la variabilidad intra-específica en el balance hídrico y energético en *Phyllotis darwini*, un roedor con un amplio rango de distribución en Chile, que enfrenta ambientes disímiles en cuanto a temperaturas, precipitaciones y productividad primaria. Se capturaron individuos en 4 localidades rurales de Chile a lo largo de un gradiente latitudinal y se evaluaron rasgos energéticos (Tasa metabólica basal, TMB; Pérdida total de agua evaporativa, PTAE; Masa corporal Mc; masa de órganos; actividad de enzimas metabólicas) y rasgos osmorregulatorios (tamaño renal; Grosor medular relativo, GMR) en asociación con las características abióticas del ambiente. A un nivel interpoblacional, *Phyllotis darwini* presentó variaciones en atributos energéticos en asociación con las demandas hídricas y energéticas propias de cada localidad. Los individuos provenientes de sectores áridos, presentaron una disminución en la TMB, PTAE, un incremento en la conductancia térmica, y en el tamaño de la oreja, probablemente asociado con una mayor eficiencia en la pérdida de calor, adicionalmente, mostraron diferencias hasta de 122% en el GMR respecto de otras localidades másicas. Por otra parte, la localidad más austral, caracterizada por presentar el mayor índice de precipitaciones y menores temperaturas, mostraron un incremento en las tasas de gasto energético en relación a quienes habitan ambientes áridos. Los resultados confirman el efecto de la variabilidad ambiental sobre los atributos fisiológicos a un nivel interpoblacional en *Phyllotis darwini*.

Introducción

Estudios de comparaciones interespecíficas han demostrado que especies y poblaciones de endotermos habitantes de ambientes áridos o semi-áridos presentan una serie de diferencias fisiológicas, morfológicas y conductuales con aquellos que habitan ambientes másicos. Por ejemplo, es común observar en animales desérticos un menor tamaño corporal, riñones con asas de Henle elongadas (Sperber, 1994), un incremento en el grosor medular relativo (GMR) y de la capacidad de concentrar la orina (Schmidt Nielsen, 1997; Cortez et al., 1988; Sperber, 1994; Al-Kahtani, 2004; Diaz et al., 2006; Sabat et al. 2006b), una menor tasa metabólica basal (acompañada de ajustes en la masa y/o actividad metabólica específica de ciertos tejidos) (Krebs, 1950; Hudson & Kimzey, 1966; Daan et al., 1990; Hinsley et al., 1993; Williams & Tieleman, 2001; Bozinovic et al., 2009), una menor pérdida de agua evaporativa (explicada por variaciones en la constitución de esfingolípidos del estrato corneo) (Menon et al., 1989) y selección de micro sitios que proveen una protección al calor (Williams & Tieleman, 2001). Así, estos ajustes se explicarían fundamentalmente por la necesidad de reducir (i) las tasas de producción endógena de calor y de pérdida de agua evaporativa y excretada debido a la escasez de agua en el ambiente (McNab & Morrison, 1963; Dawson & Bennett, 1973; Sabat et al., 2006a) y (ii) los requerimientos y el gasto energético en ambientes en donde la productividad primaria es reducida (Bozinovic et al., 2009).

Entre los factores abióticos que podrían explicar estas diferencias fenotípicas, se destacan la temperatura, la humedad y la productividad primaria. Diversos estudios tanto en laboratorio como en campo, han revelado que endotermos adultos responden a las bajas temperaturas aumentando la tasa metabólica basal (Williams & Tieleman, 2000; Nespolo &

Rosenman, 1997; Nespolo et al., 1999; Cavieres & Sabat, 2008). Además, se ha sugerido que la escasez de agua sería un factor selectivo que favorecería bajas tasas de gasto energético y de pérdida de agua por evaporación, acompañada de una reducción en el tamaño y masa corporal. En este sentido, en un estudio experimental, Al-Kahtani (2003) encontró que restricciones hídricas aplicadas a roedores juveniles (*Mus musculus*) produce una disminución de hasta un 50% de la masa corporal, acompañado de un incremento en la masa renal. Dentro de las hipótesis planteadas para explicar cómo las condiciones bióticas y abióticas afectan la tasa metabólica basal masa-independiente en mamíferos, destaca la hipótesis de hábitos alimenticios (FHH) (Mc Nab, 2002), que predice que la evolución de bajas tasas metabólicas basales es más probable que ocurra en especies con dietas de bajo contenido energético y/o baja predictibilidad (véase Cruz-Neto & Jones, 2005). Por ejemplo, un estudio en roedores a nivel interespecifico demostró que las variaciones en la tasa metabólica basal (TMB) pueden ser explicadas por la productividad primaria (Müller & Diamond, 2001). En este sentido Bozinovic et al. (2009) documentaron que la TMB del roedor diurno *Octodon degus*, se asocia positiva y significativamente con la productividad primaria, índice de aridez y las precipitaciones, a nivel interpoblacional. Paralelamente y con el propósito de evaluar componentes de FHH la productividad primaria (disponibilidad y predictibilidad), estos autores realizaron experimentos de jardín común en esta especie y encontraron que las diferencias metabólicas se mantienen a pesar de la aclimatación en animales adultos. Sin embargo, estas diferencias podrían tener una base genética y/o responder al fenómeno de plasticidad del desarrollo, lo que en éste y otros estudios, es una interrogante que permanece sin respuesta (pero véase Oswald, 1998; Tracy & Walsberg, 2001). Por otra parte, es importante notar que la capacidad de un organismo de sobrevivir y

reproducirse en un ambiente en particular, no depende solamente de un sistema fisiológico en particular (e.g. la función renal, ver Sperber, 1941; Diaz et al., 1996) sino que de todos los caracteres fenotípicos en su conjunto. En general, los estudios que incorporan la problemática de gradientes ambientales sobre atributos tanto fisiológicos como morfológicos lo hacen a través del estudio de sistemas aislados, sin embargo, es necesario comprender como responden los organismos de manera integrada a los desafíos que significa habitar sectores con diferencias en las condiciones ambientales. En este capítulo, se busca estudiar la asociación entre rasgos fenotípicos, a diversos niveles de organización biológica (sistémico a bioquímico) y las características abióticas del ambiente.

Hipótesis

A lo largo del gradiente latitudinal de temperatura, precipitación y productividad primaria en Chile, las poblaciones experimentan diferencias en la disponibilidad hídrica, en el estrés térmico y en la disponibilidad de alimento, esto se traduce en una mayor habilidad de conservar agua en sectores áridos y un incremento en las capacidades termogénicas hacia mayores latitudes.

Predicción

Ajustes morfológicos y fisiológicos como el aumento del tamaño renal y del grosor medular relativo, estarán asociados negativamente con el índice de aridez. Por otro lado, la TMB, PTAE, actividad enzimas oxidativas estarán positivamente correlacionados con el índice de aridez.

Objetivo

Determinar los ajustes morfológicos y fisiológicos a nivel interpoblacional en *Phyllotis darwini* en respuesta a variación en el índice de aridez, mediante el análisis de los siguientes parámetros energéticos: (1) tasa metabólica basal (2) pérdida total de agua evaporativa (3) conductancia térmica (TC) (4) capacidad oxidativa (actividad enzimas metabólicas, e.g., citrato sintasa y citocromo c oxidasa) y (5) masa de órganos (corazón, hígado, intestino, estomago y riñón), y de parámetros osmorregulatorios (6) estructura renal (tamaño renal y grosor medular relativo (GMR))

Materiales y métodos

Modelo de Estudio

El roedor *Phyllotis darwini*, probablemente es uno de los mamíferos más estudiados en Chile (Jaksic, 1997). Es un múrido omnívoro con una amplia distribución en Chile que abarca desde Paposo (II Región) hasta Malleco (IX Región) desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm (Iriarte, 2008). Su amplia distribución a lo largo de Chile, hacen de *Phyllotis darwini* un buen modelo para el estudio sobre las estrategias fisiológicas que presentan los animales en relación a las condiciones climáticas a lo largo de un gradiente de aridez.

Diseño experimental

Se capturaron individuos provenientes de 4 localidades rurales de Chile a lo largo de un gradiente latitudinal de precipitaciones, temperatura y productividad primaria (Di Castri & Hayek, 1976) que abarca un rango de 1.200 km. Las localidades escogidas fueron 1) Copiapó (II Región, Provincia de Copiapó, Comuna Copiapó, 27°58'S, 70°36'O), 2) Marquesa (IV Región, Provincia de Elqui, Comuna Vicuña, 29° 55' S, 70° 57'O), 3) Quebrada de la Plata (RM, Provincia de Santiago, Comuna Maipú, 33° 31' S, 70° 50'O,) y 4) Quirihue (VIII Región, Provincia Ñuble, Comuna Quirihue, 36° 12' S, 72° 39'O). Los individuos fueron capturados mediante trampas Sherman, y en un lapso no superior a 4 días desde la captura se realizaron las determinaciones metabólicas (TMB, TC) y de pérdida total de agua evaporativa (PTAE). Posteriormente, los animales fueron sacrificados

y disecados, los órganos fueron removidos y pesados, el hígado fue guardado a -80°C para posteriores análisis de actividad de enzimas oxidativas (ver Figura 1.1)

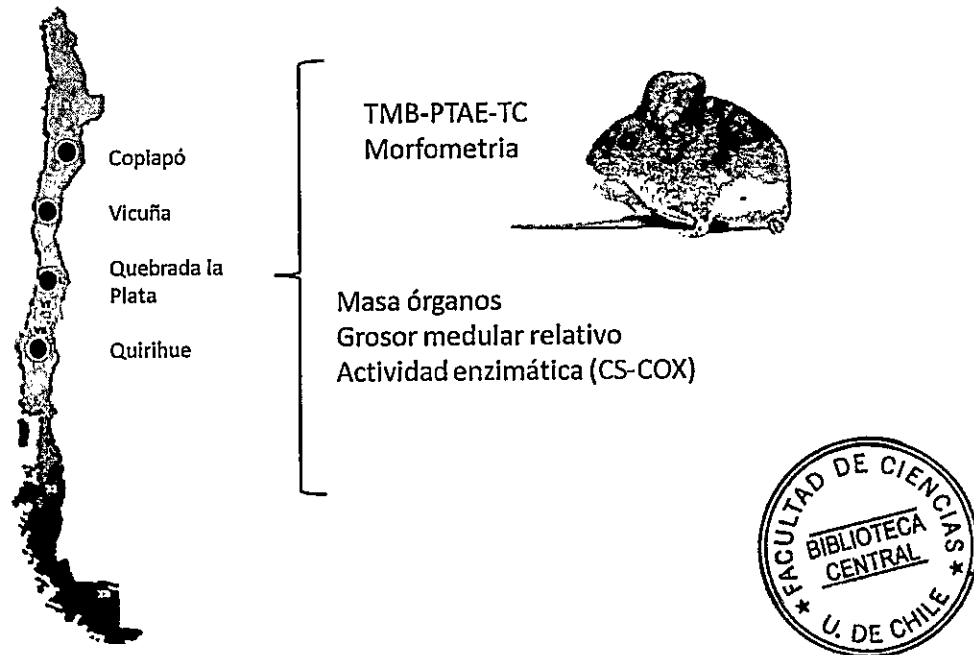


Figura 1.1. Diseño experimental para estudiar la variabilidad fisiológica y morfológica a lo largo de un gradiente de aridez en *Phyllotis darwini*

Tasa Metabólica Basal

El consumo de oxígeno (VO_2) se determinó en la fase de descanso del ritmo de actividad de la especie, en individuos postabsortivos, mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems) computarizado (Datacan V) calibrado con una mezcla de oxígeno conocida (20%) y nitrógeno (80%) certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las

determinaciones individuales se realizaron en cámaras metálicas a temperatura ambiente correspondiente a termoneutralidad, i.e., 30 ± 0.5 °C (Novoa 1993). Las cámaras metabólicas recibieron aire seco a una tasa de 750 mL/min desde un controlador de flujo (Sierra Instruments) para asegurar una mezcla adecuada en la cámara. El aire fué secado antes y después de la cámara y monitoreado cada 5 s mediante un analizador de oxígeno 1FC-1B (Sable System). El CO₂ se retiró antes de entrar al analizador de O₂ y el consumo de oxígeno se calculó utilizando la ecuación de Withers (1977: p 122): $V.O_2 = [FR \cdot 60 \cdot (F_i O_2 - F_e O_2)] / (1 - F_i O_2)$, donde FR es la tasa del flujo en ml/min después de la corrección STP, F_i y F_e son las fracciones de concentración de O₂ al ingreso y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

Pérdida total de agua por evaporación (PTAE)

Los individuos se pusieron en cámaras metálicas de 5 l con un piso de malla de alambre sobre una capa de aceite mineral para atrapar las fecas y orina, excluyéndolas como fuente de agua. El aire pasó a través de columnas de Dierite y Baralime para remover el agua y CO₂ del aire mediante un controlador de flujo (Sierra Instrument). El aire que salió de la cámara pasó a través de un higrómetro (1-RH 200, Sable System) antes que una submuestra se desvíe hacia a el analizador de oxígeno para las determinaciones de consumo de oxígeno en reposo, en conjunto con las determinaciones higrométricas. La PTAE fué calculada como $PTAE = [(V_e p_{out} - V_i p_{in})] [(V_e p_{out} - V_i p_{in})]$ donde PTAE es expresada en mg/ml. p_{in} y p_{out} son la humedad absoluta en kg/m³ del aire de entrada y salida respectivamente, V_i es la tasa del flujo que ingresa a la cámara según un controlador de flujo de masa (750 ml min⁻¹ después de la corrección STP) y V_e es el flujo de aire que sale. V_e será calculado

siguiendo a Williams & Tieleman (2000) como $V_e = V_i - [VO_2 (1-RQ)] + VH_2O V_i$, y VO_2 (mL min^{-1}) son conocidos. La humedad absoluta se calculó como $\rho = P/(T \cdot R_w)$, donde P es la presión de vapor de agua del aire en Pascal, T es temperatura del punto de rocío del higrómetro en Kelvin y R_w es la constante de gas para el vapor de agua ($461.5 \text{ J/kg} \cdot \text{Kelvin}$, Lide 2001). P_{in} se determinó usando el valor promedio de la presión de vapor del aire que ingresa a la cámara vacía (i.e., periodo de base de 15 min) antes y después de cada experimento. La masa corporal (M_b) fué medida antes de las mediciones metabólicas usando una balanza electrónica ($\pm 0.1 \text{ g}$).

Producción de agua metabólica (PAM)

La estimación de PAM de *Phyllotis darwini* de las cuatro poblaciones se realizó usando la siguiente equivalencia: 0,567 ml H_2O por litro de O_2 consumido (Schmidt-Nielsen, 1997).

Gradiente de aridez

Los datos climáticos de las localidades de estudio (Tabla 1) fueron obtenidos a partir de <http://www.worldclim.org> y analizados con el programa ESRI. Para cada área de estudio se calculó el promedio mensual de las variables climáticas: precipitación, altura, T_{max} , T_{min} , $T_{promedio}$ en un área de 5 km^2 del sector de captura de los animales, con bases de datos desde los años 1950 al 2000.

Se calculó el índice de aridez como $Q = P/((T_{max} + T_{min})(T_{max} - T_{min})) * 1000$ donde P es el promedio anual de precipitaciones (mm), T_{max} es la temperatura media máxima del mes más cálido ($^{\circ}\text{C}$) y T_{min} la temperatura mínima media del mes más frío ($^{\circ}\text{C}$) (Emberger 1955). Aún cuando este índice parece contra intuitivo, ha sido derivado empíricamente

para describir la productividad primaria en áreas áridas y semi-áridas y ha sido utilizado como un buen predictor de caracteres fisiológicos a un nivel interespecífico en aves (véase Tieleman et al. 2002b).

Tabla 1. Datos climáticos y origen geográfico para las cuatro poblaciones de *Phyllotis darwini* a lo largo de Chile.

| Localidad | Precipitación anual | T° media anual | T° media mes cálido | T° media mes frío | T° máxima mes cálido | T° mínima mes frío | Altura | Índice de Aridez (Qi) |
|-----------|---------------------|----------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------|--------|-----------------------|
| Copiapó | 32.8 | 15.69±0.84 | 19.82 | 11.85 | 25.56 | 6.38 | 434.5 | 9.66 |
| Vicuña | 80.75 | 14.57±0.84 | 18.64 | 10.82 | 24.2 | 5.3 | 433.6 | 28.91 |
| Santiago | 381.45 | 14.90 ±1.32 | 21.18 | 8.78 | 29.66 | 3.8 | 485 | 134.88 |
| Quirihue | 1012.2 | 11.71±1.0 | 16.72 | 7.26 | 23.24 | 3.5 | 391 | 593.44 |

Ensayos enzimáticos

Después de la eutanasia y la disección de roedores, las muestras de hígado fueron almacenadas a -80°C para los subsecuentes ensayos de actividad enzimática. El tejido congelado fue pesado y homogeneizado e 10 volúmenes de buffer fosfato 0.1M con EDTA (PH 7.3) con Ultra Turrax (20000 rpm) en hielo para evitar reacciones enzimáticas. Las muestras fueron sonicadas a 130 watt mediante un Ultrasonic Processor VCX 130, por 20 segundos con 10 segundos de intervalo, 14 veces cada una, mantenidas en hielo. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 150000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido en un nuevo tubo evitando la transferencia del la capa de

lípidos presentes e las preparaciones de hígado. La concentración de proteínas de las muestras fue determinada usando el método descrito por Bradford (1976), usando serum de albumina como estándar.

La actividad de dos enzimas mitocondriales fueron determinadas: (a) Citocromo c oxidasa (COX; E.C. 1.9.3.1), una enzima terminal de la cadena respiratoria, que indica la capacidad de la mitocondria de proveer energía al sistema, y (b) Citrato Sintasa (CS; E.C. 4.1.3.7), una enzima soluble localizada en la matriz mitocondrial, participante del Ciclo de Krebs. La actividad de COX fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo a Moyes et al. (1997), con pequeñas modificaciones. La actividad enzimática fue determinada en 10mM Tris/HCl pH7.0, que contiene 120 mM KCl, 250 mM se sucralosa, y citocromo c reducido con dithiothereitol en un volumen final de 0.2 ml. La absorción de citocromo c a 550 nm cambia en estado oxidado. La disminución en la densidad óptica a 550 nm fue monitoreada con un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO UV/VIS a 25°C. La actividad en unidades por gramo de tejido fue calculada usando la diferencia de coeficiente de extinción ($\Delta\epsilon^{mM}$) entre el citocromo c reducido y oxidado, que es $21.84 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 550nm por el citocromo c. La actividad de CS fue medida de acuerdo a Sidell et al. (1987), con pequeñas modificaciones. El medio de ensayo de CS contuvo 10mMTris/HCl, pH8.0, 10mM 5,5'dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 30mM acetyl Coenzyma A (Acetyl CoA) y 10mM ácido oxaloacético (OAA; omitido para el control) en un volumen final de 0.2 ml. CS cataliza la reacción entre acetyl CoA y OAA para formar ácido cítrico. El incremento en la extinción a 412 nm fue medido a 25°C. La actividad enzimática en unidad por gramo de tejido fue calculada usando un coeficiente de extinción de $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412nm. Se reportan las actividades masa específica como $\mu\text{mol min}^{-1}$

g de tejido⁻¹, actividad total (actividad masa específica por la masa de tejido fresco) como $\mu\text{mol min}^{-1}$ y actividad específica por gramo de proteína.

Estructura renal: Grosor medular relativo

Después de la eutanasia y la disección de roedores, los riñones fueron pesados y conservados en una solución de paraformaldehído-glutaraldehído. Se examinó la estructura renal de individuos provenientes de las 4 localidades. Para ello, se midió tanto el largo como el ancho renal con un Vernier (± 0.01 cm) y cortes medio-sagitales (Cortes et al., 1990). El ancho total y el grosor medular se realizaron en cortes sagitales desde la punta de la corteza-médula hasta extremo de la papila (Heisinger & Breitenbach, 1969; Blake, 1977) bajo observación en un microscopio óptico (10X). Los cortes medio sagitales se realizaron para maximizar el área de visualización de la médula. El grosor medular relativo (GMR) se calculó según Al-Kahtani et al. (2004), como sigue: $\text{GMR} = 10 (\text{grosor medular}) / (\text{largo} \times \text{grosor} \times \text{ancho})^{1/3}$

Análisis estadístico

En los casos en que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad las variables fueron transformadas a log₁₀. Para determinar la existencia de diferencias tanto en los parámetros morfológicos como fisiológicos en el estudio de variación fisiológica y morfológica a lo largo del gradiente de aridez; se utilizó un ANCOVA, usando la masa corporal como covariable y la localidad y sexo como factores. Para determinar las diferencias específicas entre los promedios de rasgos fisiológicos y morfológicos se utilizó una prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey. Para

determinar la posible asociación entre parámetros fisiológicos (e.g. TMB, PTAE, GMR) y la masa corporal se realizó una regresión simple. Para determinar la posible asociación entre los residuos de la TMB con la masa corporal y los residuos de masa de órganos con la masa corporal se realizó un análisis de regresión múltiple paso a paso (*stepwise forward*). Para determinar la asociación entre variables fisiológicas e índice de aridez se realizó un análisis de regresión simple. Se realizó un análisis de correlación para determinar la asociación entre variables fisiológicas y variables climáticas (véase Tabla 1). En casos de tener modelos con desigual tamaño muestral, se utilizó la opción suma de cuadrados tipo III. Para determinar la respuesta integrada de las variables se realizó un análisis de componentes principales (ACP), incluyendo en el modelo todas las variables analizadas, para posteriormente realizar un ANOVA sobre los ejes arrojados por el ACP.

Resultados

Tamaño corporal

Todos los datos de Masa corporal fueron transformados a \log_{10} antes de los análisis para corregir desviaciones de normalidad, (K-S $d=0.$, $p>0,2$) y homogeneidad de varianza (Levene, $F_{(3,90)}=1,54$ $p=0,2$). La masa corporal de *Phyllotis darwini* de las cuatro localidades de Chile, promedió en Copiapó $31,3 \pm 1,7$ g (N=24), en Vicuña $37,8 \pm 1,6$ g (N=28), en Santiago $54,1 \pm 2,0$ g (N=17) y en Quirihue $40,35 \pm 1,7$ g (N=25), encontrándose diferencias significativas entre localidades ($F_{3, 86}=26,41$ $p<0,0001$) y entre sexos ($F_{1, 86}=7,81$ $p=0,006$). No se encontró un efecto significativo en la interacción de la variables ($F_{3, 86}=2,25$ $p=0,088$). (Ver Tabla 1.2).

El análisis de componentes principales (ACP) que incluyó a las variables morfométricas (masa corporal, largo total, largo de la oreja, largo de la pata y largo de la cola) de *P. darwini* de las 4 localidades de estudio, usando las 5 variables incorporadas en el análisis, redujo a 1 factor que explica el 42% de la variación. El componente estuvo correlacionado la masa corporal, largo de la cola, largo de la pata y largo total. Este eje se interpretó como "tamaño corporal". El ANOVA reveló que este factor varía significativamente entre las localidades ($F_{3,61}=6,27$ $p<0,001$) y entre sexos ($F_{1,61}=6,02$ $p=0,01$). No se encontró efecto en la interacción de los factores ($F_{3,86}=1,91$ $p=0,13$). La prueba de Tukey reveló que la localidad de Santiago se diferenció significativamente del resto de las localidades (Tukey test $p<0,05$).

Considerando las variables morfométricas de manera individual, sólo el tamaño de la oreja, presentó diferencias entre localidades (ANCOVA, $F_{3, 60}=37,18$ $p<0,0001$), pero no entre sexos ni en la interacción de los factores ($F_{1,60}=0,02$ $p=0,9$ y $F_{3, 60}=1,09$ $p=0,36$

respectivamente), el test *a posteriori* de Tukey reveló que la localidad de Quirihue presentó valores significativamente menores (Tukey test $p < 0,05$) alcanzando una disminución de 22% comparado con la localidad xérica de Copiapó. En este sentido, el análisis de regresión nos muestra que esta variable se asocia negativa y significativamente con la latitud ($r = -0,8$, $r^2 = 0,64$, $F_{(1,63)} = 111,72$ $p < 0,0001$) y con el índice de aridez, Qi ($r = -0,91$, $r^2 = 0,83$, $F_{(1,63)} = 316,09$, $p < 0,0001$).

Tabla 1.2. Masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades a lo largo de un gradiente latitudinal. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey (con letras diferencias significativas entre sexo de cada localidad, y con números diferencias significativas entre localidades). Los valores se muestran en promedio \pm error estándar. Entre paréntesis se indica el tamaño muestral de cada grupo.

| Localidad | Macho | Hembra |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Copiapó ¹ | 34,17 \pm 2,19 (14) ^a | 28,41 \pm 2,59 (10) ^a |
| Vicuña ^{2,4} | 39,08 \pm 2,05 (16) ^a | 36,57 \pm 2,36 (12) ^a |
| Santiago ³ | 60,56 \pm 2,59 (10) ^a | 47,7 \pm 3,1 (7) ^b |
| Quirihue ⁴ | 39,56 \pm 2,11 (15) ^a | 41,15 \pm 2,59 (10) ^a |

Tabla 1.3. Eje ACP derivado del análisis de caracteres morfométrico en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. En negrilla las variables que presentan una carga $> 0,7$

| VARIABLES | ACP |
|------------------------|---------------|
| Masa corporal | -0,700 |
| Largo la oreja | -0,754 |
| Largo Pata | -0,297 |
| Largo de la cola | -0,710 |
| Largo total | -0,688 |
| Varianza explicada (%) | 42,4 |

Balance hídrico (PTAE, PAM) y energético (TMB, CT)

Los datos de TMB y PTAE fueron transformados a log10 para corregir desviaciones de la normalidad. Ambos, TMB y PTAE se asociaron positivamente con la masa corporal (TMB, $r^2=0,54$, $F_{(1,32)}=38,2$, $p<0,001$ y TEWL, $r^2=0,39$, $F_{(1,29)}=19,11$, $p<0,001$; Figura 1.2). El análisis de los residuos de las variables fisiológicas (TMB y PTAE) y la masa corporal reveló la existencia de una asociación funcional entre ellas ($r^2=0,14$, $F_{(1,28)}$, $p=0,04$; Figura 1.2). El MANOVA reveló un fuerte efecto de la localidad sobre los residuos de la TMB y la PTAE con la masa corporal (Wilks'lambda = 0,39, $F_{6,44}=4,34$, $p=0,001$), sin embargo no se presentaron diferencias entre sexos (Wilks $\Lambda=0,89$, $F_{2,22}=1,22$, $p=0,31$) ni en la interacción de ambos factores (Wilks $\Lambda=0,83$, $F_{6,44}=0,66$, $p=0,67$, ver Figura 1.2). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que tanto TMB como PTAE presentaron valores significativamente más altos en la localidad más austral (comuna de Quirihue, Tukey test: $p<0,05$). En paralelo, los resultados revelaron una asociación positiva y significativa entre los residuos tanto de TMB como de PTAE con el índice de aridez Qi (res TMB, $r^2=0,33$, $F_{(1,32)}=16,02$, $p<0,001$ y res PTAE, $r^2=0,25$, $F_{(1,29)}=9,63$, $p=0,004$, véase figura 1.3 y 1.4).

Al analizar los valores de PTAE de *P. darwini* medidos a 3 temperaturas ambientales (5, 15 y 30°C), los resultados revelaron una disminución significativa de la PTAE con el incremento de Ta ($F_{2,52}=60,97$, $p<0,0001$). Estas diferencias alcanzaron un 110% entre las temperaturas extremas (5 y 30°C); adicionalmente se encontró una disminución de 33% entre la PTAE alcanzada a los 5 y 15°C (Tukey test $p<0,05$ para todas las comparaciones). No se encontraron efectos significativos de la localidad ($F_{3,26}=1,84$, $p=0,16$), ni de la interacción localidad - Ta ($F_{6,52}=0,18$, $p=0,97$).

La razón entre la PAM y la PTAE tampoco presentó variación entre localidades ($F_{3,22} = 2,14$, $p = 0,12$), pero sí entre Ta ($F_{2,44} = 47,39$, $p < 0,0001$). El test de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$) reveló que a 30°C PAM/PTAE se diferenció significativamente de las otras temperaturas, disminuyendo un 35% a los 30°C. No se encontró un efecto de la interacción ($F_{6,44} = 0,93$, $p = 0,48$).

La diferencia entre la PTAE y la PAM presentó variaciones marginalmente significativas entre Ta ($F_{2,46} = 3,03$, $p = 0,05$) y el test de Tukey evidenció que a los 30°C se produce una significativa disminución en PTAE-PAM, que alcanza un 18% respecto de las otras temperaturas ($p < 0,05$). No se encontró diferencias significativas entre localidades ni un efecto de la interacción de los factores ($F_{3,23} = 2,33$, $p = 0,1$ y $F_{6,46} = 0,78$, $p = 0,58$, respectivamente).

Por su parte, la conductancia térmica de *P. darwini* fue significativamente mayor en la localidad de Copiapó ($F_{3,21} = 8,86$, $p < 0,001$), mostrando un incremento de un 111%, 146% y 86% respecto de Vicuña, Santiago y Quirihue respectivamente (ver Figura 1.5). No se encontró efecto significativo del sexo y de la interacción de ambos factores ($F_{1,21} = 0,44$, $p = 0,51$ y $F_{3,21} = 1,34$, $p = 0,28$ respectivamente). A pesar de variar significativamente entre los sitios de estudio, la conductancia térmica no se asoció significativamente con el índice de aridez (Q_i) ($r^2 = 0,01$, $F_{(1,28)} = 0,26$, $p = 0,61$). El análisis de correlación entre la conductancia térmica y variables climáticas de los sitios de estudio, reveló la existencia de una asociación significativa y negativa con la latitud ($r = -0,47$, $p = 0,009$) y una asociación positiva con la temperatura mínima anual ($r = 0,44$, $p = 0,01$). Sin embargo, no se correlacionó significativamente ni con la temperatura media anual ($r = 0,3$, $p = 0,1$), ni con la

temperatura máxima anual ($r=0,19$, $p=0,12$), tampoco con las precipitaciones anuales ($r=-0,29$, $p=0,23$).

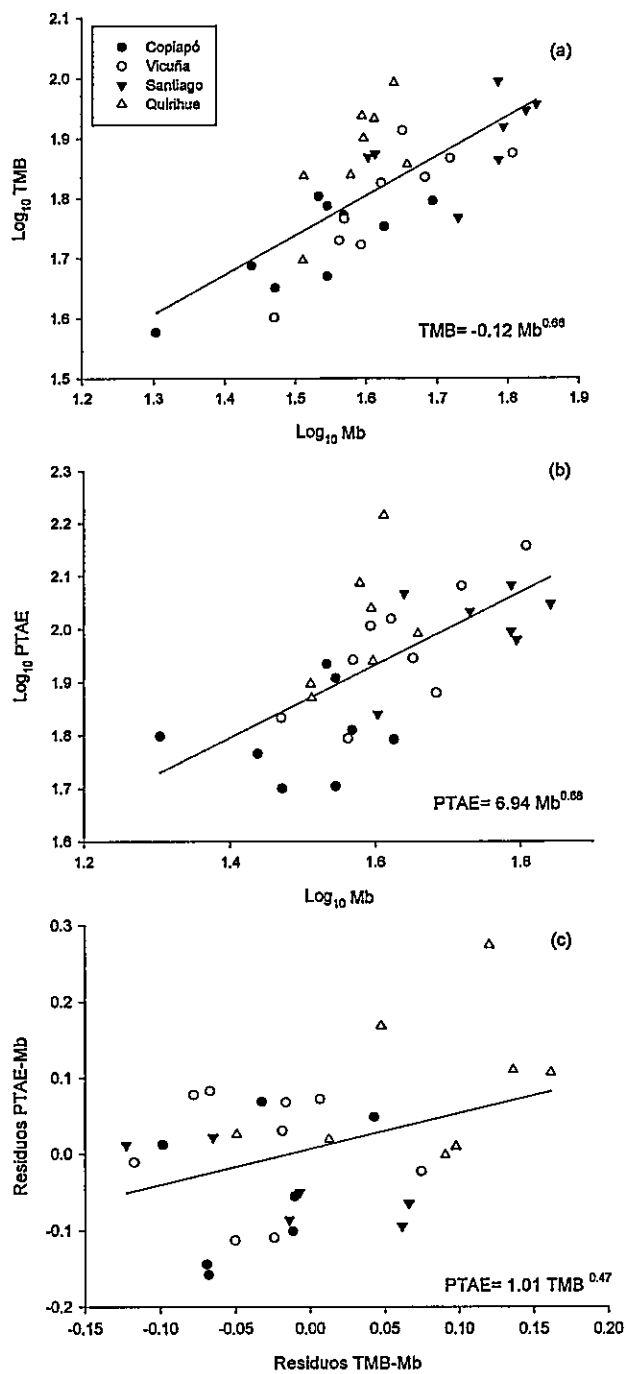


Figura 1.2. Relación entre tasa metabólica basal, la Pérdida de agua evaporativa y la Masa corporal en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile (a) TMB en función de la masa corporal; (b) PTAE en función de la masa corporal, (c) residuos de la PTAE en función de los residuos de TMB con la masa corporal.

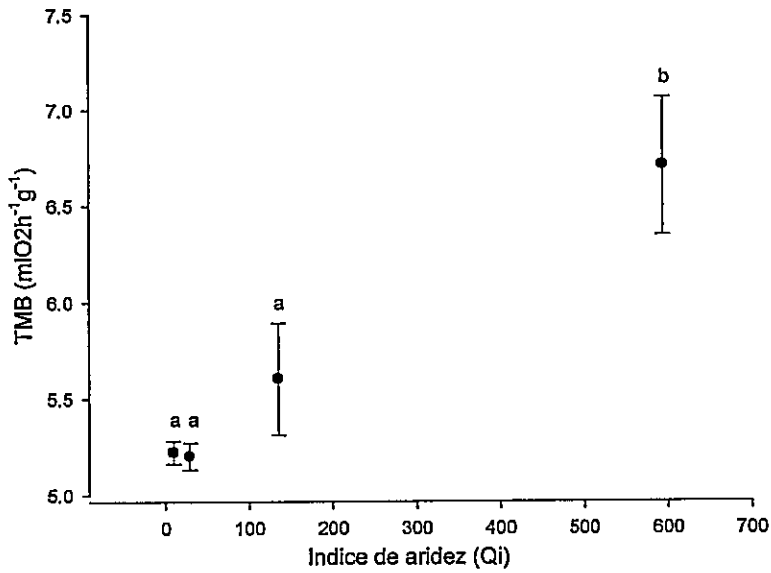


Figura 1.3. Tasa Metabólica Basal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile en función índice de aridez. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Las letras indican las diferencias entre grupos luego del test de comparaciones múltiples de Tukey.

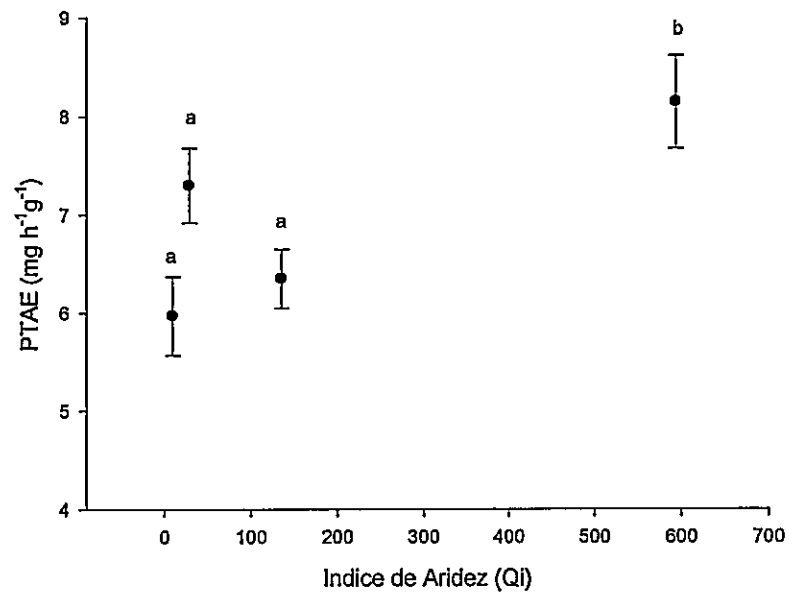
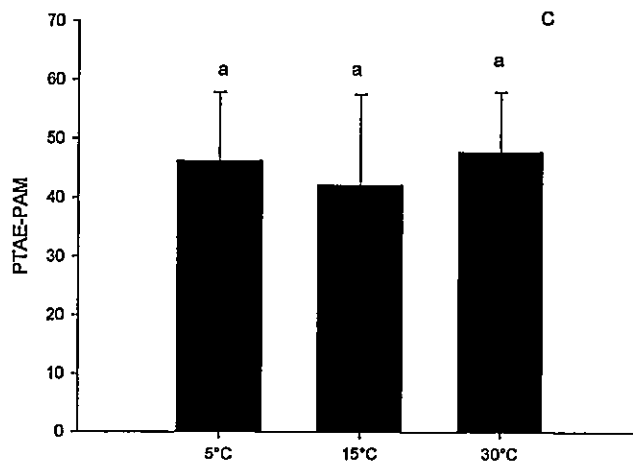
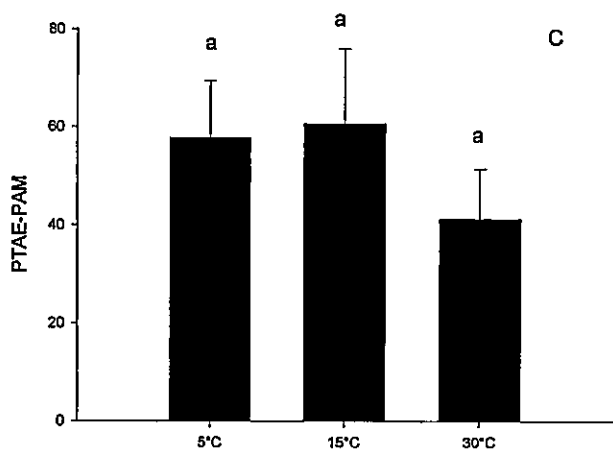
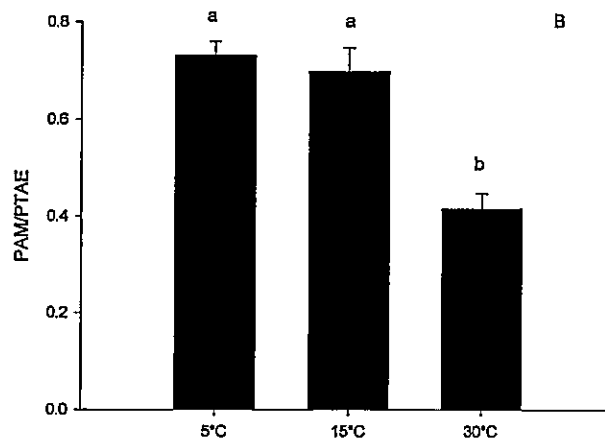
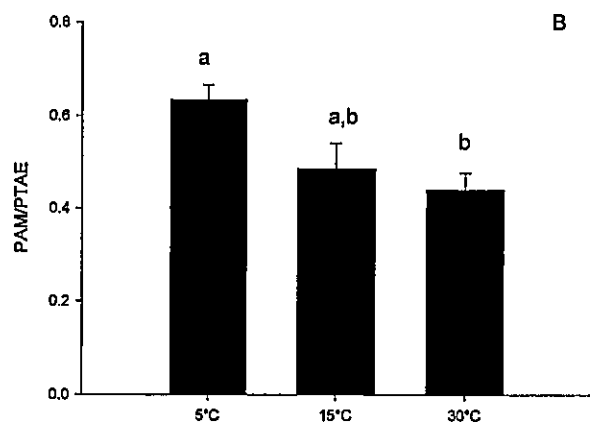
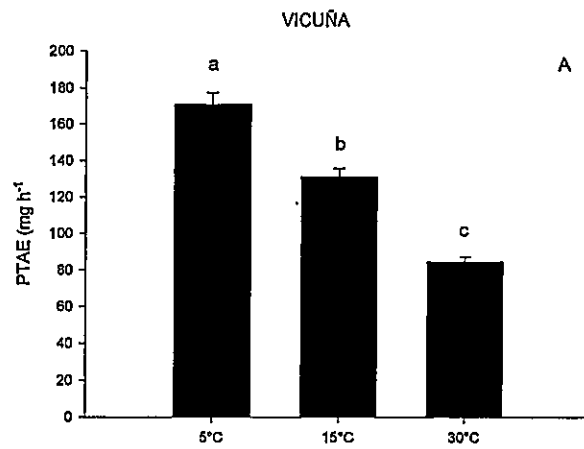
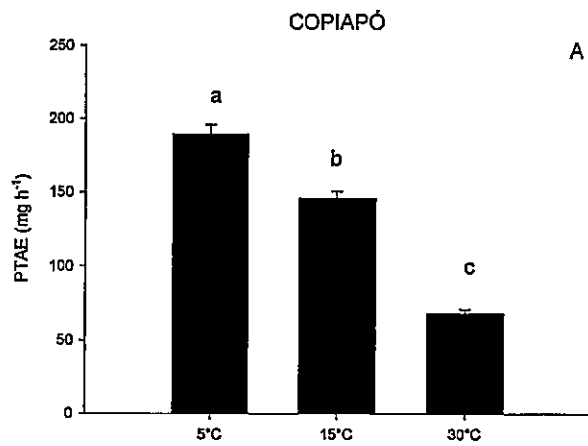


Figura 1.4. Pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile en función de índice de aridez. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Las letras indican las diferencias entre grupos luego del test de comparaciones múltiples de Tukey.



