



**Enzimas metabólicas mitocondriales en eritrocitos de  
*Zonotrichia capensis* (Paseriformes: Passerellidae):  
interacción entre termorregulación y osmorregulación**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias

Por

**Francisco Javier Nicolás del Basto Llancaqueo**

Octubre, 2023

Director de Tesis Dr. Pablo Sabat Kirkwood

Codirector de Tesis Dr. Isaac Peña Villalobos

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

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

**Francisco Javier Nicolás del Basto Llancaqueo**

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

Director de Tesis:

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

---

Codirector de Tesis:

Dr. Isaac Peña Villalobos

---

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vásquez Salfate

---

Dra. Natalia Ramírez Otarola

---

*Quien teme a lo incierto,  
la condena le espera,  
de un destino fugaz  
hacia su final.*

*Es el adiós  
de lo vivo dentro,  
de uno mismo y  
de uno en los demás*

**Francisco Del Basto Llancaqueo**

*Dedicado a mi amor, mi familia, a  
quienes me vieron crecer en juventud  
quienes me ven madurar en la ciencia  
y al viaje a la austral carretera*



Mi vida comienza en Santiago de Chile el 09 de Diciembre de 1998. Durante mi infancia, mis padres me han contado que siempre expresé curiosidad por el mundo que me rodeaba, lo cual me condujo a la ciencia tempranamente. Aunque en el colegio no tuve un rumbo, en el preuniversitario encuentre un área que me maravilló, la Biología. Situaciones fortuitas me derivaron hacia estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Biología, en la gloriosa Universidad de Chile el año 2017. Durante el pregrado en el 2018 realicé el curso de Zoología Funcional, el cual antes de iniciar pensé en postergar y fue el que finalmente me envolvió. Con esfuerzo, compromiso egreso en pandemia en el 2020. Para luego continuar en este trabajo en la Maestría en Ciencias Biológicas bajo la tutoría del profesor Dr. Alejandro Pablo Sabat y el cotutor Dr. Isaac Peña Villalobos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis tutores Pablo Sabat y cotutor Isaac Peña Villalobos por darme la oportunidad de participar en sus proyectos y por entregarme los recursos, disposición, conocimientos y enseñanzas sutiles a la hora de realizar investigación (que no se aprende leyendo artículos). Resultado en un crecimiento como persona y científico.

De manera innata agradezco a mi amor, madre, padre, hermanos y abuelos. Cada uno me ha enseñado, protegido y amado. Me han dado la oportunidad de habitar experiencias inimaginables y de cada uno he obtenido aprendizajes que han moldeado mi carácter y temperamento.

Les agradezco a mis amigos de pregrado, con quienes sufrimos, aprendimos, desarrollamos, potenciamos, discutimos, creamos, y muchas otras cosas más. Gracias Diego San Martín, Nayla Serey, Sofia Quintana, Marcos Cayuleo, Octavio Robles y Valentina Herrera. Además, con quienes desarrollamos biología teórica por un momento y logrando ir a un congreso virtual en Praga (Artificial life 2021).

A los miembros del Laboratorio de Ecofisiología Animal, les agradezco por las risas, conversaciones, apoyos, discusiones y asesorías experimentales. En particular a Felipe Álvarez por prenderme los respirometros los domingos. A Lucas Navarrete por enseñarme durante pregrado las técnicas que han permitido el éxito de esta tesis. A Diego Landaeta por las largas discusiones acerca de las múltiples ideas de investigación que podríamos desarrollar. A Andrés Sazo, por las historias, apoyo logístico y su invaluable experiencia en terreno.

En un misceláneo reconozco las enseñanzas de los profesores Jorge Mpodozis, Carezza Botto, Julio Alcayaga. Los cuales me han entregado conocimientos fundamentales de temas de Neurobiología-Neuroetología, Ecología y Fisiología de sistemas. Además, de abrirme las puertas para colaborar con ellos en diferentes proyectos.

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

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Hipótesis.	7
1.2 Objetivos.	9
1.2.1 Objetivo general.	
1.2.2 Objetivos específicos.	
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>10</b>
2.1 Captura y mantención.	10
2.2 Aclimatación.	11
2.3 Tasa metabólica y conductancia térmica.	12
2.4 Extracción de sangre y hematocrito.	13
2.5 Capacidad de concentración de fluidos corporales.	14
2.6 Tasa de hidratación.	16
2.7 Enzimas metabólicas.	16
2.8 Estado oxidativo.	18
2.9 Análisis estadístico.	20
<b>3. Resultados</b>	<b>22</b>
3.1 Respuesta energética orgánica bajo la aclimatación hidrosalina y térmica.	22
3.2 Impacto de la aclimatación térmica e hidrosalina sobre la función osmorregulatoria.	25
3.3 Metabolismo celular de eritrocitos durante la aclimatación térmica e hidrosalina y la relación con el metabolismo orgánico.	28
3.4 Estado oxidativo durante la aclimatación térmica e hidrosalina.	30
<b>4. Discusión</b>	<b>33</b>
4.1 Flexibilidad metabólica y osmorregulatoria por la aclimatación térmica y salina.	33
4.2 Ajustes de eficiencia energética según las aclimatación térmica e hidrosalina.	35
4.3 Capacidad metabólica de eritrocitos durante la aclimatación térmica y salina y predicción de la capacidad termogénica.	37

4.4 Capacidad osmorregulatoria y estrés oxidativo durante la aclimatación térmica y salina.	39
<b>5. Conclusión</b>	<b>42</b>
<b>6. Referencias</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de parámetros metabólicos energéticos. <sup>§</sup>Los valores de tasa metabólica basal y reposo están expresados en unidades masa específico. Superíndices denotan diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.
- Tabla 2.** Relación de la tasa metabólica de reposo con la temperatura corporal y la tasa metabólica basal masa específico, categorizadas por temperatura de aclimatación. Se muestran los intervalos de confianza al 95% de las pendientes de la relación.
- Tabla 3.** Medidas de resumen (promedio  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de los parámetros osmorregulatorios y hematológicos. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.
- Tabla 4.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas del consumo de agua en función de la salinidad y temperatura. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.
- Tabla 5.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de la actividad de enzimas mitocondriales.

**Tabla 6.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas los parámetros de estado oxidativo. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Relación entre la osmolalidad de la orina y la osmolalidad del plasma. Cada punto está categorizado por tratamiento salino y térmico.

**Figura 2.** Relación entre la actividades de enzimas mitocondriales (CS y COX) de los eritrocitos de *Zonotrichia capensis*. Cada punto está categorizado por tratamiento de aclimatación salina y térmica.

**Figura 3.** Relación entre la expansividad metabólica y la actividad de la citrato sintasa. La medida de expansividad metabólica fue calculada como RMR – BMR y se categorizó según la aclimatación térmica a 27°C y 17°C.