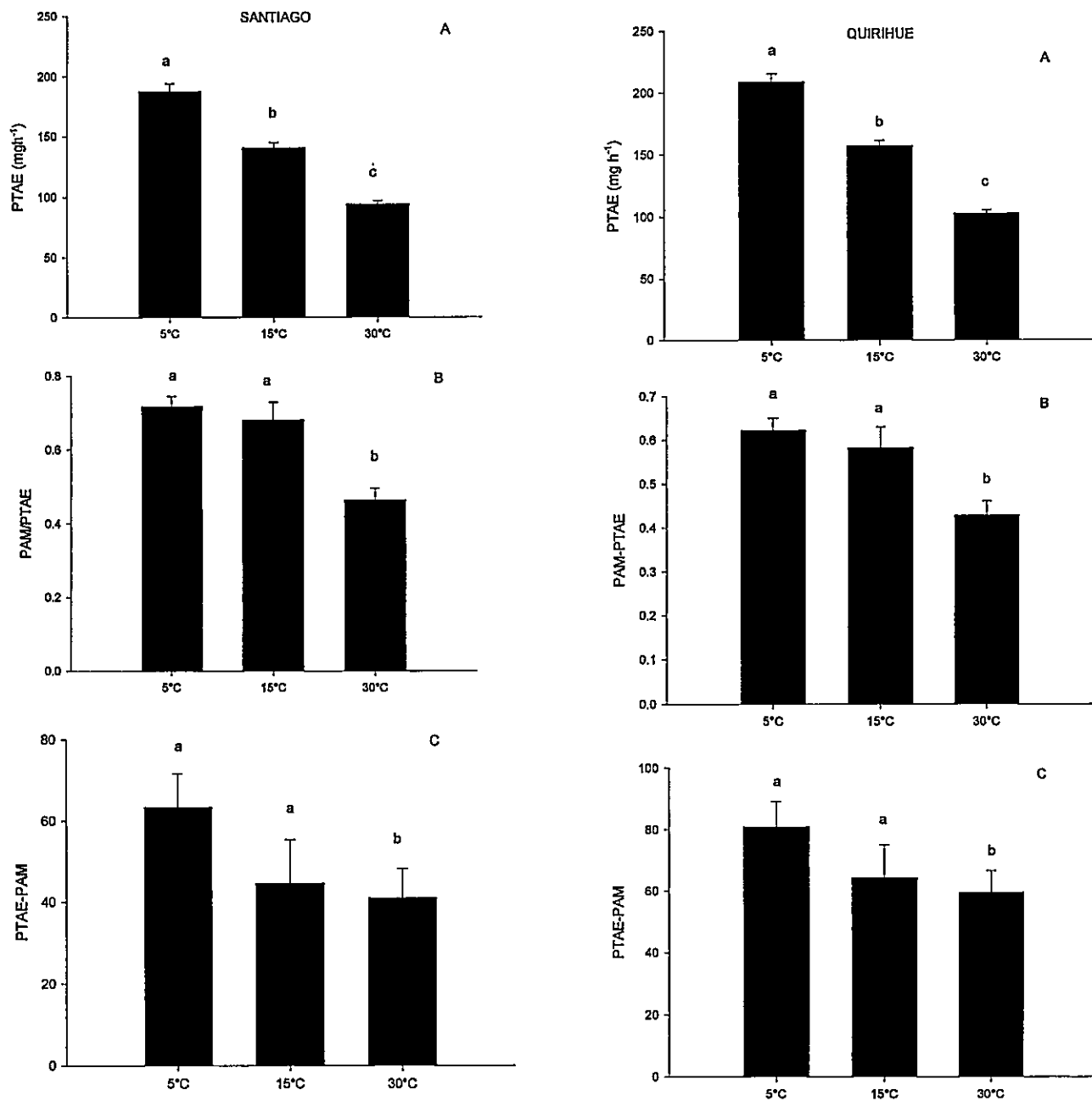


Figura 1.5. Balance hídrico en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile en relación a la Temperatura ambiental (A) Pérdida total de agua evaporativa (PTAE); (B) Proporción entre producción de agua metabólica y pérdida total de agua evaporativa; (C) Diferencia entre pérdida total de agua evaporativa y producción de agua metaolica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar

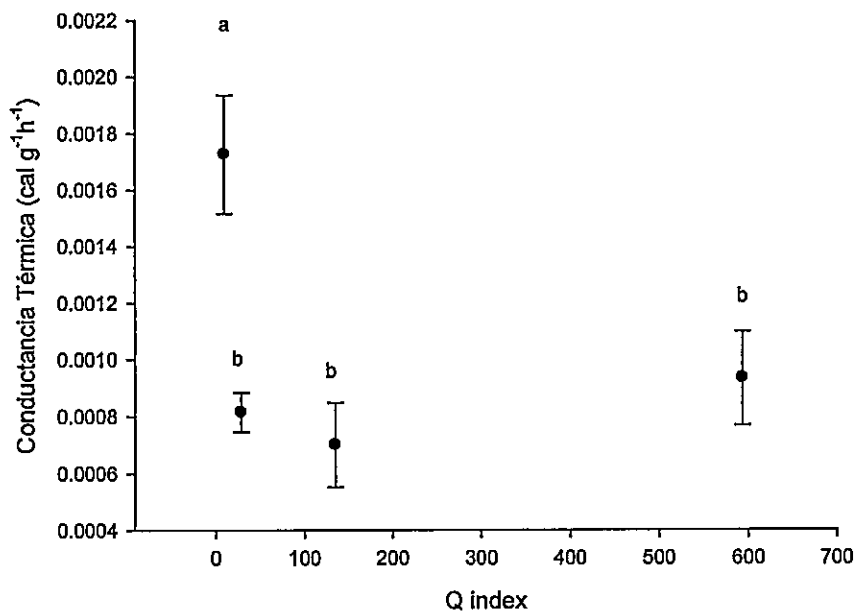


Figura 1.6. Conductancia térmica *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Masa de órganos

La masa del hígado, del páncreas, del riñón, del pulmón, del estómago, de los ciegos y del intestino grueso y delgado se correlacionaron positivamente con la masa corporal, (hígado $r=0,9$ $p<0,001$, páncreas $r=0,56$ $p=0,02$, riñón $r=0,75$ $p<0,001$, pulmón $r=0,75$ $p<0,001$, estómago $r=0,89$ $p<0,001$, ciegos $r=0,68$ $p=0,001$, intestino grueso $r=0,59$ $p=0,006$, e intestino delgado $r=0,58$ $p=0,008$).

Comparaciones de la masa fresca de los órganos entre las 4 localidades se muestran en la Tabla 1.4. Se encontraron diferencias significativas en el hígado ($F_{3,21}=3,54$, $p=0,03$), riñón, ($F_{3,22}=32,0$, $p<0,001$), pulmón ($F_{3,22}=14,73$ $p<0,001$), estómago ($F_{3,22}=7,17$, $p=0,001$) y ciegos ($F_{3,18}=328,86$, $p<0,001$). No se encontraron diferencias entre localidades en la masa del corazón ($F_{3,21}=0,27$, $p=0,84$), páncreas ($F_{3,21}=0,63$, $p=0,60$), intestino grueso ($F_{3,22}=1,41$, $p=0,26$) y en la masa y el largo del intestino delgado ($F_{3,22}=1,95$ $p=0,14$ y $F_{3,19}=0,09$ $p=0,96$ respectivamente). Además, se encontró que las hembras presentaron un incremento significativo tanto de la masa de estómago como del largo del intestino grueso ($F_{1,22}=6,35$, $p=0,01$ y $F_{1,18}=30$, $p=0,08$). No se encontró un efecto significativo del sexo sobre la masa del riñón ($F_{1,22}=2,22$, $p=0,14$), ciegos ($F_{1,18}=0,91$, $p=0,35$), intestino grueso ($F_{1,22}=1,11$, $p=0,3$), corazón ($F_{1,21}=0,59$, $p=0,44$), páncreas ($F_{1,21}=2,5$ $p=0,12$), pulmón ($F_{1,22}=0,97$ $p=0,33$) ni en el largo del intestino grueso y delgado ($F_{1,18}=3,30$, $p=0,08$ y $F_{1,19}=0,99$ $p=0,33$). Tampoco se encontró efecto de la interacción de los factores localidad y sexo sobre la masa de hígado ($F_{3,21}=1,3$ $p=0,2$), riñón ($F_{3,22}=0,99$ $p=0,41$), estómago ($F_{3,22}=1,49$ $p=0,24$), ciegos ($F_{3,22}=2,98$ $p=0,06$), intestino delgado y grueso ($F_{3,22}=2,59$ $p=0,07$ y $F_{3,22}=0,25$ $p=0,8$), corazón ($F_{3,21}=0,89$ $p=$

0,45), páncreas ($F_{3,21}=0,5$ $p= 0,68$) , pulmón ($F_{3,22}=0,46$ $p= 0,71$) ni en el largo del intestino grueso y delgado ($F_{3,18}=0,74$ $p= 0,53$ y $F_{3,19}=0,43$ $p= 0,73$).

Tabla 1.4. Masa corporal y masa de los órganos en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios \pm EE.

| | Copiapó | Vicuña | Santiago | Quirihue |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Masa Corporal (g) | 35.0 \pm 2.62 ^a (8) | 41.9 \pm 3.77 ^a (8) | 57.1 \pm 4.57 ^b (7) | 36.49 \pm 1.35 ^a (8) |
| Hígado (g) | 1.32 \pm 0.10 ^a (8) | 1.45 \pm 0.12 ^a (8) | 2.45 \pm 0.31 ^b (7) | 1.58 \pm 0.08 ^a (7) |
| Corazón (g) | 0.26 \pm 0.12 ^a (8) | 0.20 \pm 0.02 ^a (8) | 0.28 \pm 0.02 ^a (7) | 0.19 \pm 0.01 ^a (8) |
| Páncreas (g) | 0.15 \pm 0.06 ^a (8) | 0.07 \pm 0.01 ^a (8) | 0.07 \pm 0.33 ^a (7) | 0.14 \pm 0.02 ^a (8) |
| Riñón (g) | 0.35 \pm 0.01 ^a (8) | 0.36 \pm 0.02 ^a (8) | 0.59 \pm 0.02 ^b (7) | 0.37 \pm 0.01 ^a (8) |
| Pulmón (g) | 0.21 \pm 0.01 ^a (8) | 0.23 \pm 0.01 ^a (8) | 0.46 \pm 0.03 ^b (7) | 0.20 \pm 0.01 ^a (8) |
| Estomago (g) | 0.41 \pm 0.19 ^a (8) | 0.57 \pm 0.04 ^b (8) | 0.77 \pm 0.04 ^c (7) | 0.53 \pm 0.03 ^{bd} (8) |
| Ciego (g) | 0.6 \pm 0.02 ^a (8) | 0.75 \pm 0.09 ^a (8) | 0.76 \pm 0.09 ^a (6) | 0.60 \pm 0.03 ^a (7) |
| ID (g) | 1.14 \pm 0.06 ^a (8) | 1.23 \pm 0.07 ^a (8) | 1.76 \pm 0.23 ^a (7) | 1.14 \pm 0.02 ^a (8) |
| IG (g) | 0.32 \pm 0.02 ^a (8) | 0.43 \pm 0.03 ^a (8) | 0.43 \pm 0.04 ^a (7) | 0.32 \pm 0.02 ^a (8) |
| ID (mm) | 261.5 \pm 11.5 ^a (8) | 292.2 \pm 4.0 ^a (8) | 300.9 \pm 17.5 ^a (7) | 274.6 \pm 14.8 ^a (8) |
| IG(mm) | 128.1 \pm 5.81 ^a (8) | 164.8 \pm 9.3 ^a (8) | 151.7 \pm 29.6 ^a (7) | 129.5 \pm 6.06 ^a (8) |

El análisis de regresión múltiple paso a paso (*forward stepwise*) entre los residuos de TMB y los residuos de la masa de órganos revelan que un 66 % de la varianza en TMB es explicada por la masa del corazón, estómago y de los ciegos (r^2 ajustado =0,66 $F_{(4,15)}=7.2$ $p=0,002$)

Actividad enzimática

La actividad total de *Citrato sintasa* y *Citocromo c Oxidasa* se asoció significativamente con la masa corporal (CS, $r^2=0,38$ $F_{(1,25)}=15,39$ $p<0,001$; COX, $r^2=0,47$ $F_{(1,27)}=28,82$ $p<0,001$, Figura 1.7).

Comparaciones de la actividad en el hígado de estas 2 enzimas, entre las 4 localidades se muestran en la Tabla 1.5. La actividad total no presentó diferencias significativas entre localidades (CS $F_{(3,18)}=2,97$ $p=0,06$ y COX $F_{(3,19)}=0,86$ $p=0,47$), entre sexo (CS $F_{(1,18)}=2,26$ $p=0,14$ y COX $F_{(3,19)}=0,02$ $p=0,87$) y no hubo efecto significativo de la interacción entre los factores (CS $F_{(3,18)}=0,43$, $p=0,72$ y COX $F_{(3,19)}=1,99$ $p=0,14$). La actividad específica tampoco presentó diferencias significativas entre localidades (CS $F_{(3,21)}=1,49$, $p=0,24$ y COX $F_{(3,21)}=0,58$, $p=0,63$), entre sexo (CS $F_{(1,21)}=2,69$, $p=0,11$ y COX $F_{(3,19)}=0,41$, $p=0,52$) y no hubo efecto de la interacción (CS $F_{(3,18)}=0,77$, $p=0,52$ y COX $F_{(3,19)}=2,0$ $p=0,14$). La actividad por gramo de proteína tampoco presentó diferencias significativas entre localidades (CS $F_{(3,21)}=1,63$, $p=0,21$ y COX $F_{(3,22)}=0,41$, $p=0,73$), sin embargo la CS presentó diferencias significativas entre sexos (CS $F_{(1,21)}=4,88$ $p=0,03$). No se encontró un efecto significativo del sexo sobre COX ($F_{(3,22)}=1,44$, $p=0,24$). Ninguna de las actividades específicas presentaron diferencias significativas en la interacción de los factores (CS $F_{(3,21)}=0,68$ $p=0,57$ y COX $F_{(3,22)}=1,77$ $p=0,18$).

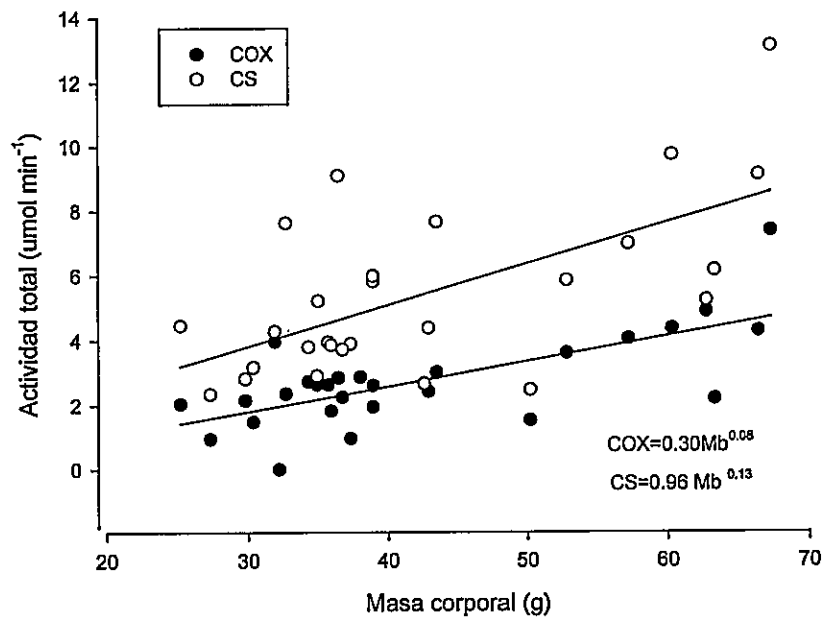


Figura 1.7. Actividad enzimática de Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en función de la masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile.

Tabla 1.5. Actividad de Enzimas metabólicas en muestras de hígado de de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios \pm EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | Vallenar | Vicuña | Santiago | Quirihue |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| COX | | | | |
| umol min ⁻¹ g tejido ⁻¹ | 1.48 \pm 0.23 (8) | 1.34 \pm 0.25 (8) | 1.17 \pm 0.32 (6) | 1.76 \pm 0.19 (8) |
| Act.total (U) | 1.90 \pm 0.30 (8) | 2.04 \pm 0.49 (8) | 3.21 \pm 0.99 (6) | 2.69 \pm 0.21 (8) |
| umol min ⁻¹ g proteina ⁻¹ | 6.46 \pm 0.72 (8) | 6.19 \pm 0.70 (8) | 6.27 \pm 0.72 (6) | 7.24 \pm 0.83 (8) |
| CS | | | | |
| umol min ⁻¹ g tejido ⁻¹ | 2.74 \pm 0.36 (7) | 3.34 \pm 0.41 (8) | 3.06 \pm 0.21 (6) | 3.49 \pm 0.30 (8) |
| Act.total (U) | 3.37 \pm 0.27 (7) | 4.89 \pm 0.75 (8) | 8.45 \pm 1.12 (6) | 5.49 \pm 0.55 (8) |
| umol min ⁻¹ g proteina ⁻¹ | 10.86 \pm 0.65 (7) | 14.02 \pm 1.79 (8) | 12.51 \pm 1.26 (6) | 14.36 \pm 1.49 (8) |

Morfología renal: Grosor medular relativo

El grosor medular relativo (GMR) mostró un escalamiento negativo con la masa corporal ($GMR = 2,73 Mb^{-0,51}$, $r^2 = 0,39$, $F_{(1,29)} = 18,4$, $p < 0,001$, Figura 6) y se asoció negativa y significativamente con el índice de aridez ($GMR = 1,82 Mb^{-0,13}$, $r^2 = 0,2$, $F_{(1,31)} = 7,71$, $p < 0,01$, ver Figura 8). Se encontró un efecto significativo de la localidad en el GMR ($F_{(3,22)} = 9,55$, $p < 0,001$). La prueba de Tukey reveló que las dos localidades del norte, no se diferencian significativamente entre sí, pero presentan un incremento de GMR de un 126% en relación a Santiago y de un 32% (respecto de la localidad de Quirihue, ver Figura 1.9 y 1.10).

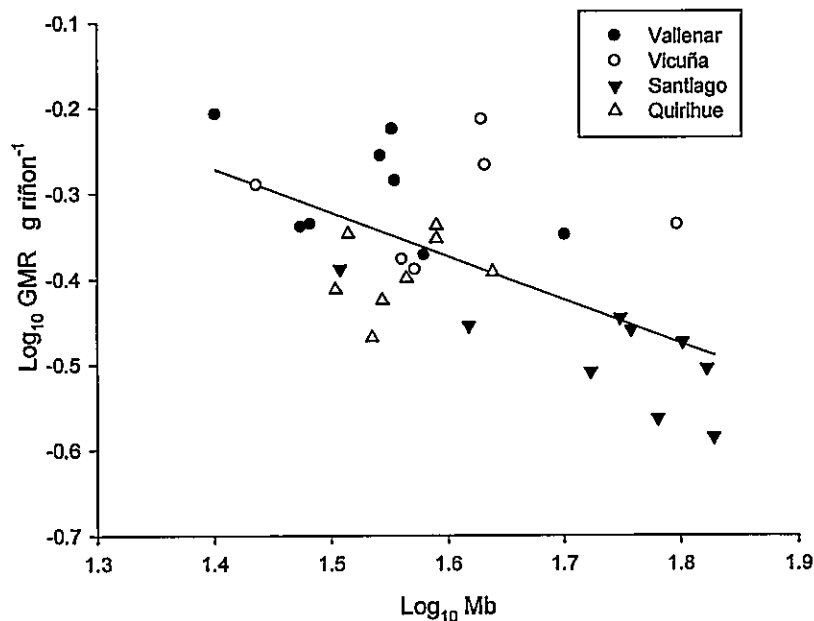


Figura 1.8. Grosor Medular Relativo (GMR) en relación a la masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile.

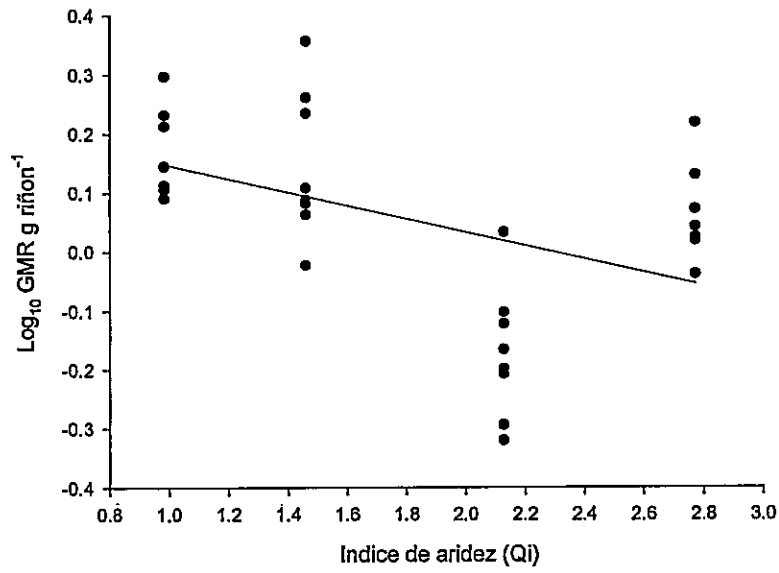


Figura 1.9. Grosor medular relativo de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile en relación al índice de aridez



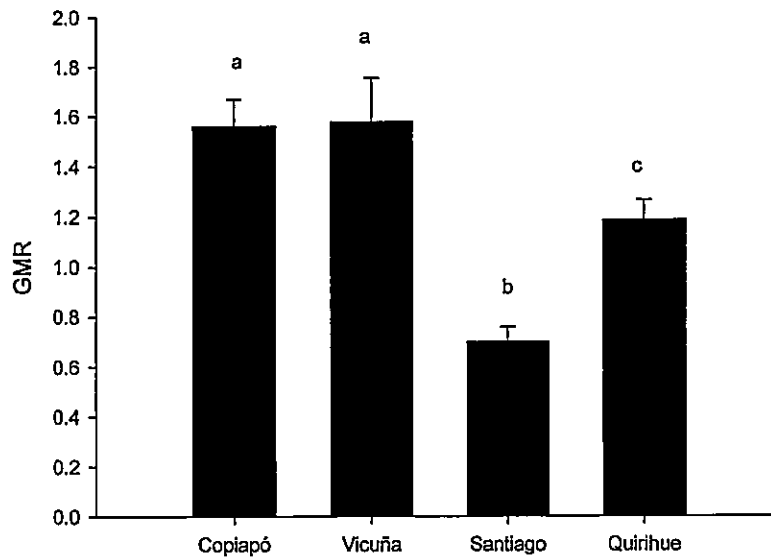


Figura 1.10. Grosor medular relativo de *Phyllotis darwini* en cuatro localidades de Chile. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar

Análisis multivariado

Para reducir el número de variables correlacionadas, a un número menor de variables ortogonales, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) incluyendo todas las variables estudiadas. Adicionalmente, se utilizó un ANOVA usando localidad como factor y los dos ejes principales arrojados por el análisis (CP1 y CP2) como variables dependientes. De las 16 variables incorporadas al análisis, el modelo las redujo a 2 factores que explican el 70.7 % de la variación (Tabla 1.6). El primer componente estuvo fuertemente correlacionado con la masa corporal (Mc), la tasa metabólica basal (TMB), la masa del hígado, del páncreas, del riñón, del pulmón, del estómago, se los ciegos, del intestino delgado, del intestino grueso, con el grosor medular relativo (GMR) y la actividad

total de las enzimas Citrato Sintasa (CS) y Citocromo c Oxidasa (COX). El segundo eje (ACP 2) estuvo correlacionado con la Pérdida total de agua evaporativa (PTAE), Tabla 1.6. El Anova reveló la existencia de un fuerte efecto tanto de la localidad ($F_{(6,36)}=11.06$ $p<0,0001$) sobre ambos ejes. El análisis de comparaciones múltiples muestra una significativa diferenciación de *Phyllotis darwini* provenientes de la localidad de Santiago (Figura 1.11).

Tabla 1.6. Ejes de ACP derivados del análisis de caracteres energéticos y osmoregulatorios en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. En negrilla las variables que presentan una carga $> 0,7$

| Variables | ACP eje 1 | ACP eje 2 |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|
| PTAE | -0.408556 | 0.775928 |
| Mc | -0.878794 | 0.111915 |
| TMB | -0.716644 | 0.074822 |
| GMR | 0.802410 | -0.019307 |
| CT | 0.507095 | -0.482737 |
| Masa Hígado | -0.939697 | -0.17893 |
| Masa Corazón | -0.076635 | -0.492357 |
| Masa Páncreas | -0.668446 | -0.53207 |
| Masa Riñón | -0.901857 | -0.186126 |
| Masa Pulmón | -0.883011 | -0.195382 |
| Masa Estómago | -0.951362 | 0.157871 |
| Masa Ciegos | -0.770205 | 0.302459 |
| Masa Intestino delgado | -0.871638 | -0.214356 |
| Masa Intestino grueso | -0.730889 | 0.266601 |
| Actividad total Actividad total CS | -0.901461 | -0.169525 |
| Actividad total Actividad total COX | -0.823268 | -0.079798 |
| Varianza explicada (%) | 59.7 | 10.95 |
| Varianza explicada acumulativa (%) | 59.7 | 70.73 |

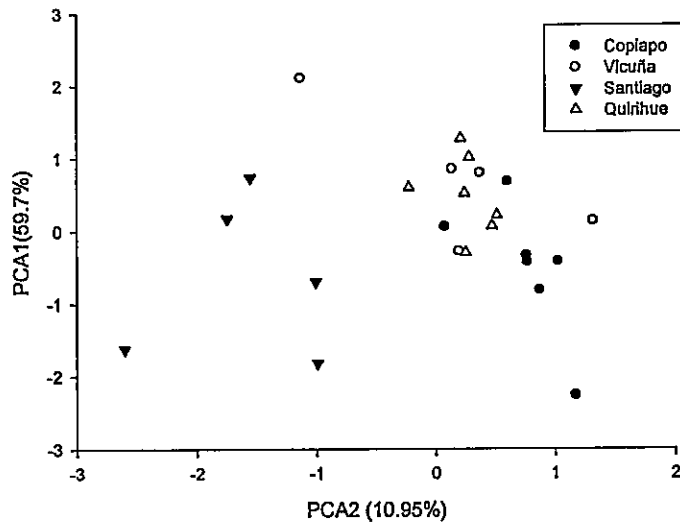


Figura 1.11. Espacio de ordenación de los componentes principales de caracteres energéticos y osmoregulatorios en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Entre paréntesis el porcentaje de varianza explicada por cada eje.

Discusión

El efecto de las variables ambientales sobre la diversidad fisiológica ha sido ampliamente descrito en la literatura (McNab, 1986; Lovegrove, 2000; Rezende et al., 2004; Karasov & McWilliams, 2005). Por ejemplo, Corp et al. (2008) encontraron que dos poblaciones de *Apodemus sylvaticus* presentaron variaciones estacionales en la tasa metabólica y en la conductancia térmica asociado a diferencias tanto en vegetación como en temperatura ambiental. De la misma forma, Wan-long et al. (2013) reportaron que *Eothenomis olitor* es capaz de ajustar, entre otros atributos fisiológicos, la tasa metabólica y la pérdida de agua por evaporación en ambientes altamente estacionales de tal manera de asegurar su sobrevivencia en esas condiciones. Asimismo, Díaz et al. (2006) reportaron que el tamaño renal y el grosor medular relativo roedores sudamericanos, se asoció directamente con la aridez del área, incrementando en sectores caracterizados por altas temperaturas ambientales y baja disponibilidad hídrica. En este capítulo, se evaluó la variabilidad intra-específica en el balance hídrico y energético en *Phyllotis darwini*, un roedor con un amplio rango de distribución en Chile, que enfrenta ambientes disímiles en cuanto a temperaturas, precipitaciones y productividad primaria.

La dificultad de mantener altas temperaturas corporales constantes en ambientes cálidos comparados con ambientes de bajas temperaturas, puede ser resuelta a través de modificaciones en la producción y en la pérdida de calor (Schmidt Nielsen, 1997). Cuando la temperatura ambiental es elevada, las respuestas termorregulatorias, pueden incluir cambios en el flujo de calor desde el animal hacia el entorno a través de variaciones en el metabolismo, en la pérdida de agua cutánea y/o respiratoria, en las propiedades físicas de la

piel, en la respuesta pilomotor y vasomotor y en cambios posturales entre otros (Serrat, et al., 2008, Wan-Long et al., 2008, 2010, 2013). En paralelo, y a nivel biogeográfico, la regla de Allen ha sido utilizada para describir la observación de que apéndices (e.g. orejas, extremidades y colas) de animales que habitan regiones geográficas frías son consistentemente más cortas que la de su contraparte cercanamente relacionadas que habitan áreas cálidas (Allen, 1877). Así, una disminución en el tamaño de dichos apéndices minimizaría la pérdida de calor por reducir el área superficial en relación al volumen, (Ashoub, 1958; Weave & Ingram, 1969, Harrison, 1960; Serrat, 2008). A un nivel interoblacional, *Phyllotis darwini* presentó variaciones en atributos energéticos, entre localidades que presentan índices de aridez que van desde 9.8 hasta 593.4 (Copiapó y Quirihue respectivamente). Individuos provenientes de la localidad más árida, además de presentar una reducción significativa en la tasa metabólica basal (33% entre localidades extremas, figura 1.2), presentaron una conductancia térmica significativamente mayor, alcanzando más del doble valor encontrado en las localidades más australes (ver figura 1.5). Adicionalmente las medidas morfométricas de roedores provenientes de las cuatro localidades de estudio apoyan la regla biogeográfica de Allen, el largo de la oreja se asoció negativamente con la latitud, alcanzando diferencias de 21% entre localidades extremas (Copiapó-Quirihue).

En este sentido, surge la interrogante ¿qué mecanismos proximales podrían explicar el incremento en la tasas de gasto energético a lo largo del gradiente latitudinal? Se ha descrito que en sintonía con la demanda energética, los animales podrían modificar tanto el tamaño de órganos, como la actividad de órganos metabólicamente activos (Crabtree & Newsholme, 1971, Dowson & Olson, 2003, Koteja, 1995). Nuestros resultados no

respaldan esta hipótesis: el incremento en la TMB (masa independiente) observado en la localidad de Quirihue, no se asoció con incrementos en la masa de órganos en esa localidad, tampoco con mayor actividad enzimática de CS o COX. Por otra parte, los resultados revelaron que individuos de la localidad de Santiago fueron quienes presentaron una mayor masa corporal y mayor masa de órganos (hígado, riñón, pulmón, estomago y ciegos) respecto de las otras localidades, lo interesante, es que estas variaciones no se traducen en incrementos significativos en la TMB masa independiente.

Diversos estudios, han mostrado que en condiciones de aridez, los animales presentan bajas tasas de pérdida de agua y poseen la habilidad de conservarla más eficientemente, respecto de especies o poblaciones que habitan ambientes más húmedos (Wolf & Walsberg, 1996, Buttermer & Thomas, 2003, Sabat et al, 2006; Tirado et al., 2007). La respuesta de *P. darwini* en relación a la PTAE fue de acuerdo a lo esperado y en efecto, la localidad del extremo norte de este estudio (Copiapó) presentó una reducción del un 37% en la PTAE en relación a la localidad de Quirihue, mostrando una significativa asociación con el índice de aridez. Además, la PTAE medida a tres temperaturas ambientales (5, 15 y 30°C) mostró valores 110% inferiores cuando se midió a 30°C respecto de las medidas realizadas a 5°C. En todas las localidades de estudio la tasa entre PAM y PTAE disminuyó significativamente con el incremento de la temperatura ambiental, y la cantidad neta de agua perdida (PAM-PTAE) también fue significativamente menor a altas temperaturas ambientales. Estos resultados apoyan la hipótesis que la reducción de la pérdida de agua evaporativa tendría un importante valor adaptativo para los animales que experimentan altas temperaturas ambientales, como aquellos que habitan climas desérticos (Marilyn & Dale, 2001; Bozinovic & Gallardo, 2006).

En relación a la estructura renal, las diferencias encontradas entre localidades no fueron concordante con lo descrito anteriormente para roedores (véase Al-Kahtani et al., 2004). Como se mencionó, para este grupo se ha documentado que existiría una relación positiva entre el tamaño renal y el aridez del hábitat a un nivel inter-especifico (véase además Braun 1978; Goldstein & Braun 1989, Gallardo & Cortez, 1999). Sin embargo, el tamaño renal, no se diferencio significativamente entre las localidades extremas en este gradiente de aridez. Fueron los individuos provenientes de la localidad de Santiago, quienes mostraron tamaños renales significativamente mayores (23%). Sin embargo, cuando se analizó el GMR, un indicador de la habilidad de los individuos de concentrar la orina (Al-kahtani et al., 2004), los resultados revelaron que los individuos las localidades áridas (Copiapó-Vicuña) presentaron valores significativamente mayores respecto de Santiago y Quirihue (122 y 36% respectivamente), de tal manera que como respuesta a la necesidad de conservar agua, los individuos modificarían el GMR y no el tamaño renal, como se había documentado a nivel interespecifico (Al-kahtani et al., 2004).

El análisis de componentes principales permite ver de una manera integrada las características fisiológicas de *Phyllotis darwini* entre localidades, y revela, por una parte, la existencia de una clara integración de la fisiología energética y osmorregulatoria a nivel inter-poblacional, ya que el 59.7% de la variabilidad observada en atributos fisiológicos entre los individuos fue explicada por el componente principal 1 (véase tabla 1.6 para detalle), además, el espacio de ordenación de los componentes principales mostro una clara diferenciación entre las localidades, separando significativamente a los individuos de Santiago del resto de las poblaciones (figura 10). Esta diferenciación podría explicarse entre otros factores, por cambios en la disponibilidad y calidad de los ítems dietarios entre

localidades. Individuos de Santiago mostraron mayores tamaños en órganos relacionados con el procesamiento y absorción de nutrientes (Hammond & Janes, 1998). En este contexto sería interesante conocer aspectos de la fisiología digestiva y hábitos dietarios entre las localidades para incrementar el entendimiento de cómo los diversos factores ambientales afectan la fisiología de las especies silvestres en el campo. Es interesante que en algunos casos (e.g., el tamaño renal) los resultados encontrados en *P. darwini* se contradicen con lo encontrado a un nivel interespecífico en roedores. La discrepancia puede revelar la diferencia entre los niveles de análisis, inter- e intra-específico.

En conclusión, las poblaciones de *Phyllotis darwini* a lo largo del gradiente de aridez, presentan diferentes estrategias fisiológicas en relación a sus ambientes naturales. Por ejemplo, los individuos de la localidad más austral, caracterizada por presentar el mayor índice de precipitaciones y menores temperaturas, mostraron un incremento en las tasas de gasto energético en relación a quienes habitan ambientes áridos. Individuos de ambientes áridos, por su parte, además de disminuir la TMB y la PTAE, presentaron modificaciones en estructura renal asociada con el incremento en la habilidad de conservar agua en esas condiciones, adicionalmente incrementaron la habilidad en la pérdida de calor, a través de aumento en la CT y del tamaño de apéndices (e.g. oreja).

Referencias

1. Arens, J. & Cooper, S. J. 2005. Metabolic and ventilatory acclimatization to cold stress in house sparrows (*Passer domesticus*) *Physiol. Bioch. Zool.* 78:579–589.
2. Ashoub, M.A. 1958. Effect of two extreme temperatures on growth and tail-length of mice. *Nature* 181:284
3. Al-kahtani, M.A. 2003. Evolutionary and Phenotypic Plasticity of Mammalian Kidney: Using the Laboratory House Mouse as a Model. PhD diss. University of Wisconsin-Madison.
4. Al-kahtani, M.A., Zuleta, C., Caviedes-Vidal, E. & Garland, T. 2004 Kidney mass and relative medullary thickness of rodent in relation to habitat, body size, and phylogeny. *Physiol Bioch Zool* 77: 346-365.
5. Bozinovic, F., Rojas, J.M., Broitman, B.R. & Vásquez, R.A. 2009. Basal metabolism is correlated with habitat productivity among populations of degus (*Octodon degus*). *Comp Bioch Physiol A.* 152: 560-564.
6. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
7. Braun, E. 1978. Renal response of the starling (*Sturnus vulgaris*) to an intravenous salt load *Am J Physiol* 234: F270-F278.
8. Cavieres, G. & Sabat, P. 2008. Geographic variation in the response to thermal acclimation in rufous-collared sparrows: are physiological flexibility and environmental heterogeneity correlated? *Funct Ecol* 22: 509-515.
9. Crabtree, B., Newsholme, E.A. 1972. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem* 126:49-58.

10. Cruz-Neto, A.P. & Jones, K. 2005. Exploring the evolution of basal metabolic rate in bats. Pp. 58–69 in Zubaid, A., Kunz, T.H. & McCracken, G., eds. *Functional Morphology and Ecology of Bats*. Oxford University Press, Oxford.
11. Daan, S., Masman, D. & Groenewold, A. 1990. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *Am J Physiol* 259: R333-R340.
12. Dawson, W.R. & Bennett, A.F. 1973. Roles of metabolic level and temperature regulation in the adjustment of Western plumed pigeons (*Lophophaps ferruginea*) to desert conditions. *Comp Biochem Physiol* 44: 249-266.
13. Dawson, W.R., & Olson, J.M. 2003. Thermogenic capacity and enzymatic activities in the winter-acclimatized dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J Therm Biol* 28:497–508.
14. di Castri, F. & Hajek, E.R. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 129 pp.
15. Diaz, G. B., Ojeda, R. A. & Rezende, E. L. 1996. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptation of South American hystricognath rodents. *Funct Ecol* 20:609-620.
16. Gallardo, P.A., Cortez, A. & Bozinovic, F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. *Physiol Bioch Zool* 78:145-152.
17. Goldstein, D.L. & Braun, E.J. 1989. Structure and concentrating ability in the avian kidney. *Am J Physiol* 25: R501-R509.
18. Guderley, H. 1998. Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In *Cold Ocean Physiology* (ed. H.-O. Pörtner and R. Playle), pp. 58-87. Cambridge: Cambridge University Press.
19. Harrison, G.A. 1960. Environmental modification of mammalian morphology. *Man* 60:3-6.
20. Hammond, K.A. & Janes, D.N. 1998. The effects of increased protein intake on kidney size and function. *J Exp Biol* 201, 2081-2090.

21. Hinsley, S.A., Ferns, P.N., Thomas, D.H. & Pinshow, B. 1993. Black-bellied Sandgrouse (*Pterocles orientalis*) and Pin-tailed Sandgrouse (*Pterocles alchata*): Closely related species with differing bioenergetic adaptations to arid zones. *Physiol Zool* 66: 20-42.
22. Iriarte, A. 2008. *Mamíferos de Chile*. Lynx Edicions. Barcelona, España. 150 pp.
23. Jaksic, F. M. 1997. *Ecología de los vertebrados de Chile*. Vol. 1. Ediciones de la Universidad Católica, Santiago.
24. Karasov, W.H., & McWilliams, S.R. 2005. Digestive constraints in mammalian and avian ecology. Chapter 4, pp 87 – 112 in J. M. Starck & T. Wang, eds. *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates*, Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
25. Krebs, H.A. 1950. Body size and tissue respiration. *Bioch Bioph Act* 4: 249–269.
26. Lovegrove, J.A., Clohessy, A., Milon, H. & Williams, C.M. 2000. Modest doses of beta-glucan do not reduce concentrations of potentially atherogenic lipoproteins. *Am J Clin Nut* 72:49-55.
27. McNab, B.K. 1986a. The influence of food habits on the energetics of eutherian mammals. *Ecol Monographs* 56:1-19.
28. McNab, BK. 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View from Energetics*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
29. McNab, B.K. & Morrison, P.R. 1963. Body temperature and metabolism in subspecies of *Peromyscus* from arid and mesic environments. *Ecol Mon* 33: 63-82.
30. McKechnie, A.E., Freckleton, R.P. & Jetz, W. 2006. Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. *Proc Roy Soc B* 273: 931-937.
31. McKechnie, A.E., Chetty, K., & Lovegrove, B.G. 2007. Phenotypic flexibility in the basal metabolic rate of Laughing Doves: responses to short-term thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 210:97-106.

32. Menon, G.K., Baptista, F., Elias, P.M. & Bouvier, M. 1987. Fine structural basis of the cutaneous water barrier in nestling Zebra finches *Poephila guttata*. *IBIS* 130:503-511.
33. Moyes, C.D., Mathieu-Costello, O.A., Tsuchiya, N., Filburn, C. & Hansford, R.G. 1997. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am J Physiol* 272: 1345-1351.
34. Mueller P & Diamond J (2001) Metabolic rate and environmental productivity: Well-provisioned animals evolved to run and idle fast. *Proc. Nat. Ac. Sc.* 98: 12550-12554
35. Nespolo, R.F. & Rosenman, M. 1997. Historia térmica de roedores: una aproximación experimental. *Rev Chil Hist Nat* 70: 363-370.
36. Nespolo, R.F., Opazo, J., Rosenmann, M. & Bozinovic, M. 1999. Thermal acclimation, maximum metabolic rate and nonshivering thermogenesis in *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia) inhabiting the andean range. *J Mam* 80: 742 - 748.
37. Nespolo, R., Bacigalupe, L., Sabat, P. & Bozinovic, F. 2002. Interplay among energy metabolism, organ mass and digestive enzyme activity in the mouse opossum *Thylamys elegans*: the role of thermal acclimation. *J Exp Biol* 205: 2697-2703.
38. Oswald, C. 1998. Geographic variation and plasticity in renal function in the whitw-footed mouse *Peromyscus leucopus*. *J Mam* 79: 1103-1110.
39. Rezende, E.L., Bozinovic, F. & Garland Jr. T. 2004. Climatic adaptation and the evolution of basal and maximum rates of metabolism in rodents. *Evol* 58:1361-1374.
40. Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C. & Canals, M. 2006a. Water and energy economy of an omnivorous bird: population differences in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comp Bioch Physiol* 144: 485-490.
41. Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology. Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, New York.

42. Serrat, M.A., King, D. & Lovejoy, C.O. 2008. Temperature regulates limb length in homeotherms by directly modulating cartilage growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19348-53.
43. Sperber, I. 1941. Studies on the mammalian kidney. *Zool Bidr* 22: 249-431.
44. Tieleman, B.I. & Williams, J.B. 2000. The adjustment of avian metabolic rates and water fluxes to desert environments. *Physiol Bioch Zool* 73: 461-479.
45. Tracy, R.L. & Walsberg, G.E. 2001. Developmental and acclimatory contributions to water loss in a desert rodent: investigating the time course of adaptive change. *J Comp Physiol* 171: 669.
46. West-Eberhard M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. New York: Oxford University Press.
47. Williams, J.B. & Tieleman, B.I. 2000. Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *J. Exp. Biol.* 203: 3153-3159.
48. Williams, J.B. & Tieleman, B.I. 2001. Physiological ecology and behavior of desert birds. *Current Ornithology*, Vol. 16 (eds V. Nolan & C.F. Thompson), pp. 299-353. Plenum Press, New York. Chapter 2.
49. Wang, X.L., Bao, Y.X., Liu, J.S., Cheng, T. & Ling, X.R., 2008. Characteristics of metabolic heat production and thermoregulation in Melano-bellied oriental voles (*Eothenomys melanogaster*). *Acta Theriol Sin* 28, 293-299.
50. Wan-Long, Z., Zhanga, L. & Wang, Z.K. 2010. Thermogenic characteristics and evaporative water loss in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) *J Therm Biol* 35: 290-294.
51. Wan-Long, Z., Zheng-Kun, W., Lin, Z. & Guang, Y. 2013. Metabolism, thermoregulation and evaporative water loss in the Chaotung Vole (*Eothenomys olitor*) in Yunnan-Kweichow Plateau in summer. *J Therm Biol* 38:318-323.

52. Wolf, B.O., Walsberg, G.E. 1996. Thermal effects of radiation and wind on a small bird and implications for microsite selection. *Ecol* 77:2228-2236.

Capítulo 2

**Mecanismos de variación fenotípica: asociación entre flexibilidad fisiológica y
variabilidad climática en un gradiente latitudinal.**

Resumen

En este capítulo se estudió la asociación entre la flexibilidad fisiológica de rasgos energéticos (Tasa metabólica basal, TMB; Pérdida total de agua evaporativa, PTAE; Masa corporal, Mc) y osmorregulatorios (Osmolalidad de la orina) y la variabilidad climática en *Phyllotis darwini*, un roedor que presenta un amplio rango de distribución en Chile. Individuos adultos fueron capturados en 4 localidades rurales de Chile a lo largo de un gradiente latitudinal de variabilidad climática (medido a través de la varianza del índice de aridez) y llevados al laboratorio. Con el objetivo de evaluar la contribución de la flexibilidad fenotípica sobre la variabilidad fisiológica en respuesta a la temperatura, los individuos fueron mantenidos en un tratamiento de pre-aclimatación térmica de 22°C por 4 semanas, posteriormente fueron aclimatadas a 15°C y re-aclimatados a 30°C durante cuatro semanas. Además, para conocer la contribución de la flexibilidad fisiológica en relación a la disponibilidad hídrica, los individuos provenientes del tratamiento a 30°C (agua *ad libitum*) fueron re-aclimatados a un tratamiento de restricción hídrica (30°C/50% agua) por el mismo periodo de tiempo. Finalizada la aclimatación térmica, la Mc y a través de ella la TMB sólo presentó variaciones significativas en la localidad más austral de este estudio, y esta variación fue dependiente de la dirección de la señal ambiental, los individuos incrementaron la Mc y la TMB sólo cuando provenían de un ambiente de mayor temperatura. Por otra parte, y en respuesta a la disponibilidad hídrica, no se encontró asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática en la función renal, las capacidades de concentrar orina fueron rasgos altamente plásticos, los individuos provenientes de todas las localidades incrementaron la osmolalidad de la orina en respuesta

a la disminución en la disponibilidad de agua, respecto de los atributos energéticos, sólo la localidad más austral de este estudio varió la Mc y a través de ella la pérdida total de agua evaporativa. Los resultados sugieren que la asociación entre variabilidad climática y flexibilidad fisiológica es dependiente del atributo analizado y que la experiencia (e.g. térmica) de los organismos a lo largo de su vida podría contribuir a la flexibilidad fisiológica en los individuos adultos. Además, debido a que sólo los individuos de Quirihue mostraron flexibilidad en atributos energéticos, se propone la existencia de un umbral de variabilidad climática sobre la cual los individuos responderían con modificaciones fisiológicas.

Introducción

La plasticidad fenotípica es la habilidad de un organismo de expresar distintos fenotipos en respuesta a señales del ambiente biótico o abiótico (West-Eberhard, 2003). Un caso particular de plasticidad fenotípica, denominada flexibilidad fenotípica, se refiere a las transformaciones reversibles de características fenotípicas (e.g., bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, o conductuales) que tienen lugar cuando las condiciones ambientales cambian en cortos periodos de tiempo (Agrawal, 2001; Piersma, 2003; Scantlebury et al., 2009). La comprensión del fenómeno de plasticidad fenotípica, es fundamental en entendimiento de cómo los organismos interactúan con su ambiente (Pigliucci, 2001) y puede ser abordado a través del estudio de la norma de reacción (NR), que se refiere al conjunto de fenotipos que pueden ser producidos por un genotipo en particular que es expuesto a diferentes condiciones ambientales (Schlichting & Pigliucci, 1998). En este contexto, se ha descrito que bajo ciertos escenarios, la plasticidad fenotípica podría ser beneficiosa y que los organismos ajustarían su fenotipo en relación al ambiente para incrementar su desempeño biológico en esas condiciones (véase Garland & Carter, 1994; Sabat & Bozinovic, 2000; Agrawal, 2001). Pigliucci (2001) propone que la plasticidad fenotípica es un componente importante de la ecología de los organismos y que los costos de la plasticidad de un rasgo estarían relacionados a costos energéticos de mantención y de producción de estructuras plásticas. Adicionalmente, ha sido documentada la importancia de la historia en el desempeño biológico de organismos. Por ejemplo, Mckechnie et al. (2006) encontraron que las variaciones en los rasgos metabólicos son adaptativos y reflejan ajustes a las condiciones ambientales ya sea por selección natural, plasticidad fenotípica o por una combinación de estas dos fuentes de variación fenotípica. En un estudio posterior

Mckechnie (2007) propuso que tanto la velocidad como la magnitud de la respuesta a la aclimatación térmica pueden variar entre poblaciones y podrían depender de la temperatura ambiental. Además, se ha sugerido que la flexibilidad fenotípica será mayor en especies que habitan ambientes heterogéneos donde las características ecológicas varían en el curso de vida de los individuos (Schlichting & Pigliucci, 1998). El mantenimiento de la variación interindividual entre fenotipos, entonces, dependería de la frecuencia del cambio ambiental y de la naturaleza espacial o temporal de la heterogeneidad del ambiente. Así, la heterogeneidad temporal y espacial podría mantener la variación genética y la plasticidad fenotípica, dando como resultado la variación fenotípica (Hedrick, 1986; Schlichting & Pigliucci, 1998).

Algunos autores sugieren que la plasticidad de caracteres fisiológicos y morfológicos podría estar restringida en individuos especialistas y que debieran tener un valor adaptativo en aquellos que experimentan gran variación en el ambiente físico y biótico (Stearns, 1989; Via et al., 1995; Padilla & Adolph, 1996; Sabat et al., 1999, Cavieres & Sabat, 2008). En este sentido, y debido a que el rango de fluctuación climática que experimentan los animales terrestres incrementa con la latitud, diversos estudios a nivel macrofisiológico, han reportado a la latitud como un buen predictor de la plasticidad fenotípica (Naya et al., 2008, Speakman, 2000, Rezende et al., 2004). La Hipótesis de variabilidad climática (HVC; Janzen 1967; Stevens 1989; Gaston & Chown 1999) propone que los individuos que habitan mayores latitudes presentarían un mayor rango de tolerancias que quienes habitan latitudes bajas, esto determinaría un incremento en la plasticidad fenotípica con la latitud (ver Chown et al., 2004, Naya et al., 2008). Sin embargo, no es claro, si la alta flexibilidad observada en mayores latitudes se debe al

efecto directo de la variabilidad climática o a otros factores asociados con la latitud (Naya, et al, 2011, Molina-Montenegro & Naya, 2012). En este capítulo, se examinará a un nivel interpoblacional la asociación entre flexibilidad fenotípica y variabilidad climática a un nivel intraespecífico, en poblaciones que habitan diferentes latitudes a lo largo de un gradiente de temperaturas y precipitaciones.

Hipótesis

Individuos provenientes de mayores latitudes y que por tanto han experimentado a lo largo de su vida una mayor fluctuación en las condiciones climáticas (temperatura, precipitaciones y productividad primaria) presentan flexibilidad fenotípica en los atributos relacionados con el balance hídrico y energético.

Predicción

La magnitud de la flexibilidad fenotípica, tanto para parámetros energéticos como osmorregulatorios será mayor en los individuos provenientes de Santiago y Quirihue, localidades altamente estacionales. Sin embargo, la norma de reacción será inflexible en individuos provenientes de Copiapó y Vicuña, localidades caracterizadas por presentar estabilidad en las condiciones climáticas, siendo esta respuesta por tanto, adaptación y/o plasticidad del desarrollo.

Objetivo

Evaluar la contribución de la flexibilidad fenotípica sobre la variabilidad fisiológica de rasgos energéticos: (1) tasa metabólica basal (2) pérdida total de agua evaporativa (3) masa corporal, y parámetros osmorregulatorios (1) función renal a lo largo de un gradiente latitudinal en *Phyllotis darwini*

Materiales y métodos

Modelo de Estudio

El roedor *Phyllotis darwini*, un múrido omnívoro con una amplia distribución en Chile que abarca desde Paposo (II Región) hasta Malleco (IX Región) desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm (Iriarte, 2008). Estudios en este roedor en el campo de la fisiología evolutiva han revelado la potencial respuesta evolutiva a la selección en rasgos relacionados con la producción de calor (Nespolo et al., 2003). Este autor encontró que rasgos termogénicos en *Phyllotis darwini*, presentan una baja heredabilidad, sugiriendo, que las variaciones fenotípicas encontradas en estos rasgos responden mayoritariamente al ambiente. Considerando la hipótesis de correspondencia entre heterogeneidad ambiental y flexibilidad fenotípica, es esperable que roedores habitantes de sectores altamente heterogéneos presenten mayor flexibilidad fenotípica que los que habitan en sectores estables. Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen estudios que hayan puesto a prueba esta hipótesis en mamíferos (ver Cavieres & Sabat, 2008 para un estudio en aves). Considerando la amplia distribución que presenta a lo largo de Chile, y la amplia gama de estudios ecofisiológicos y evolutivos desarrollados en este roedor, lo hacen un buen modelo para el estudio sobre la asociación entre de la flexibilidad fenotípica de rasgos relacionados con el balance hídrico y energético y la variabilidad climática a lo largo de un gradiente de aridez.

Diseño experimental

Se colectaron individuos adultos en cuatro localidades rurales de Chile (N=8 en cada sitio) a lo largo de un gradiente latitudinal de precipitaciones, temperatura y productividad primaria (Di Castri & Hayek, 1976). Las localidades fueron 1) Copiapó (II Región, Provincia de Copiapó, Comuna Copiapó, 27°58'S, 70°36'O), 2) Marquesa (IV Región, Provincia de Elqui, Comuna Vicuña, 29° 55' S, 70° 57'O), 3) Quebrada de la Plata (RM, Provincia de Santiago, Comuna Maipú, 33° 31' S, 70° 50'O,) y 4) Quirihue (VIII Región, Provincia Ñuble, Comuna Quirihue, 36° 12' S, 72° 39'O). Los individuos fueron capturados mediante trampas Sherman y transportados al laboratorio. Con el objetivo de conocer el estatus fisiológico inicial de los individuos provenientes de las 4 localidades de estudio, todos los individuos fueron sometidos a un tratamiento de pre aclimatación térmica a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 4 semanas. Posteriormente, y con el objetivo de conocer la respuesta fisiológica a la temperatura, las poblaciones fueron aclimatadas a 15°C y re-aclimatados a 30°C . Además, para conocer la respuesta fisiológica en relación a la disponibilidad hídrica, los individuos provenientes del tratamiento a 30°C (agua *ad libitum*) fueron re-aclimatados a un tratamiento de restricción hídrica ($30^{\circ}\text{C}/50\%$ agua). Cada etapa de aclimatación tuvo una duración de 4 semanas. Luego de cada periodo de aclimatación se realizaron las determinaciones de BMR y TEWL y Mc, y después de los tratamientos hídricos (30°C agua *ad libitum* y restricción hídrica además se determinó la osmolalidad de la orina (véase Figura 2.1)

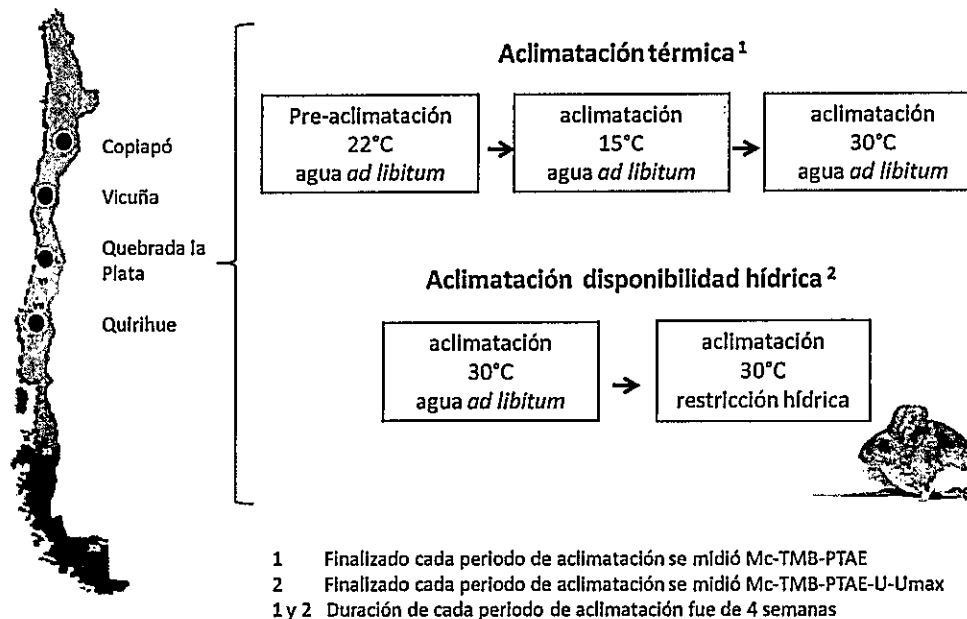


Figura 2.1. Diseño experimental para determinar la asociación entre flexibilidad fenotípica y variabilidad climática a través de un gradiente latitudinal.

Tasa Metabólica Basal

El consumo de oxígeno (VO_2) se determinó en la fase de descanso del ritmo de actividad de la especie, en individuos postabsortivos, mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems) computarizado (Datacan V) calibrado con una mezcla de oxígeno conocida (20%) y nitrógeno (80%) certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las determinaciones individuales se realizó en cámaras metálicas, en oscuridad, a temperatura ambiente correspondiente a termoneutralidad, i.e., 30 ± 0.5 °C (Novoa 1993). Las cámaras metabólicas recibieron aire seco a una tasa de 750 a mL/min desde un controlador de flujo (Sierra Instruments) para asegurar una mezcla adecuada en la cámara. El aire se secó antes y después de la cámara y monitoreado cada 5 s mediante un analizador de oxígeno 1FC-1B (Sable System). El CO_2 se retiró antes de entrar al analizador de O_2 y el consumo de

oxígeno se calculó utilizando la ecuación de Withers (1977: p 122): $V.O_2 = [FR*60*(Fi O_2 - Fe O_2)]/(1-Fi O_2)$, donde FR es la tasa del flujo en ml/min después de la corrección STP, Fi y Fe son las fracciones de concentración de O₂ al ingreso y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

Pérdida total de agua por evaporación (PTAE)

Los individuos se pusieron en cámaras metálicas con un piso de malla de alambre sobre una capa de aceite mineral para atrapar las fecas y orina, excluyéndolas como fuente de agua. El aire pasó a través de columnas de Dierite y Baralime para remover el agua y CO₂ del aire mediante un controlador de flujo (Sierra Instrument). El aire que sale de la cámara pasó a través de un higrometro (1-RH 200, Sable System) antes que una submuestra se desviara hacia el analizador de oxígeno para las determinaciones de consumo de oxígeno, en conjunto con las determinaciones higrométricas. La PTAE fue calculada como $PTAE = [(Ve \rho_{out} - Vi \rho_{in})] / [(Ve \rho_{out} - Vi \rho_{in})]$ donde PTAE es expresada en mg/ml. ρ_{in} y ρ_{out} son la humedad absoluta en kg/m³ del aire de entrada y salida respectivamente, Vi es la tasa del flujo que ingresa a la cámara según un controlador de flujo de masa (750 ml min⁻¹ después de la corrección STP) y Ve es el flujo de aire que sale de la cámara. Ve fue calculado siguiendo a Williams & Tieleman (2000) como $Ve = Vi - [V.O_2 (1-RQ)] + V_{H_2O} Vi$, y V.O₂ (mL min⁻¹) son conocidos. La humedad absoluta se calculó como $\rho = P/(T*R_w)$, donde P es la presión de vapor de agua del aire en Pascal, T es temperatura del punto de rocío del higrometro en Kelvin y R_w es la constante de gas para el vapor de agua (461.5 J/kg*Kelvin, Lide 2001). ρ_{in} se determinara usando el valor promedio de la presión de vapor del aire que ingresa a la cámara vacía (i.e., periodo de base de 15 min) antes y

después de cada experimento. La masa corporal (M_b) será medida antes de las mediciones metabólicas usando una balanza electrónica (± 0.1 g) y la temperatura rectal (T_b) fué tomada al final de cada medición con una termocupla Cole-Palmer copper-constantan conectada a un termómetro Digi-Sense (Modelo 92800-15).

Gradiente de aridez

Los datos climáticos de las localidades de estudio fueron obtenidos a partir de <http://www.worldclim.org> y analizados con el programa ESRI. Para cada área de estudio se calculó el promedio mensual de las variables climáticas: precipitación, altura, T_{max} , T_{min} , $T_{promedio}$ en un área de 5 km^2 del sector de captura de los animales, con bases de datos desde los años 1950 al 2000.

Se calculó el índice de aridez como $Q = P / ((T_{max} + T_{min})(T_{max} - T_{min})) * 1000$ donde P es el promedio anual de precipitaciones (mm), T_{max} es la temperatura media máxima del mes más cálido ($^{\circ}\text{C}$) y T_{min} la temperatura mínima media del mes más frío ($^{\circ}\text{C}$) (Emberger 1955). Aun cuando este índice parece contra intuitivo, ha sido derivado empíricamente para describir la productividad primaria en áreas áridas y semi-áridas y ha sido utilizado como un buen predictor de caracteres fisiológicos a un nivel interespecífico en aves (véase Tieleman et al., 2002b).

Función renal: U y U_{max}

Antes y después de la aclimatación hídrica los roedores se mantuvieron en cajas metálicas individuales de $25 \times 25 \times 30$ cm, para la obtención de muestras de orina, las que fueron recogidas con una micropipeta Eppendorf y vertidas a un tubo Eppendorf. Las muestras

fueron guardadas y congeladas (-40 °C) antes de los análisis osmométricos (Wescor 5130B). Posteriormente, los roedores fueron sometidos a un período de 24 horas de privación de agua para determinar la capacidad máxima de concentración de la orina (U_{max}), las muestras de orina fueron recogidas siguiendo el mismo protocolo.

Análisis estadístico

Con el objetivo de solucionar problemas de normalidad y homocedasticidad las variables fueron transformadas a \log_{10} . Para determinar la existencia de asociación funcional entre las variables TMB, PTAE y Mc se realizó un análisis de regresión simple y cuando la asociación entre las variables fisiológicas y la Mc fue significativa, se calculó los residuos de dicha asociación para utilizarlos en los subsecuentes análisis estadísticos. En casos de tener modelos con desigual tamaño muestral, se utilizó la opción suma de cuadrados tipo III. Para determinar la existencia de diferencias tanto en los atributos fisiológicos se utilizó un ANOVA para medidas repetidas, utilizando como factores la localidad y el sexo de los individuos. Para determinar las diferencias específicas entre los promedios de rasgos fisiológicos y morfológicos se utilizó una prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey.

Resultados

I. Efecto de la temperatura ambiental sobre la masa corporal, la tasa metabólica basal y la pérdida de agua evaporativa en *Phyllotis darwini*

Pre-aclimatación térmica

La Mc de *Phyllotis darwini* se diferenció significativamente entre las localidades ($F_{3,31}=13,89$, $p<0,0001$), siendo los individuos provenientes de Santiago quienes presentaron valores significativamente mayores al resto de las localidades (17%, Tukey $p<0,05$; Tabla 2.1). También se encontraron diferencias entre sexos, promediando $49,0\pm 1,5$ g en machos y $42,8\pm 1,3$ g en hembras ($F_{1,31}=6,91$ $p=0,01$). No se encontró un efecto de la interacción de los factores ($F_{3,31}=1,18$ $p=0,33$). La TMB también varió significativamente entre las localidades ($F_{3,32}=10,62$ $p<0,0001$), presentando valores significativamente mayores en las localidades de Vicuña y Santiago (en promedio 20% superior a Copiapó y Quirihue), la TMB además varió entre sexos (machos: $68,84\pm 3,23$ g, hembras: $63,43$ g, $F_{1,32}=9,8$ $p=0,003$) y en la interacción de los factores ($F_{3,32}=3,95$ $p=0,02$). La PTAE presentó variaciones significativas entre sexos (machos: $95,4\pm 4,5$ mgh^{-1} , hembras: $81,1\pm 3,9$ mgh^{-1} , $F_{1,31}=5,02$, $p=0,03$), no se diferenció entre las localidades ($F_{3,31}=0,6$ $p=0,62$), tampoco en la interacción de los factores ($F_{3,31}=1,45$, $p=0,24$).

La TMB y la PTAE se asociaron positiva y significativamente con la Mc (TMB, $r^2=0,42$, $F_{(1,42)}=30,8$, $p<0,0001$ y PTAE, $r^2=0,20$, $F_{(1,39)}=9,92$, $p=0,003$). El análisis de los residuos de TMB-Mc mostró un efecto significativo de la localidad sobre la TMB ($F_{3,31}=3,08$, $p=0,04$) y el test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que la TMB de *Phyllotis*

darwini de la localidad de Vicuña fue significativamente mayor a Copiapó. No se encontró efecto del sexo ($F_{1,31}=0,48$, $p=0,48$) ni de la interacción de los factores ($F_{3,31}=2,29$, $p=0,09$). Cuando se analizó los residuos de PTAE-Mc no se encontraron diferencias entre localidades ($F_{1,31}=0,13$, $p=0,93$) , sexos ($F_{1,31}=3,92$, $p=0,06$) ni de la interacción de los factores ($F_{3,31}=1,49$, $p=0,23$).

Tabla 2.1. Tasa metabólica basal, pérdida total de agua evaporativa y masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de finalizado el tratamiento de pre-aclimatación térmica.

| | Copiapó | Vicuña | Santiago | Quirihue |
|--|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Mc (g) | 41.8±2.5 ^{a,c} | 45.8±1.1 ^a | 54.9±3.1 ^b | 37.8±1.6 ^c |
| TMB (ml O ₂ h ⁻¹) | 58.5±2.6 ^a | 74.1±2.3 ^b | 71.1±4.6 ^b | 59.9±3.9 ^a |
| PTAE (mgh ⁻¹) | 83.9±3.2 ^a | 87.4±5.2 ^a | 86.3±3.5 ^a | 83.1±5.7 ^a |

Aclimatación térmica

Masa corporal

Finalizados los experimentos de aclimatación térmica, la masa corporal de *Phyllotis darwini* presentó variaciones significativas entre los tratamientos ($F_{2,56}=29,44$ $p<0,0001$, Figura 2.2) y entre sexos ($F_{1,28}=12,36$ $p=0,001$), promediando los machos $53,6 \pm 1,5$ g y las hembras $46,6 \pm 1,2$ g, entre las localidades de estudio ($F_{3,28}=12,88$ $p<0,0001$) y en la interacción tratamiento de aclimatación-localidad ($F_{6,56}=7,56$ $p<0,001$). El test de

comparaciones múltiples de Tukey reveló que la masa corporal de *Phyllotis darwini* provenientes de Quirihue incrementó en 9% una vez finalizado el tratamiento de 15°C ($p < 0,001$)

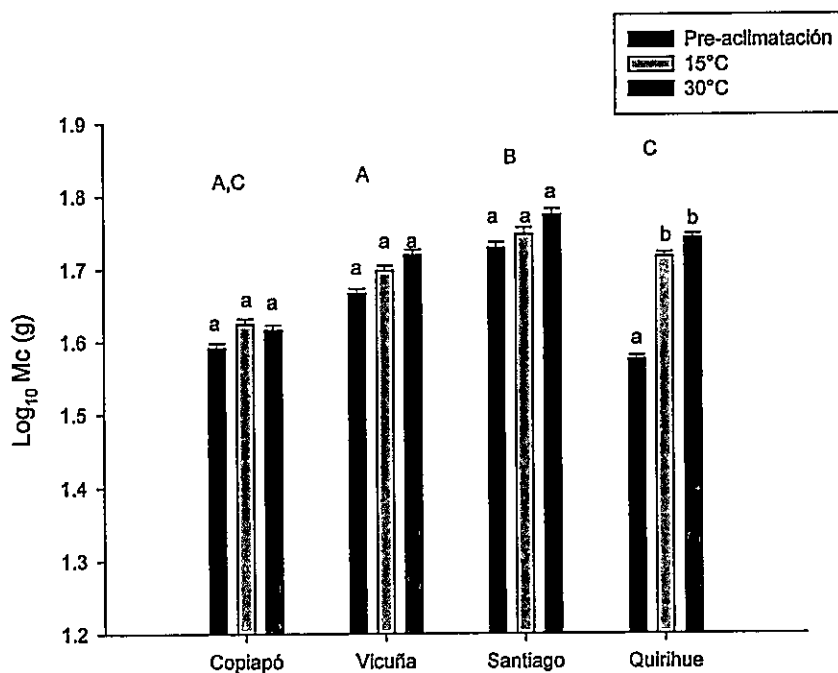


Figura 2.2. Masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Luego de los tratamientos de aclimatación térmica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey, en minúscula se muestran las diferencias dentro de cada población, las letras mayúsculas muestran las diferencias interpopulacionales.

Tasa Metabólica Basal

La tasa metabólica basal se vio afectada significativamente por la localidad ($F_{3,28}=12,27$ $p<0,0001$), sexo ($F_{1,28}=10,3$ $p<0,003$), tratamiento de aclimatación térmica ($F_{2,56}=5,99$ $p=0,004$) y la interacción tratamiento-localidad ($F_{6,56}=2,79$ $p=0,01$). No se encontró efecto significativo de las interacciones sexo-localidad ($F_{2,28}=0,78$ $p=0,5$) y aclimatación-sexo ($F_{2,56}=0,95$ $p=0,39$). En la interacción tratamiento-localidad-sexo se encontraron diferencias marginalmente significativas ($F_{6,56}=2,21$ $p=0,05$; Figura 2.3). Además, la TMB la se asoció significativamente con la masa corporal luego de los tratamientos térmicos, 15°C ($r^2=0,44$, $F_{(1,36)}=28,33$, $p<0,0001$) y 30°C ($r^2=0,24$, $F_{(1,34)}=10,52$, $p=0,002$), ver Figura 2.4.

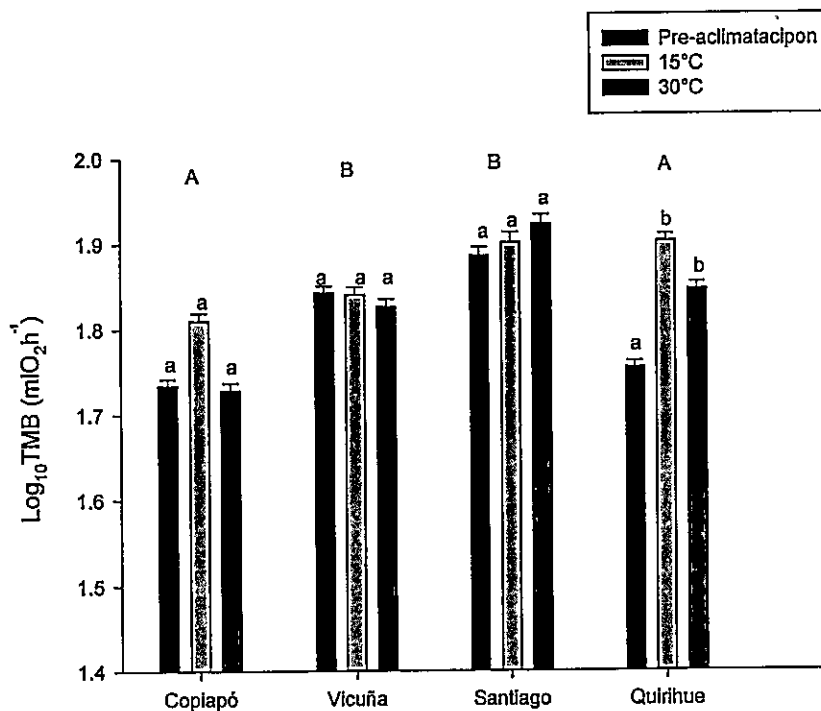


Figura 2.3. Tasa metabólica basal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile. Luego de los tratamientos de aclimatación térmica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey, en minúscula se muestran las diferencias dentro de cada población, las letras mayúsculas muestran las diferencias interpoblacionales.

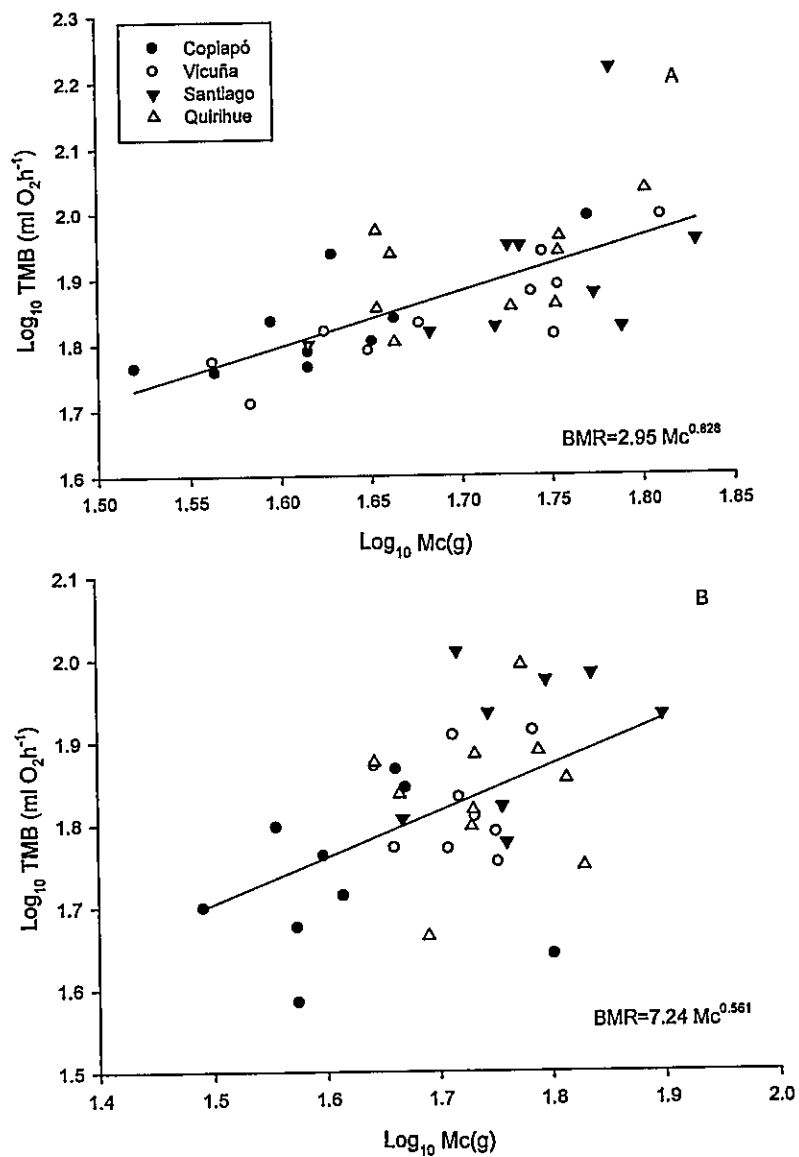


Figura 2.4. Asociación entre la Tasa metabólica basal y la masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica, (A) aclimatación a 15°C, (B) aclimatación a 30°C.

Cuando se analizaron los residuos de la tasa metabólica basal con la masa corporal, no se encontró efecto de la localidad ($F_{3,28}=1,35$ $p=0,27$), sexo ($F_{1,28}=0,60$ $p=0,44$), temperatura de aclimatación ($F_{2,56}=0,11$ $p=0,88$), ni en la interacción sexo-localidad ($F_{3,28}=0,63$ $p=0,59$), temperatura de aclimatación-sexo ($F_{2,56}=1,04$ $p=0,35$), temperatura de aclimatación-sexo-localidad ($F_{6,56}=1,73$ $p=0,13$). Figura 2.5.