**Figura 4.** Capacidad antioxidante y su relación con el estrés oxidativo (a) y los parámetros osmorregulatorios (b).

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza (Analysis of Variance)  
BHT: Butil-hidroxitolueno  
BMR: Tasa metabólica basal (Basal metabolic rate).  
COX: Citocromo-c oxidasa  
CICUA: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales  
CS: Citrato sintasa  
CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity  
DE: Desviación estándar.  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
IC: Intervalo de confianza.  
MDA: Malondialdehído  
Mb: Masa corporal (Body mass)  
rcf: Fuerza centrífuga relativa (Relative centrifuge force)  
RM-ANOVA: Repeated Measures Analysis of Variance  
ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)  
RMR: Tasa metabólica en reposo.  
rpm: Revoluciones por minuto  
SDS: Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)  
TAC: Capacidad antioxidante total  
Tb: Temperatura corporal (Body temperature)  
TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (Thiobarbituric acid reactive substances)  
TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico  
TMP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano  
U/P: Razón orina y plasma (Urine-to-Plasma Ratio)

## RESUMEN

La salinización de los cuerpos de agua puede afectar la ecología de las aves paseriformes, debido a su efecto sobre el balance hídrico y a su limitada capacidad de osmorregulación. Los organismos se ven afectados simultáneamente por múltiples factores ambientales, por ejemplo, la salinidad y temperatura ambiental. Ambos factores tienen un impacto sobre el gasto energético orgánico, debido a que pueden afectar el balance osmótico de los tejidos y la capacidad termogénica. Cambios en el gasto energético se traducen en ajustes metabólicos tisulares. Los eritrocitos constituyen una alternativa mínimamente invasiva para estudiar los ajustes metabólicos tisulares, ya que presentan flexibilidad metabólica frente desafíos osmorregulatorios y termorregulatorios y se correlacionan con la tasa de gasto energético a nivel orgánico. Esta tesis evaluó los ajustes metabólicos, osmorregulatorios y celulares frente a una aclimatación hidrosalina y térmica en una especie de ave paseriforme, *Zonotrichia capensis*. Para ello, las aves se aclimataron a dos salinidades (200 y 0 mM, NaCl) por cuatro semanas y a la segunda semana se modificó la temperatura ambiental desde 27 °C y 17 °C. Se encontró que la aclimatación térmica e hidrosalina no generó variaciones en la tasa metabólica, como tampoco tuvo efectos significativos sobre variables osmorregulatorias. Sin embargo, se encontró que las aves presentaron ajustes la conductancia térmica y el gasto energético, lo que reflejaría ajustes en la eficiencia energética por efecto de la aclimatación térmica. En cuanto a la actividad metabólica de los eritrocitos, no se encontraron variaciones atribuibles a los factores de aclimatación térmica e hidrosalina.

No obstante, la actividad metabólica de los eritrocitos se asoció con el costo de termorregulación. Se encontró que la proporción entre las moléculas prooxidantes y las antioxidantes se mantuvo constante independiente de la salinidad y del cambio de temperatura ambiental. En conclusión, las aves exhibieron notables capacidades osmorregulatorias que permiten tolerar el desafío hidrosalino y por tanto explica la ausencia de modificaciones en el gasto energético. Además, los animales expresan mecanismos de compensación en su estado oxidativo, lo que les permite mantener dicho estado invariable. Finalmente, la aclimatación térmica e hidrosalina no implican necesariamente variación en la capacidad metabólica de los eritrocitos. Sin embargo, en este tipo celular observamos que los niveles de actividad de la enzima citrato sintasa predice la capacidad metabólica energética a nivel del organismo.

## ABSTRACT

Salinization of water bodies can affect the ecology of passerine birds due to its impact on water balance and their limited osmoregulatory capacity. Organisms are simultaneously affected by multiple environmental factors, such as salinity and ambient temperature. These factors have an impact on organismal energy expenditure, as they can affect the osmotic balance of tissues and thermogenic capacity. Changes in energy expenditure translate into tissue-level metabolic adjustments. A minimally invasive alternative to studying tissue-level metabolic adjustments is through erythrocytes, as they exhibit metabolic flexibility in response to osmoregulatory and thermoregulatory challenges, correlating with organismal energy expenditure rates. This thesis evaluated in a model passerine bird species *Zonotrichia capensis* metabolic, osmoregulatory, and cellular adjustments in response to hydrosaline (200 and 0 mM, NaCl) for four weeks and thermal acclimation at 27 °C the first two weeks, then at 17 °C. It was found that thermal and hydrosaline acclimation did not generate variations in metabolic rate, nor did it have significant effects on osmoregulatory variables. However, birds were found to exhibit adjustments in energy efficiency due to thermal acclimation, impacting energy expenditure and thermal conductance. Regarding cellular metabolic adjustments, no variations attributable to thermal and hydrosaline acclimation factors were found. Nonetheless, erythrocyte metabolic activity can serve as an indicator of metabolic expansion capacity. Salinity and acclimation temperature, however, did not impact the oxidative state of the birds. This is because the ratio between prooxidant and antioxidant

molecules remained constant, despite individual variations in prooxidant and antioxidant levels separately. In conclusion, birds demonstrate notable osmoregulatory capabilities that explain the absence of modifications in energy expenditure to counter the hypersaline challenge. Furthermore, animals express compensatory mechanisms in their oxidative state, enabling them to maintain this state unaltered. Finally, thermal and hydrosaline acclimation do not necessarily imply variations in erythrocyte metabolic capacity. However, we observed that levels of citrate synthase enzyme activity in erythrocytes provide indications of energy metabolic capacities at the organismal level.

## 1 INTRODUCTION

La salinización creciente de los cuerpos de agua es un tema de interés para las ciencias ecológicas, debido a que la concentración de sales (e.g., electrolitos) presentes en solución pueden afectar significativamente a la biota y, a su vez, modificar el equilibrio de los ecosistemas y finalmente a la biodiversidad (Amores et al., 2013). Los cuerpos de agua dulce (e.g., ríos, lagos, humedales) pueden presentar una gran variedad en salinidad, desde niveles dentro del rango de agua dulce hasta niveles intermedios o altos, similares a los marinos (Rivera et al., 2019; Carter et al., 2020; CEA, 2020). Dado que los rangos de distribución de las especies animales abarcan diferentes ambientes con características a menudo contrastantes en la disponibilidad y calidad de agua, la adecuación de los distintos genotipos de una misma especie podría diferir entre un hábitat y otro (McNab, 2009; Gutiérrez et al., 2014). En este sentido, en qué medida la salinidad puede ser un factor limitante para la ocupación de un hábitat es una pregunta abierta para la mayoría de las especies, en particular para las aves terrestres (Sabat, 2000; Gutiérrez et al., 2014; Sabat et al., 2017; Gutiérrez et al., 2019; Navarrete et al., 2023).

El estrés fisiológico asociado a la vida en ambientes salobres requiere de la necesidad de eliminar el exceso de electrolitos. Cuando las aves beben agua del mar o consumen presas de elevada osmolalidad, las sales son absorbidas por el intestino delgado, aumentando la osmolalidad de los fluidos corporales (e.g., plasma sanguíneo)