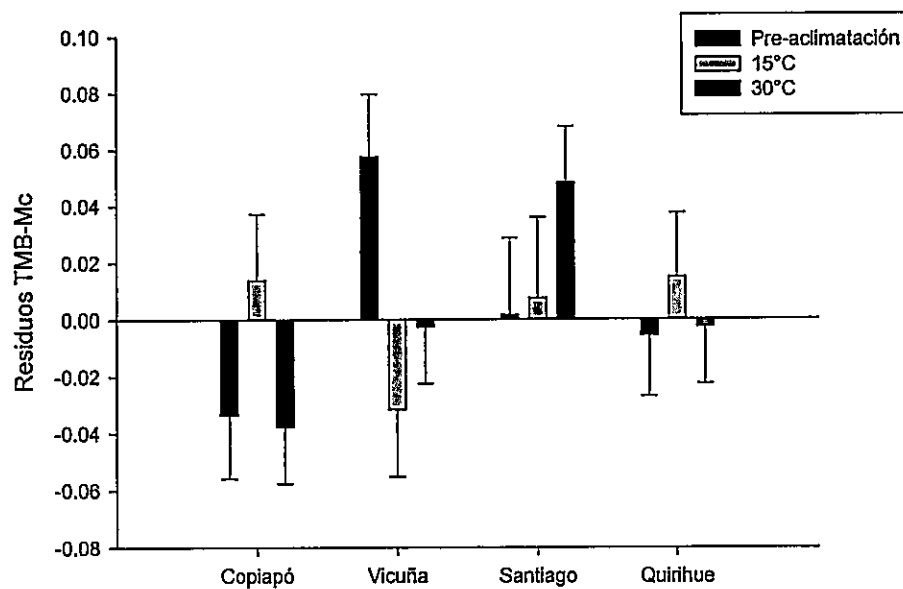


Figura 2.5. Residuos de la Tasa metabólica basal y la masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Pérdida total de agua evaporativa

La PTAE varió significativamente entre sexos ($F_{1,25}=9,67$ $p=0,004$), promediando en machos $93,9\pm 4,3$ mg h^{-1} y en hembras $78,8\pm 3,7$ mg h^{-1} . No se encontraron variaciones significativas entre localidades ($F_{3,25}=2,91$ $p=0,06$), tratamientos ($F_{2,50}=0,41$ $p=0,66$), ni en las interacciones de los factores localidad-sexo ($F_{3,25}=2,21$ $p=0,11$), tratamiento-localidad ($F_{6,50}=1,22$ $p=0,31$), tratamiento-sexo ($F_{2,50}=0,18$ $p=0,83$) ni tratamiento-localidad-sexo ($F_{6,50}=0,89$ $p=0,51$; Figura 2.6).

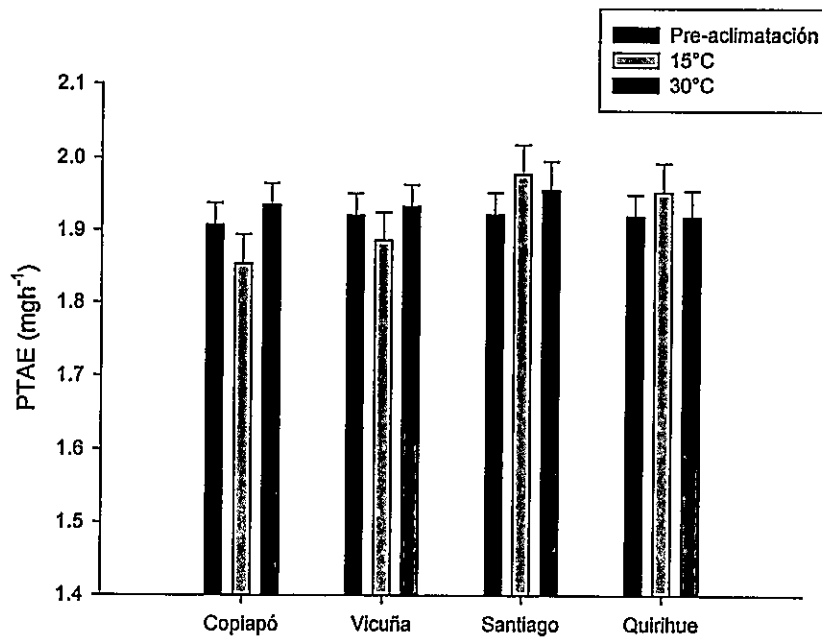


Figura 2.6. Pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile. Luego de los tratamientos de aclimatación térmica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

La PTAE de *Phyllotis darwini* provenientes de las 4 localidades se asoció de manera positiva y significativa con la masa corporal, 15°C ($r^2=0,22$ $F_{(1,34)}=9,47$ $p=0,004$) y 30°C ($r^2=0,29$ $F_{(1,33)}=13,56$ $p=0,0008$; Figura 2.7). Al analizar los residuos de la PTAE con la masa corporal, las variaciones entre sexos desaparecieron ($F_{1,24}=4,3$ $p=0,06$). Tampoco se encontró efecto de las localidades ($F_{3,24}=1,26$ $p=0,31$), tratamientos ($F_{2,48}=0,02$ $p=0,97$), ni en las interacciones de los factores localidad-sexo ($F_{3,24}=2,42$ $p=0,09$), tratamiento-localidad ($F_{6,48}=0,61$ $p=0,72$), tratamiento-sexo ($F_{2,48}=0,41$ $p=0,61$) ni tratamiento-localidad-sexo ($F_{6,48}=0,41$ $p=0,86$).

Debido a que la TMB y PTAE se asociaron significativamente con Mc, el análisis entre los residuos con Mc (TMB-Mc y PTAE-Mc) reveló una asociación significativa y positiva entre las variables después de la aclimatación a 15°C ($r^2=0,39$ $F_{(1,33)}=21,15$ $p<0,0001$) y a 30°C ($r^2=0,12$ $F_{(1,32)}=4,42$ $p=0,04$; Figura 2.8).

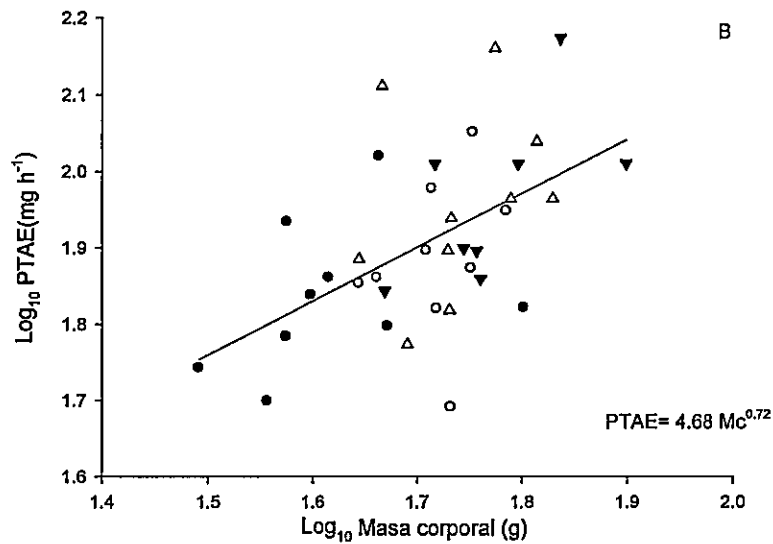
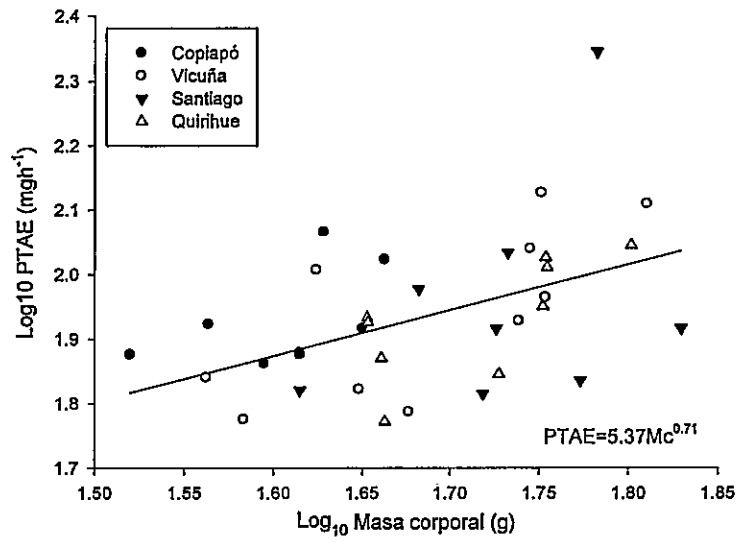


Figura 2.7. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa y la masa corporal de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamiento de aclimatación térmica a 15°C (A) y a 30°C (B).

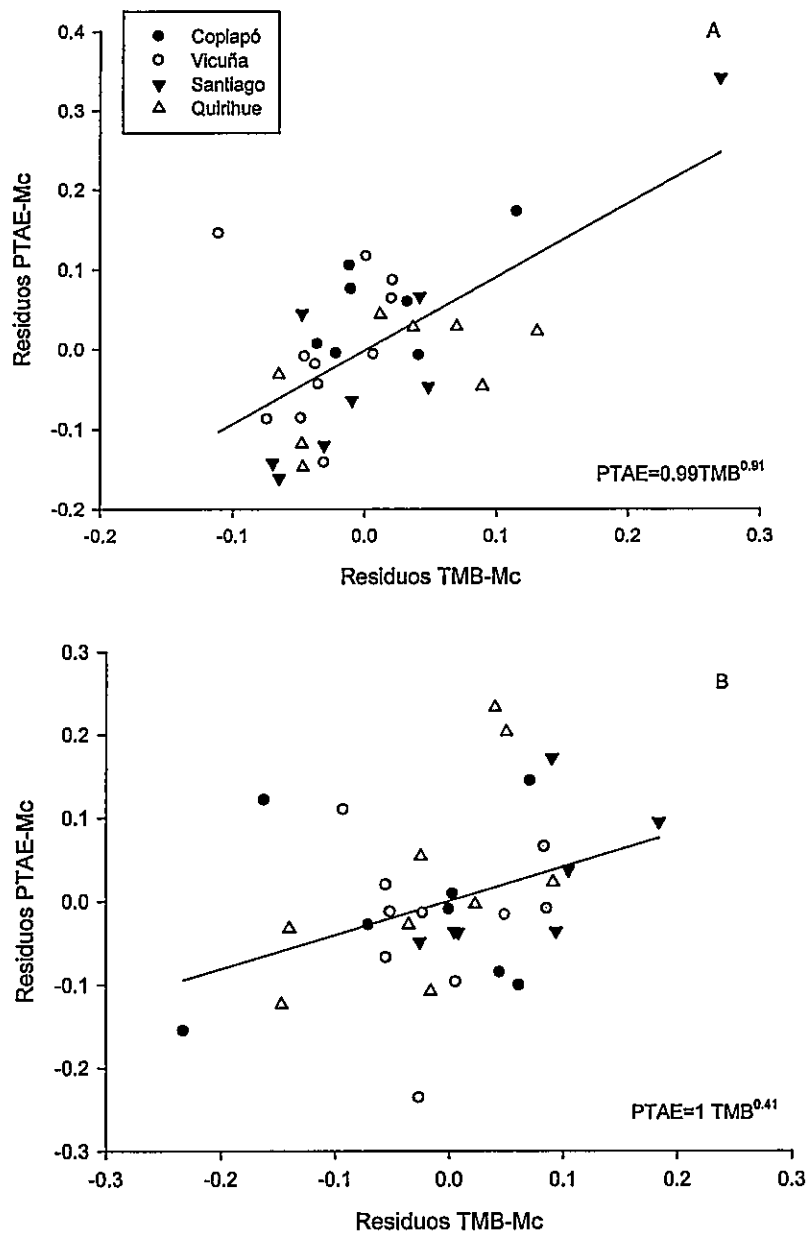


Figura 2.8. Asociación entre los residuos de la PTAE y de TMB con la masa corporal de *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica a 15°C (A) y 30°C (B).

II. Efecto de la disponibilidad de agua sobre la fisiología energética y osmorregulatoria en *Phyllotis darwini*

Masa Corporal

La Mc de *Phyllotis darwini* presentó variaciones significativas entre los tratamientos experimentales ($F_{1,24}=18,78$ $p<0,001$), promediando $54,05 \pm 1,4$ g y $49,05 \pm 1,04$ g en el tratamiento de 30°C agua *Ad libitum* y 30°C restricción hídrica (50% agua) respectivamente. Además presentó variaciones significativas entre sexos (machos: $55,29 \pm 1,7$ g y $48,3 \pm 1,4$ g, $F_{1,24}=10,42$ $p=0,003$) y entre localidades de estudio ($F_{3,24}=13,45$ $p<0,0001$, Figura 9). No se encontró efecto en la interacción localidad-sexo ($F_{3,24}=0,51$ $p=0,61$), tratamiento hídrico-localidad ($F_{3,24}=2,6$ $p=0,07$), tratamiento hídrico-sexo ($F_{1,24}=1,09$ $p=0,30$), ni en la interacción tratamiento hídrico-localidad-sexo ($F_{3,24}=0,34$ $p=0,79$).



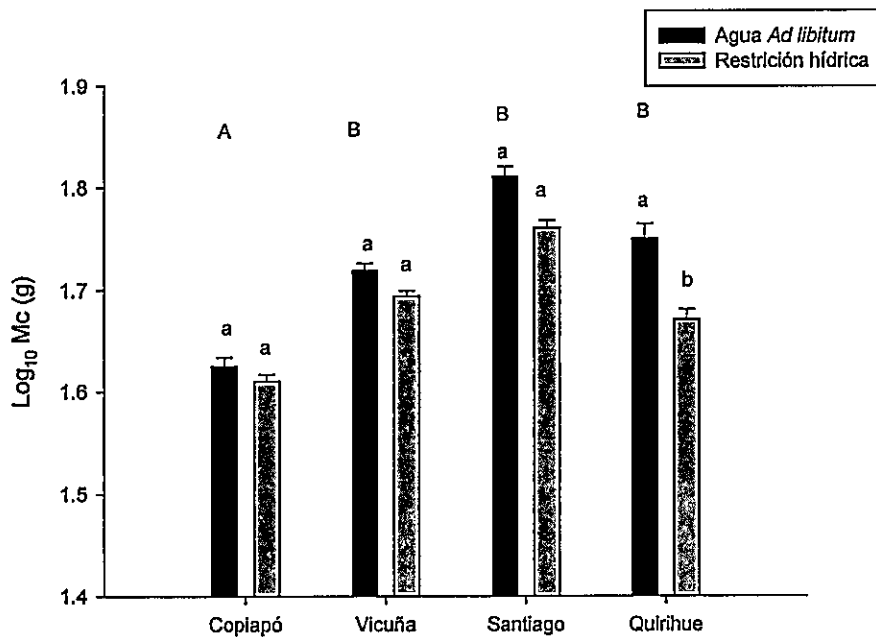


Figura 2.9. Masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile. Luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey en minúscula se muestran las diferencias dentro de cada población, las letras mayúsculas muestran las diferencias interpoblacionales.

Tasa metabólica basal

La tasa metabólica basal total de *Phyllotis darwini* presentó variaciones significativas entre localidades ($F_{3,22}=6,45$ $p=0,002$, Figura 2.10). Sin embargo no se encontró efecto del sexo ($F_{1,22}=2,79$ $p=0,10$), de la interacción sexo-localidad ($F_{3,24}=0,70$ $p=0,56$), de tratamiento hídrico ($F_{1,22}=1,79$ $p=0,19$), tampoco de la interacción tratamiento-localidad ($F_{3,22}=0,53$ $p=0,67$), tratamiento-sexo ($F_{1,22}=0,27$ $p=0,60$), ni tratamiento-localidad-sexo ($F_{3,22}=0,10$ $p=0,95$).

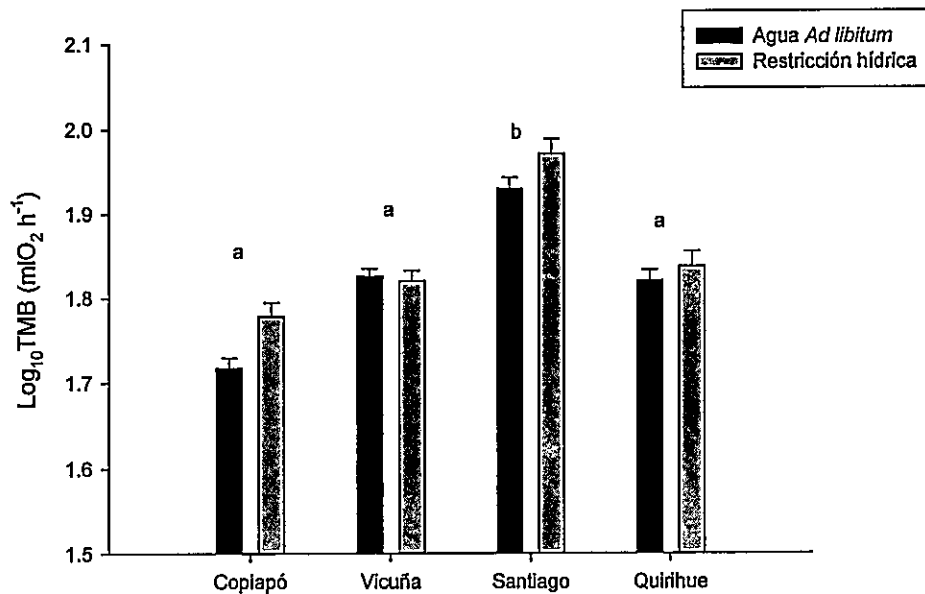


Figura 2.10. Tasa metabólica basal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey.

Finalizado el tratamiento de aclimatación de restricción hídrica, la TMB se asoció significativamente con la masa corporal ($r^2=0,18$, $F_{(1,28)}=4,46$, $p=0,04$, $N=30$; Figura 2.11).

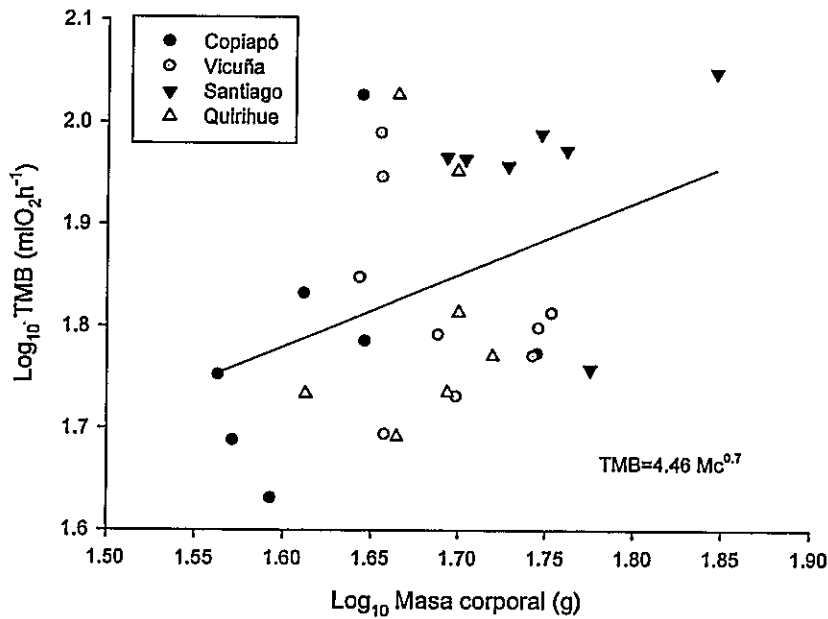


Figura 2.11. Asociación entre la Tasa Metabólica Basal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego del experimento de aclimatación 30°C-Restricción Hídrica.

Cuando se analizaron los residuos de la tasa metabólica basal con la masa corporal, no se encontró un efecto significativo de la localidad ($F_{3,22}=1,42$ $p=0,26$), sexo ($F_{1,22}=0,30$ $p=0,58$), interacción sexo-localidad ($F_{3,22}=0,73$ $p=0,54$), régimen hídrico ($F_{1,22}=0,45$ $p=0,50$), interacción régimen hídrico-localidad ($F_{3,56}=0,46$ $p=0,70$), interacción régimen hídrico-sexo ($F_{1,22}=0,41$ $p=0,52$), ni en la interacción régimen hídrico- sexo-localidad ($F_{3,22}=0,10$ $p=0,95$; Figura 2.12).

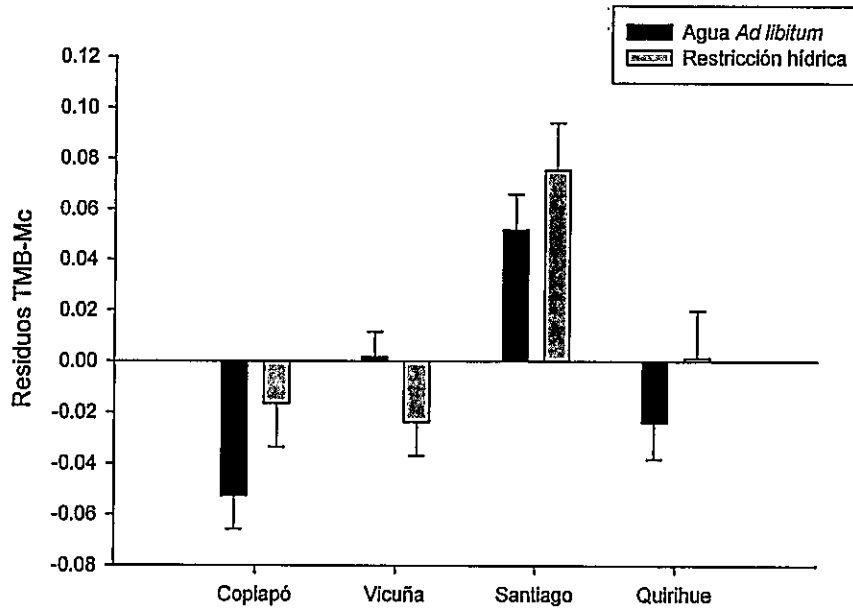


Figura 2.12. Residuos de la tasa metabólica basal y la masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Pérdida total de agua evaporativa

La PTAE de *Phyllotis darwini* presentó variaciones significativas entre localidades ($F_{3,9}=4,55$ $p=0,014$). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que la PTAE de individuos provenientes de Santiago fue significativamente mayor que la de los individuos de Copiapó (9 % mayor, $p=0,01$). Además, la PTAE varió significativamente entre tratamientos experimentales ($F_{1,19}=10,62$ $p=0,004$), siendo menor luego del tratamiento de restricción hídrica (5%). No se encontró un efecto significativo del sexo ($F_{1,19}=0,07$ $p=0,79$), de la interacción sexo-localidad ($F_{3,19}=0,43$ $p=0,73$), tratamiento-localidad ($F_{3,19}=0,29$ $p=0,83$), tratamiento-sexo ($F_{1,19}=2,38$ $p=0,14$), ni tratamiento-localidad-sexo ($F_{3,19}=0,13$ $p=0,93$). Para el detalle por localidad véase figura 2.13.

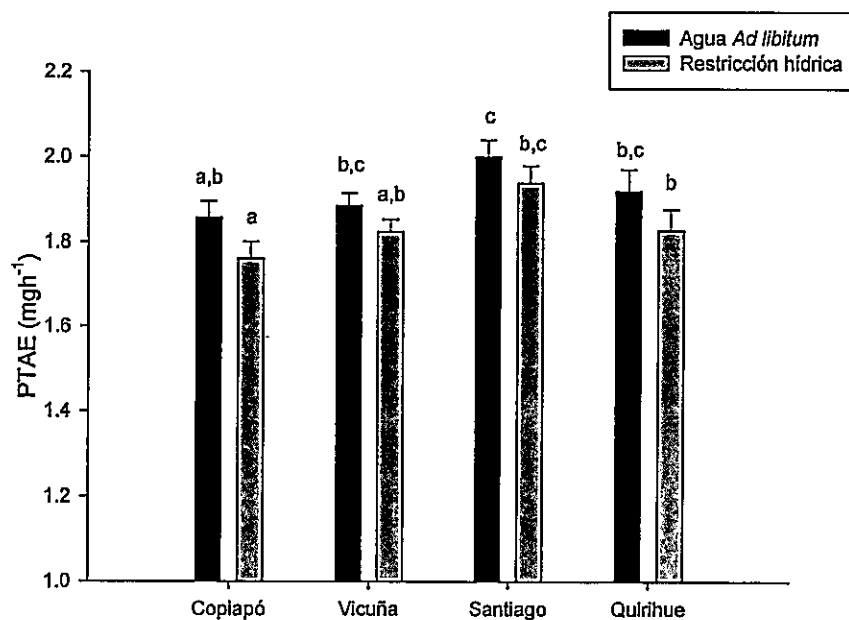


Figura 2.13. Pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de Tukey.

La PTAE se relacionó positiva y significativamente con la masa corporal luego del tratamiento de restricción hídrica, ($r^2=0,20$ $F_{(1,25)}=6,23$ $p=0,01$, Figura 2.14). Cuando se analizaron los residuos de la PTAE con la masa corporal, el efecto tanto del tratamiento como de la localidad sobre la PTAE se perdió (localidad ($F_{3,19}=0,97$ $p=0,42$), sexo ($F_{1,19}=1,30$ $p=0,26$), interacción localidad-sexo ($F_{3,19}=0,29$ $p=0,54$), régimen hídrico ($F_{1,19}=0,14$ $p=0,71$), interacción régimen hídrico-localidad ($F_{3,19}=0,24$ $p=0,86$), interacción régimen hídrico-sexo ($F_{1,19}=1,86$ $p=0,18$), ni en la interacción régimen hídrico- sexo-localidad ($F_{3,19}=0,05$ $p=0,98$); Figura 2.15).

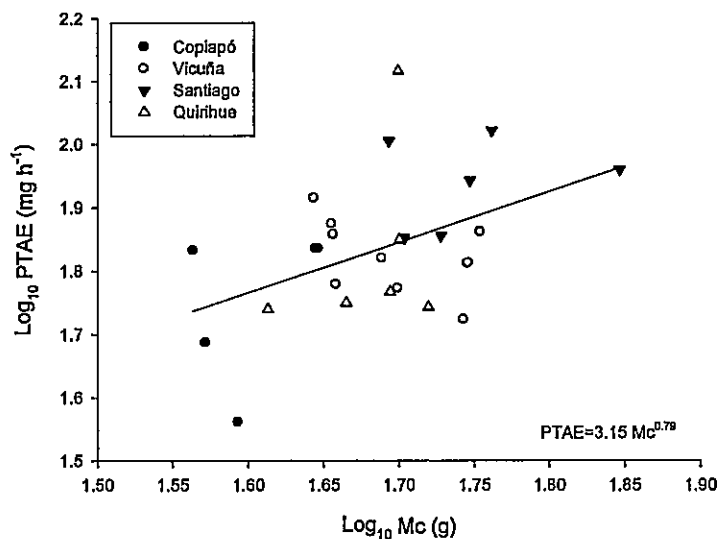


Figura 2.14. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego del experimento de aclimatación 30°C-restricción hídrica.

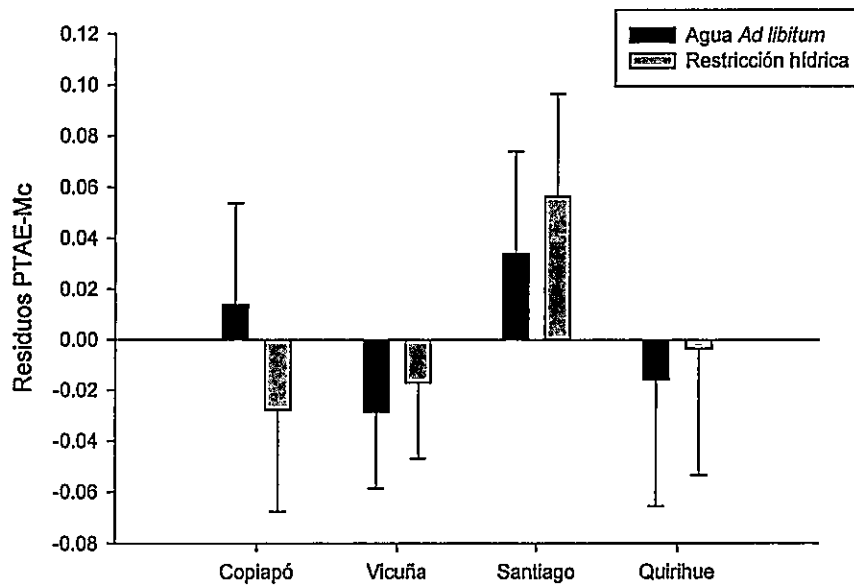


Figura 2.15. Residuos de la Pérdida total de agua evaporativa y la Masa corporal de *Phyllotis darwini* de 4 localidades de Chile, luego de los tratamientos de disponibilidad hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

La comparación de los residuos de la TMB y PTAE con la Mc, reveló una asociación funcional entre las variables ($r^2=0,53$ $F_{(1,25)}=27,94$ $p<0,0001$; Figura 2.16).

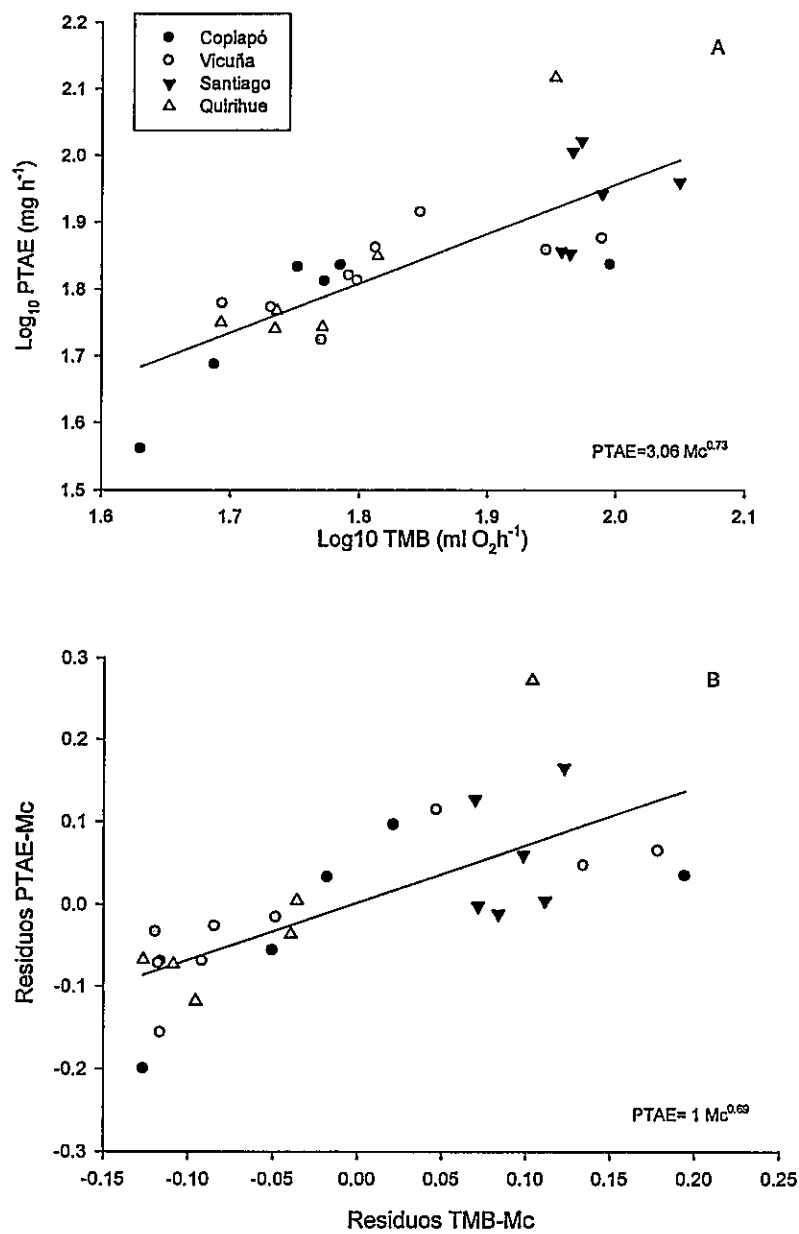


Figura 2.16. Asociación entre la Pérdida total de agua evaporativa y la tasa metabólica basal de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de los tratamientos de aclimatación térmica a 30°C restricción hídrica (A) Asociación entre PTAE y TMB (C) Residuos PTAE y TMB con la masa corporal.

Fisiología osmorregulatoria: U y Umax

Finalizado el periodo de restricción hídrica, la capacidad máxima de concentración de la orina (*Umax*) presentó valores significativamente mayores (3241 ± 83 msom/Kg) a los registrados en tratamiento control (2662 ± 100 msom/Kg; $F_{1,28}=24,81$ $p < 0,0001$). Los resultados revelan que los individuos provenientes de Copiapó y Quirihue incrementaron esta capacidad en un 25%, mientras los provenientes de Vicuña y Santiago la incrementaron en un 18% (Figura 2.17). No se encontraron diferencias significativas entre las localidades ($F_{3,28}=0,35$ $p=0,78$), ni en la interacción localidad-tratamiento ($F_{3,28}=0,25$ $p=0,85$).

Al comparar la osmolalidad de la orina (U), se observaron significativas diferencias entre los tratamientos de aclimatación, promediando (2150 ± 59 msom/Kg) luego del tratamiento de restricción hídrica y (1136 ± 61 msom/Kg) en el régimen de agua *ad libitum*. Además, se encontró un efecto significativo en la interacción localidad-tratamiento ($F_{3,28}=0,25$ $p=0,85$). No se encontró un efecto significativo de la localidad ($F_{3,28}=0,28$ $p=0,83$, Tabla 2).

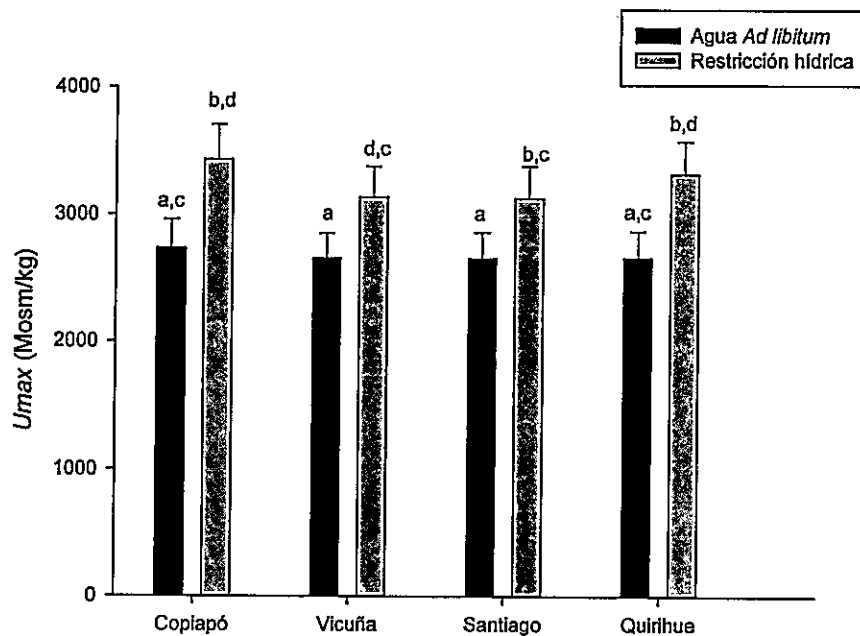


Figura 2.17. Osmolalidad de la Orina en *Phyllotis darwini* de cuatro localidades de Chile, luego de aclimatación a 30°C- agua *ad libitum* y 30°C restricción hídrica. Se muestra la osmolalidad de la orina antes (U) y después de derivación de agua por 24hrs (U_{max}) en barras negras y blancas respectivamente).

Tabla 2.2. Osmolalidad de la orina (U) de *Phyllotis darwini* provenientes de cuatro localidades de Chile, luego de finalizar los tratamientos 30°C-agua *ad libitum* y 30°C-Restricción hídrica. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Fisher. Los valores se muestran como promedios \pm EE

| U (mosm/kg) | Copiapó | Vicuña | Santiago | Quirihue |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Agua <i>ad libitum</i> | 924 \pm 122 ^a | 851.3 \pm 107 ^a | 1450.5 \pm 114 ^b | 1218.1 \pm 114 ^a |
| Restricción hídrica | 2372.5 \pm 114 ^a | 2374.3 \pm 110 ^a | 1974 \pm 106 ^b | 2008 \pm 106 ^b |

Discusión

En este capítulo, evaluamos la asociación entre la flexibilidad fisiológica de rasgos energéticos y osmorregulatorios y la variabilidad climática en *Phyllotis darwini*, un roedor que presenta un amplio rango de distribución en Chile, y cuyas poblaciones enfrentan diferentes grados de heterogeneidad temporal en las condiciones abióticas y de productividad primaria. De acuerdo con la hipótesis de variabilidad climática, los individuos de mayores latitudes debieran ser más plásticos que aquellos que habitan bajas latitudes; esto debido a que los rangos fluctuación climática experimentada por los animales incrementan con la latitud (Spicer & Gaston 1999; Chown et al. 2004; Bozinovic et al. 2011; Naya et al., 2012). Los resultados de este estudio revelaron que entre las poblaciones estudiadas, los individuos responden de manera diferencial a cambios en las condiciones térmicas y/o hídricas de ambiente, como también que la respuesta a la aclimatación varía entre los rasgos fenotípicos analizados. En este sentido, la población de *P. darwini* de la localidad más austral en nuestro rango muestreo, (que va desde los 27°58'S, 70°36'O hasta 36° 12' S, 72° 39'O y cuyas varianzas en el índice de aridez (\log_{10}) van desde 2.29 hasta 5.7) fue la única que mostró variaciones en la masa corporal luego de la aclimatación térmica a 15°C. El resto de las poblaciones (incluyendo a Santiago, $\sigma^2_{O_i}=4.5$), presentaron normas de reacción inflexibles. Por otra parte, los individuos provenientes de la localidad de Quirihue, modificaron M_c solo cuando provenían de un ambiente cuya temperatura ambiental era superior a la temperatura de aclimatación (desde 22°C (tratamiento de pre-aclimatación) a 15°C). Sin embargo, la respuesta plástica no fue observada en la dirección opuesta (cuando los individuos que provenían de 15°C fueron cambiados al tratamientos de

30°C), a pesar de que la diferencia entre temperaturas de aclimatación fuera el doble. Por otra parte, cuando se analizó la TMB, la población proveniente de Quirihue mostró variaciones significativas entre los tratamientos experimentales, variaciones que siguen el mismo patrón que la Mc. Al analizar los residuos de TMB con Mc, las diferencias desaparecieron, de tal manera que las modificaciones metabólicas experimentadas por *P. darwini* de la localidad de Quirihue, estarían dadas como un efecto indirecto de las variaciones en la masa corporal. Estos resultados, contrastan con lo encontrado por Nespolo & Rosemnan, (1997), quienes evaluaron la temperatura de aclimatación como inductor de las modificaciones en la capacidad termorregulatorias en el roedor andino de Chile central, *Abrotrix andinus* encontrando que las modificaciones fisiológicas (Mmax y TMB,-masa específica) se producen y mantienen constantes luego de tres semanas de aclimatación térmica. Este patrón se conserva incluso cuando los animales cambian a tratamientos térmicos opuestos, evidenciando reversibilidad en las capacidades metabólicas. Por otra parte, Barceló et al., (2009), en un estudio en aves, encontraron que la dirección de la flexibilidad fenotípica de TMB-masa específica es dependiente de la temperatura de aclimatación y que la magnitud de la respuesta plástica, en cambio, es dependiente del ambiente térmico previamente experimentado (en este caso de 4 semanas). Consistentemente, Mckechnie (2007) propuso que tanto la velocidad y la magnitud de la respuesta a la aclimatación térmica pueden variar entre poblaciones y que podrían depender de la temperatura ambiental experimentada por los individuos. En este sentido, es probable que la flexibilidad de la Mc que presentaron los individuos de la localidad de Quirihue, se explique porque, a través de la ontogenia, ellos experimenten una temperatura media anual menor a las de las otras localidades (11.7°C respecto de 14.9, 14.5 y 16.6°C de las

localidades de Santiago, Vicuña y Copiapó respectivamente), lo que probablemente favorecería la respuesta de la masa corporal a la disminución en la temperatura del ambiente. De der así, se confirmaría la importancia de la experiencia térmica sobre la flexibilidad fenotípica, en el sentido que en el ambiente natural los individuos responden a cambios en las condiciones climáticas modificando la masa corporal y a través de ella, la TMB. Esta respuesta indirecta de atributos fisiológicos a través de Mc, ha sido ampliamente observada en otras escalas jerárquicas de organización, por ejemplo a nivel bioquímico, donde es habitual encontrar que los organismos incrementan la actividad de enzimas (e.g. metabólicas, digestivas) a través de aumentar la masa de los órganos involucrado en el proceso (Dawson & Oslon, 2003, Drahota et al., 2004).

Respecto de la señal ambiental “disponibilidad de agua”, una vez finalizado el experimento de restricción hídrica, sólo los individuos de la localidad de Quirihue, presentaron variaciones significativas en la masa corporal. La PTAE también disminuyó significativamente, aparentemente como un efecto de las variaciones en masa corporal, debido a que el efecto del tratamiento de restricción hídrica sobre la PTAE desaparece cuando se analizan los residuos de la PTAE con la Mc. Paralelamente, la capacidad máxima de concentración de la orina (*U_{max}*), parece ser un rasgo altamente plástico en *Phyllotis darwini*, pues todas las poblaciones incrementan esta habilidad finalizado el tratamiento de restricción hídrica. Estos resultados se oponen a los encontrado por Oswald (1998), quien encontró que la flexibilidad en concentración de la orina presenta normas de reacción inflexibles en roedores de zonas áridas respecto de zonas mésicas. En el presente estudio, en cambio se evidencia cambios de hasta un 25% en individuos de zonas áridas.

Considerando la alta variabilidad climática presente en la localidad de Santiago, y la baja heredabilidad de rasgos termogénicos en *Phyllotis darwini* (ver Nespolo et al., 2003) surge la pregunta ¿Por qué estos individuos no cambian sus atributos fenotípicos en respuesta a la temperatura? Es probable, que exista un umbral de variabilidad ambiental sobre el cual los individuos sean capaces de responder con cambios fisiológicos, y que este umbral sea específico para diferentes especies y/o poblaciones, lo que explicaría que sólo los individuos de la localidad austral de Quirihue variaron la Mc e indirectamente la TMB como respuesta a la temperatura de aclimatación. En este sentido estos resultados son opuestos a lo encontrado en otras especies de la misma localidad (ver Cavieres & Sabat, 2008; Nespolo et al., 1999). Efectivamente *Phyllotis darwini* de Santiago a pesar provenir de una localidad con mayor heterogeneidad ambiental que los individuos de Copiapó y Vicuña ($\text{Log}_{10}Q_{index}=4.5$ comparado con 2.29 y 3.14 de Copiapó y Vicuña) presentó normas de reacción inflexibles. De acuerdo a esto, la flexibilidad fenotípica dependería, no sólo de las condiciones abióticas experimentadas previamente (e.g. experiencia térmica) sino que también, del grado de heterogeneidad temporal de las señales ambientales. En este sentido, son escasos los estudios en endotermos que hayan puesto a prueba la asociación entre heterogeneidad ambiental y flexibilidad fenotípica. Recientemente, Naya et al., (2012) encontraron que la flexibilidad fenotípica de atributos metabólicos incrementa con la latitud en roedores, pero en su estudio se compararon especies provenientes de localidades que diferían hasta en 57° de latitud, lo que contrasta con el rango de 6° de latitud entre las localidades extremas del presente estudio. La menor escala geográfica utilizada en el análisis de la norma de reacción de las capacidades fisiológicas en *P. darwini* podría explicar la ausencia del patrón encontrado por estos autores.

Por último, los resultados revelan que el grado de asociación entre flexibilidad fenotípica y variabilidad climática es dependiente del atributo fenotípico analizado. Por ejemplo, en relación a la capacidad máxima de concentración de la orina, *P. darwini* presentó flexibilidad fisiológica independientemente de la localidad de origen. Sin embargo, la flexibilidad de rasgos relacionados con la fisiología energética varió entre las localidades, posiblemente en respuesta a la experiencia térmica experimentada durante la ontogenia y al grado de heterogeneidad del ambiente. Asimismo, las modificaciones fenotípicas podrían manifestarse de manera directa o indirecta a través de otros atributos fenotípicos (e.g., masa corporal). En este contexto, son necesarios un mayor número de estudios que evalúen la asociación entre el grado de heterogeneidad ambiental y la flexibilidad fenotípica en endodermos, incorporando no solo el efecto de la media sino también la varianza de la temperatura sobre la diversidad fisiológica a nivel interpoblacional.

Referencias

1. Agrawal, A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 249: 321-325.
2. Barceló, G., Salinas, J., Cavieres, G., Canals, M. & Sabat, P. 2009. Thermal history can affect the short-term thermal acclimation of basal metabolic rate in the passerine *Zonotrichia capensis*. *J Therm Biol* 34: 415-419.
3. Bozinovic, F., Calosi, P. & Spicer, J.I. 2011. Physiological correlates of geographic range in animals. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42: 155-179.
4. Cavieres, G. & Sabat, P. 2008. Geographic variation in the response to thermal acclimation in rufous-collared sparrows: are physiological flexibility and environmental heterogeneity correlated?. *Funct Ecol* 22: 509-515.
5. Chown, S.L., Gaston, K.J. & Robinson, D. 2004. Macrophysiology: large-scale patterns in physiological traits and their ecological implications. *Funct Ecol* 18: 159-167.
6. Drahota, Z., Milerová, M., Stieglerová, A., Houstěk, J. & Ostádal, B. 2004. Developmental changes of cytochrome c oxidase and citrate synthase in rat heart homogenate. *Physiol Res* 53: 119-122
7. Dawson, W.R. & Olson, J.M. 2003. Thermogenic capacity and enzymatic activities in the winter-acclimatized dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J Therm Biol* 28: 497-508.
8. di Castri, F. & Hajek, E.R. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 129 pp.

9. Garland, T.Jr. & Carter, P.A. 1994. Evolutionary Physiology. *Annu Rev Physiol* 56: 579-621.
10. Gaston, K.J., & Chown S.L. 1999. Why Rapoport's rule does not generalize. *Oikos* 84: 309-312.
11. Hedrick, P.W. 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annu Rev Ecol Syst* 17: 535-566
12. Janzen, D.H. 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. *Am Nat* 101: 233-249.
13. McKechnie, A.E., Freckleton, R.P. & Jetz, W. 2006. Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. *Proc Biol Sci* 273: 931-937.
14. McKechnie, A.E., Chetty, K. & Lovegrove, B.G. 2007. Phenotypic flexibility in the basal metabolic rate of Laughing Doves: responses to short-term thermal acclimation. *J Exp Biol* 210: 97-106
15. Molina-Montenegro, M.A. & Naya, D.E. 2012. Latitudinal patterns in phenotypic plasticity and fitness-related traits: assessing the climatic variability hypothesis with an invasive plant species. *PLoS One* 7: e47620.
16. Naya, D.E., Bozinovic, F. & Karasov, W.H. 2008. Latitudinal trends in digestive flexibility: testing the climatic variability hypothesis with data on the intestinal length of rodents. *Am Nat* 172: E122-E134
17. Naya, D.E., Spangenberg, L., Naya, H. & Bozinovic, F. 2012. Latitudinal pattern in rodent metabolic flexibility. *Am Nat* 179: E172-E179.
18. Nespolo, R.F. & Rosenman, M. 1997. Historia térmica de roedores: una aproximación experimental. *Rev Chil Hist Nat* 70: 363-370.

19. Nespolo, R.F., Opazo, J., Rosenmann, M. & Bozinovic, F. 1999. Thermal acclimation, maximum metabolic rate and nonshivering thermogenesis in *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia) inhabiting the andean range. *J Mammal* 80: 742-748.
20. Nespolo, R.F., Bacigalupe, L.D. & Bozinovic, F. 2003. Heritability of energetics in a wild mammal, the leaf-eared mouse (*Phyllotis darwini*). *Evolution* 57: 1679-1688
21. Oswald, C. 1998. Geographic variation and plasticity in renal function in the white-footed mouse *Peromyscus leucopus*. *J Mammal* 79: 1103-1110.
22. Padilla, D.K. & Adolph, S.C. 1996. Plastic inducible morphologies are not always adaptive: the importance of time delays in a stochastic environments. *Evol Ecol* 10: 105-117.
23. Piersma, T. & Drent, J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol Evol* 18: 228-233.
24. Pigliucci, M. 2001. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. 328pp.
25. Rezende, E.L., Bozinovic, F. & Garland T.Jr. 2004. Climatic adaptation and the evolution of basal and maximum rates of metabolism in rodents. *Evolution* 58: 1361-1374.
26. Sabat, P., Lagos, J.A. & Bozinovic, F. 1999. Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 123: 83-87.
27. Sabat, P. & Bozinovic, F. 2000. Digestive plasticity and the cost of acclimation to dietary chemistry in the omnivorous leaf-eared mice *Phyllotis darwini*. *J Comp Physiol B* 170: 411-417.

28. Scantlebury, M., Shanas, U., Or-Chen, K. & Haim, A. 2009. Osmoregulatory traits of broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) populations from different habitats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 154: 551-556.
29. Schlichting C.D. & Pigliucci, M. 1998. *Phenotypic Evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer Associates Inc. USA. 340pp.
30. Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology. Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, New York. USA. 612pp.
31. Speakman, J.R. 2000. The cost of living: field metabolic rates of small mammals. *Adv Ecol Res* 30: 177-297.
32. Stearns, S.C. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* 39: 436-445.
33. Stevens, G. C. 1989. The latitudinal gradient in geographical range: how so many species coexist in the tropics. *Am Nat* 133: 240-256.
34. Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong G., Scheiner S.M., Shlichting C.D. & Van Tienderen P.H. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol Evol* 10: 212-217.
35. West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. New York, USA. 794pp.

Capítulo 3

Mecanismos de variación fenotípica: efecto de la experiencia térmica e hídrica durante el desarrollo sobre la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*.

Resumen

A pesar que la plasticidad del desarrollo es una fuente importante de variación fenotípica, son escasos los estudios que la analizan explícitamente, esto podría llevar a la subestimación de la capacidad que tiene un organismo, población o especie, de responder a los desafíos ambientales. En este estudio, se evaluó el efecto potencial de la historia térmica e hídrica experimentada durante el desarrollo sobre la flexibilidad fisiológica de rasgos energéticos (tasa metabólica basal, TMB; pérdida total de agua evaporativa, PTAE; masa corporal Mc; masa de órganos; actividad de enzimas metabólicas) y rasgos osmorregulatorios (tamaño renal; grosor medular relativo, GMR; osmolalidad de la orina, Umax) en el roedor altricial *Phyllotis darwini*. Individuos adultos fueron capturados en Chile central y mantenidos en pares para la reproducción, las crías fueron aisladas después del destete y aclimatadas a condiciones térmicas (15°C y 30°C) e hídricas (agua *ad libitum* y restricción hídrica) hasta la adultez. Subsecuentemente, los individuos fueron aclimatados al tratamiento térmico y/o hídrico opuesto por 5 semanas. Los resultados revelaron que frente a variaciones en el ambiente térmico e hídrico, experimentado durante el desarrollo, *Phyllotis darwini* presenta modificaciones fenotípicas, mostrando ajustes desde un nivel celular (a través de la actividad de enzimas metabólicas), en el tamaño de órganos (masa y largo total, GMR) y a nivel organismico (a través de modificaciones de la TMB, PTAE y Mc), lo que contribuiría a incrementar los esfuerzos termogénicos y a disminuir la pérdida de agua evaporativa y excretada. Adicionalmente, la magnitud de la flexibilidad fisiológica en individuos adultos, depende del rasgo evaluado, de la dirección de la señal ambiental y de posibles compromisos entre rasgos. Cuando los individuos se desarrollan de un ambiente de 15°C (RH y AL) y fueron re-aclimatados al tratamiento térmico opuesto (manteniendo

las condiciones de disponibilidad de agua), presentaron flexibilidad fisiológica de atributos metabólicos y plasticidad del desarrollo en la fisiología osmorregulatoria (GMR, U_{max}), evidenciando posibles compromisos energéticos asociados al incremento en capacidades renales. En el sentido opuesto, cuando los roedores crecieron en un régimen de altas temperaturas (30°C, RH y AL) y en la adultez fueron re-aclimatados al tratamiento contrario (15°C, manteniendo las condiciones hídricas), presentaron normas de reacción inflexibles en sus atributos energéticos (plasticidad del desarrollo) y flexibilidad en los atributos osmorregulatorios. Finalmente, cuando los individuos adultos experimentan cambios en el ambiente térmico y en la disponibilidad de agua (en relación a la condición del desarrollo) la capacidad de cambio fenotípico presenta resultados contrastantes, probablemente, debido a una combinación de estrategias celulares que les permitan sobrevivir en esas condiciones, favoreciendo el incremento en la producción de agua metabólica y la mantención de la temperatura corporal constante. Los resultados sugieren la existencia de una dependencia ontogenética, de la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*. La historia térmica e hídrica experimentada durante etapas tempranas del desarrollo determina las trayectorias fenotípicas y la flexibilidad fisiológica de los atributos fenotípicos en respuesta a señales del ambiente.

Introducción

Históricamente, los esfuerzos por entender la diversidad fisiológica se han centrado principalmente en comprender las causas de las variaciones fenotípicas en respuesta a modificaciones del ambiente, fenómeno conocido como flexibilidad fenotípica³. (véase McKechnie et al., 2006; Arens & Cooper, 2005; Nespolo et al., 2002; Tracy & Walsberg, 2001; Oswald, 1998). Sin embargo, son escasos los estudios que incorporan explícitamente a la plasticidad del desarrollo, siendo una fuente importante de variación fenotípica sobre la cual podría actuar la selección natural (Schiling & Pigluicci, 1998). El no considerar explícitamente esta fuente de variación del fenotipo podría llevar a la subestimación de la capacidad que tiene un organismo, población o especie, de responder a los desafíos ambientales (Pigliucci, 1996). En este contexto se ha evidenciado que los individuos pueden responder de manera irreversible a desafíos ambientales durante las primeras etapas del desarrollo viéndose favorecida su adecuación biológica (Goldstein, 1991; Tracy & Walsberg, 2001; Hammond et al., 2002; Sabat & Bozinovic, 2008). En relación a las modificaciones reversibles del fenotipo, se ha documentado la importancia de la experiencia sobre el desempeño biológico de organismos, sin embargo, en este sentido los antecedentes contrastan entre especies (McKechnie et al., 2006, 2007, Barceló, 2009). Por lo tanto, resulta fundamental realizar estudios comparativos que avancen en esclarecer por una parte la contribución de la plasticidad fenotípica (la plasticidad del desarrollo y flexibilidad fenotípica) sobre los individuos y por otra las consecuencias de la historia (e.g.

¹ Flexibilidad fenotípica: transformaciones reversibles conductuales, fisiológicas y/o morfológicas que pueden incurrir en ventajas selectivas (Piersma & Drent, 2003)

ontogenia) sobre el desempeño y capacidades fisiológicas, de tal manera de incrementar nuestro entendimiento tanto de causas próximas e históricas de la diversidad fenotípica como de los límites y tolerancias de los organismos.

A pesar de la gran cantidad de estudios que buscan esclarecer los patrones y mecanismos que subyacen a las variaciones fisiológicas en ambientes contrastantes, la mayoría se han realizado en individuos adultos, siendo escasos los que exploran el rol de la historia ontogenética sobre la expresión del fenotipo adulto (e.g., Canals et al., 2009). Un ejemplo de ello es el estudio de Oswald (1998) en el que se evaluó la contribución de la plasticidad fenotípica del desarrollo y la flexibilidad fenotípica en adultos, sobre rasgos relacionados con el balance hídrico en un roedor que habita sectores áridos y méxicos. Este autor encontró que la plasticidad del desarrollo es una importante fuente de variación fenotípica en roedores que habitan sectores méxicos con una marcada estacionalidad climática. Así, cuando estos roedores fueron expuestos a regímenes de restricción hídrica, alcanzaron la misma capacidad de concentrar la orina que los roedores de la población árida. Sin embargo, la norma de reacción es inflexible en individuos provenientes de localidades áridas, sugiriendo que la fuente de variación fenotípica en esos sectores posee una base genética (para otros estudios ver Tracy & Walberg 2001; Russel et al., 2008). Por otra parte, la ausencia de variación fenotípica en adultos no solo se puede explicar por bases genéticas, sino también por plasticidad del desarrollo (Tolozza & Diamond, 1990; Goldstein, 1991). En este sentido, es necesario establecer la contribución de la historia ontogenética sobre la capacidad de ajustar el fenotipo a las demandas ambientales y analizar la norma de

reacción⁴ de atributos relacionados con el balance hídrico y energético en especies con amplios rangos de distribución y que experimenten variaciones significativas en las condiciones ambientales.

Diversos autores han encontrado la existencia de plasticidad fenotípica durante el desarrollo en estructuras que presentan una respuesta inflexible durante la vida adulta (Tolosa & Diamond, 1990; Biviano et al., 1993; Bozinovic, 1993). De esta manera la plasticidad de ciertos rasgos morfológicos podría ser dependiente del estado ontogenético (Cheplick, 1995). Schlitching & Pigliucci (1998) proponen que cuando se consideran sólo individuos adultos para el estudio de las consecuencias de variaciones ambientales sobre el fenotipo se podría subestimar el potencial de respuesta plástica. En esta vía, Cheplick (1995), reportó que existiría una dependencia ontogenética en la magnitud de respuesta plástica en plantas. En animales, el estudio de los efectos del ambiente en el desarrollo ha incrementado este último tiempo. Por ejemplo, Goldstein (1991), estudiando las consecuencias de la restricción hídrica durante la ontogenia y la vida adulta de codornices, demostró que el número total de conos medulares (estructuras internas del riñón de las aves) se determinan dentro de las primeras 3 a 4 semanas después de la eclosión. Por otra parte Brzek et al. (2009) en un estudio sobre el capacidades digestivas de gorriones durante la ontogenia, encontraron que la actividad enzimática responde a la oferta dietaria durante las primeras etapas del desarrollo. En mamíferos, Canals et al. (2009) encontró que el roedor altricial, *Phyllotis darwini*, incrementa significativamente la temperatura corporal y la tasa de desarrollo como respuesta a la aclimatación térmica a bajas temperaturas durante

⁴ Norma de Reacción: conjunto de fenotipos que pueden ser producidos por un genotipo en particular que es expuesto a diferentes condiciones ambientales (Schlichting & Pigliucci, 1998)

la ontogenia. Adicionalmente, diversos estudios suponen que el desarrollo o la exposición post natal temprana a condiciones de estrés (i.e. hipoxia, bajas temperaturas) podrían tener importante influencia en el desempeño de adultos, sin embargo los resultados en este sentido son contradictorios (véase Hammond et al., 2002). En esta vía, Tracy & Walsberg (2001) investigaron la resistencia a deshidratación en un roedor (*Dipodomys merriami merriami*) provenientes de ambientes xericos y mésicos, encontrando que la variabilidad intraespecífica en respuesta a la desecación en condiciones de laboratorio podría ser explicada tanto por el desarrollo, la aclimatación y el linaje; y que la contribución relativa de cada una de estas fuentes de variación fenotípica dependería del atributo observado. A pesar del incremento en estudios de plasticidad durante el desarrollo de atributos fisiológicos en el último tiempo, son escasos los estudios que incorporen el impacto del desarrollo sobre el desempeño de adultos en poblaciones que habiten sectores con marcadas diferencias climáticas (e.g. en temperatura, precipitaciones y productividad primaria).

El objetivo de este capítulo, es estudiar la respuesta fenotípica a diversos niveles de organización biológica (del sistémico al bioquímico) a las demandas ambientales y determinar el rol de la plasticidad fenotípica (del desarrollo y en adultos) sobre el fenotipo de individuos provenientes de una localidad altamente estacional (temperaturas , precipitación y productividad primaria) y evaluar la existencia de dependencia ontogenética de la flexibilidad fisiológica de rasgos relacionados con la fisiología energética y osmorregulatoria.

Hipótesis

En individuos adultos, la capacidad de modificar los atributos relacionados con energética y osmorregulación se asocia con las condiciones térmicas e hídricas durante el desarrollo, por tanto existe dependencia ontogenética en la magnitud de la respuesta plástica relacionada con estas variables.

Predicciones

La magnitud de la flexibilidad fenotípica disminuirá en estado adulto, si durante la ontogenia los individuos experimentan condiciones térmicas y /o hídricas extremas. Lo anterior se traduciría en variaciones de la cinética de cambio de (BMR, PTAE, Mc, masa de órganos, actividad enzimas oxidativas) y osmorregulatorios (función renal, grosor medular relativo (GMR)).

Objetivo general

Estudiar el efecto de la plasticidad fenotípica (plasticidad del desarrollo y flexibilidad fenotípica) sobre la variabilidad fisiológica de *Phyllotis darwini*.

Objetivos específicos

-Evaluar los ajustes morfológicos y fisiológicos en una población de *Phyllotis darwini* en respuesta a la aclimatación térmica (15°C) y a la restricción hídrica durante la ontogenia y estado adulto mediante el análisis de los siguientes variables funcionales: (1) tasa metabólica basal (2) pérdida total de agua evaporativa (3) capacidad oxidativa (actividad enzimas metabólicas, e.g., citrato sintasa y citocromo c oxidasa) y (4) masa de órganos (corazón, hígado, intestino, estomago y riñón), y de parámetros osmorregulatorios (1) estructura renal (tamaño renal y grosor medular relativo (RMT)

Evaluar el efecto de la historia ontogenética sobre la cinética de cambio (patrón, magnitud y velocidad) de la flexibilidad fenotípica, de individuos provenientes de una localidad que experimenta marcadas diferencias en regímenes térmicos e hídricos de Chile (localidad estacional).

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Se escogió *a priori* la localidad de Quebrada de la Plata (RM, Provincia de Santiago, Comuna Maipú, 33° 31' S, 70° 50'O), debido a que presenta un régimen climático estacional, lo que probablemente aumente la posibilidad de presentar una norma de reacción plástica. En esta localidad, se colectaron individuos adultos que fueron transportados al laboratorio. Al menos 5 hembras no preñadas se asignaron aleatoriamente a cada uno de 8 machos reproductivos y se les permitió interactuar por un período de 10 días, o hasta que se determine un estado de preñez evidente. Las hembras preñadas fueron mantenidas a 22°C con alimento y agua *ad libitum*, durante la preñez y lactancia. Una vez destetadas las crías (día 20, véase Sabat & Bozinovic, 2000), se asignaron a los tratamientos de aclimatación térmica: 15 ± 1 °C (aclimatación al frío) y 30 ± 1 °C (zona termoneutral) y a dos tratamientos hídricos: agua *ad libitum* y 50% de restricción de agua (N total=160). Los cuatro tratamientos experimentales fueron los siguientes: (1) 30°C/agua *ad libitum*; (2) 30°C/50% agua; (3) 15°C/agua *ad libitum*; (4) 15°C/50% agua. Finalizado su desarrollo (aproximadamente 4 meses desde el nacimiento, se escogieron 10 individuos de cada tratamiento y se sacrificaron para la determinación de los parámetros funcionales y estructurales ya mencionados. En etapa adulta, los individuos fueron aclimatados por un periodo de 5 semanas a dos temperaturas y regímenes hídricos contrastantes. Una vez terminado el periodo de aclimatación los individuos fueron sacrificados para realizar los análisis morfológicos y fisiológicos. Con el fin de determinar curvas de cinética de cambio

de atributos metabólicos, durante el periodo de aclimatación de adultos se realizaron mediciones semanales de masa corporal, BMR y TEWL (ver detalle Fig 3.1).

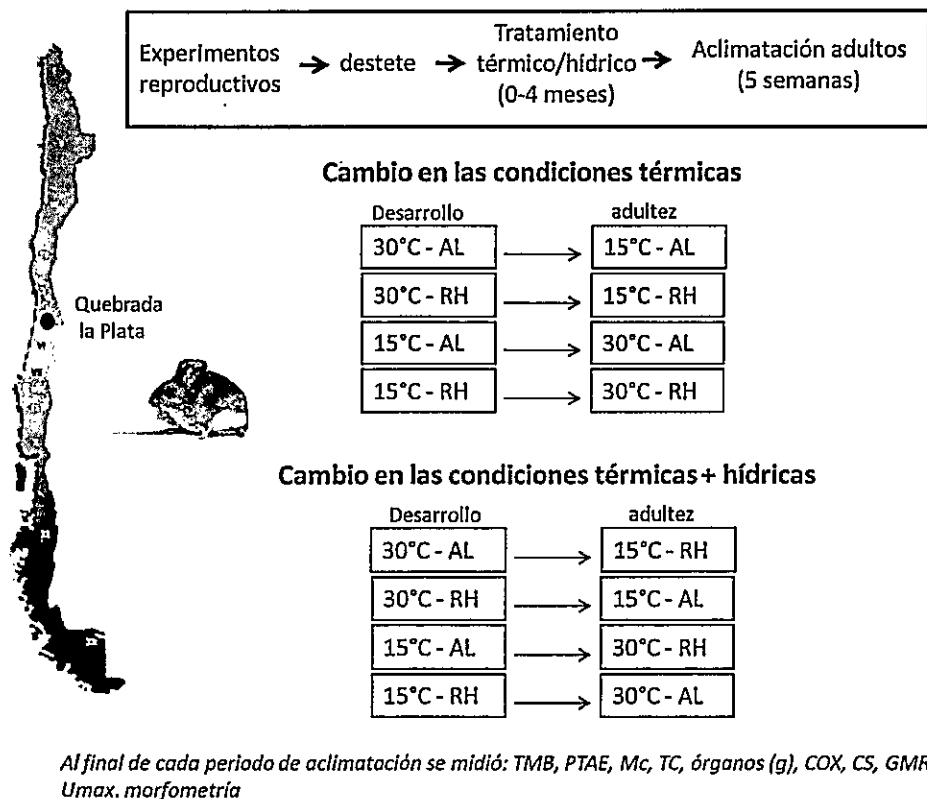


Figura 3.1. Diseño experimental para determinar si existe dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica en atributos energéticos y osmorregulatorios.

Tasa Metabólica Basal

El consumo de oxígeno (VO_2) se determinó en la fase de descanso del ritmo de actividad de la especie, en individuos postabsortivos, mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems) computarizado (Datacan V) calibrado con una mezcla de oxígeno conocida (20%) y nitrógeno (80%) certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las determinaciones individuales se realizaron en cámaras metálicas, en oscuridad, a

temperatura ambiente correspondiente a termoneutralidad, i.e., 30 ± 0.5 °C (Novoa 1993). Las cámaras metabólicas recibieron aire seco a una tasa de 750 a mL/min desde un controlador de flujo (Sierra Instruments) para asegurar una mezcla adecuada en la cámara. El aire se secó antes y después de la cámara y monitoreado cada 5 s mediante un analizador de oxígeno 1FC-1B (Sable System). El CO₂ se retiró antes de entrar al analizador de O₂ y el consumo de oxígeno se calculó utilizando la ecuación de Withers (1977: p 122): $V.O_2 = [FR \cdot 60 \cdot (F_i O_2 - F_e O_2)] / (1 - F_i O_2)$, donde FR es la tasa del flujo en ml/min después de la corrección STP, F_i y F_e son las fracciones de concentración de O₂ al ingreso y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

Pérdida total de agua por evaporación (PTAE)

Los individuos se pusieron en cámaras metálicas con un piso de malla de alambre sobre una capa de aceite mineral para atrapar las fecas y orina, excluyéndolas como fuente de agua.

El aire pasó a través de columnas de Dierite y Baralime para remover el agua y CO₂ del aire mediante un controlador de flujo (Sierra Instrument). El aire que sale de la cámara pasó a través de un higrómetro (1-RH 200, Sable System) antes que una submuestra se desvíe hacia a el analizador de oxígeno para las determinaciones de consumo de oxígeno, en conjunto con las determinaciones higrométricas. La PTAE fué calculada como $PTAE = [(V_e p_{out} - V_i p_{in})] / [(V_e p_{out} - V_i p_{in})]$ donde PTAE es expresada en mg/ml. p_{in} y p_{out} son la humedad absoluta en kg/m³ del aire de entrada y salida respectivamente, V_i es la tasa del flujo que ingresa a la cámara según un controlador de flujo de masa (750 ml min⁻¹ después de la corrección STP) y V_e es el flujo de aire que sale. V_e fué calculado siguiendo a Williams & Tieleman (2000) como $V_e = V_i - [VO_2 (1 - RQ)] + V_{H_2O} V_i$, y VO_2 (mL min-

1) son conocidos. La humedad absoluta se calculó como $\rho = P/(T \cdot R_w)$, donde P es la presión de vapor de agua del aire en Pascal, T es temperatura del punto de rocío del higómetro en Kelvin y R_w es la constante de gas para el vapor de agua (461.5 J/kg*Kelvin, Lide 2001). P_{in} se determinara usando el valor promedio de la presión de vapor del aire que ingresa a la cámara vacía (i.e., periodo de base de 15 min) antes y después de cada experimento. La masa corporal (M_c) será medida antes de las mediciones metabólicas usando una balanza electrónica (± 0.1 g) y la temperatura rectal (T_b) fué tomada al final de cada medición con una termocupla Cole-Palmer copper-constantan conectada a un termómetro Digi-Sense (Modelo 92800-15).

Ensayos enzimáticos

Después de la eutanasia y la disección de roedores, las muestras de hígado fueron guardadas a -80°C para los subsecuentes ensayos de actividad enzimática. El tejido congelado fue pesado y homogeneizado en 10 volúmenes de buffer fosfato 0.1M con EDTA (PH 7.3) con un homogenizador Ultra Turrax (20000 rpm) en hielo para evitar reacciones enzimáticas. Las muestras fueron sonicadas a 130 watt mediante un sonicador Ultrasonic Processor VCX 130, por 20 segundos con 10 segundos de intervalo, 14 veces cada una, mantenidas en hielo. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 150000 rpm a 4°C . El sobrenadante fue cuidadosamente transferido en un nuevo tubo evitando la transferencia del la capa de lípidos presentes e las preparaciones de hígado. La concentración de proteínas de las muestras fue determinada usando el método descrito por Bradford (1976), usando serum de albumina como estándar. La actividad de dos enzimas mitocondriales fueron determinadas: (a) Citocromo c oxidasa (COX; E.C. 1.9.3.1), una

enzima terminal de la cadena respiratoria, que indica la capacidad de la mitocondria de proveer energía al sistema, y (b) Citrato Sintasa (CS; E.C. 4.1.3.7), una enzima soluble localizada en la matriz mitocondrial, participante del Ciclo de Krebs. La actividad de COX fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo a Moyes et al. (1997), con pequeñas modificaciones. La actividad enzimática fue determinada en 10mM Tris/HCl pH7.0, que contiene 120 mM KCl, 250 mM se sucralosa, y citocromo c reducido con dithiothereitol en un volumen final de 0.2 ml. La absorción de citocromo c a 550 nm cambia en estado oxidado. La disminución en extinción a 550 nm fue monitoreada in un Thermo Scientific Multiskan GO monochromatorbased UV/VIS espectrofotómetro a 25°C. La actividad en unidades por gramo de tejido fue calculada usando la diferencia de coeficiente de extinción ($\Delta\epsilon^{mM}$) entre el citocromo c reducido y oxidado, que es $21.84 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 550nm por el citocromo c. La actividad de CS fue medida de acuerdo a Sidell et al. (1987), con pequeñas modificaciones. El medio de ensayo de CS contuvo 10mMTris/HCl, pH8.0, 10mM 5,5'dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 30mM acetil Coenzyma A (Acetyl CoA) y 10mM acido oxaloacetico (OAA; omitido para el control) en un volumen final de 0.2 ml. CS cataloza la reaccipon entre acetil CoA y OAA para formar acido cítrico. El incremento y la extinción a 412 nm fueron medidas en un Thermo Scientific Multiskan a 25°C. La actividad e zimatica en unidad por gramo de tejido fue calculada usando un coeficiente de extinción de $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412nm. Las actividades se reportan como actividad masa específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g tejido fresco}^{-1}$) actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$) y omo y actividad específica por gramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g proteina}^{-1}$).

Función renal

Antes y después de la aclimatación hídrica los roedores se mantuvieron en cajas metálicas individuales de 25 x 25 x 30 cm, para la obtención de muestras de orina, las que fueron recogidas con una micropipeta Eppendorf y vertidas a un tubo Eppendorf. Las muestras fueron guardadas y congeladas (-40 °C) antes de los análisis osmométricos (Wescor 5130B). Posteriormente, los roedores fueron sometidos a un período de 24 horas de privación de agua para determinar la capacidad máxima de concentración de la orina (*U_{max}*), las muestras de orina fueron recogidas siguiendo el mismo protocolo.

Estructura renal: Grosor medular relativo (GMR)

Se examinará la estructura renal de individuos provenientes de las 4 localidades. Para ello, se medirá tanto el largo como el ancho renal con un Vernier (± 0.01 cm) y cortes medio-sagitales (Cortes et al., 1990). El ancho total y el grosor medular se medirán con cortes sagitales desde la punta de la corteza -medula hasta extremo de la papila (Heisinger & Breitenbach, 1969; Blake, 1977) en un microscopio óptico. Los cortes medio sagitales se realizaron para maximizar el área de visualización de la médula. El grosor medular relativo se calculó según Al-Kahtani et al. (2004), como sigue: $GMR = 10 (\text{grosor medular}) / (\text{largo} \times \text{grosor} \times \text{ancho})^{1/3}$

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias tanto en los parámetros morfológicos como fisiológicos entre tratamientos experimentales se utilizó un ANCOVA, usando la masa corporal como covariable y la localidad y temperatura de aclimatación (cuando

corresponda) como factores. Para determinar las diferencias específicas entre los promedios de rasgos fisiológicos y morfológicos se utilizó una prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey. Para estudiar la cinética de cambio de BMR, TEWL y Mb se realizó un ANOVA de medidas repetidas con BMR, TEWL y Mb como variables respuestas. Para determinar la posible asociación entre BMR y la masa de los órganos se realizó una regresión múltiple paso a paso (*stepwise forward*).

Resultados

Efecto del ambiente hídrico y térmico experimentado durante el desarrollo sobre la fisiología energética y osmorregulatoria de *Phyllotis darwini*.

Masa corporal

La masa corporal de *Phyllotis darwini* varió significativamente entre los tratamientos experimentales ($F_{3,137}=11,1$ $p<0,0001$) y entre sexo ($F_{1,137}=42,8$ $p<0,0001$), sin embargo no se encontró un efecto de la interacción de los factores ($F_{3,137}=1,0$ $p=0,39$). El promedio de la masa corporal de individuos luego de los tratamientos experimentales fue: 15°C-agua *ad libitum* = $49,29 \pm 1,02$ g (N=45), 15°C-restricción hídrica = $42,39 \pm 1,57$ g (N=21), 30°C-agua *ad libitum* $45,47 \pm 1,07$ g (N=45) y 30°C-restricción hídrica $42,9 \pm 1,19$ g (N=34). Así, la masa corporal de individuos que se desarrollaron en condiciones de baja temperatura y agua *ad libitum* (15°C-AL) fue un 16% superior a quienes se desarrollaron a 15°C restricción hídrica, 8,4% superior a quienes se desarrollaron a 30°C agua *ad libitum*, y 14% mayor a los que se desarrollaron a 30°C restricción hídrica. Por otra parte, considerando el total de los datos analizados, la masa corporal de los machos fue un 16,5% mayor que en las hembras, promediando $49,2 \pm 0,81$ g (N=70) versus $42,2 \pm 0,72$ (N=75).

Tasa Metabólica Basal y Pérdida Total de Agua Evaporativa

Finalizados los 4 tratamientos experimentales durante el desarrollo, la tasa metabólica basal (TMB) y la pérdida total de agua evaporativa (PTAE) se asociaron positiva y significativamente con la masa corporal TMB, $r^2=0,18$ $F_{(1,141)}=31,98$ $p<0,0001$ (N=143) y

PTAE, $r^2=0,1$ $F_{(1,142)}=16,16$, $p<0,0001$, (N=144). El análisis de los residuos de las variables fisiológicas (TMB y PTAE) y la masa corporal reveló la existencia de una asociación funcional positiva y significativa entre ellas ($r^2=0,16$ $F_{(1,140)}=27,53$ $p<0,001$) Figura 2 y 3.

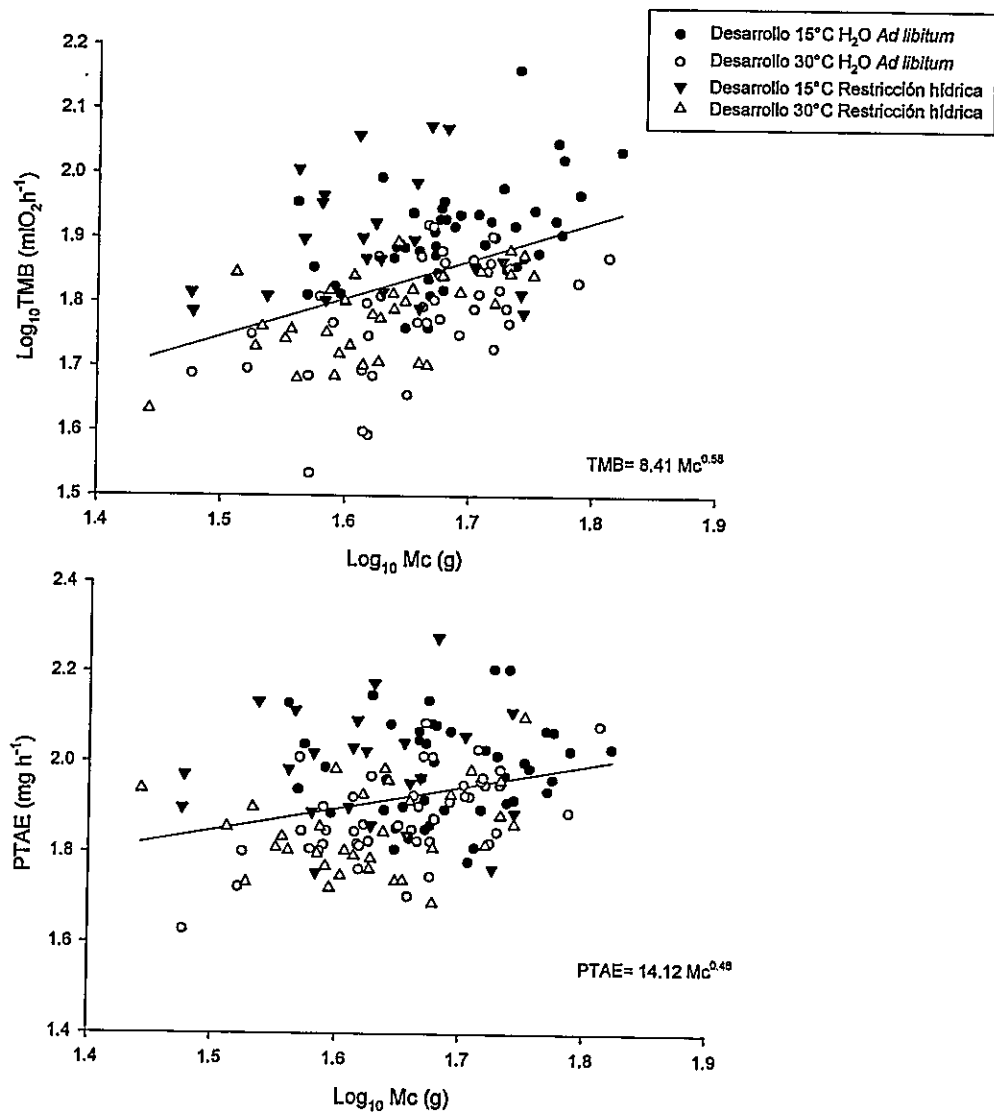


Figura 3.2. Pérdida total de agua evaporativa en función de la masa corporal de *Phyllotis darwini* finalizados los tratamientos experimentales durante su desarrollo.