(Purdue & Haines, 1977; Simon, 1982; Holmes & Phillips, 1985). El consumo de sales puede desencadenar respuestas fisiológicas y conductuales (Hawkins, 1973; Gerson & Guglielmo, 2011; Gutiérrez et al. 2014; Sabat et al., 2021) que permiten regular la osmolalidad en tejidos y fluidos corporales. Los mecanismos fisiológicos de osmorregulación en aves involucran la acción coordinada de riñones, intestino grueso y en algunas especies la glándula de la sal a través del transporte activo de electrolitos y recaptación de agua (Braun & Scanes, 2015; Aw et al. 2018). Lo que resulta en el incremento de la osmolalidad de la excreta permitiendo la homeostasis salina de los fluidos corporales (e.g., plasma sanguíneo; Aldea & Sabat 2007), y que puede conllevar un incremento en el gasto metabólico de tejido osmorregulatorios (Hughes, 2003; Sabat et al., 2017; Gutiérrez et al. 2014; Tapia-Monsalve et al. 2018; Gutiérrez et al., 2019; Sabat et al., 2019). A pesar de que existen varios estudios de fisiología osmorregulatoria en diversos grupos de aves (véase Shoemaker, 1972; Sabat, 2000; Sabat et al. 2004a; Sabat et al., 2006b; Sabat et al., 2006c; Gutiérrez et al., 2012; Gutiérrez, 2014; Sabat et al., 2017), son escasas las investigaciones del impacto de la salinidad y de adaptaciones bioquímicas osmorregulatorias y energéticas asociadas al consumo de sales o deshidratación en paseriformes (Sabat et al., 2017; Sabat et al., 2019; Navarrete et al., 2021). Es de considerar que este grupo no presenta glándula de la sal, lo cual puede limitar la capacidad de osmorregulación frente al consumo de sales (Shoemaker, 1972; Sabat, 2000; Braun & Scanes, 2015) y pueden habitar en ambientes con diferentes salinidades (e.g., humedales costeros) (Estades et al., 2017)

Es común que los organismos sean afectados simultáneamente por múltiples factores ambientales, los cuales pueden impactar de manera aditiva sobre el gasto energético (Garland et al., 2022). El principio de asignación de energía plantea que,

frente a cambios en los requerimientos energéticos, se produce una distribución de recursos que depende de la magnitud del gasto energético de ciertos tejidos o funciones (Weiner, 1992; Buckley et al., 2015; Garland et al., 2022). Sin embargo, también puede expresarse respuestas de compensación mediante ajustes en el presupuesto energético (e.g., Barceló et al. 2017; Garland et al., 2022). En este sentido, no es claro los mecanismos que gatillan la compensación o la reasignación. Sin embargo, se ha propuesto que una aproximación adecuada para evaluar el efecto de la asignación de energía es el estudio de dos o más factores ambientales que puedan modular la tasa metabólica a escala orgánica y tisular (e.g., Norin & Metcalfe, 2019; Sabat et al., 2019). En particular, el estudio de los organismos a lo largo del tiempo y entre individuos de una misma especie permiten entender el fenómeno de reasignación o compensación de energía entre distintas funciones en compromiso (e.g., Briga & Verlhust, 2017; Linek et al., 2021; Tapper et al., 2021)

El estudio de la interacción de factores ambientales permite comprender como se administra el presupuesto energético en los animales frente al desafío que podría significar habitar en ambientes de salinidades variables. En este sentido, comprender la interacción con la variación de la temperatura ambiental es relevante, dado que contribuye en gran medida al gasto energético (i.e., tasa metabólica) (e.g., Sabat et al., 2006a). En efecto, la aclimatación térmica y la exposición a un estrés salino, de manera independiente, ha evidenciado generalmente un incremento en el presupuesto energético (i.e., la tasa metabólica) (Maldonado et al. 2009; Peña-Villalobos et al. 2013; Peña-Villalobos et al. 2014; Sabat et al. 2017). Además, estudios recientes sugiere que el efecto de la ingesta de sal en la fisiología osmorregulatoria en aves passeriformes costeras del género *Cinclodes* depende de la temperatura ambiental (Navarrete et al.,

2023). Sin embargo, aún no es claro el efecto de la interacción de estos factores sobre el presupuesto energético. Aunque se ha documentado que la salinidad produce un aumento en la tasa metabólica basal (BMR por sus siglas en inglés) en *Zonotrichia capensis* durante la aclimatación a una alta salinidad y baja temperatura, los resultados no respaldaron la existencia de una interacción significativa entre la temperatura y la salinidad del agua bebida, en la mayoría de los rasgos energéticos ni osmorregulatorios. Sin embargo, se desconoce si la variación de la tasa metabólica responde a diferencias asociadas a la estrategia termo- u osmoreguladora (McNab, 1980; Layton et al. 2000; Sabat et al. 2004); como tampoco es claro si los ajustes osmorregulatorios y termorregulatorios varían a lo largo del tiempo y cuál es su impacto sobre el presupuesto energético.

Los cambios en las tasas de gasto de energía totales de un organismo dependen de ajustes de la actividad metabólica de órganos y tejidos (Vézina et al., 2006; Zheng et al., 2008; Zheng et al., 2013; Peña-Villalobos et al. 2014; Vézina et al., 2017). En este sentido, una de las características que genera interés en los eritrocitos de aves es la presencia de mitocondrias funcionales (Stier et al., 2013), estimado por medio de la tasa de respiración y mediante determinaciones de actividad de enzimas mitocondriales (Spinazzi et al., 2012; Stier et al. 2017) y que podría ser utilizado como indicador o *proxi* de los ajustes energéticos orgánicos frente a distintos desafíos fisiológicos. Hay evidencia de que la intensidad metabólica de los eritrocitos se correlaciona con la tasa metabólica orgánica (Malkok et al. 2021) y, que el metabolismo del tejido sanguíneo presenta una característica flexible asociado a la variación de las condiciones ambientales que impactan sobre la función osmorregulatoria (Gutierrez et al., 2019; Navarrete et al., 2021) y termorregulatoria (Nord et al., 2021).

El significado de la variación del metabolismo de los eritrocitos podría estar vinculado a factores locales y sistémicos que modulan el metabolismo celular. El factor local se ve reflejado en los ajustes del metabolismo mitocondrial asociado a la restricción hídrica (i.e., deshidratación) (Navarrete et al., 2021) o a la alimentación de presas salinas en las costas (Gutiérrez et al., 2019), tal que podría ser una compensación para controlar la lisis celular osmótica. Dado que la regulación del volumen celular ocurre mediante transporte activo de iones (Orlov et al., 1993; Hoffmann et al. 2009), es posible que la producción de ATP mitocondrial contribuya a mantener el volumen celular. Es más, los eritrocitos de algunas aves presentan mayor resistencia a la lisis en medios hipo e hiper osmóticos (e.g., de 0 mM) (Kregenow, 1971a; Kregenow 1971b; Singh et al., 2019) respecto a mamíferos los cuales carecen de mitocondrias (Yap & Zhang, 2021). El factor sistémico se evidencia en el contexto de un desafío termorregulatorio, tal que se ha reportado en dos especies de passeriformes (*Periparus ater* y *Parus major*) un incremento en la capacidad metabólica energética de los eritrocitos en invierno respecto al otoño, que podría relacionarse a una respuesta de modificaciones de la demanda metabólica entre estaciones (Nord et al., 2021). La variación del metabolismo asociado al efecto de temperatura ambiental puede estar dado por la interacción de señales (e.g., hormonas tiroideas) sistémicas que modulan las remodelaciones fisiológicas asociadas a la capacidad termogénicas. (Pani & Bal, 2022). De esta manera, analizar el metabolismo del tejido sanguíneo podría ser útil para evaluar el impacto de los efectos de la temperatura y la salinidad sobre la variación de la tasa metabólica orgánica.

Así, es posible que el metabolismo de las mitocondrias, a través de la actividad de enzimas involucradas en el gasto de energía a nivel tisular, se correlacione con modificaciones fisiológicas que ocurren en aves sometidas a estrés hídrico (Gutiérrez et

al., 2019; Navarrete et al., 2021), tal como sucede cuando aves consumen agua y/o presas saladas. Paralelamente y debido a que el metabolismo mitocondrial es una fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS de la sigla en inglés) (Treberg et al. 2011; Quinlan et al. 2012, Costantini, 2019), resulta interesante evaluar si esta potencial respuesta bioquímica representa un costo asociado a un desbalance en el estado oxidativo (Tapia-Monsalve et al., 2018; Sabat et al., 2019).