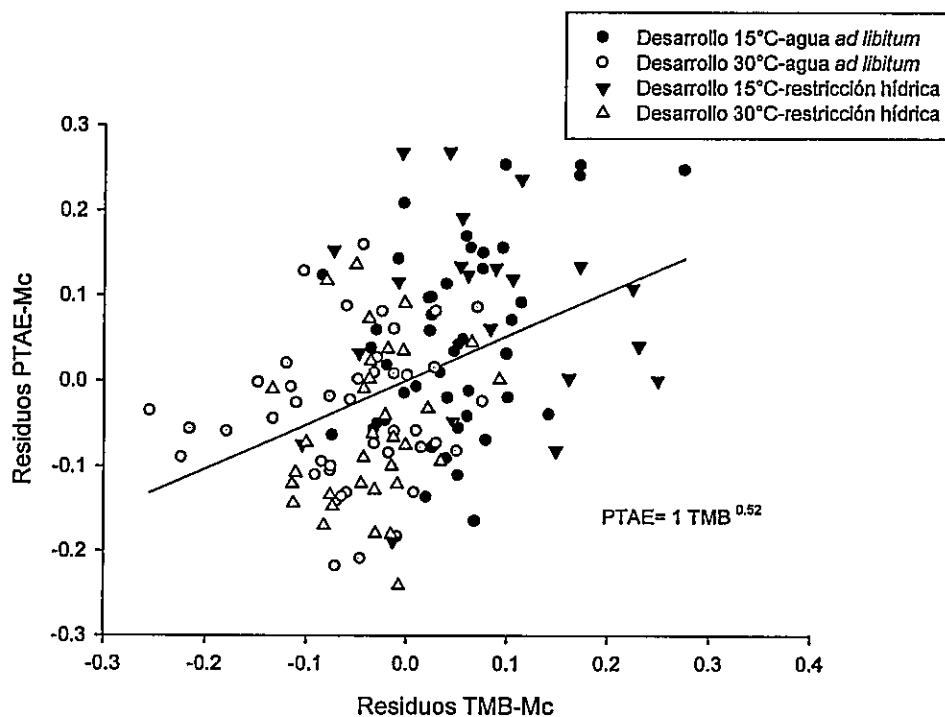


Figura 3.3. Relación entre los residuos de PTAE y la TMB con la masa corporal en *Phyllotos darwini* finalizado los tratamientos experimentales durante el desarrollo.

El análisis de los residuos de TMB y de PTAE con la masa corporal reveló la existencia de un efecto significativo del tratamiento experimental sobre las tasas de gasto energético y la pérdida de agua evaporativa en *Phyllotis darwini* (MANOVA, Wilks'lambda = 0,58, $F_{(6,266)}=13,68$, $p<0,0001$). Sin embargo no se presentaron diferencias entre sexos (Wilks $\Lambda=0,96$, $F_{(2,133)}=2,44$, $p=0,09$) ni un efecto significativo de la interacción de ambos factores (Wilks $\Lambda=0,97$, $F_{(6,266)}=0,62$, $p=0,670$).

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey reveló que ambos, TMB y PTAE de *P. darwini* desarrollados en bajas temperaturas experimentaron valores significativamente superiores respecto de quienes se desarrollaron a 30°C. Figura 4.

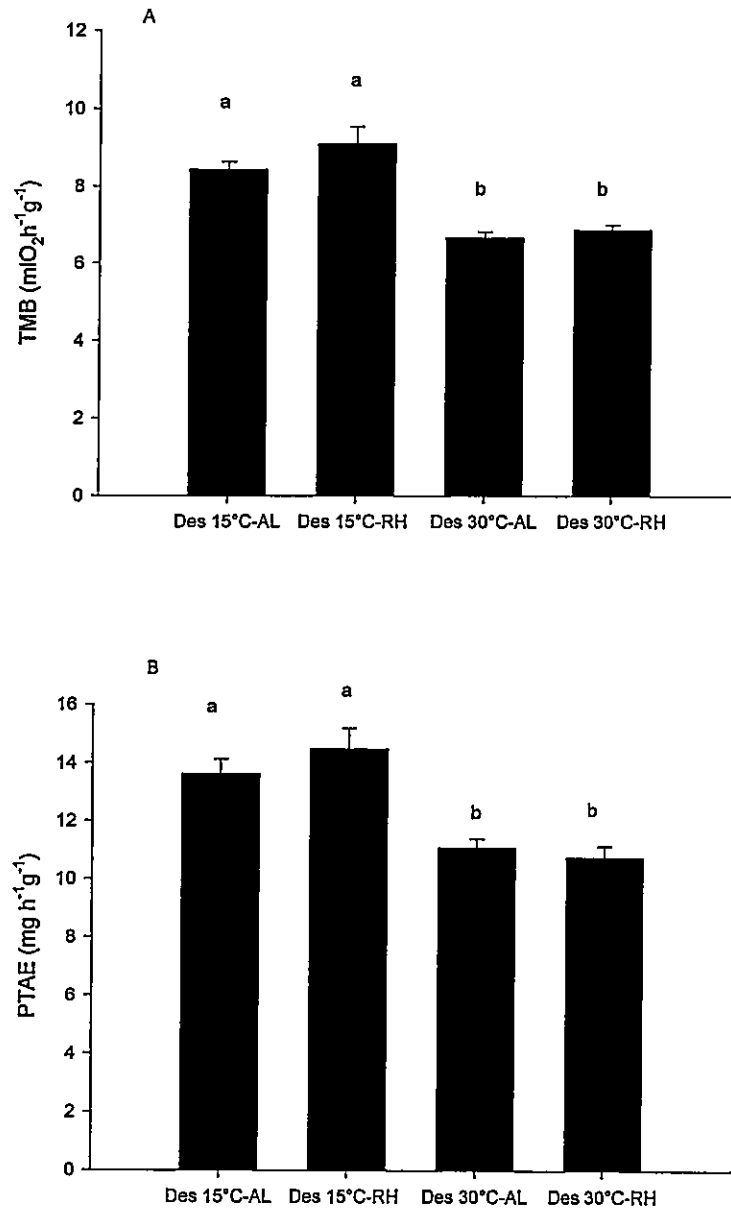


Figura 3.4. Tasa metabólica basal y pérdida total de agua evaporativa de *Phyllotis darwini* de cuatro tratamientos experimentales durante el desarrollo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Masa de órganos

La masa del corazón, hígado, riñón, estómago, páncreas, pulmón, intestino delgado e intestino grueso se asoció positiva y significativamente con el masa corporal, (corazón $r=0,50$ $p=0,002$; hígado $r=0,59$ $p<0,0001$; riñón $r=0,66$ $p<0,0001$; estómago $r=0,51$ $p=0,002$; páncreas $r=0,55$ $p=0,001$; pulmón $r=0,48$, $p=0,008$; intestino delgado $r=0,44$, $p=0,008$; intestino grueso $r=0,47$ $p=0,005$). El largo del intestino delgado y del intestino grueso no se asocio significativamente con la masa corporal ($r=0,05$ $p=0,73$ y $r=0,1$ $p=0,56$ respectivamente).

Las comparaciones de la masa fresca de los órganos entre los cuatro tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 1. Se encontraron diferencias significativas en la masa del riñón ($F_{3,26} =9,33$ $p< 0,001$), páncreas ($F_{3,26} =3,83$ $p= 0,02$), intestino delgado ($F_{3,26} =23,04$, $p< 0,001$), intestino grueso ($F_{3,26} =9,33$ $p< 0,001$), largo del intestino delgado ($F_{3,26} =3,3$ $p= 0,03$) y en el largo del intestino grueso ($F_{3,26} =6,44$ $p= 0,002$). No se encontró efecto del tratamiento sobre la masa del corazón ($F_{3,26} =1,12$ $p= 0,35$), hígado ($F_{3,26} =2,48$ $p= 0,08$), estómago ($F_{3,26} =2,71$ $p= 0,06$) y pulmón ($F_{3,26} =1,32$ $p= 0,28$).

Tabla 3.1. Masa de los órganos en *Phyllotis darwini*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como promedios \pm EE. El número de animales utilizado en cada medición: 30°C agua Ad libitum (10), 30°C Restricción hídrica (10), 15°C agua Ad libitum (8), 15°C Restricción hídrica (7).

| | 30°C-AL | 30°C-RH | 15°C-AL | 15°C-RH |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Corazón (g) | 0.20 \pm 0.01 ^a | 0.18 \pm 0.01 ^a | 0.22 \pm 0.01 ^a | 0.22 \pm 0.01 ^a |
| Hígado (g) | 1.64 \pm 0.12 ^a | 1.21 \pm 0.10 ^a | 1.71 \pm 0.13 ^a | 1.61 \pm 0.11 ^a |
| Riñón (g) | 0.41 \pm 0.02 ^a | 0.43 \pm 0.01 ^a | 0.45 \pm 0.02 ^b | 0.47 \pm 0.02 ^b |
| Estómago (g) | 0.67 \pm 0.03 ^a | 0.61 \pm 0.01 ^a | 0.81 \pm 0.05 ^a | 0.64 \pm 0.02 ^a |
| Páncreas (g) | 0.05 \pm 0.00 ^a | 0.03 \pm 0.00 ^b | 0.04 \pm 0.00 ^b | 0.04 \pm 0.00 ^b |
| Pulmón(g) | 0.24 \pm 0.01 ^a | 0.19 \pm 0.01 ^a | 0.24 \pm 0.01 ^a | 0.22 \pm 0.01 ^a |
| ID (g) | 1.14 \pm 0.04 ^a | 0.84 \pm 0.03 ^b | 1.29 \pm 0.06 ^{ac} | 1.34 \pm 0.04 ^c |
| IG (g) | 0.44 \pm 0.02 ^{ab} | 0.41 \pm 0.02 ^a | 0.50 \pm 0.02 ^b | 0.50 \pm 0.02 ^b |
| ID (mm) | 28.8 \pm 0.62 ^a | 34.7 \pm 0.78 ^b | 34.23 \pm 1.09 ^b | 26.9 \pm 0.64 ^a |
| IG (mm) | 16.02 \pm 0.93 ^a | 19.4 \pm 0.32 ^b | 18.2 \pm 0.76 ^{ab} | 15.48 \pm 0.87 ^a |

Una correlación de residuos de los órganos con la masa corporal demostró las siguientes asociaciones significativas: intestino delgado con hígado, estómago, pulmón, intestino grueso y largo del intestino delgado; hígado con riñón; estómago con intestino grueso; riñón con páncreas e intestino grueso. (ver tabla 2 para estadística). El análisis de regresión múltiple paso a paso (*forward stepwise*) entre los residuos de TMB y los residuos de la masa de órganos reveló que un 22 % de la varianza en TMB es explicada por la masa del intestino delgado (r^2 ajustado =0,22 $F_{(5,30)}=5,41$ $p=0,009$).

Tabla 3.2. Matriz de correlación de los residuos de la masa de los órganos de individuos adultos de *Phyllotis darwini* que crecieron en diferentes tratamientos experimentales. Las correlaciones significativas son mostradas en negrita (*P<0,05, **P<0,01).

| | Hígado | Riñón | Estómago | Páncreas | Pulmón | ID | IG | LID | LIG |
|----------|--------|---------------|----------|--------------|--------|---------------|---------------|-------------------|---------------|
| Corazón | 0.11 | 0.24 | 0.24 | -0.08 | 0.03 | 0.48** | 0.15 | 0.24 | 0.33 |
| Hígado | | 0.45** | 0.16 | 0.07 | 0.16 | 0.39* | 0.17 | 0.12 | 0.21 |
| Riñón | | | 0.26 | 0.36* | 0.09 | 0.30 | 0.49** | 0.33 ^M | 0.24 |
| Estómago | | | | 0.22 | 0.31 | 0.43* | 0.47** | 0.13 | 0.21 |
| Páncreas | | | | | -0.06 | 0.04 | 0.13 | 0.33 ^M | 0.29 |
| Pulmón | | | | | | 0.38* | 0.21 | 0.28 | 0.26 |
| ID | | | | | | | 0.49** | 0.37* | 0.19 |
| IG | | | | | | | | 0.07 | 0.22 |
| LID | | | | | | | | | 0.61** |

Actividad oxidativa: Citrato sintasa y Citocromo c Oxidasa

Las enzimas mitocondriales *Citrato sintasa* y *Citocromo c oxidasa* se asociaron significativamente con la masa corporal (CS, $r^2=0,18$ $F_{(1,93)} =20,17$ $p<0,0001$; COX, $r^2=0,17$ $F_{(1,103)} =20,37$ $p<0,0001$; Figura 3.5). Las comparaciones entre tratamientos experimentales, revelaron que la actividad enzimática total de CS y COX en el hígado, no presentó diferencias significativas (CS, $F_{(3,23)} =2,49$ $p=0,08$ y COX $F_{(3,22)} =2,4$ $p=0,09$) y tampoco se encontró diferencias entre sexos (CS, $F_{(1,23)} =0,28$ $p=0,6$ y COX $F_{(1,22)} =0,84$ $p=0,36$) ni en la interacción de los factores (CS, $F_{(3,23)} =2,49$ $p=0,08$ y COX $F_{(3,22)} =2,4$ $p=0,09$; Tabla 3.3).

La actividad enzimática específica de la COX presentó variaciones entre grupos experimentales ($F_{(3,23)} =11,23$ $p<0,001$), mostrando una significativa disminución en *Phyllotis darwini* desarrollados a bajas temperatura (ver detalle en Tabla 3.3), la actividad específica de CS no varió entre los tratamientos experimentales ($F_{(3,22)} =1,88$ $p<0,16$), entre sexos (COX $F_{(1,23)} =0,50$ $p=0,48$ y CS, $F_{(1,22)} =0,02$ $p=0,87$) ni de la interacción de los factores (COX $F_{(1,23)} =0,08$ $p=0,96$ y CS, $F_{(1,22)} =0,70$ $p=0,55$).

La actividad enzimática por gramo de proteína, varió significativamente entre tratamientos de aclimatación, individuos que se desarrollaron a 15°C-RH incrementaron significativamente la actividad de COX y CS, además se observó un incremento en la actividad de COX en quienes se desarrollaron a 30°C-RH (COX $F_{(3,23)} =14,61$, $p<0,0001$ y CS, $F_{(3,22)} =17,49$ $p<0,0001$). No se encontró efecto del sexo (COX $F_{(1,23)} =0,57$ $p=0,46$ y CS, $F_{(1,22)} =0,72$ $p=0,40$) ni de la interacción de los factores (COX $F_{(3,23)} =2,08$, $p=0,13$ y CS $F_{(3,22)} =1,95$ $p=0,14$).

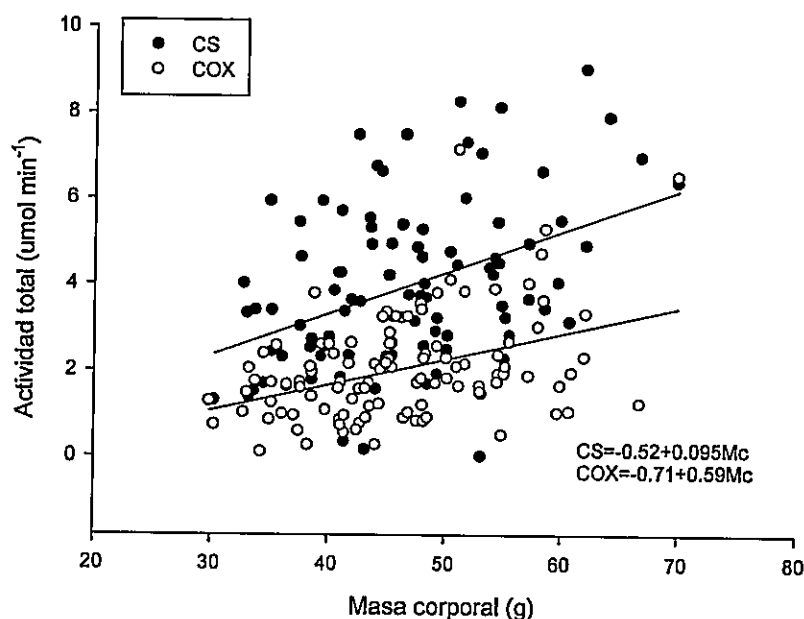


Figura 3.5. Actividad enzimática de Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en función de la masa corporal de *Phyllotis darwini*

Tabla 3.3. Actividad de las enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de *Phyllotis darwini* de cuatro tratamientos experimentales durante el desarrollo. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios \pm EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | 30°C AL | 30°C RH | 15°C AL | 15°C RH |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| COX | | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 1.21 \pm 0.15 ^{a,c} (9) | 1.68 \pm 0.12 ^a (8) | 0.68 \pm 0.08 ^b (8) | 0.89 \pm 0.11 ^{b,c} (7) |
| Act.total (U) | 2.06 \pm 0.28 ^a (9) | 2.21 \pm 0.22 ^a (8) | 1.30 \pm 0.22 ^a (6) | 1.37 \pm 0.21 ^a (7) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 3.95 \pm 0.4 ^a (9) | 12.4 \pm 1.45 ^b (8) | 2.03 \pm 0.2 ^a (8) | 8.46 \pm 1.85 ^b (7) |
| CS | | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 2.8 \pm 0.27 ^a (9) | 2.03 \pm 0.37 ^a (9) | 3.1 \pm 0.18 ^a (7) | 2.23 \pm 0.13 ^a (7) |
| Act.total (U) | 4.16 \pm 0.57 ^a (9) | 2.65 \pm 0.46 ^a (9) | 5.38 \pm 0.55 ^a (7) | 3.71 \pm 0.43 ^a (7) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 9.7 \pm 1.43 ^a (9) | 13.65 \pm 1.11 ^a (9) | 9.48 \pm 0.63 ^a (7) | 22.3 \pm 3.59 ^b (7) |

Estructura y Función renal: Grosor medular relativo (GMR) y Capacidad máxima de concentración de la orina (Umax)

El grosor medular relativo mostró un escalamiento negativo con la masa corporal (GMR= $1,53-0,013Mc$, $r^2=0,45$ $F_{(1,31)}=25,55$ $p<0,0001$; Figura 3.6). Además, se encontró un efecto significativo del tratamiento durante el desarrollo sobre en el GMR ($F_{(3,25)}=8,07$ $p<0,001$). La prueba de Tukey reveló que animales que se desarrollaron a 15°C agua *Ad libitum* tienen un GMR significativamente menor (Figura 3.7). No se encontró un efecto del sexo ($F_{(1,25)}=0,0005$ $p=0,08$) ni de la interacción del tratamiento-sexo ($F_{(3,25)}=0,61$ $p=0,61$) sobre el GMR. Finalizado el periodo de 24 horas de privación de agua, la capacidad máxima de concentración de la orina (*Umax*), presentó variaciones significativas entre tratamientos experimentales ($F_{(3,87)}=4,49$ $p=0,005$), mostrando valores significativamente menores en roedores que se desarrollaron en el tratamiento de 15°C-AL (véase Figura 3.8).

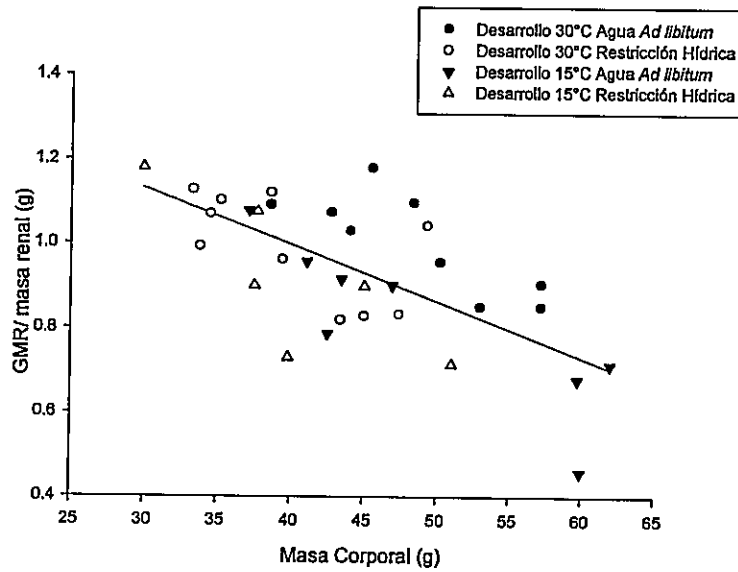


Figura 3.6. Asociación entre el grosor medular relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón y la masa corporal de *Phyllotis darwini* finalizados los tratamientos experimentales durante el desarrollo.

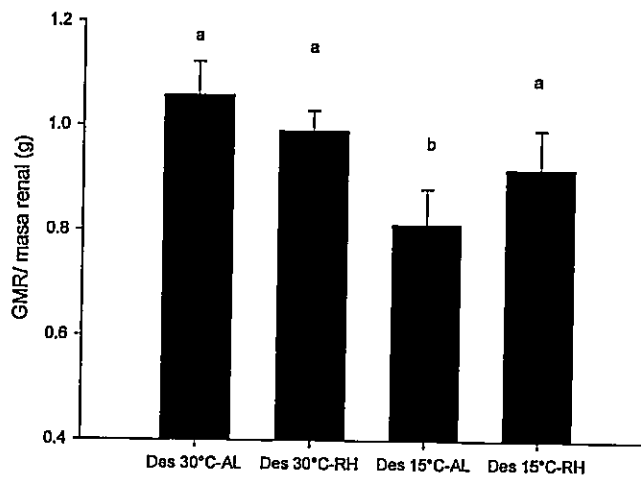


Figura 3.7. Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

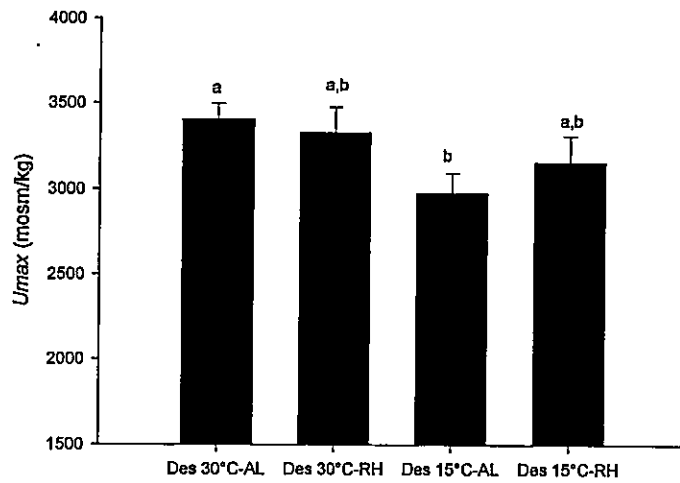


Figura 3.8. Máxima capacidad de concentración de la orina de *Phyllotis darwini* finalizado el desarrollo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Asociación entre flexibilidad fenotípica y experiencia térmica e hídrica

I. Desarrollo 15°C - agua *ad libitum*

Tasa Metabólica Basal y Pérdida total de agua evaporativa

Los individuos adultos provenientes del tratamiento desarrollo 15°C-agua *Ad libitum* (15°C-AL) fueron separados en dos grupos experimentales: 30°C *agua ad libitum* y 30°C restricción hídrica (30°C-AL y 30°C-RH respectivamente). En ambos grupos la TMB masa específica presentó un significativa disminución durante la primera semana de aclimatación, 33% (30°C-AL: $F_{(5,35)}=11,53$ $p<0,0001$; 30°C-RH: $F_{(5,40)}=9,69$ $p<0,0001$, Figura 3.9). No se encontró efecto del sexo (30°C-AL: $F_{(1,8)}=4,47$ $p=0,07$; 30°C-RH: $F_{(1,7)}=0,02$ $p=0,88$), ni de la interacción de los factores sobre TMB (30°C-AL $F_{(5,40)}=0,81$ $p=0,54$, 30°C-RH : $F_{(5,35)}=6,11$ $p=0,0003$). La PTAE también disminuyó significativamente durante la primera semana de aclimatación (30°C-AL: $F_{(5,30)}=8,32$, $p<0,0001$ (-34%); 30°C-RH: $F_{(5,40)}=7,91$ $p<0,0001$ (-33%)). No se encontró variación entre sexos (30°C-AL $F_{(1,6)}=1,54$, $p<0,001$; 30°C-RH $F_{(1,8)}=4,42$ $p=0,06$), ni en la interacción tratamiento-sexo (30°C-AL $F_{(5,30)}=4,1$ $p=0,005$; 30°C-RH: $F_{(5,40)}=0,31$ $p=0,9$).

La masa corporal también presentó variaciones luego del tratamiento de aclimatación térmica, pero de manera opuesta. Los individuos del tratamiento 30°C-AL experimentaron un incremento significativo en la masa corporal ($F_{(5,40)}=3,93$ $p=0,002$). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que la masa corporal incremento un 9% cuando finalizó la tercera semana de aclimatación. Sin embargo roedores que terminaron el tratamiento 30°C-RH disminuyeron significativamente la masa corporal ($F_{(5,40)}=4,82$

p=0,001). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que la masa corporal disminuyó un 12% la primera semana de aclimatación.

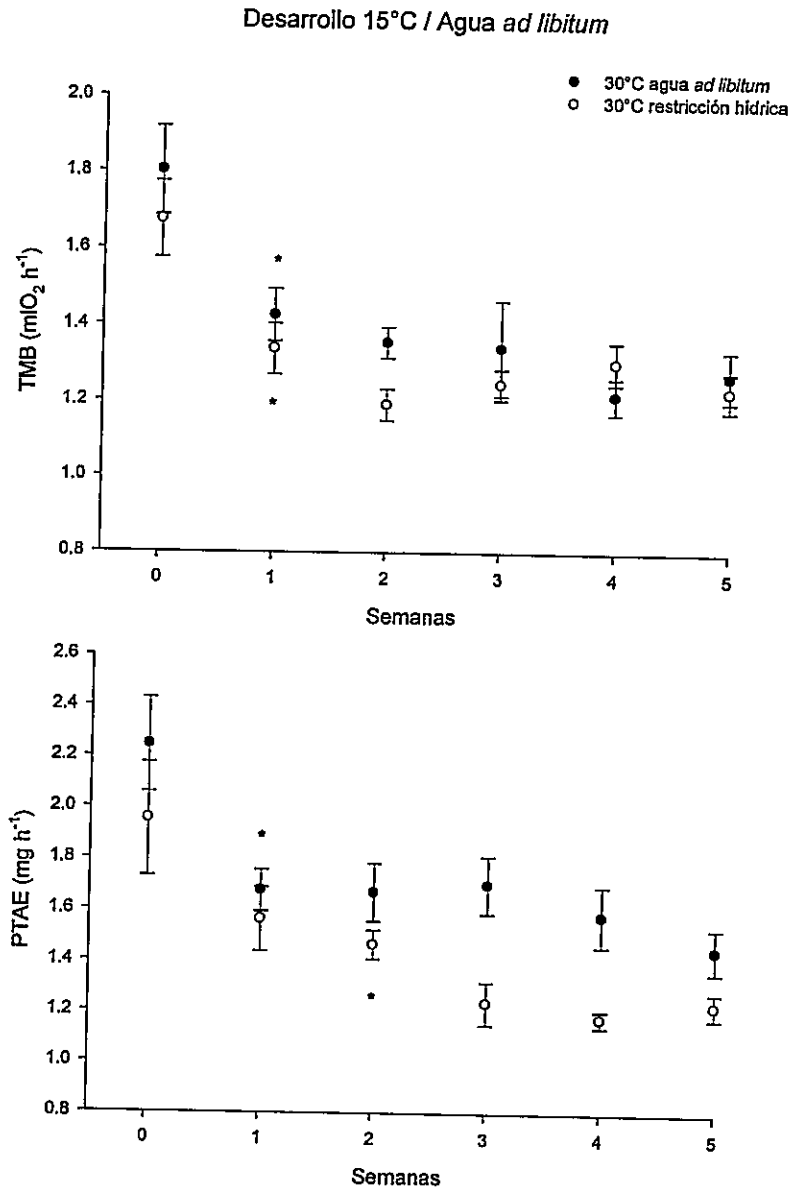


Figura 3.9. TMB y PTAE de *Phyllotis darwini* mantenidos en una condición experimental 15°C/agua *ad libitum* desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 30°C/ agua *ad libitum* (en círculos cerrados) y 30°C/ restricción hídrica (círculos abiertos) durante 5 semanas. Los asteriscos indican la semana donde se produce el cambio de metabolismo y /o pérdida de agua.

Masa de órganos

La masa del hígado, del corazón, del páncreas, del pulmón y del intestino grueso no varió significativamente entre los tratamientos experimentales (hígado: $F_{2,33} = 2,26$ $p = 0,11$; corazón: $F_{2,33} = 0,6$ $p = 0,55$; riñón: $F_{2,33} = 0,03$ $p = 0,97$; páncreas: $F_{2,33} = 0,34$ $p = 0,71$; pulmón: $F_{2,33} = 1,74$ $p = 0,19$; intestino grueso: $F_{2,33} = 1,64$ $p = 0,21$). Sin embargo, la masa del estómago y del intestino delgado variaron significativamente entre tratamientos experimentales (estómago: $F_{2,33} = 10,19$ $p < 0,001$; intestino delgado: $F_{2,33} = 13,9$ $p < 0,0001$). El largo del intestino delgado y del intestino grueso también variaron significativamente entre los tratamientos experimentales (intestino delgado: $F_{2,33} = 6,1$ $p < 0,01$; intestino grueso $F_{2,33} = 12,38$ $p < 0,0001$; Tabla 3.4). Sólo la masa del riñón presentó variaciones significativas entre sexos ($F_{1,33} = 6,09$ $p = 0,02$), promediando en machos $0,58 \pm 0,02$ g y en hembras $0,46 \pm 0,01$ g.

Tabla 3.4 Masa (g) de los órganos en *Phyllotis darwini*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como promedios \pm EE.

| Órgano | Des 15°C-AL | Aclimatación 30°C-AL | Aclimatación 30°C-RH |
|------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Corazón | 0.21 \pm 0.01 ^a (8) | 0.26 \pm 0.03 ^a (10) | 0.20 \pm 0.01 ^a (22) |
| Páncreas | 0.04 \pm 0.00 ^a (8) | 0.06 \pm 0.00 ^a (10) | 0.04 \pm 0.00 ^a (22) |
| Riñón | 0.51 \pm 0.03 ^a (8) | 0.55 \pm 0.03 ^a (10) | 0.49 \pm 0.02 ^a (22) |
| Hígado | 1.71 \pm 0.13 ^a (8) | 1.88 \pm 0.07 ^a (10) | 1.74 \pm 0.07 ^a (22) |
| Estómago | 0.81 \pm 0.05 ^a (8) | 0.70 \pm 0.04 ^b (10) | 0.71 \pm 0.02 ^b (22) |
| Pulmón | 0.24 \pm 0.01 ^a (8) | 0.29 \pm 0.01 ^a (10) | 0.24 \pm 0.00 ^a (22) |
| Intestino delgado (g) | 1.29 \pm 0.06 ^a (8) | 1.21 \pm 0.03 ^a (10) | 0.95 \pm 0.02 ^b (22) |
| Intestino grueso (g) | 0.5 \pm 0.03 ^a (8) | 0.53 \pm 0.02 ^a (9) | 0.44 \pm 0.01 ^a (22) |
| Intestino delgado (mm) | 34.2 \pm 1.1 ^a (8) | 32.0 \pm 1.6 ^{a,b} (10) | 36.1 \pm 0.9 ^{a,c} (22) |
| Intestino grueso (mm) | 18.2 \pm 0.7 ^a (8) | 17.6 \pm 0.7 ^a (10) | 20.1 \pm 0.5 ^b (22) |

Actividad oxidativa: Citrato sintasa y Citocromo c oxidasa

La actividad total de COX no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,20)}=0,58$ $p=0,56$), entre sexos ($F_{(1,20)}=0,18$ $p=0,67$), ni en la interacción ($F_{(2,20)}=0,42$ $p=0,66$; Tabla 3.5). Sin embargo, la actividad enzimática total de la CS varió significativamente entre los tratamientos ($F_{(2,16)}=3,59$ $p=0,04$). El test de comparaciones múltiples mostró una disminución luego de la aclimatación a 15°C-RH (Tukey $p<0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre sexos ni en la interacción de los factores ($F_{(1,16)}=1,57$ $p=0,22$ y $F_{(2,16)}=1,17$ $p=0,33$ respectivamente).

La actividad específica de ambas enzimas fue diferente entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo (CS $F_{(2,17)}=7,35$ $p=0,005$ y COX $F_{(2,23)}=5,86$ $p=0,008$), específicamente, la COX incrementó la actividad en el tratamiento 30°C-AL y la COX en individuos del tratamiento 30°C-RH. No se encontró efecto del sexo (CS $F_{(1,17)}=0,49$ $p=0,48$ y COX $F_{(1,23)}=0,02$ $p=0,87$), ni de la interacción de los factores (CS $F_{(2,17)}=2,32$ $p=0,12$ y COX $F_{(2,23)}=0,01$ $p=0,98$).

La actividad estandarizada por gramo de proteína también presentó diferencias significativas entre los tratamientos (CS $F_{(2,18)}=9,91$ $p=0,001$ y COX $F_{(2,22)}=13,54$ $p<0,0001$), COX incrementó su actividad en ambos tratamientos (30°C-AL y 30°C-RH), la CS sólo en individuos aclimatados a 30°C-RH. Además, sólo la actividad de CS varió entre sexos ($F_{(1,18)}=7,79$ $p=0,01$) y con la interacción sexo-tratamiento (CS $F_{(2,18)}=4,53$ $p=0,025$); esto último debido a un incremento significativo de la actividad en machos del tratamiento de aclimatación 15°C-RH (Tukey, $p<0,05$). No se encontró efecto del sexo ni de la interacción en la actividad de la COX (sexo: $F_{(1,22)}=0,58$ $p=0,45$; interacción: $F_{(3,22)}=0,44$ $p=0,64$).

Tabla 3.5. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de de *Phyllotis darwini* desarrollados 15°C/agua ad libitum y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios ± EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | Desarrollo 15°C AL | Aclimatación 30°C AL | Aclimatación 30°C RH |
|--|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| COX | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 0.68±0.08 ^a (8) | 1.69±0.29 ^b (10) | 1.01±0.11 ^{a,b} (11) |
| Act.total (U) | 1.30±0.2 ^a (6) | 3.24±0.6 ^a (10) | 1.85±0.24 ^a (11) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 2.03±0.2 ^a (8) | 6.01±0.8 ^b (9) | 7.31±0.77 ^b (11) |
| CS | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 3.1±0.18 ^a (7) | 3.18±0.2 ^a (8) | 2.11±0.22 ^b (9) |
| Act.total (U) | 5.38±0.55 ^a (7) | 5.8±0.32 ^a (8) | 4.06±0.5 ^b (9) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 9.48±0.63 ^a (7) | 10.04±0.53 ^a (8) | 14.9±2.12 ^b (9) |

Estructura y Función renal: Grosor medular relativo (GMR) y Capacidad máxima de concentración de la orina (U_{max})

El grosor medular relativo no presentó diferencias significativas respecto de lo observado una vez finalizado el desarrollo ($F_{(2,33)}=2.51$ $p=0.09$), tampoco se evidenciaron diferencias entre sexos $F_{(1,33)}=0.72$ $p=0.4$ ni en la interacción de los factores $F_{(2,33)}=0.21$ $p=0.8$. U_{max} no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y del desarrollo ($F_{(2,47)}=0.08$ $p=0.92$).

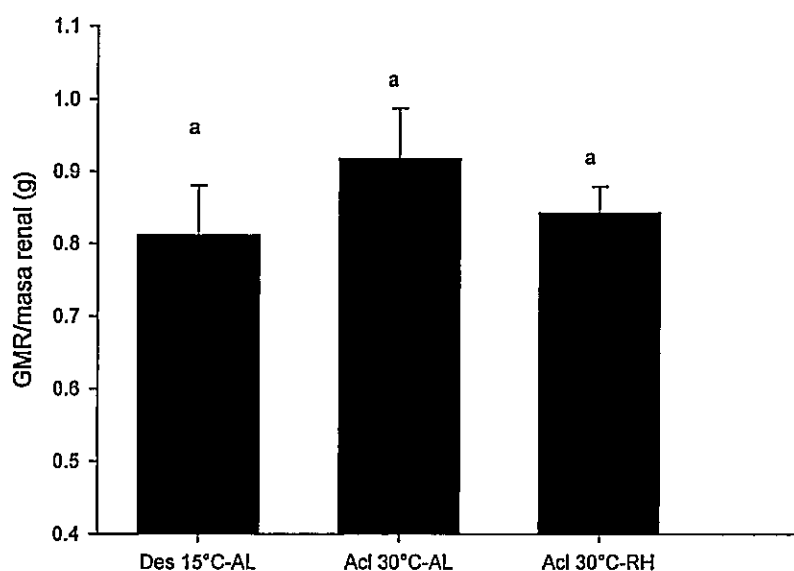


Figura 3.10. Grosor Medular Relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón desarrollados 15°C-agua *ad libitum* y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua *ad libitum* y 30°C restricción hídrica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

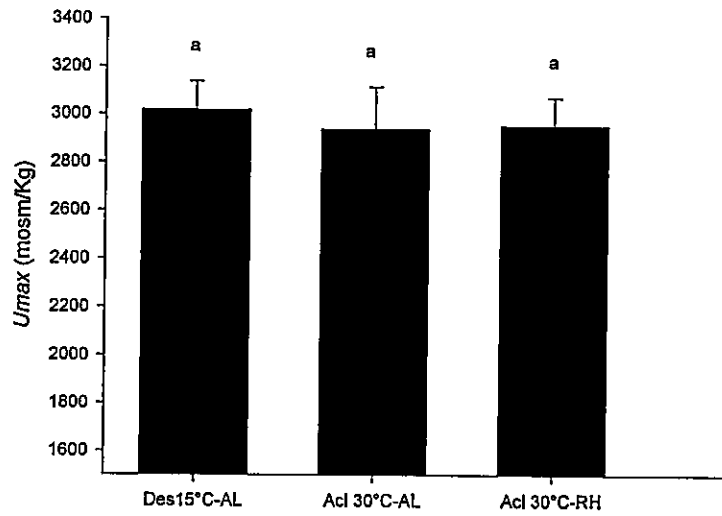


Figura 3.11. Osmolalidad de la orina (U_{max}) de *Phyllotis darwini* desarrollados 15°C-agua *ad libitum* y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua *ad libitum* y 30°C restricción hídrica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

II. Desarrollo a 15°C - restricción hídrica

Tasa Metabólica Basal y Pérdida total de agua evaporativa

Los individuos adultos provenientes del tratamiento desarrollo 15°C y *Agua* restricción hídrica fueron separados en dos grupos experimentales: 30°C *agua ad libitum* y 30°C restricción hídrica. La masa corporal de individuos aclimatados a 30°C-AL no presentó variaciones significativas durante el periodo de aclimatación ($F_{(5,30)}=1,56$ $p=0,2$, $N=8$), pero sí varió entre sexos ($F_{(1,6)}=1,67$ $p=0,23$) promediando en machos $52 \pm 1,9$ g y en hembras $42 \pm 1,5$ g. No se observó un efecto significativo de la interacción de los factores ($F_{(5,30)}=1,71$ $p=0,16$). La TMB y la PTAE, se mantuvieron invariantes durante el tiempo de aclimatación (TMB: $F_{(5,30)}=1,95$ $p=0,11$ y PTAE: $F_{(5,30)}=0,46$ $p=0,80$; Figura 3.12), entre sexos (TMB: $F_{(1,6)}=0,01$ $p=0,91$ y PTAE: $F_{(1,6)}=2,8$ $p=0,14$) y no existió un efecto significativo de la interacción de los factores (TMB: $F_{(5,30)}=0,19$ $p=0,96$ y PTAE: $F_{(5,30)}=1,27$ $p=0,29$). La Mc de los individuos aclimatados a 30°C-RH no presentaron variaciones significativas durante el periodo de aclimatación ($F_{(5,30)}=1,25$ $p=0,3$, $N=9$; Figura 3.12), como tampoco varió entre sexos ($F_{(1,7)}=1,67$ $p=0,23$), ni se observó un efecto de la interacción de los factores ($F_{(5,30)}=0,39$ $p=0,85$). Sin embargo la PTAE y la TMB varió significativamente durante la adultez (TMB: $F_{(5,35)}=10,54$ $p<0,0001$; PTAE: $F_{(5,30)}=3,35$ $p=0,01$) pero no se encontró variación entre sexos (TMB: $F_{(1,7)}=2,49$ $p=0,15$ y PTAE: $F_{(1,6)}=4,2$ $p=0,08$), ni en la interacción de los factores (TMB: $F_{(5,35)}=10,54$ $p=0,71$ y PTAE: $F_{(5,30)}=1,91$ $p=0,12$).

Desarrollo 15°C / Restricción hídrica

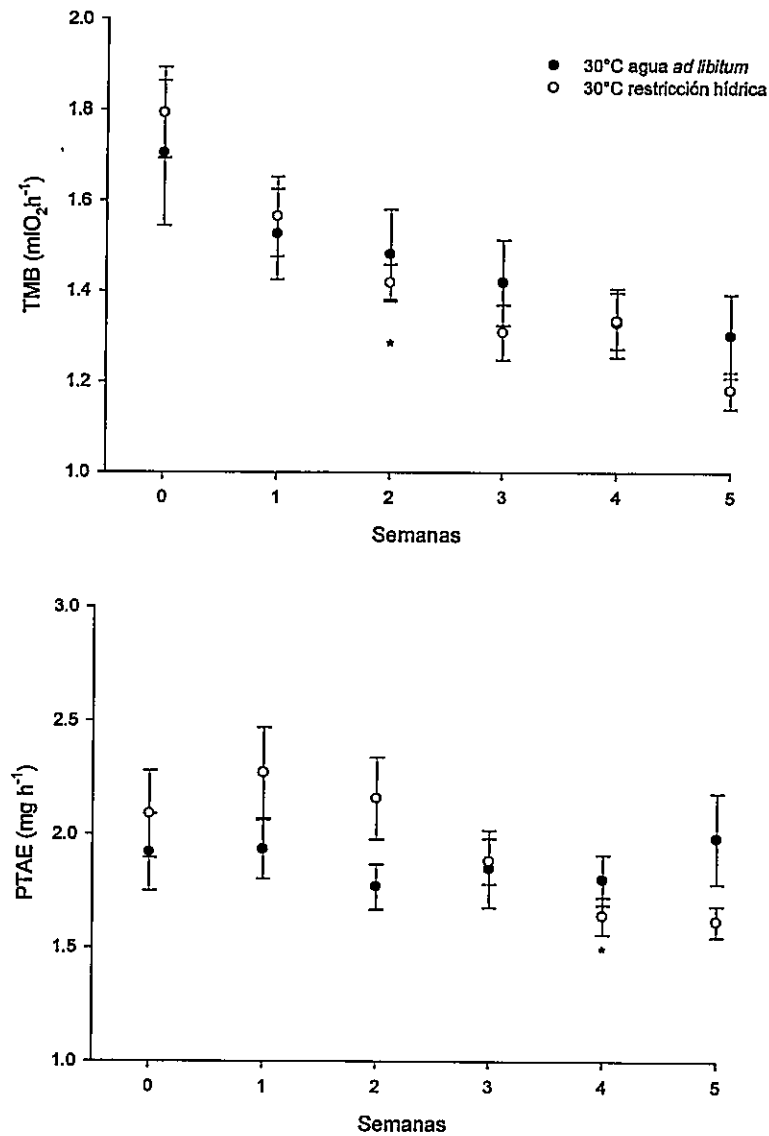


Figura 3.12. Tasa metabólica basal (TMB) y Pérdida total de agua evaporativa (PTAE) de *Phyllotis darwini* mantenidos en una condición experimental 15°C-restricción hídrica desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 30°C- agua *ad libitum* (en círculos cerrados) y 30°C/ restricción hídrica (círculos abiertos) durante 5 semanas. Los asteriscos indican La semana donde se produce el cambio de metabolismo y /o pérdida de agua. Solo los individuos re-aclimatados a 30°C/RH disminuyen la TMB (semana 2) y PTAE (semana 4).

Masa de órganos.

La masa del intestino delgado presentó variaciones entre tratamientos experimentales ($F_{(2,17)}=9,13$ $p=0,002$). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló que la masa del intestino luego del tratamiento de aclimatación 15°C - agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica fueron 20% y 14% menores que en el tratamiento de desarrollo a 15°C restricción hídrica. No se encontró efecto del tratamiento experimental sobre la masa húmeda del resto de los órganos (corazón: $F_{(2,17)}=0,82$ $p=0,45$; hígado: $F_{(2,17)}=2,16$ $p=0,14$; pulmón: $F_{(2,17)}=0,19$ $p=0,82$; páncreas : $F_{(2,17)}=1,04$ $p=0,37$; estómago: $F_{(2,17)}=3,7$ $p=0,05$; riñón : $F_{(2,17)}=2,21$ $p=0,14$; intestino grueso: $F_{(2,17)}=0,50$ $p=0,61$; largo del intestino delgado $F_{(2,17)}=0,79$ $p=0,46$ y largo del intestino grueso $F_{(2,17)}=1,63$ $p=0,22$; Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Masa de los órganos en *Phyllotis darwini*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como promedios \pm EE.

| Órgano | Des 15°C/RH | Aclimatación 30°C/AL | Aclimatación 30°C/RH |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Corazón | 0.21 \pm 0.01 ^a (7) | 0.20 \pm 0.03 ^a (8) | 0.21 \pm 0.01 ^a (9) |
| Páncreas | 0.04 \pm 0.00 ^a (7) | 0.13 \pm 0.09 ^a (8) | 0.04 \pm 0.00 ^a (9) |
| Riñón | 0.47 \pm 0.02 ^a (7) | 0.44 \pm 0.02 ^a (8) | 0.48 \pm 0.02 ^a (9) |
| Hígado | 1.61 \pm 0.13 ^a (7) | 1.76 \pm 0.07 ^a (8) | 1.64 \pm 0.07 ^a (9) |
| Estómago | 0.64 \pm 0.02 ^a (7) | 0.60 \pm 0.03 ^b (8) | 0.59 \pm 0.04 ^b (9) |
| Pulmón | 0.22 \pm 0.01 ^a (7) | 0.23 \pm 0.01 ^a (8) | 0.24 \pm 0.00 ^a (9) |
| Intestino delgado (g) | 1.34 \pm 0.04 ^a (7) | 1.11 \pm 0.05 ^b (8) | 1.17 \pm 0.03 ^b (9) |
| Intestino grueso (g) | 0.5 \pm 0.01 ^a (7) | 0.40 \pm 0.02 ^b (8) | 0.44 \pm 0.03 ^b (9) |
| Intestino delgado (mm) | 26.8 \pm 0.6 ^a (7) | 28.8 \pm 1.4 ^a (8) | 29.0 \pm 1.5 ^a (9) |
| Intestino grueso (mm) | 15.4 \pm 0.9 ^a (7) | 14.0 \pm 0.5 ^a (8) | 15.12 \pm 0.5 ^a (9) |

Actividad oxidativa: Citrato sintasa y Citocromo c oxidasa

La actividad total de CS y COX no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo (CS $F_{(2,16)}=1,64$ $p=0,22$ y COX $F_{(2,15)}=0,39$ $p=0,68$), entre sexos (CS $F_{(1,16)}=1,08$ $p=0,31$ y COX $F_{(1,15)}=0,14$ $p=0,71$), como en la interacción de los factores (CS $F_{(2,16)}=1,98$ $p=0,16$ y COX $F_{(2,15)}=0,004$ $p=0,99$).

La actividad específica tampoco varió entre tratamientos (CS $F_{(2,16)}=1,63$ $p=0,22$ y COX $F_{(2,15)}=0,32$ $p=0,73$), entre sexos (CS $F_{(1,16)}=0,58$, $p=0,45$ y COX $F_{(1,15)}=0,19$ $p=0,66$), ni en la interacción de los factores (CS $F_{(2,16)}=1,55$ $p=0,24$ y COX $F_{(2,15)}=0,01$ $p=0,98$).

Sólo se encontraron diferencias en la actividad enzimática de CS por gramo de proteína entre tratamientos. El test de Tukey ($p<0,05$) reveló un incremento significativo en ambos tratamientos de aclimatación en adultos (CS $F_{(2,16)}=11,13$, $p<0,001$ y COX $F_{(2,16)}=0,75$ $p=0,48$). No se encontró un efecto del sexo (CS $F_{(1,16)}=1,89$ $p=0,18$ y COX $F_{(1,16)}=0,22$ $p=0,64$), ni de la interacción de los factores (CS $F_{(2,16)}=1,64$, $p=0,22$ y COX $F_{(2,16)}=2,09$ $p=0,15$; Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de *Phyllotis darwini* desarrollados 15°C/restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios \pm EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | Desarrollo 15°C RH | Aclimatación 30°C AL | Aclimatación 30°C RH |
|--|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| COX | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 0.89 \pm 0.11 ^a (7) | 1.05 \pm 0.2 ^a (8) | 1.08 \pm 0.27 ^a (7) |
| Act.total (U) | 1.30 \pm 0.2 ^a (7) | 3.24 \pm 0.6 ^a (8) | 1.85 \pm 0.24 ^a (7) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 8.46 \pm 1.85 ^a (7) | 6.39 \pm 2.04 ^a (8) | 7.56 \pm 1.33 ^a (7) |
| CS | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 2.23 \pm 0.13 ^a (7) | 1.32 \pm 0.24 ^a (8) | 1.55 \pm 0.34 ^a (8) |
| Act.total (U) | 3.71 \pm 0.43 ^a (7) | 2.45 \pm 0.86 ^a (8) | 2.39 \pm 0.5 ^a (8) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 22.3 \pm 3.59 ^a (7) | 6.22 \pm 1.38 ^b (8) | 14.67 \pm 2.75 ^{a,b} (9) |

Estructura y función renal: Grosor medular relativo (GMR) y capacidad máxima de concentración de la orina (Umax)

El grosor medular relativo no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,16)}=2,02$ $p=0,16$; Figura 3.13), tampoco se evidenciaron diferencias entre sexos ($F_{(1,16)}=1,07$ $p=0,2$), ni de la interacción de los factores ($F_{(2,16)}=0,8$ $p=0,46$). *Umax* presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,27)}=4,46$ $p=0,02$; Figura 3.14). El test de comparaciones múltiples reveló un incremento de un 27% finalizado el tratamiento 15°C restricción hídrica (Tukey, $p<0,05$).

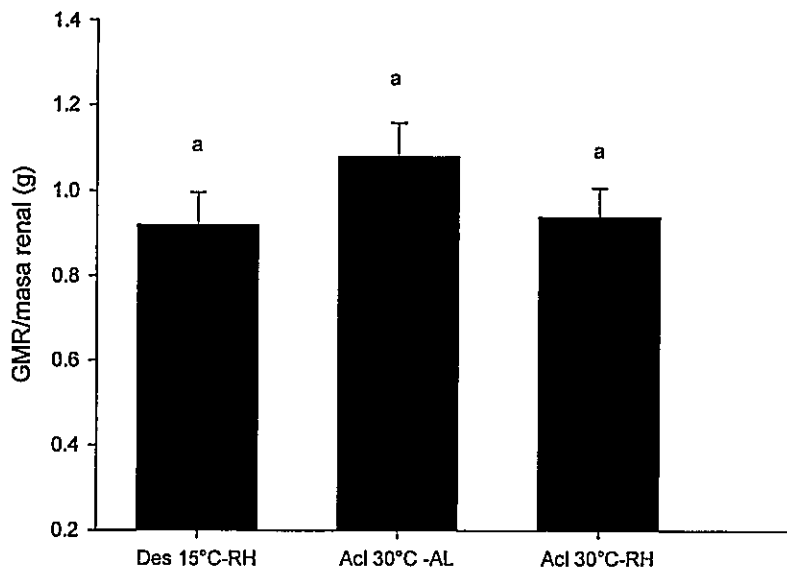


Figura 3.13. Grosor medular relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (15°C / restricción hídrica) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

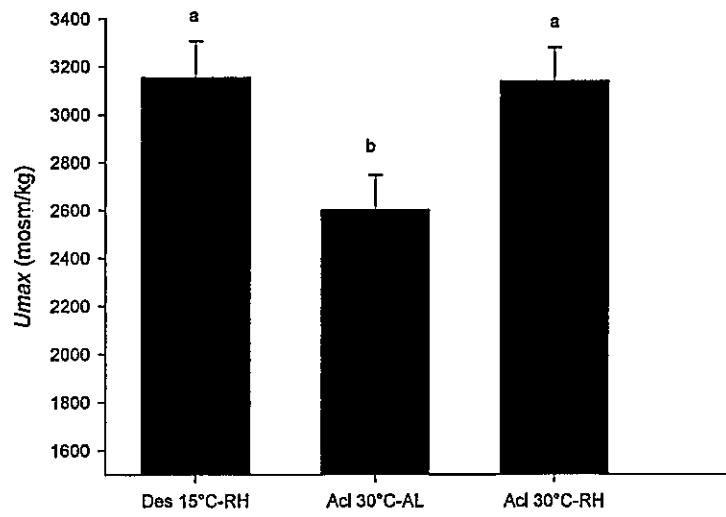


Figura 3.14. Osmolalidad de la orina (U_{max}) de *Phyllotis darwini* desarrollados 15°C/restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

III. Desarrollo a 30°C - agua *ad libitum*

Tasa Metabólica Basal y Pérdida total de agua evaporativa

Los individuos adultos provenientes del tratamiento desarrollo 30°C-agua *ad libitum* fueron separados en dos grupos experimentales: 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica. En ambos tratamientos la Mc no presentó variaciones significativas durante el periodo de aclimatación (15°C-AL: $F_{(5,40)}=0,44$ $p=0,81$; 15°C-RH: $F_{(5,30)}=1,39$ $p=0,25$; Figura 3.15). Sin embargo, el grupo aclimatado a 15°AL mostró significativas diferencias entre sexos promediando en machos $55\pm 1,6$ g y en hembras $45\pm 1,6$ g ($F_{(1,8)}=22,09$ $p=0,001$). El grupo aclimatado a 15°C-RH no experimentó variación significativa en la masa corporal ($F_{(1,6)}=1,88$ $p=0,21$) y no se encontraron variaciones producto de la interacción de los factores (15°C-AL: $F_{(5,40)}=0,48$ $p=0,79$; 15°C-RH: $F_{(5,30)}=0,73$ $p=0,6$). Tampoco se encontró efecto de la semana de aclimatación sobre TMB (15°C-AL : $F_{(5,40)}=0,98$ $p=0,44$; 15°C-RH: $F_{(5,30)}=1,21$ $p=0,32$), del sexo ni de la interacción de los factores en TMB (15°C-AL: sexo, $F_{(1,8)}=2,5$ $p=0,15$, interacción $F_{(5,40)}=0,61$ $p=0,69$; 15°C-RH: sexo $F_{(1,6)}=0,24$ $p=0,6$, interacción $F_{(5,30)}=1,62$ $p=0,18$). La PTAE no varió entre tratamientos de aclimatación (15°C-AL: $F_{(5,35)}=2,07$, $p=0,09$; 15°C-RH, $F_{(5,30)}=1,88$ $p=0,12$), sin embargo, la PTAE de *Phyllotis* aclimatados a 15°C-AL, varió significativamente entre sexos, mostrando un incremento de 15% en hembras (15°C-AL $F_{(1,7)}=7,05$ $p=0,03$; 15°C-RH: $F_{(1,6)}=0,004$ $p=0,95$). No se encontró efecto de la interacción de los factores (15°C-AL: $F_{(5,35)}=0,33$ $p=0,89$; 15°C-RH: $F_{(5,30)}=1,42$ $p=0,24$).

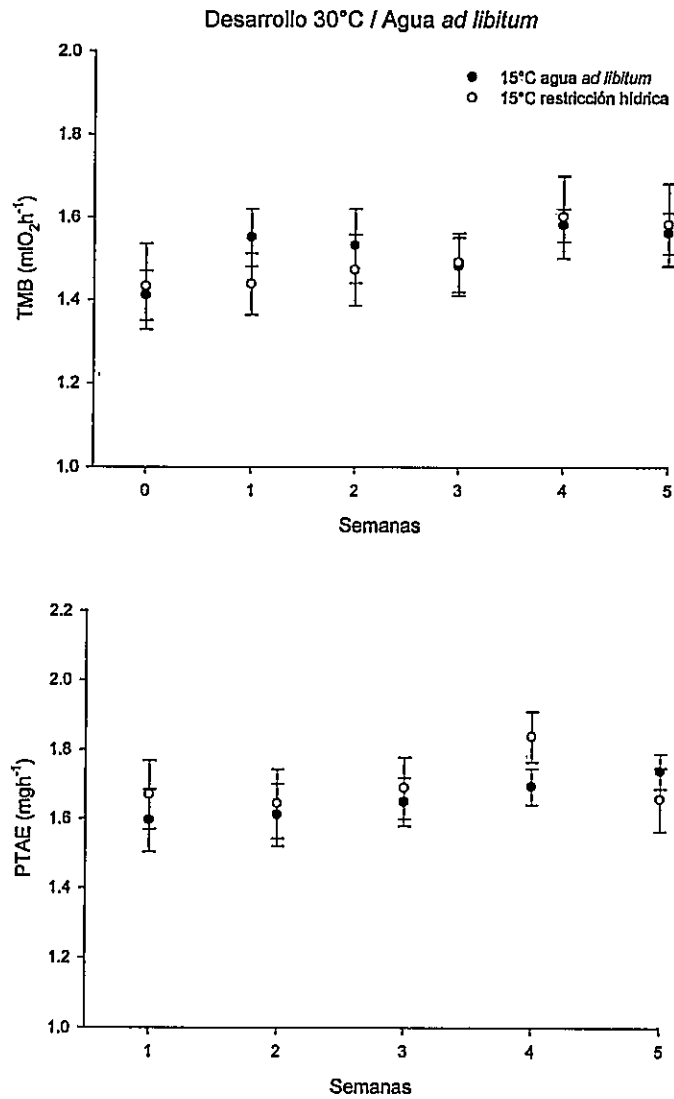


Figura 3.15. Tasa metabólica basal (TMB) y Pérdida total de agua evaporativa (PTAE) de *Phyllotis darwini* mantenidos en una condición experimental 30°C-*agua ad libitum* desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 15°C-*agua ad libitum* (en círculos cerrados) y 15°C-restricción hídrica (círculos abiertos) durante 5 semanas. Ningún grupo experimental experimentó cambios en TMB o PTAE durante la re-aclimatación térmica e hídrica.

Masa de órganos

La masa del riñón, del pulmón, del intestino delgado y el largo del intestino delgado varió significativamente entre los tratamientos experimentales (riñón: $F_{2,20} = 24,66$ $p < 0,0001$; pulmón: $F_{2,20} = 4,19$ $p = 0,03$; intestino delgado: $F_{2,20} = 7,53$, $p = 0,003$; largo de intestino delgado $F_{2,20} = 7,15$, $p = 0,004$; Tabla 3.8). Sin embargo la masa del corazón, del hígado, páncreas, estómago, del intestino grueso y el largo del intestino grueso no se diferenciaron significativamente entre los tratamientos experimentales (corazón: $F_{2,19} = 0,81$ $p = 0,41$; hígado: $F_{2,19} = 2,36$ $p = 0,11$; páncreas: $F_{2,19} = 0,50$ $p = 0,61$; estómago: $F_{2,19} = 2,41$ $p = 0,11$; intestino grueso: $F_{2,19} = 1,27$ $p = 0,3$ y largo del intestino grueso: $F_{2,19} = 0,76$ $p = 0,47$). Véase Tabla 3.8 para comparaciones múltiples.

Sólo la masa del riñón presentó variaciones significativas entre sexos ($F_{1,20} = 11,92$, $p = 0,002$), promediando en machos $0,57 \pm 0,03$ g y en hembras $0,43 \pm 0,02$ g.

Tabla 3.8. Masa de los órganos en *Phyllotis darwini*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como promedios \pm EE.

| Organo | Des 30°C/AL | Aclimatación 15°C/AL | Aclimatación 15°C/RH |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Corazón | 0.20 \pm 0.01 ^a (10) | 0.24 \pm 0.01 ^a (9) | 0.19 \pm 0.01 ^a (7) |
| Páncreas | 0.05 \pm 0.00 ^a (10) | 0.05 \pm 0.030 ^a (8) | 0.06 \pm 0.00 ^a (8) |
| Riñón | 0.41 \pm 0.03 ^a (9) | 0.58 \pm 0.03 ^b (9) | 0.50 \pm 0.02 ^c (8) |
| Hígado | 1.64 \pm 0.13 ^a (9) | 1.97 \pm 0.09 ^a (9) | 1.63 \pm 0.07 ^a (8) |
| Estómago | 0.68 \pm 0.03 ^a (10) | 0.81 \pm 0.02 ^a (9) | 0.75 \pm 0.05 ^a (7) |
| Pulmón | 0.23 \pm 0.01 ^a (10) | 0.29 \pm 0.01 ^a (9) | 0.25 \pm 0.00 ^a (8) |
| Intestino delgado (g) | 1.13 \pm 0.04 ^a (10) | 1.49 \pm 0.04 ^b (9) | 1.21 \pm 0.07 ^a (8) |
| Intestino grueso (g) | 0.44 \pm 0.03 ^a (10) | 0.51 \pm 0.02 ^a (9) | 0.45 \pm 0.03 ^a (8) |
| Intestino delgado (mm) | 28.8 \pm 0.6 ^a (10) | 33.9 \pm 1.2 ^b (9) | 30.8 \pm 1.2 ^a (8) |
| Intestino grueso (mm) | 16.0 \pm 0.9 ^a (10) | 17.7 \pm 0.9 ^a (9) | 15.5 \pm 0.7 ^a (8) |

Actividad oxidativa: Citrato sintasa y Citocromo c Oxidasa

La actividad total de CS presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,16)}=4,16$ $p=0,02$; Tabla 3.9). Específicamente, presentó un incremento en el tratamiento de aclimatación 15°C- AL. La actividad total de COX no mostró cambios significativos entre los tratamientos ($F_{(2,16)}=2,27$, $p=0,13$), sin embargo, sólo esta última presentó variaciones entre los sexo (COX $F_{(1,16)}=11,13$, $p=0,004$; CS, $F_{(1,16)}=0,08$ $p=0,77$) y en la interacción de los factores (COX $F_{(2,16)}=3,7$ $p=0,05$; CS $F_{(2,16)}=2,28$, $p=0,13$). No se encontraron variaciones significativas en la actividad específica de CS y COX entre los tratamientos experimentales (CS $F_{(2,17)}=1,74$ $p=0,21$; COX $F_{(2,17)}=0,13$ $p=0,87$), entre sexos (CS $F_{(1,17)}=0,22$ $p=0,64$; COX $F_{(1,17)}=3,55$ $p=0,07$), ni de la interacción de los factores (CS $F_{(2,17)}=1,32$ $p=0,29$; COX, $F_{(2,17)}=1,97$ $p=0,16$).

La actividad por gramo de proteína varió significativamente en ambas enzimas entre tratamientos experimentales (CS $F_{(2,18)}=11,88$ $p<0,001$; COX $F_{(2,17)}=37,12$ $p<0,001$), mostrando un incremento significativo en *individuos* que finalizaron el tratamiento 15°C- restricción hídrica (Tukey $p<0,01$). No se observó un efecto significativo efecto del sexo (CS $F_{(1,18)}=2,36$ $p=0,14$; COX $F_{(1,17)}=1,58$ $p=0,22$) ni de la interacción de los factores (CS $F_{(2,18)}=1,67$ $p=0,21$); COX $F_{(2,17)}=1,04$ $p=0,91$).

Tabla 3.9. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C/agua ad libitum y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 15°C agua ad libitum y 15°C restricción hídrica. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios ± EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | Desarrollo 30°C AL | Aclimatación 15°C AL | Aclimatación 15°C RH |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| COX | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 1.21±0.15 ^a (9) | 1.11±0.43 ^a (6) | 1.27±0.10 ^a (8) |
| Act.total (U) | 2.06±0.28 ^a (9) | 2.25±0.98 ^a (6) | 2.09±0.24 ^a (8) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 3.95±0.4 ^a (9) | 3.45±1.33 ^a (6) | 11.59±0.93 ^b (8) |
| CS | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 2.8±0.27 ^a (9) | 3.43±0.21 ^a (7) | 2.58±0.30 ^a (8) |
| Act.total (U) | 4.16±0.57 ^a (9) | 7.33±0.45 ^b (7) | 4.22±0.47 ^a (8) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 9.7±1.43 ^a (9) | 10.6±0.76 ^a (7) | 23.68±2.8 ^b (8) |

Estructura y Función renal: Grosor medular relativo (GMR) y Capacidad máxima de concentración de la orina (Umax)

Como consecuencia de la aclimatación térmica e hídrica, el GMR presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,20)}=12,40$ $p<0,001$; Figura 3.16). La prueba de comparaciones múltiples reveló una disminución de un 43% y 23% finalizados los tratamientos 15°C agua ad libitum y 15°C restricción hídrica respectivamente (Tukey $p<0,01$). No se encontraron diferencias entre sexos $F_{(1,20)}=3,57$ $p=0,07$ ni en la interacción de los factores $F_{(2,20)}=0,78$ $p=0,48$. Por su parte, *Umax* presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,47)}=7,29$ $p=0,001$; Figura 3.17). El test de comparaciones múltiples reveló una disminución de un 22% finalizado el tratamiento 15°C agua *ad libitum* (Tukey $p<0,05$).

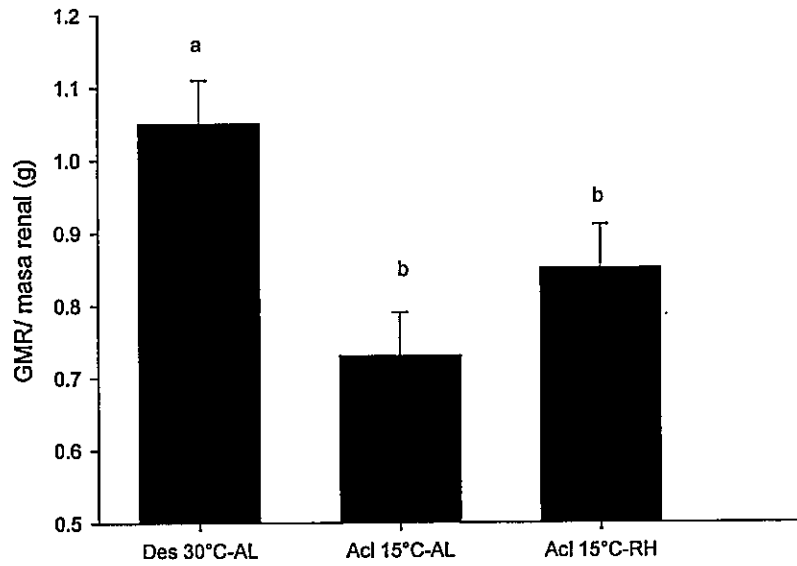


Figura 3.16. Grosor medular relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (30°C / agua ad libitum) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 15°C agua ad libitum y 15 °C restricción hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar. Las letras indican diferencias entre grupos después de la prueba de Tukey.

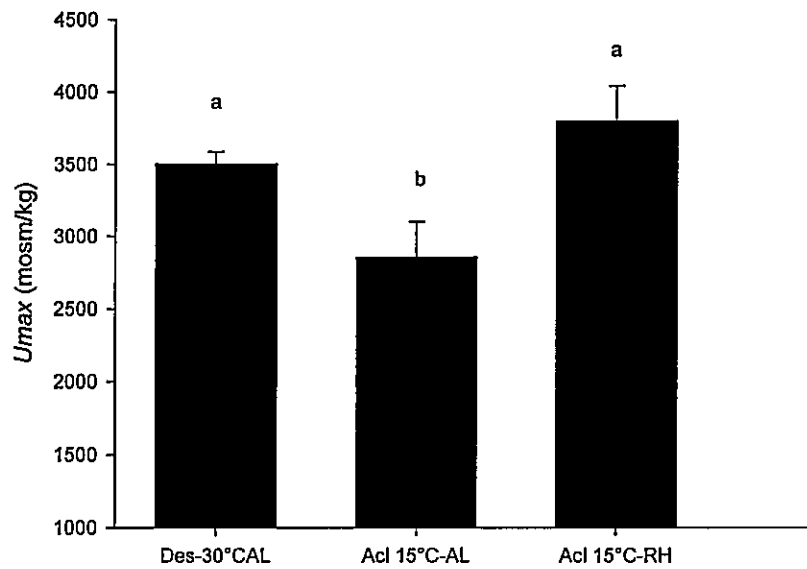


Figura 3.17. Osmolalidad de la orina (U_{max}) de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C/agua *ad libitum* y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

IV. Desarrollo 30°C - restricción hídrica

Masa Corporal, Tasa Metabólica Basal y Pérdida total de agua evaporativa

Los individuos adultos provenientes del tratamiento desarrollo 30°C - Restricción hídrica fueron separados en dos grupos experimentales: 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica. *Phyllotis darwini* aclimatados a 15°C-AL presentaron un significativo incremento (9%) de la masa corporal durante el periodo de aclimatación térmica e hídrica ($F_{(5,35)}=1,52$ $p=0,01$ $N=9$) y el test de comparaciones múltiples reveló que el incremento se produjo finalizada la primera semana de aclimatación ($p<0,05$). No se encontró efecto del sexo ($F_{(1,7)}=4,97$ $p=0,06$), ni de la interacción de los factores ($F_{(5,35)}=0,77$ $p=0,57$) sobre la masa corporal. La masa corporal del grupo aclimatado a 15°C-RH no fue afectado significativamente por el tratamiento de aclimatación ($F_{(5,30)}=1,25$ $p=0,3$ $N=10$), pero sí presentó diferencias entre sexos ($F_{(1,8)}=6,73$ $p=0,03$), promediando en machos $42,2\pm 1,7$ g y en hembras $38,1\pm 2,1$ g. No se encontró efecto de la interacción de los factores ($F_{(5,40)}=0,98$ $p=0,98$). La TMB de *Phyllotis darwini* aclimatados a 15°C-AL varió significativamente durante el tiempo de aclimatación ($F_{(5,35)}=9,5$ $p<0,0001$; Figura 3.18). El cambio metabólico se produjo durante la quinta semana de aclimatación (Tukey $p<0,05$). Además se encontró un efecto significativo del sexo sobre la TMB ($F_{(1,7)}=8,24$ $p=0,02$). La PTAE presentó variaciones significativas durante el periodo de aclimatación ($F_{(5,35)}=2,36$ $p=0,05$; Figura 3.18), pero no hubo un efecto del sexo ($F_{(1,7)}=1,8$ $p=0,22$), ni de la interacción de los factores ($F_{(5,35)}=0,36$ $p=0,87$). Al contrario, terminado el tratamiento 15°C-RH ni la TMB ni la PTAE presentaron variaciones significativas durante el tiempo de aclimatación (TMB: $F_{(5,40)}=0,32$ $p=0,89$ y PTAE: $F_{(5,40)}=1,86$ $p=0,12$), entre sexos (TMB: $F_{(1,8)}=0,71$

$p=0,41$ y $PTAE: F_{(1,8)}=3,2$ $p=0,1$), ni como efecto de la interacción de los factores ($TMB: F_{(5,40)}=0,97$ $p=0,44$ y $PTAE: F_{(5,40)}=1,35$ $p=0,26$).

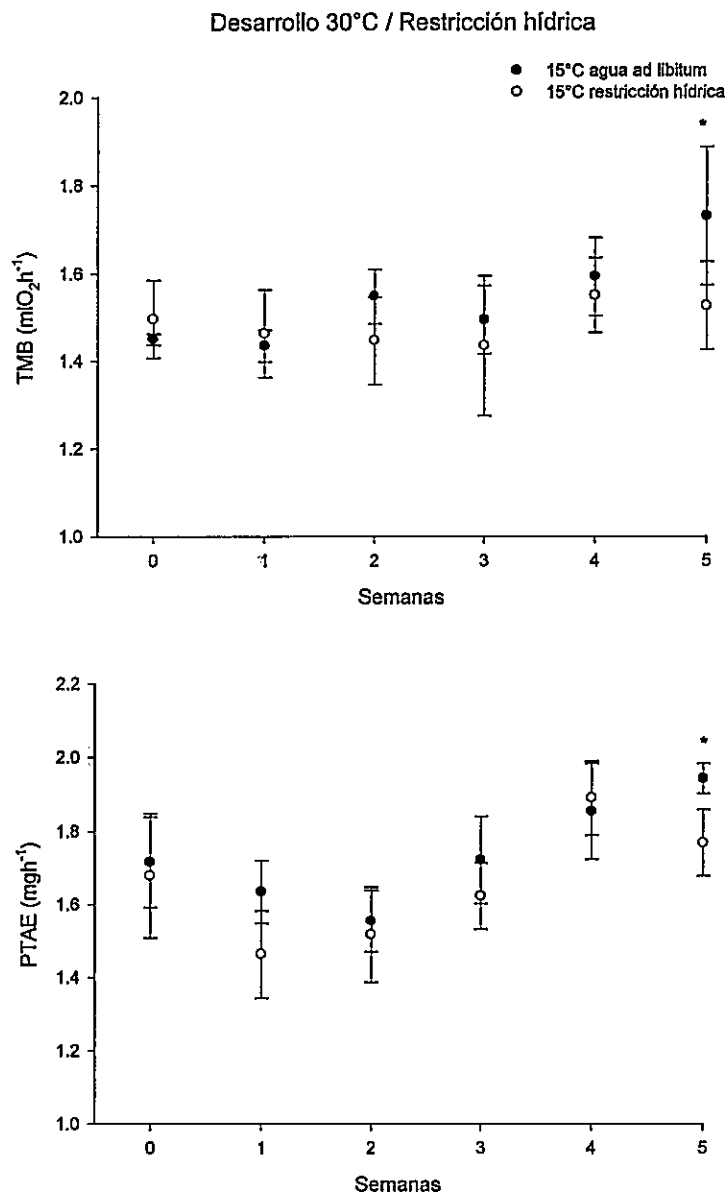


Figura 3.18. TMB y PTAE de *Phyllotis darwini* mantenidos en una condición experimental 30°C-restricción hídrica desde el destete a la adultez y re-aclimatados en la etapa adulta a los tratamientos 15°C-agua *ad libitum* (en círculos cerrados) y 15°C-restricción hídrica (círculos abiertos) durante 5 semanas. Sólo el grupo re-aclimatado a 15°C-AL cambió la TMB y PTAE durante la quinta semana.

Masa de órganos

La masa del hígado, del riñón, del pulmón, del intestino delgado, el largo del intestino delgado y del intestino grueso varió significativamente entre los tratamientos experimentales (hígado: $F_{2,31} = 7,39$ $p < 0,0001$; riñón: $F_{2,31} = 9,23$ $p < 0,001$; pulmón: $F_{2,31} = 3,41$ $p = 0,04$; intestino delgado: $F_{2,31} = 6,4$ $p = 0,004$; largo de intestino delgado $F_{2,31} = 7,71$, $p = 0,002$ y largo del intestino grueso $F_{2,31} = 3,96$ $p = 0,02$; Tabla 10). Sin embargo, la masa del corazón, del estómago, del páncreas y del intestino grueso no se diferenció significativamente entre los tratamientos experimentales (corazón: $F_{2,31} = 2,76$, $p = 0,07$; estómago: $F_{2,31} = 1,55$, $p = 0,23$; páncreas: $F_{2,31} = 1,01$ $p = 0,37$ intestino grueso y estómago: $F_{2,19} = 2,41$ $p = 0,11$). Véase Tabla 3.10 para comparaciones múltiples. Sólo la masa del riñón presentó variaciones significativas entre sexos ($F_{1,31} = 7,04$, $p = 0,012$), promediando en machos $0,56 \pm 0,02$ g y en hembras $0,45 \pm 0,01$ g.