A partir de esto, cabe preguntarse si frente a una ingesta salina crónica, es posible que existan modificaciones en la función mitocondrial; si estos ajustes se asocian a cambios en el estrés oxidativo y finalmente si ambas funciones se correlacionan con modificaciones en la tasa metabólica (e.g., BMR masa-específico). Además, para dilucidar si la función mitocondrial corresponde a ajustes tejido-específicos y/o a modificaciones orgánsmicas asociadas a los requerimientos energéticos, se estudiará el efecto de la variación en la tasa metabólica desencadenada por una variación en la temperatura ambiental. Así, en esta tesis, se pretende integrar determinaciones de la actividad metabólica de eritrocitos a través de su capacidad catabólica (e.g., Citocromo-C oxidasa y citrato sintasa), la tasa metabólica basal, la concentración de fluidos corporales y el estado oxidativo de tejido sanguíneo, para examinar los ajustes osmorregulatorios y energéticos (organísmicos y celulares) frente al consumo de sales en el *Zonotrichia capensis*.

## 1.1 HIPÓTESIS

### **Hipótesis 1**

La mantención de la homeostasis hidrosalina frente a un consumo elevado de sales requiere de la acción de mecanismos activos para su eliminación, lo que en conjunto con una variación de la temperatura ambiental impacta sobre el gasto energético y la capacidad osmorregulatoria y termogénica, respectivamente. Así, se espera que tanto la salinidad como la temperatura ambiente provoquen cambios en el gasto energético del organismo, y cuando actúan juntas, podrían crear un efecto distinto al de cada factor por separado. A su vez, se espera que el efecto de la aclimatación hidrosalina y térmica sobre el estado oxidativo este vinculado al cambio en el gasto metabólico.

### **Predicción 1**

En particular, se predice que en la aclimatación a una hidratación alta en contenido de sales incrementaran la capacidad de concentración de la orina (índice U/P) permitiendo mantener la osmolaridad del plasma, asociado a un incremento en la tasa metabólica; mientras que la disminución de la temperatura ambiental durante la aclimatación térmica generará un incremento de la capacidad termogénica (i.e., tasa metabólica). Producto de la interacción de ambos factores se espera un incremento del gasto energético y en ambas capacidades termo- y osmorreguladora. Además, se espera en todos los casos

que la variación del gasto metabólico sea en un mismo sentido con la variación en los niveles de prooxidantes

## **Hipótesis 2**

Dado el carácter flexible del metabolismo de los eritrocitos y del impacto de la carga salina sobre la regulación del volumen celular, se espera encontrar modificaciones bioquímicas en el metabolismo mitocondrial en respuesta al cambios en la osmolalidad del plasma. Además, se espera que los cambios en la actividad metabólica pueden tener impacto sobre el balance oxidativo, dada la relación entre el metabolismo y la producción de moléculas prooxidantes.

## **Predicción 2**

Se predice que, frente a la aclimatación a un consumo elevado de sales, se observará un incremento de la capacidad metabólica bioquímica de los eritrocitos, manifestada como aumentos en la actividad enzimática mitocondrial. Lo cual, se espera que pueda conllevar un incremento en los niveles de prooxidantes plasmáticos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar las respuestas orgánsmicas energéticas, osmorregulatorias y celulares de una especie de paseriforme, ante la exposición a factores que desafían la regulación hidrosalina y térmica, con la finalidad de identificar las variables que inciden sobre los ajustes fenotípicos.

### 1.2.2 Objetivo específico

- Evaluar las respuestas energéticas orgánsmicas frente a la aclimatación térmica e hidrosalina en *Zonotrichia capensis*.
- Analizar el impacto de la aclimatación térmica e hidrosalina sobre el funcionamiento del sistema osmorregulatorio.
- Examinar el efecto de la aclimatación hidrosalina y térmica la capacidad metabólica celular y el vínculo con las respuestas organismicas.
- Evaluar el costo fisiológico a través del estado oxidativo, asociado al funcionamiento del metabolismo energético orgánsmico y celular, debido a la aclimatación térmica e hidrosalina.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Captura y Mantención

Se capturó a 24 individuos de *Zonotrichia capensis* (Passeriformes: Passerellidae) adultos en octubre de 2022 en el sitio experimental German Greve Silva de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicado en la zona de Rinconada de Maipú (33.492058S, 70.824561W). El tiempo de captura y traslado fue de aproximadamente de dos horas, hasta el bioterio en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Las aves fueron capturadas con permiso del Servicio Agrícola y Ganadero (No. 7959/2021).

En el bioterio, las aves se mantuvieron de manera individual, en jaulas metálicas de 40 cm x 40 cm x 40 cm, a una temperatura ambiental de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) con un fotoperiodo de 12:12 día-noche. Las aves tuvieron acceso a semillas de alpiste (*Phalaris canariensis*) y agua potable *ad libitum*. Cada dos días se les ofrecieron 500 mg de larvas de *Tenebrio molitor*. Los animales se habituaron por una semana a estas condiciones y luego se asignaron de manera aleatoria a los tratamientos experimentales de aclimatación (ver sección Aclimatación) manteniendo la composición de la dieta.

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, en donde se llevaron a cabo los experimentos.

## 2.2 Aclimatación

Se asignó a 12 individuos de *Z. capensis* a una hidratación de baja salinidad (0 mmol L<sup>-1</sup> de suplementación) en base a agua potable, y otras 12 aves a una hidratación de salinidad moderada con agua potable suplementada con cloruro de sodio (NaCl) para alcanzar una osmolalidad teórica de 200 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl (400 mOsm) asumiendo el uso de agua pura (Peña-Villalobos et al., 2013). Esta concentración se utilizó para permitir la comparación con otros estudios (Peña-Villalobos et al., 2013; Sabat et al., 2017; Sabat et al., 2019) y debido a que es una concentración que las aves paserinos pueden tolerar sin perder masa corporal (Bartholomew & Cade, 1963). Dado que el agua potable tiene osmolalidad de entre 50-100 mOsm, la osmolalidad real de la solución fue de entre 450 y 500 mOsm, lo cual pudimos corroborar por osmometría (Wescor 5130B). El tratamiento se mantuvo por cuatro semanas de manera continua, recambiando el agua cada dos días.

Durante el tratamiento de hidratación salina, a ambos grupos de aves, se les modificó la temperatura ambiental (aclimatación térmica). Las primeras dos semanas se aclimataron a 27°C y las siguientes dos semanas a 17°C. La aclimatación a 17 °C se debe a que, se espera que la tasa metabólica puede incrementar un 37% respecto a la tasa metabólica basal (Sabat et al., 2006) y así evitar un exceso de efecto de la aclimatación térmica sobre la hidrosalina (que puede incrementar la tasa metabólica en un 20%) (Peña-Villalobos et al., 2013; Sabat et al., 2017). La secuencia de temperatura ambiental se debe a que según Barceló et al. (2009) la historia térmica tiene un efecto sobre la tasa metabólica basal. El diseño experimental permitió analizar el efecto de la salinidad, la temperatura ambiental e interacción, sobre las variables fisiológicas. Además, se integra un componente temporal, que permite analizar la cinética de cambio del presupuesto energético debido a la interacción de los factores. De esta manera los

tratamientos se abreviaron según la salinidad a 400 mOsm (alta salinidad) y salinidad a 0 mOsm (baja salinidad) y temperatura de aclimatación 27 °C (alta temperatura) y 17 °C (baja temperatura).

### **2.3 Tasa metabólica y conductancia térmica.**

Para evaluar la respuesta termogénica se cuantificó al cumplir los 14 y 28 días de aclimatación a cada ave se le determinó la tasa metabólica basal mediante el consumo de oxígeno ( $\text{mL hr}^{-1}$ ) en un estado postabsorbtivo (4 h de ayuno) a 30 °C. Además, se determinó la tasa metabólica de reposo a 15 °C un día antes de la tasa metabólica basal. Las mediciones se realizaron en tres aves por día, con un registro de doce horas durante la noche (y en oscuridad) para la tasa metabólica basal (20:00-8:00) y de cuatro horas (12:00-17:00) en el día para la tasa metabólica de reposo a 15°C. Los animales ayunaron de agua y comida antes de cada medición de tasa metabólica (basal y estándar) por cuatro horas.

La tasa metabólica basal o reposo se determinó mediante tres sistemas computarizados de Respirimetría de flujo abierto (dos FMS y un FoxBox, Sable System, Henderson, NV, Estados Unidos) calibrado con una mezcla conocida de oxígeno (20%) y nitrógeno (80%) que se certificó por cromatografía (INDURA, Chile).

Los animales se colocaron en una cámara metabólica metálica de dos litros las que fueron dispuestas en gabinetes de temperatura controlada (Sable Systems, Henderson, Nevada) a 30 o 15°C. Durante las mediciones, la cámara recibió aire seco y libre de anhídrido carbónico, debido a un paso previo por columnas de baralime (absorbe anhídrido carbónico, hidróxido de calcio al 80% y de hidróxido de bario al 20%) y diédrita (desecante, sulfato de calcio). Se estableció un flujo de  $500 \text{ mL min}^{-1}$  (Sabat et al., 2006). El aire fluyó a través de un tubo Bev-A-Line (Thermoplastic Processes Inc.) desde un

controlador de flujo de masa incluido en los sistemas de respirometría. El aire que sale de la cámara pasa primero a través de un higrómetro que graba la presión de vapor de agua (kPa), luego atraviesa una columna de dióxido de silicio para secar el aire, así, el aire seco entra al analizador de CO<sub>2</sub> que después pasa a través de un analizador de O<sub>2</sub>.

Debido a que el CO<sub>2</sub> se extrajo antes de entrar en el O<sub>2</sub> analizador, el consumo de oxígeno se calculó como (Withers, 1977):  $VO_2 = (FR \times 60 \times (F_i O_2 - F_e O_2) / (1 - F_i O_2))$ , donde FR es la tasa de flujo en mL min<sup>-1</sup>, F<sub>i</sub> y F<sub>e</sub> son las concentraciones fraccionarias de O<sub>2</sub> entrando y saliendo de la cámara metabólica, respectivamente. El análisis y procesamiento de datos se realizó a través del software EXPEDATA (Sable System, international, NV, Estados Unidos). Antes y después de cada registro, se realizó una línea base de al menos 15 min. Para estimar la tasa metabólica basal y estándar se utilizó un periodo de 20 min más estables y de menor consumo de oxígeno en el registro.

La masa corporal se registró al final de cada medición de respirometría usando una balanza electrónica ( $\pm 0,1$  g). Se registró la temperatura cloacal a 1,0 cm de profundidad desde la entrada de la cloaca dentro de un minuto, luego el ave se retiró de la cámara y utilizando la temperatura corporal que se mantuvo estable y al menos durante cinco segundos. Para esto se utilizó una termocupla fina Cole-Palmer copper-constantan unida a un lector Chy 500 Thermometer (Veto®). Se calculó la conductancia a 15°C, a partir de la ecuación:  $M = C(T_b - T_a)$ , donde M es la tasa metabólica reposo, C conductancia, T<sub>b</sub> temperatura corporal y T<sub>a</sub> temperatura ambiental de la cámara de registro.

#### **2.4 Extracción Sangre y Hematocrito**

Al final del registro de respirometría de tasa metabólica basal (para *Z. capensis*) a las segunda y cuarta semana (después de medir la masa y temperatura corporal), se

realizó una extracción de sangre, desde la vena braquial del ala izquierda, mediante una punción con aguja de 25 g, extrayendo ceca de un 1 % de sangre en masa corporal ( $0,01 \text{ mL g}^{-1}$  o  $10 \mu\text{L g}^{-1}$ ), mediante capilares heparinizados (sódica) de  $75 \mu\text{L}$  (Hirschmann®). El primer capilar se obtuvo aproximadamente  $20 \mu\text{L}$  sellándose en un extremo para cuantificar el hematocrito. El resto de sangre se recolectó y se depositó en un tubo de  $1,5 \text{ mL}$  con  $20 \mu\text{L}$  (para *Z. capensis*) de heparina ( $5000 \text{ u.i mL}^{-1}$ ) (Fresenius Kabi, Laboratorio Sanderson S.A, Chile), esta sangre se utilizó para los análisis de enzimas metabólicas.

El capilar para hematocrito se colocó en una microcentrífuga (MX-12, LW Scientific, Estados Unidos) a  $12000 \text{ rpm}$  (equivalente a  $13500 \text{ rcf}$ ) por  $8 \text{ min}$  a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ). Mediante una regla milimétrica se cuantificó la distancia entre extremos de la fase con eritrocitos empaquetados y la distancia entre extremos de la muestra total (plasma más eritrocitos). Se calculó la razón de la primera respecto a la segunda distancia multiplicando por cien, así obtener la proporción de eritrocitos respecto a plasma.

La sangre para enzimas metabólicas se centrifugó (M-240R, Boeco, Alemania) a  $10000 \text{ rpm}$  (equivalente a  $9500 \text{ rcf}$ ) por  $10 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ , para separar los eritrocitos del plasma. Ambas fases se recolectaron y se almacenaron por separado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta ser analizadas. Además, el plasma se almacenó en dos submuestras, una de  $25 \mu\text{L}$  para la cuantificación de osmolalidad y otra de mayor volumen para análisis de estatus oxidativo (de moléculas prooxidantes y antioxidantes).