Tabla 3.10. Masa de los órganos en *Phyllotis darwini*. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los valores se muestran como promedios \pm EE.

| Órgano | Des 30°C/RH | Aclimatación 15°C/AL | Aclimatación 15°C/RH |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Corazón | 0.18 ± 0.01^a (10) | 0.21 ± 0.01^a (13) | 0.20 ± 0.01^a (15) |
| Páncreas | 0.03 ± 0.00^a (10) | 0.05 ± 0.01^a (13) | 0.03 ± 0.00^a (15) |
| Riñón | 0.43 ± 0.021^a (10) | 0.56 ± 0.02^b (13) | 0.52 ± 0.02^b (15) |
| Hígado | 1.21 ± 0.11^a (10) | 1.95 ± 0.07^b (13) | 1.73 ± 0.08^b (15) |
| Estómago | 0.61 ± 0.01^a (10) | 0.73 ± 0.03^a (13) | 0.70 ± 0.03^a (15) |
| Pulmón | 0.18 ± 0.01^a (10) | 0.24 ± 0.071^b (13) | 0.23 ± 0.01^b (15) |
| Intestino delgado (g) | 0.84 ± 0.03^a (10) | 1.22 ± 0.05^b (13) | 1.12 ± 0.06^b (15) |
| Intestino grueso (g) | 0.41 ± 0.01^a (10) | 0.47 ± 0.02^b (13) | 0.49 ± 0.02^b (15) |
| Intestino delgado (mm) | 34.8 ± 0.8^a (10) | 30.4 ± 0.9^b (13) | 30.8 ± 0.9^b (15) |
| Intestino grueso (mm) | 19.4 ± 0.3^a (10) | 16.9 ± 0.5^b (13) | 18.6 ± 0.5^a (15) |

Actividad oxidativa: Citrato sintasa y Citocromo c Oxidasa

En ambas enzimas, la actividad total no presentó diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (CS $F_{(2,25)}=2,85$ $p=0,11$ y COX $F_{(2,26)}=0,95$ $p=0,39$), entre sexos (CS $F_{(1,25)}=0,06$ $p=0,81$ y COX $F_{(1,26)}=0,003$ $p=0,95$) y tampoco se observó un efecto significativo de la interacción de los factores (CS $F_{(2,25)}=0,08$ $p=0,91$ y COX $F_{(2,26)}=0,17$ $p=0,83$). Solamente, la actividad específica de COX presentó diferencias significativas entre los tratamientos (COX $F_{(2,26)}=4,52$ $p=0,02$ y CS $F_{(2,25)}=1,72$ $p=0,19$), mostrando un incremento a bajas temperatura (véase detalle en Tabla 3.11). Sin embargo, no se encontró un efecto del sexo (COX $F_{(1,26)}=0,08$, $p=0,77$ y CS $F_{(1,25)}=0,22$ $p=0,64$, ni tampoco de la interacción de los factores (COX $F_{(2,26)}=0,12$ $p=0,88$ y CS $F_{(2,25)}=0,22$ $p=0,79$). La actividad enzimática de CS estandarizada por gramo de proteína no presentó variaciones entre los tratamientos, (CS $F_{(2,28)}=1,71$, $p=0,20$ y COX $F_{(2,25)}=1,21$ $p=0,31$) y tampoco se encontró un efecto del sexo (CS $F_{(1,28)}=0,01$ $p=0,92$ y COX $F_{(1,25)}=0,03$ $p=0,86$), ni de la interacción de los factores (CS $F_{(2,28)}=0,02$ $p=0,97$ y COX $F_{(2,25)}=0,07$ $p=0,92$).

Tabla 3.11. Actividad de las Enzimas Citrato Sintasa y Citocromo c Oxidasa en muestras de hígado de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C-agua restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a las condiciones 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Entre paréntesis aparece el número de animales utilizado en cada medición. Los valores se muestran como promedios \pm EE. COX=Citocromo c Oxidasa, CS=Citrato Sintasa.

| | Desarrollo 30°C RH | Aclimatación 15°C AL | Aclimatación 15°C RH |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| COX | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 1.68 \pm 0.12 ^a (8) | 1.06 \pm 0.17 ^{a,b} (12) | 1.01 \pm 0.14 ^b (13) |
| Act.total (U) | 2.21 \pm 0.22 ^a (8) | 2.04 \pm 0.35 ^a (12) | 1.86 \pm 0.31 ^a (13) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 12.4 \pm 1.45 ^a (8) | 10.58 \pm 3.02 ^a (11) | 6.63 \pm 0.96 ^a (12) |
| CS | | | |
| umol min ⁻¹ gtejido ⁻¹ | 2.03 \pm 0.37 ^a (9) | 2.14 \pm 0.19 ^a (12) | 1.53 \pm 0.18 ^a (13) |
| Act.total (U) | 2.65 \pm 0.46 ^a (9) | 4.04 \pm 0.34 ^a (12) | 2.95 \pm 0.29 ^a (13) |
| umol min ⁻¹ gproteína ⁻¹ | 13.65 \pm 1.11 ^a (9) | 20.89 \pm 12.9 ^a (12) | 11.6 \pm 2.5 ^a (12) |

Estructura y función renal: Grosor medular relativo (GMR) y Capacidad máxima de concentración de la orina (U_{max})

El GMR presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,27)}=6,78$ $p=0,004$; Figura 3.19). El test de comparaciones múltiples reveló una disminución de un 35% y 25% finalizados los tratamientos 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica respectivamente (Tukey $p<0,001$). Además, se encontraron diferencias entre sexo ($F_{(1,27)}=3,57$ $p<0,001$) promediando los machos $0,71\pm 0,03$ y las hembras $0,96\pm 0,04$. No se encontró efecto de la interacción de los factores ($F_{(2,7)}=0,72$ $p=0,49$). *U_{max}* presentó diferencias significativas entre los tratamientos de aclimatación y el desarrollo ($F_{(2,47)}=7,29$ $p=0,001$; Figura 3.20). El test de comparaciones múltiples reveló una disminución de un 20% y 13% finalizados los tratamientos 15°C agua *ad libitum* y 15°C restricción hídrica respectivamente (Tukey $p<0,05$).

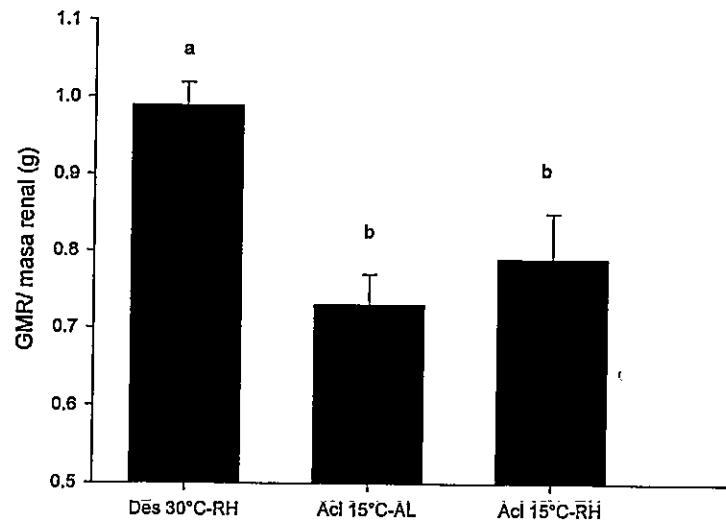


Figura 3.19. Grosor medular relativo (GMR) por unidad de gramo de riñón de *Phyllotis darwini* luego de los tratamientos experimentales durante el desarrollo (15°C - restricción hídrica) y una vez terminados los tratamientos de aclimatación a 30°C agua ad libitum y 30°C restricción hídrica. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

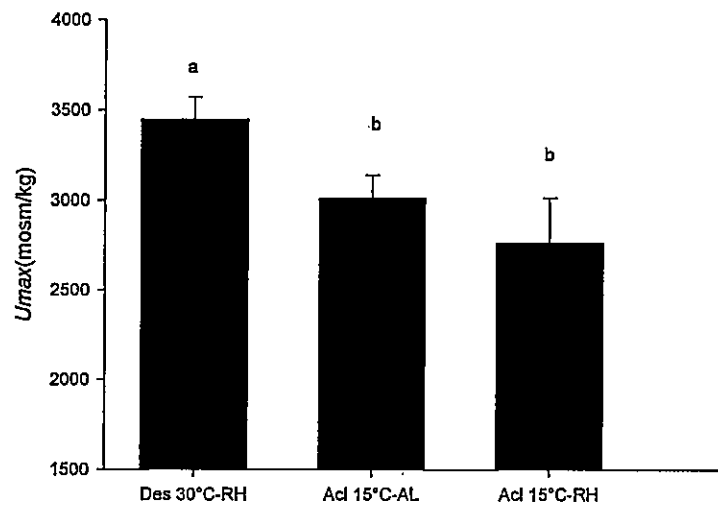


Figura 3.20. Osmolalidad de la orina (U_{max}) de *Phyllotis darwini* desarrollados 30°C-restricción hídrica y aclimatados durante 5 semanas a 15°C agua ad libitum y 15°C restricción hídrica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba de Tukey. Los datos se reportan como promedios \pm error estándar.

Discusión

En este capítulo se evaluó el efecto de las condiciones ambientales experimentadas durante el desarrollo sobre la variabilidad fisiológica en *Phyllotis darwini*, y el efecto de la experiencia ontogenética sobre flexibilidad fenotípica de rasgos relacionados con la fisiología energética y osmorregulatoria. Los resultados indican, que las características ambientales (térmicas e hídricas), modulan los rasgos fenotípicos en *Phyllotis darwini*. La magnitud y dirección de la plasticidad observada dependen del rasgo evaluado y de la ventana temporal en que la señal ambiental actúa, lo que concuerda con estudios previos (Sultan, 2007; Gilbert & Epel, 2009). Asimismo, se ha postulado que las bases mecánicas de la aclimatación térmica y /o hídrica difieren entre niveles de organización, las que incluyen modificaciones en estructuras morfológicas, como el tamaño de órganos (McDevitt & Speakman, 1994; Diaz et al., 2006), fisiológicas y bioquímica (Golozoubova et al., 2001; Nedergaard et al., 2001) y expresión de genes, entre otros (Jacobsson et al., 1994; Yu et al., 2002; Bozinovic., et al., 2003).

En este contexto, y en respuesta a la temperatura durante el desarrollo, *Phyllotis darwini* presentó modificaciones en diferentes niveles jerárquicos de organización. En efecto, los roedores desarrollados a 15°C presentaron un incremento de la tasa de gasto energético respecto de quienes se desarrollaron a 30°C (independientemente de la disponibilidad hídrica), también se observaron variaciones en el tamaño de órganos. En este sentido, las modificaciones en el tracto intestinal han sido asociadas con cambios en las demandas energéticas (Gross et. al., 1985). Diversos estudios indican que cuando las demandas termogénicas son elevadas, los endotermos responden incrementando en la

ingesta de alimento (ítem no evaluado en este estudio), y con modificaciones en el intestino y órganos relacionados con el procesamiento y absorción de nutrientes (Hammond & Janes, 1998). Este efecto se traduciría en incrementos en la TMB debido al incremento de tejidos con una alta actividad metabólica (Grosset al., 1985; Haim et al., 1990). Efectivamente, los resultados obtenidos, revelaron que un 22% de la variación en la TMB se explicarían por variaciones en la masa del intestino. Paralelamente, a nivel bioquímico, se encontraron diferencias entre los grupos experimentales, en donde la actividad específica y la actividad por gramo de proteína de la enzima mitocondrial *Citocromo c oxidasa* en el hígado presentó un incremento significativo en roedores aclimatados a 15°C. Este resultado es coincidente con estudios previos que han evaluado el papel adaptativo de enzimas del hígado en la termogénesis durante la aclimatación al frío (Wrutniak-Cabello et al., 2001; Zaninovich et al., 2003). Adicionalmente la actividad de COX por gramo de proteína, fue cuatro veces mayor en animales desarrollados en regímenes de restricción hídrica, lo que sugiere una mayor eficiencia en la actividad de esta enzima mitocondrial, además el incremento de la actividad, podría asociarse con la necesidad de producir agua metabólica, debido que producto de la actividad de COX se reduce una molécula de O₂, obteniéndose como producto dos moléculas de agua (Lehninger, 2005).

Por otro lado, se observó que animales aclimatados a 15°C-AL presentaron una masa renal significativamente mayor y un grosor medular relativo significativamente menor a quienes desarrollaron a 30°C (agua *ad libitum* y restricción hídrica). Debido a que este último índice es un indicador de la habilidad de concentrar orina (Al-Kahtani, et al., 2004) nuestros resultados son consistentes, con los análisis osmométricos que revelaron una menor capacidad de concentración de la orina en el grupo 15°C-AL. De esta manera, y

en este grupo particular, el tamaño renal estaría asociado con el incremento en las demandas termorregulatorias más que con la habilidad de conservar agua. Estos resultados, contrastan con lo encontrado en el grupo desarrollado a la misma temperatura pero con restricción hídrica, quienes presentaron valores de GMR tan altos como *Phyllotis* desarrollados a altas temperaturas, probablemente por la necesidad de disminuir la pérdida de agua en esas condiciones. Los roedores desarrollados a 30°C presentan una serie de ajustes fisiológicos respecto de quienes se desarrollaron bajas temperaturas, entre ellos, incremento en la capacidad de concentración de la orina, en el GMR, disminución en la TMB y PTAE, incremento en el largo del intestino grueso (en roedores aclimatados a 30°C-RH), modificaciones que responderían a la necesidad de reducir la producción endógena de calor y de pérdida de agua (evaporada y excretada) (McNab & Morrison, 1963; Dawson & Bennett, 1973; Gallardo et al., 2005; Bozinovic & Gallardo, 2006).

Los resultados sugieren, que frente a variaciones en el ambiente térmico e hídrico, experimentado durante el desarrollo, *Phyllotis darwini* respondería con modificaciones fenotípicas, presentando ajustes desde un nivel celular (a través de la actividad de enzimas metabólicas), en el tamaño de órganos (masa y largo total, GMR) y a nivel organismico (a través de modificaciones de la TMB, PTAE y Mc), lo que contribuiría a incrementar los esfuerzos termogénicos por una parte y a disminuir la pérdida de agua evaporativa y excretada. Los resultados apoyan la idea que la plasticidad fenotípica es una propiedad de un rasgo y no de los individuos (Gilbert & Epel, 2009). Efectivamente, *Phyllotis darwini* mostró Plasticidad de desarrollo en algunos rasgos y flexibilidad fisiológica en otros. En este sentido, la naturaleza de las variaciones que se observaron, en términos de reversibilidad, magnitud, patrón y velocidad, fue diferente entre los atributos y fue

dependiente de la señales del ambiente. Al analizar las modificaciones en las condiciones térmicas durante la adultez en relación con la historia térmica experimentada durante el desarrollo, los resultados mostraron que cuando los individuos provenían de un ambiente de 15°C (RH y AL) y se re-aclimataron al tratamiento térmico opuesto (manteniendo las condiciones de disponibilidad de agua), presentaron flexibilidad fisiológica de atributos metabólicos. Es decir, estos animales disminuyeron significativamente las tasas de gasto energético y de pérdida de agua. Sin embargo los caracteres relacionados con las capacidades osmorregulatorias (GMR, U_{max}) se mantuvieron invariantes. En otras palabras, estos individuos presentan flexibilidad fisiológica en rasgos energéticos (TMB, PTAE) y plasticidad del desarrollo en la fisiología osmorregulatoria (GMR, U_{max}), probablemente debido al costo energético asociado con un incremento en las capacidades renales (Peña-Villalobos et al., 2012), revelando un compromiso entre la necesidad de disminuir las tasas de gasto y de producir orina mas conecentrada en ambientes de mayor temperatura. En el sentido opuesto, cuando los roedores crecieron en un régimen de altas temperaturas (RH-AL) y en la adultez fueron re-aclimatados al tratamiento contrario (manteniendo las condiciones hídricas), presentaron normas de reacción inflexibles en sus de atributos energéticos (plasticidad del desarrollo). Tanto la TMB la PTAE no variaron significativamente, pero las capacidades osmorregulatorios mostraron un norma de reacción flexible, es decir, los individuos pudieron disminuir el GMR y U_{max} como respuesta a la disminución en la temperatura ambiental. En el caso particular de quienes desarrollaron a 30°C-RH y fueron re-aclimatados a 15°C-RH, junto con la disminución en el GMR, se observa un incremento en la masa renal, probablemente debido a un incremento

en la ingesta de alimentos. Curiosamente, este incremento en el tamaño renal no se reflejó en la TMB.

Cuando los individuos adultos experimentan cambios en el ambiente térmico y en la disponibilidad de agua (en relación a la condición del desarrollo), la capacidad de cambio fenotípico los resultados fueron contrastantes. Por ejemplo, en relación a los atributos osmorregulatorios, los resultados revelaron que independientemente del ambiente hídrico experimentado durante el desarrollo, roedores que se desarrollan a baja temperatura presentaron plasticidad del desarrollo (i.e., irreversibilidad en la norma de reacción), en contraste con aquellos que se desarrollan a 30°C, los que presentan flexibilidad fenotípica (i.e., una norma de reacción flexible). Sin embargo, el análisis de los rasgos metabólicos, muestra diferencias interesantes. Cuando *Phyllotis darwini* crece en un ambiente de agua *ad libitum* (independiente de la temperatura) y es re-aclimatado a un ambiente con restricción hídrica, la capacidad de cambio metabólico (PTAE y TMB) sigue el mismo patrón descrito anteriormente, es decir, individuos que crecen a 30°C-AL re-aclimatados a 15°C-RH presentan normas de reacción inflexibles. Por otra parte, si los individuos crecen a 15°C-AL y son re-aclimatados a 30°C-RH presentan flexibilidad fisiológica en la TMB y la PTAE. Sin embargo, cuando los individuos experimentan durante el desarrollo una baja disponibilidad de agua, y esta condición cambia durante el curso de su vida, las respuestas fisiológicas contrastan con lo previamente descrito. Por ejemplo, en individuos desarrollados a 15°C-RH y re-aclimatados a 30°C-AL, muestran una norma de reacción inflexibles en TMB y PTAE (opuesto a lo que ocurre cuando crecen en condición de agua *ad libitum*). Es decir, estos individuos son incapaces de disminuir las tasas de gasto energético cuando enfrentan un ambiente de mayor temperatura, lo que podría asociarse,

por ejemplo, a la existencia de vías metabólicas utilizadas durante el desarrollo, que pudieran mantenerse invariantes a pesar de cambiar las condiciones de agua en la adultez. En este contexto, se ha documentado que roedores que sectores caracterizados por una baja disponibilidad de agua, o sometidos a regímenes de restricción hídrica en laboratorio, alterarían las estrategias metabólicas como un mecanismo que les permite incrementar la producción de agua en esas condiciones (Takey, et al., 2012). Es posible que cuando los individuos se enfrentan al doble desafío que significa un ambiente con baja temperatura y baja disponibilidad de agua, utilicen una combinación de estrategias bioquímicas celulares que les permitan sobrevivir en esas condiciones, favoreciendo el incremento en la producción de agua metabólica y en la producción de calor. Asimismo, es posiblemente, que los individuos compensen las altas tasas metabólicas por medio de incrementar la pérdida de calor, disminuyendo la aislación a través de modificaciones en las propiedades de la piel (Elias & Friend, 1975; Menon et al., 1987; Haugen et al. 2003)

Por otra parte, cuando los individuos se desarrollan a 30°C-RH y se re-aclimatan a 15°C-AL, la norma de reacción de TMB y PTAE es flexible. Efectivamente, en la quinta semana de aclimatación se produce un incremento significativo de TMB y PTAE y junto un incremento en la masa de órganos (e.g., hígado y el pulmón), los que permanecen invariantes en los demás tratamientos experimentales. Es probable que los individuos que se desarrollaron en condiciones de 30°C-RH, potencialmente presenten una mayor batería enzimática que quienes se desarrollan a 30°C-AL, esto debido a la necesidad, de producir mayor cantidad de agua metabólica por oxígeno consumido durante el desarrollo, lo que podría eventualmente permitirles incrementar las tasas de gasto energético cuando experimenten bajas temperaturas.

En conclusión, los resultados revelan que existe una dependencia ontogenética de la flexibilidad fenotípica en *Phyllotis darwini*. En otras palabras, la historia térmica e hídrica experimentada durante etapas tempranas del desarrollo determinaría las trayectorias fenotípicas y la capacidad de cambiar los atributos fenotípicos en respuesta a señales del ambiente. Adicionalmente, la flexibilidad fenotípica, dependerá de la dirección de la señal ambiental (e.g. incremento o disminución en la media térmica). Por último, las respuestas fisiológicas pueden variar dependiendo de la combinación de señales ambientales que experimentan durante su desarrollo, probablemente, en relación a los costos y desafíos que impliquen los nuevos escenarios ambientales.

Referencias

1. Arens, J.R. & Cooper, S.J. 2005. Metabolic and ventilatory acclimatization to cold stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol Biochem Zool* 78: 579-589.
2. Al-kahtani, M.A., Zuleta, C., Caviedes-Vidal, E. & Garland, T.Jr. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodent in relation to habitat, body size, and phylogeny. *Physiol Biochem Zool* 77: 346-365.
3. Barceló, G., Salinas, J., Cavieres, G., Canals, M. & Sabat, P. 2009. Thermal history can affect the short-term thermal acclimation of basal metabolic rate in the passerine *Zonotrichia capensis*. *J Therm Biol* 34: 415-419.
4. Biviano, A.B., Martínez del Río, C. & Phillips, D.L. 1993. Ontogenesis of intestine morphology and intestinal disaccharidases in chickens (*Gallus gallus*) fed contrasting purified diets. *J Comp Physiol B* 163: 508-518.
5. Bozinovic, F. 1993. Nutritional ecophysiology of the Andean mouse *Abrothrix andinus*: energy requirements, food quality and turnover time. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 104: 601-604.
6. Bozinovic, F., Gallardo, P.A., Visser, R.H. & Cortés, A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. *J Exp Biol* 206: 2959-2966.
7. Bozinovic, F. & Gallardo, P. 2006. The water economy of south american desert rodents: from integrative to molecular physiological ecology. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142: 163-172.
8. Brzek, P., Kohl, K., Caviedes-Vidal, E. & Karasov, W.H. 2009. Developmental

- adjustments of house sparrow (*Passer domesticus*) nestlings to diet composition. *J Exp Biol* 212: 1284-1293.
9. Canals, M., Figueroa, D.P., Miranda, J.P. & Sabat, P. 2009. Effects of environmental temperature on oxygen diffusion capacity during post-natal development in the altricial rodent, *Phyllotis darwini*. *Rev Chil Hist Nat* 82: 153-162.
 10. Cheplick, G. 1995. Genotypic variation and plasticity of clonal growth in relation to nutrient availability in *Amphibromus scabrivalvis*. *J Ecol* 83: 459-468.
 11. Dawson, W.R. & Bennett, A.F. 1973. Roles of metabolic level and temperature regulation in the adjustment of western plumed pigeons (*Lophophaps ferruginea*) to desert conditions. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 44: 249-266.
 12. di Castri, F. & Hajek, E.R. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 129 pp.
 13. Diaz, G.B., Ojeda, R.A. & Rezende, E.L. 1996. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptation of South American hystricognath rodents. *Funct Ecol* 20: 609-620.
 14. Elias, P.M. & Friend, D.S. 1975. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 65: 180-191.
 15. Gallardo, P.A, Cortés, A. & Bozinovic, F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. *Physiol Biochem Zool* 78: 145-152.
 16. Gilbert, S.F. & Epel, D. 2009. *Ecological Developmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine and Evolution* (1^a Ed). Sinauer Associated, Inc. Sunderland,

MA, USA. 459pp.

17. Garland, T.Jr. & Carter, P.A. 1994. Evolutionary Physiology. *Annu Rev Physiol* 56: 579-621.
18. Goldstein, D.L. 1991. Effects of water restriction during growth and adulthood on renal function of bobwhite quail, *Colinus virginianus*. *J Comp Physiol B* 164: 663-670.
19. Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B. & Nedergaard, J. 2001. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J* 15: 2048-2050.
20. Gross, J.E., Wang, Z. & Wunder, B.A. 1985. Effects of food quality and energy needs: changes in gut morphology and capacity of *Microtus ochrogaster*. *J Mammal* 66: 661-667.
21. Haim, A., Van Arder, R. & Skinner, D. 1990. Metabolic rates, food consumption and thermoregulation in seasonal acclimatization of the Cape porcupine *Hystrix africaeaustralis*. *Oecologia* 83: 197-200.
22. Hammond, K.A., Chappell, M.A. & Kristan, D.M. 2002. Developmental plasticity in aerobic performance in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 213-224.
23. Haugen, M. J. 2003. Cutaneous water loss and lipids in the stratum corneum of larks. PhD Thesis, The Ohio State University.
24. Hedrick, P.W. 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annu Rev Ecol Syst* 17: 535-566.
25. Hinsley, S.A., Ferns, P.N., Thomas, D.H. & Pinshow, B. 1993. Black-bellied

- Sandgrouse (*Pterocles orientalis*) and Pin-tailed Sandgrouse (*Pterocles alchata*): Closely related species with differing bioenergetics adaptations to arid zones. *Physiol Zool* 66: 20-42.
26. Hudson, J.W. & Kimzey, S.L. 1966. Temperature regulation and metabolic rhythms in populations of the house sparrow, *Passer domesticus*. *Comp Biochem Physiol A* 17: 203-217.
27. Iriarte, A. 2008. Mamíferos de Chile. Lynx Edicions. Barcelona, España. 424pp
28. Jaksic, F.M. 1997. Ecología de los vertebrados de Chile. Vol. 1. Ediciones de la Universidad Católica, Santiago, Chile.
29. McNab, B.K. & Morrison, P.R. 1963. Body temperature and metabolism in subspecies of *Peromyscus* from arid and mesic environments. *Ecol Monogr* 33: 63-82.
30. McKechnie, A.E., Freckleton, R.P. & Jetz, W. 2006. Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. *Proc Biol Sci* 273: 931-937.
31. McKechnie, A.E., Chetty, K. & Lovegrove, B.G. 2007. Phenotypic flexibility in the basal metabolic rate of Laughing Doves: responses to short-term thermal acclimation. *J Exp Biol* 210: 97-106.
32. McDevitt, R.M. & Speakman, J.R. 1994. Central limits to sustainable metabolic-rate have no role in cold-acclimation of the short-tailed field vole (*Microtus agrestis*). *Physiol Zool* 67: 1117-1139.
33. Menon, G.K., Baptista, F., Elias, P.M. & Bouvier, M. 1987. Fine structural basis of the cutaneous water barrier in nestling Zebra finches *Poephila guttata*. *IBIS* 130: 503-511

34. Mueller, P. & Diamond, J. 2001. Metabolic rate and environmental productivity: well-provisioned animals evolved to run and idle fast. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12550-12554.
35. Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. & Cannon, B. 2001. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504: 82-106.
36. Nespolo, R.F. & Rosenman, M. 1997. Historia térmica de roedores: una aproximación experimental. *Rev Chil Hist Nat* 70: 363-370.
37. Nespolo, R.F., Opazo, J., Rosenmann, M. & Bozinovic, F. 1999. Thermal acclimation, maximum metabolic rate and nonshivering thermogenesis in *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia) inhabiting the andean range. *J Mammal* 80: 742-748.
38. Nespolo, R., Bacigalupe, L., Sabat, P. & Bozinovic, F. 2002. Interplay among energy metabolism, organ mass and digestive enzyme activity in the mouse-opossum *Thylamys elegans*: the role of thermal acclimation. *J Exp Biol* 205: 2697-2703.
39. Oswald, C. 1998. Geographic variation and plasticity in renal function in the white-footed mouse *Peromyscus leucopus*. *J Mammal* 79: 1103-1110.
40. Piersma, T. & Drent, J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol Evol* 18: 228-233.
41. Pigliucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends Ecol Evol* 11: 168-173.
42. Russell, G.A., Rezende, E.L. & Hammond, K.A. 2008. Development partly determines the aerobic performance of adult deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *J*

Exp Biol 211: 35-41.

43. Sabat, P. & Bozinovic, F. 2008. Do changes in dietary chemistry during ontogeny affect digestive performance in adults of the herbivorous rodent *Octodon degus*?
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 151: 455-460.
44. Schlichting C.D. & Pigliucci, M. 1998. Phenotypic Evolution: a reaction norm perspective. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA, USA. 340pp.
45. Stearns, S.C. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity.
BioScience 39: 436-445.
46. Sultan SE & Stearns SC. 2005. Environmentally contingent variation: phenotypic plasticity and norms of reaction. Invited chapter in Variation: A Hierarchical Examination of a Central Concept in Biology (eds. Brian Hall and Benedikt Hallgrímsson). Academic Press series on key concepts in Evolutionary Biology. In: Miner B, Sultan S, Morgan S, Padilla D and Relyea R., 2005 Ecological consequences of phenotypic plasticity Trends 20(12):685-692
47. Takei, Y., Bartolo, R.C, Fujihara, H., Ueta, Y. & Donald J.A. 2012. Water deprivation induces appetite and alters metabolic strategy in *Notomys alexis*: unique mechanisms for water production in the desert. Proc Biol Sci 1738: 2599-2608.
48. Tolosa, E.M. & Diamond, J. 1990. Ontogenetic development of transporter regulation in bullfrog intestine. Am J Physiol 258: G770-G773.
49. Tracy, R.L. & Walsberg, G.E. 2001. Developmental and acclimatory contributions to water loss in a desert rodent: investigating the time course of adaptive change. J Comp Physiol B 171: 669-679.
50. Wrutniak-Cabello, C., Casas, F. & Cabello, G. 2001. Thyroid hormone action in

mitochondria. *J Mol Endocrinol* 26: 67-77.

51. Zaninovich, A.A., Rebagliati, I., Raices, M., Ricci, C. & Haggmüller, K. 2003.

Mitochondrial respiration in muscle and liver from cold-acclimated hypothyroid rats. *J. Appl Physiol* 95: 1584-1590.

Conclusiones

Los resultados analizados en esta tesis permiten concluir la existencia de un patrón de variación geográfica de los atributos fisiológicos en *Phyllotois darwini*. Efectivamente, las capacidades energéticas incrementaron con la latitud y con el índice de aridez, un *proxi* de la productividad primaria. Por su parte los atributos fisiológicos relacionados con la capacidad de conservar agua se favorecieron en latitudes bajas, donde disminuye la disponibilidad de agua y aumentan las temperaturas promedio. En relación a los mecanismos de variación fisiológica, la capacidad de *Phyllotis darwini* de reaccionar con cambios fenotípicos frente a señales del ambiente fue dependiente de la ventana temporal en que la señal ambiental actuó, de la dirección de la señal, de los compromisos entre rasgos y del grado de heterogeneidad temporal del ambiente. En individuos adultos, la magnitud y velocidad de la flexibilidad fisiológica fue dependiente de la historia térmica y/o hídrica durante el desarrollo. Estos resultados enfatizan la necesidad de incorporar diferentes ventanas temporales en el estudio y comprensión de los mecanismos de variación fenotípica, con el objetivo de no subestimar la capacidad de los individuos de cambiar en asociación con las características abióticas del ambiente.

En relación al patrón de variación geográfica de atributos fisiológicos, los resultados sugieren que las posibles presiones selectivas que direccionarían la diferenciación fisiológica interpoblacional de *Phyllotis darwini*, son la aridez de área (estimado a través de *Qindex*) y la temperatura mínima anual; esta última positivamente asociada a la conductancia térmica, que presentó un fuerte aumento en la localidad árida de Copiapó. Sin embargo, para mejorar el entendimiento de las causas ambientales de las variaciones

fisiológicas se hace necesario obtener una mayor información, por ejemplo, del tipo y disponibilidad de refugios utilizados por estos roedores, así como la incorporación de modelos físicos que permitan conocer la tasas de calentamiento/enfriamiento de los animales en sectores áridos. Esto podría ayudarnos en la comprensión, por ejemplo, de las diferencias poblacionales en la conductancia térmica entre localidades aparentemente similares en las condiciones abióticas (i.e., Copiapó y Vicuña).

La asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática a lo largo del gradiente latitudinal en Chile, fue dependiente del atributo fisiológico evaluado, de la dirección de la señal ambiental y del grado de heterogeneidad del ambiente. Al analizar los rasgos de la fisiología osmorregulatoria, la variabilidad climática no influyó la capacidad de concentrar orina: tanto los individuos de ambientes con baja variabilidad climática como aquellos que provienen de un ambiente altamente estacional incrementaron significativamente la osmolalidad de la orina bajo condiciones de restricción hídrica. Por lo tanto, no se encontró una asociación entre la variabilidad climática de las poblaciones de origen y la flexibilidad de atributos osmorregulatorios en *Phyllotis darwini*. Sin embargo, cuando se analizaron los rasgos relacionados con la fisiología energética, la respuesta fue opuesta: sólo los individuos provenientes de la localidad de Quirihue, mostraron flexibilidad en la masa corporal y a través de ella en la TMB (como respuesta a la disminución de la temperatura) y en la PTAE (como respuesta a la restricción hídrica). Lo interesante es que esta habilidad de cambio de la masa corporal fue dependiente de la dirección de la señal ambiental, es decir, los individuos de esta localidad incrementaron la Mc cuando se enfrentaron a un ambiente de menor temperatura. Esto sugiere, que la flexibilidad de la masa corporal podría estar asociada al ambiente térmico experimentado

durante su desarrollo en la localidad de origen (que presenta menores temperaturas que el resto de las localidades en estudio). Por otra parte los datos sugieren la existencia de un umbral de variabilidad ambiental sobre el cual los individuos sean capaces de responder con cambios fenotípicos, umbral que sólo sería alcanzado por los individuos de la localidad de Quirihue. Esto podría explicar la ausencia de flexibilidad fenotípica observada en individuos adultos de la localidad (con una mayor estacionalidad) de Santiago.

Nuestros resultados revelaron, que las características ambientales experimentadas durante el desarrollo (e.g. térmicas e hídricas), no solo pueden inducir cambios en los rasgos fenotípicos en *Phyllotis darwini*, sino que también pueden afectar la flexibilidad fenotípica en la adultez. Por ejemplo, cuando se analizó la norma de reacción de la TMB en respuesta a variaciones en la temperatura del ambiente, los individuos colectados en la etapa adulta de la localidad de Santiago mostraron normas de reacción inflexibles luego de 4 semanas de aclimatación a (ver capítulo 2). En contraste, individuos provenientes de la misma localidad, pero que crecieron en el laboratorio bajo una condiciones de temperatura controlada (e.g. 15°C), al experimentar las misma condiciones térmicas en la adultez presentaron flexibilidad de los atributos metabólicos, dejando en manifiesto el efecto de la experiencia térmica durante las primeras etapas del desarrollo sobre la habilidad de cambio metabólico en individuos adultos. Además, los resultados mostraron que la magnitud y dirección de la plasticidad fenotípica fueron dependientes de la ventana temporal en que la señal ambiental actuó, de la dirección del cambio ambiental y del atributo evaluado. Es decir, en respuesta a una señal ambiental, un individuo puede presentar atributos altamente flexibles durante la vida adulta, y normas de reacción inflexibles para otro rasgo, poniendo en evidencia la existencia de posibles compromisos energéticos (ver discusión capítulo 3).

Adicionalmente, las respuestas fisiológicas a los cambios ambientales se presentaron en diferentes niveles jerárquicos de organización, desde el bioquímico al sistémico.

En resumen, *Phyllotis darwini* presentó variaciones fisiológicas a un nivel interpoblacional en asociación con las características climáticas de cada localidad. Además, la asociación entre flexibilidad fisiológica y variabilidad climática, es dependiente de un umbral de variabilidad climática cuando se analizan atributos de fisiología energética. Sin embargo, la flexibilidad de rasgos osmorregulatorios fue independiente de la localidad de origen y/o de la variabilidad ambiental. Finalmente, la capacidad de cambio fisiológico en etapas adultas presentó una dependencia ontogenética. La historia térmica e hídrica experimentada durante etapas tempranas del desarrollo, determinó las trayectorias fenotípicas y flexibilidad fisiológica en respuesta a señales del ambiente. Así, la flexibilidad fenotípica, no solo dependió de la señal ambiental (e.g. temperatura) sino también, de la dirección de la señal (e.g. incremento o disminución en la media térmica, ver capítulo 2 y 3). Por último, los resultados sugieren que las respuestas fisiológicas en general pueden variar de acuerdo a la combinación de señales ambientales que experimentan los organismos durante el desarrollo y en la adultez, probablemente en relación a los costos y desafíos que implican los nuevos escenarios ambientales.

Referencias

1. Arens, J. & Cooper, S. J. 2005. Metabolic and Ventilatory Acclimatization to Cold Stress in House Sparrows (*Passer domesticus*) *Physiol Bioch Zool* 78, 579-589.
2. Al-kahtani, M.A., Zuleta, C., Caviedes-Vidal, E., Garland, T. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodent in relation to habitat, body size, and phylogeny. *Physiol Bioch Zool* 77: 346-365.
3. Bozinovic, F., Rojas, J.M., Broitman, B.R. & Vásquez, R.A. 2009. Basal metabolism is correlated with habitat productivity among populations of degus (*Octodon degus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 152: 560-564.
4. Coleman, J.C., & Downs, C.T. 2009. Variation in urine concentrating ability and water balance of the Black-tailed Tree Rat *Thallomys nigricauda*, along an aridity gradient. *Comp Bioch Physiol* 154 A: 508-513.
5. Dawson, W.R. & Bennett, A.F. 1973. Roles of metabolic level and temperature regulation in the adjustment of Western plumed pigeons (*Lophophaps ferruginea*) to desert conditions. *Comp Bioch Physiol* 44A: 249-266.
6. Diaz, G. B., Ojeda, R. A. & Rezende, E. L. 1996. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptation of South American hystricognath rodents. *Functional Ecol* 20, 609-620.
7. Goldstein, D.L. 1991. Effects of water restriction during growth and adulthood on renal function of bobwhite quail, *Colinus virginianus*. *J Comp Physiol* 164B: 663-670.

8. Hinsley, S. A., Ferns, P. N., Thomas, D. H. & Pinshow, B. 1993. Black-bellied Sandgrouse (*Pterocles orientalis*) and Pin-tailed Sandgrouse (*Pterocles alchata*): Closely related species with differing bioenergetic adaptations to arid zones. *Physiol Zool* 66: 20-42.
9. Maldonado, K., Van Dongen, W.F.D., Vasquez, R.A. & Sabat, P. 2012. Geographic variation in the association between exploratory behavior and physiology in Rufous-Collared Sparrows. *Physiol Bioch Zool* 85:618-624.
10. McNab, B.K. & Morrison, P.R. 1963. Body temperature and metabolism in subspecies of *Peromyscus* from arid and mesic environments. *Ecol Monogr* 33: 63-82.
11. Mckechnie, A.E., Freckleton, R.P. & Jetz, W. 2006. Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. *Proc R Soc B* 273: 931-937.
12. Nespolo, R., Bacigalupe, L., Sabat, P. & Bozinovic, F. 2002. Interplay among energy metabolism, organ mass and digestive enzyme activity in the mouse - opossum *Thylamys elegans*: the role of thermal acclimation. *J Exp Biol* 205: 2697-2703
13. Oswald C (1998) Geographic variation and plasticity in renal function in the whit-footed mouse *Peromyscus leucopus*. *J Mammal* 79: 1103-1110.
14. Quispe, R., Villavicencio, C.P., Cortes, A. & Vásquez, R.A. 2009. Inter-population variation in hoarding behaviour in degus, *Octodon degus*. *Ethology* 115: 465-474.
15. Sabat P, Cavieres, G., Veloso, C. & Canals, M. 2006a. Water and energy economy of an omnivorous bird: population differences in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comp Bioch Physiol* 144A: 485-490.

16. Sabat, P., G. Cavieres, C. Veloso, M. Canals & Bozinovic, F. 2009. Intraspecific basal metabolic rate varies with trophic level in rufous-collared sparrows. *Comp Bioch Physiol A* 154: 502-507.
17. Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology. Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, New York.
18. Tolosa, E.M. & Diamond, J. 1990. Ontogenetic development of transporter regulation in bullfrog intestine. *Am J Physiol* 258: G770-G773.
19. Tracy, R.L. & Walsberg, G.E. 2001. Developmental and acclimatory contributions to water loss in a desert rodent: investigating the time course of adaptive change. *J Comp Physiol* 171B: 669.
20. Williams, J.B. & Tieleman, B.I. 2001. Physiological ecology and behavior of desert birds. *Current Ornithology*, Vol. 16 (eds V. Nolan & C.F. Thompson), p. 299-353. Plenum Press, New York. Chapter 2.
21. West-Eberhard M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. New York: Oxford University Press.