## **2.5 Capacidad de concentración y osmolalidad de fluidos corporales**

La función osmorregulatoria se evaluó mediante la capacidad de concentración se aplicó una dosis ajustada a la masa corporal ( $0,02 \text{ mL g}^{-1}$ ) de solución acuosa de

NaCl a concentración de 600 mmol L<sup>-1</sup> (véase Poulson & Bartholomew, 1962; Sabat et al. 2004a; Sabat et al., 2006). Esta se realizó mediante una ingesta con jeringa, entregándola cercana de la glotis de las aves, dispensándolo en micro dosis de aproximadamente 40 µL para disminuir la regurgitación. Luego, los animales se dispusieron en cajas cerradas con una reja en la base, que permite la caída de orina y fecas a un recipiente con aceite mineral (vaselina líquida, Droguería Michelson, Chile). Se reviso la caja de orina cada 30 min. Sabat et al. (2004a) muestra que la capacidad máxima de concentración ocurre entre 60 min a 90 min en paseriformes con modo de vida costero y luego de esto, entre 15 a 30 min la osmolalidad disminuye entre un 4 a 14 %. En este trabajo se recolecto solo la orina que los animales excretaban, con lo cual, se representa la capacidad de concentración ya ocurrido todos los mecanismos de modificación post-renal (Hughes, 2003). En todos los ensayos las aves solo orinaron luego de dos horas posterior a la aplicación de la dosis y la orina luego de esto no fue suficiente para realizar mediciones en el tiempo. Debido a lo anterior, las orinas representan la capacidad de concentración máxima en el periodo de dos horas. La orina se recolecto con micropipetas evitando residuos sólidos de ácido úrico. Esta se centrifugo a 10000 rpm (9500 rcf) por 5 min para separar la orina de contaminantes en la muestra, y debido a la diferencia de densidad entre sedimento y vaselina, es posible separar la orina, la cual se aisló y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. La osmolalidad del plasma y orina se cuantifica en un osmómetro Wescor 5130B. Las muestras se descongelaron hasta quedar completamente líquidas a temperatura ambiente. Todas las mediciones de cada ave se realizaron al menos en duplicado y se reporta el promedio de las mediciones de osmolalidad.

## **2.6 Tasa de consumo de agua**

Con el fin de analizar el posible efecto del consumo de agua con salinidad moderada en el componente de entrada del balance hídrico y de la función de osmorregulación, se investigó si el desafío osmorregulatorio es causado principalmente por la deshidratación o la restricción hídrica, en lugar del consumo y procesamiento de sales. Para ello, la tasa de consumo de agua durante la primera, tercera y cuarta semana fue cuantificada en *Z. capensis*. Al inicio de cada semana de aclimatación, las aves ayunaron de agua y alimento por tres horas en la mañana desde próximo al inicio del ciclo de luz de día (9:00-12:00). Luego se les entregó el agua designada para el tratamiento (salinidad moderada o baja) y alimento. Se cuantificó la masa del vaso con agua al inicio y luego de dos horas para el consumo. Se corrigió el consumo por la pérdida de agua por evaporación mediante el uso de dos vasos de igual forma y tamaño, con una cantidad similar de agua, para luego sustraer este valor respecto a todos los vasos asignados a las aves.

## **2.7 Enzimas metabólicas**

La capacidad metabólica de los eritrocitos se evaluó mediante la cuantificación de la actividad enzimática de la enzima citrato sintasa y citocromo c oxidasa. Para medir esto, los eritrocitos empaquetados se descongelaron y depositaron en un tubo. Luego la muestra fue pesada en una balanza analítica ( $\pm 0,0001$ ) y se diluyó en buffer fosfato (frío) de 0,1 M más 2 mM de EDTA (pH 7,3) en una proporción 1:5 ( $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) para alcanzar una concentración de  $0,25 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ . La dilución se homogenizó bajo hielo mediante trituración mecánica con vástagos. Luego las muestras se sonicaron en hielo usando un sonicador Ultrasonic Processor (VCX 130) de 130 Watt, 14 veces en ciclos de cavitación de 20 segundos y 10 segundos de intervalo entre ciclos. El homogenizado fue

centrifugado a 15000 rpm (21380 rcf) por 15 min a 4°C para obtener la fracción mitocondrial en el sobrenadante. Esa fracción se recolectó y se distribuyó en tres tubos en hielo, para el análisis de actividad enzimática de Citrato Sintasa (CS) (E.C. 4.1.3.7) y Citocromo C Oxidasa (COX) (E.C. 1.9.3.1) y determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976), con el estándar de albumina de suero de bovino, utilizando el kit QuickStart™.

La actividad enzimática de COX se midió utilizando un método espectrofotométrico de microplaca basado en Moyes et al. (1997) con modificaciones de Peña-Villalobos et al. (2014). En resumen, la actividad enzimática fue evaluada en un medio de reacción que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 120 mM NaCl, 250 mM Sacarosa y solución acuosa de citocromo C de corazón de equino reducido en ditioneol (0,27 mg mL<sup>-1</sup>). Se preparó una solución acuosa de citocromo C (2,7 mg mL<sup>-1</sup>) que luego se llevó a la concentración requerida con solución acuosa de ditioneol a 1M. El volumen total del medio de reacción fue de 0,2 mL. Se analizó la cinética de disminución de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 25 °C. La actividad de COX se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 21,84 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 550 nm.

La actividad enzimática de CS se cuantificó de acuerdo con el protocolo de Sidell et al. (1987) con modificaciones de Peña-Villalobos et al. (2014). El medio de ensayo contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM ácido 5,5'ditioneol- (2-nitrobenzoico), 30 mM Acetil Coenzima A (Acetil CoA) y 10 mM ácido oxolacético (oxolacetato, OAA) en un volumen final de 0,2 ml. La enzima CS cataliza la reacción entre acetil CoA y OAA para formar ácido cítrico. Se analizó la cinética de incremento en la extinción a 412 nm, medida en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 25°C.

Se calculo la actividad utilizando el coeficiente de extinción molar de  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 412 nm.

## **2.8 Estatus oxidativo**

El balance oxidativo depende de la capacidad antioxidante y daño oxidativo. Los cuales se cuantifico en el plasma de los individuos mediante el método en Navarrete et al. (2021). La capacidad antioxidante total (TAC, por sus siglas en inglés) se cuantifico mediante el ensayo CUPRAC (en inglés, cupric reducing antioxidant capacity) basado en el protocolo de Apak et al. (2004), que permite cuantificar la cantidad de moléculas antioxidantes no-enzimáticas. El daño oxidativo se estimó mediante el ensayo TBARS (en inglés, thiobarbituric acid reactive substances) basado en el protocolo de Okhnawa et al. (1979) para analizar los niveles de lipoperoxidación. Ambos protocolos sufrieron modificaciones para llevarlos a cabo en microplacas, las cuales se describirán a continuación.

En el ensayo CUPRAC se midió la intensidad de colorimetría del complejo cobre-neocuproína que se redujo desde iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones  $\text{Cu}^{1+}$  por la acción de moléculas antioxidantes en la muestra, generando una coloración azulada, cuantificando la absorbancia a 450 nm (Apak et al. 2008). Se preparo un medio de reacción en volumen en proporción para microplaca basado lo propuesto por Apak et al. (2004) pero con modificaciones, que contiene 10 mM de Cloruro de Cobre (II), 1 M de Acetato de Amonio (pH 7,0) como buffer, 7,5 mM de neocuproína. A diferencia de Apak et al. (2004) no se añadió agua al medio de reacción, lo cual no tuvo consecuencias en la linealidad de la curva de calibración ni en la saturación del ensayo o en el rango de concentración de la curva de calibración con el estándar (de 0 a 1 mM). El medio de reacción se terminó de

preparar al añadir el volumen de muestra o estándar y se deja incubar por una hora a 25°C. Se utilizo trolox como estándar, tal que la capacidad antioxidante se describe como capacidad antioxidantes de equivalentes de trolox. El volumen final de reacción es de 0,205 mL, el volumen de cada reactante se ajustó para un ensayo de microplaca respecto a las proporciones señaladas por Apak et al. (2004). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 450 nm a 25°C. El buffer de dilución de las muestras fue PBS.

En el ensayo TBARS midió la intensidad de formación de aductores de ácido 2-tiobarbiturico (TBA). Se forma a partir de la reacción con moléculas de malondialdehído (MDA) a una razón de 1:2 (MDA: TBA). Se cuantificó MDA plasmático que es un indicador del daño oxidativo a nivel sistémico. El protocolo se basó en Okhnawa et al. (1979) pero con modificaciones. En frío, se añadió a la muestra una solución (fría en hielo) de antioxidante 5% Butil-hidroxitolueno (BHT) para evitar la formación y el efecto de moléculas prooxidantes durante el procesamiento de la muestra de plasma, en una proporción volumen/volumen 1:100 (BHT:muestra). La dilución de la muestra se realizó en KCl al 1,15%. Se preparo por separado varias soluciones acuosas de 8% SDE (%p/v), 55 mM TBA en ácido acético al 20% (%v/v). Se preparó el medio de reacción primero añadiendo relación 3:2 de muestra y SDE, incubando por 5 minutos en hielo. Luego se mezcló un medio de reacción de proporción volumen/volumen 4:3:1 de agua, TBA y muestra. Este medio se incubó por una hora a 95°C en un baño seco. Luego de este periodo rápidamente se extrajo la muestra y se enfrió hasta temperatura ambiente en menos de 4 minutos en hielo. Se utilizo un tubo control con agua y se analiza la disminución de la temperatura de este tubo con un termómetro de mercurio. Las muestras a temperatura ambiente (25°C) se centrifugó a 4000 rpm (1520 rcf) por 10

minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se colocó un volumen de 0,2 ml en una microplaca. Se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 532 nm a 25°C. Se cuantificó el nivel de MDA en las muestras mediante una curva de calibración con el protocolo antes mencionado reemplazando por soluciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) un análogo al MDA también llamado Malondialdeido bis (dimetil acetal), en un rango de concentraciones de 0 a 125 µM en reemplazo de la muestra animal. El blanco utiliza buffer de KCl.

## **2.9 Análisis estadístico**

El análisis del efecto de la aclimatación sobre los parámetros bioquímicos, metabólicos, osmorregulatorios y enzimáticos fue evaluado mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA, del inglés) a dos tiempos durante el período de aclimatación: luego de la aclimatación al día 14 a 27°C y al día 28 a 17 °C. El análisis implica a los factores independientes la salinidad, el factor tiempo corresponde al tiempo experimentación en conjunto a la temperatura de aclimatación (27 °C y 17 °C) y el factor interacción correspondió a la salinidad y a la temperatura de aclimatación. Se utilizó una análisis de comparaciones múltiples o análisis *a posteriori* de Fisher LSD para analizar la evidencia de efecto entre los tratamientos térmicos e hidrosalinos. Además, se realizó análisis de correlaciones mediante prueba de correlación de Pearson para las variables de actividad enzimática y tasa metabólica, y entre variables osmorregulatorias y de estado oxidativo. Para el análisis de resultados mediante Pruebas de Hipótesis y de correlación de Pearson, se utilizó la nomenclatura propuesta por Muff et al (2022) para la interpretación del p-valor. Por lo cual, no se utilizó la concepción dicotómica de significancia si el p-valor es menor a 0,05 (véase Navarrete et al 2023).

Se utilizaron análisis paramétricos debido a que todos los datos cumplieron con los requerimientos de normalidad y homocedasticidad, evaluados mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, respectivamente. Todos los análisis estadísticos fueron ejecutados en STATISTICA® para el sistema operativo Windows.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Respuesta energética orgánica bajo la aclimatación hidrosalina y térmica.

Se encontró evidencia fuerte de variación de la masa corporal por efecto únicamente de la temperatura de aclimatación. Tal que, las aves aclimatadas a salinidad baja y moderada incrementaron su masa corporal durante la aclimatación a baja temperatura (Tabla 1). Hay ausencia de evidencia de cambios en la tasa metabólica basal o reposo asociado a los factores de aclimatación e interacción (Tabla 1). Se observó que no hubo variación en la capacidad de termorregulación mediada por los efectos del tipo de salinidad ni aclimatación térmica, que se analizó a través del RMR, la capacidad expansión metabólica (RMR/BMR) y del costo de termorregulación (RMR-BMR) (Tabla 1). Además, no hay evidencia de cambios en la temperatura corporal a 15 °C ni a 30 °C mediados por los factores de aclimatación. Se encontró evidencia moderada de un efecto de la interacción entre aclimatación térmica e hidratación salina sobre la conductancia térmica. El análisis *a posteriori* permitió establecer evidencia moderada de que las aves aclimatadas a alta salinidad disminuyen la conductancia según la aclimatación térmica a 17 °C, respecto a 27 °C. Además, se encontró una evidencia débil de que a 17 °C las aves bajo aclimatación alta salinidad presentaron menor conductancia que aves aclimatadas a salinidad baja y que las aves aclimatadas a baja salinidad mantuvieron la conductancia en el tiempo (Tabla 1).

Dado que no hubo un efecto de la salinidad, se evaluó el efecto de la historia térmica sobre los ajustes energéticos, comparando las variables respuesta entre la aclimatación a 27°C y a 17°C. Se analizó la relación entre la tasa metabólica basal y de reposo,

evidenciado una fuerte evidencia solo en aves aclimatadas a 17 °C y no para las aves aclimatadas a 27 °C (Tabla 1). Además, se observó una evidencia fuerte de correlación de la temperatura corporal a 15 °C para aves aclimatadas a 17 °C, pero no para a 27 °C (Tabla 2).

**Tabla 1.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de parámetros metabólicos energéticos. <sup>§</sup>Los valores de tasa metabólica basal y reposo están expresados en unidades masa específico. Superíndices denotan diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.

					TxS		T		S	
Variable	27-400	27-0	17-400	17-0	F	p	F	p	F	P
<b>Mb</b>	<b>17,47<sup>a</sup></b>	<b>17,12<sup>b</sup></b>	<b>18,37<sup>a</sup></b>	<b>18,20<sup>b</sup></b>	(1,20)	0,425	(1,20)	<b>0,007</b>	(1,20)	0,518
g	$\pm 1,29$	$\pm 1,49$	$\pm 0,72$	$\pm 1,34$	0,66		15,84		0,43	
<b>BMR<sup>§</sup></b>	2,74	3,05	2,65	3,01	(1,21)	0,484	(1,21)	0,697	(1,21)	0,101
ml O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	$\pm 0,80$	$\pm 0,35$	$\pm 0,32$	$\pm 0,52$	0,508		0,155		2,934	
<b>Tb 30°C</b>	40,29	40,94	40,46	40,21	(1,21)	0,126	(1,21)	0,502	(1,21)	0,76
°C	$\pm 0,97$	$\pm 1,06$	$\pm 1,05$	$\pm 1,45$	2,536		0,466		0,096	
<b>RMR<sup>§</sup></b>	5,01	4,98	4,38	5,16	(1,22)	0,217	(1,22)	0,485	(1,22)	0,344
ml O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	$\pm 0,85$	$\pm 0,80$	$\pm 1,17$	$\pm 1,32$	1,613		0,504		0,936	
<b>Tb 15°C</b>	39,36	39,60	39,98	39,51	(1,21)	0,123	(1,21)	<b>0,08</b>	(1,21)	0,385
°C	$\pm 0,64$	$\pm 1,11$	$\pm 0,65$	$\pm 1,18$	2,587		3,391		0,786	
<b>Conductancia</b>	<b>3,85<sup>c</sup></b>	3,60	<b>3,17<sup>cd</sup></b>	<b>3,90<sup>d</sup></b>	(1,22)	<b>0,034</b>	(1,22)	0,331	(1,22)	0,346
ml O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup>	$\pm 0,70$	$\pm 0,54$	$\pm 0,73$	$\pm 0,85$	5,091		0,988		0,928	
<b>RMR/BMR<sup>§</sup></b>	1,86	1,64	1,71	1,66	(1,18)	0,925	(1,18)	0,788	(1,18)	0,239
	$\pm 0,51$	$\pm 0,30$	$\pm 0,39$	$\pm 0,36$	0,009		0,075		1,486	
<b>RMR-BMR<sup>§</sup></b>	2,27	2,20	1,73	2,43	(1,22)	0,559	(1,22)	0,703	(1,22)	0,624
ml O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	$\pm 1,14$	$\pm 1,21$	$\pm 1,01$	$\pm 1,82$	0,351		0,149		0,248	

<sup>a</sup> comparaciones en el tiempo de masa de aves a alta salinidad,  $p = 0,036$

<sup>b</sup> comparaciones en el tiempo de masa de aves a baja salinidad,  $p = 0,002$ .

<sup>c</sup> comparaciones en el tiempo de conductancia,  $p = 0,031$ .

<sup>d</sup> comparaciones entre aves a salinidad alta y baja para conductancia,  $p = 0,071$ .

Las demás comparaciones obtuvieron un  $p > 0,1$  para el análisis *a posteriori*

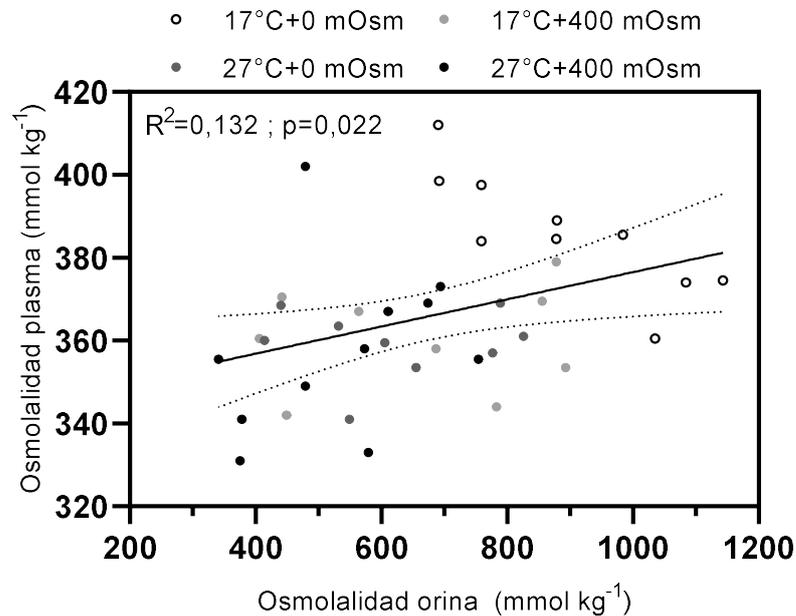
**Tabla 2.** Relación de la tasa metabólica de reposo con la temperatura corporal y la tasa metabólica basal masa específico, categorizadas por temperatura de aclimatación. Se muestran los intervalos de confianza al 95% de las pendientes de la relación.

		27°C	17°C
<b>Pendiente RMR y Tb 15°C</b>	<b>IC 95%</b>	[-0,595 to 0,120]	[0,1363 to 1,102]
<b>Parámetros de correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	0,083	0,253
	<b>P</b>	0,182	<b>0,014</b>
<b>Pendiente RMR y BMR</b>	<b>IC 95%</b>	(-0,4817 to 0,6764)	(0,2928 to 2,291)
<b>Parámetros de correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	0,0057	0,73
	<b>p</b>	0,256	<b>0,013</b>

### **3.2 Impacto de la aclimatación térmica e hidrosalina sobre la función osmorregulatoria**

Se observó fuerte evidencia de un efecto de la aclimatación térmica e hidrosalina, por separado, en la capacidad de concentración de orina (Tabla 3). El análisis *a posteriori* reveló que las aves aclimatadas a baja salinidad presentan un aumento en la capacidad de concentración de orina a 17°C en comparación con 27°C. Por otro lado, las aves aclimatadas a alta salinidad no mostraron cambios significativos en su capacidad a lo largo del tiempo. Además, se observó que, a 17°C existe evidencia moderada que indica que las aves a baja salinidad tienen una mayor capacidad de concentración de orina en comparación con las aves bajo hidratación moderada (Tabla 3).

La temperatura de aclimatación y la salinidad afectaron la osmolalidad del plasma (Tabla 3). En el análisis *a posteriori* se encontró una fuerte evidencia de un aumento en osmolalidad plasma desde aclimatación térmica a 27°C a 17°C, sólo en las aves de baja salinidad, y un patrón similar (aunque con evidencia débil) para aves aclimatadas a alta salinidad (Tabla 3). Además, durante la aclimatación a 17°C, las aves aclimatadas a una baja salinidad presentaron mayor osmolalidad de plasma en comparación con las aves aclimatadas a una alta salinidad (Tabla 3). Finalmente, se encontró una evidencia moderada de una correlación positiva entre la capacidad de concentrar la orina y la osmolalidad del plasma (Figura 1).



**Figura 1.** Relación entre la osmolalidad de la orina y la osmolalidad del plasma. Cada punto está categorizado por tratamiento salino y térmico.

Se construyó el índice U/P a partir de la relación entre la osmolalidad de orina y plasma. Se encontró evidencia débil de que la salinidad y una evidencia moderada de que la temperatura de aclimatación afecta al índice U/P. Sin embargo, el análisis de comparaciones múltiples no permitió evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3).

Respecto al hematocrito no se encontró evidencia de un efecto de la aclimatación alta salinidad, y solo se detectó un efecto débil de la aclimatación térmica. El análisis *a posteriori* revela evidencia moderada de un aumento en el hematocrito en aves aclimatadas a baja salinidad desde 27°C a 17°C (Tabla 3). Además, se observó un efecto de la aclimatación salina en la variación de la tasa de consumo de agua (Tabla 4), y el análisis de comparaciones múltiples muestra evidencia muy fuerte de que solo difieren en la tasa de consumo durante la primera semana. (Tabla 4).

**Tabla 3.** Medidas de resumen (promedio  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de los parámetros osmorregulatorios y hematológicos. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.

Variable					TxS		T		S	
	27-400	27-0	17-400	17-0	F	p	F	p	F	P
Orina mmol kg <sup>-1</sup>	532,42	<b>620,78<sup>a</sup></b>	<b>642,00<sup>b</sup></b>	<b>838,67<sup>ab</sup></b>	(1,19)	0,36	(1,19)	<b>0,009</b>	(1,19)	<b>0,005</b>
	$\pm 135,74$	$\pm 151,95$	$\pm 190,49$	$\pm 181,62$	0,879		8,606		9,829	
Plasma mmol kg <sup>-1</sup>	<b>349,00<sup>c</sup></b>	<b>359,25<sup>a</sup></b>	<b>362,75<sup>bc</sup></b>	<b>384,00<sup>ab</sup></b>	(1,16)	0,231	(1,16)	<b>0,001</b>	(1,16)	<b>0,0001</b>
	$\pm 13,14$	$\pm 7,98$	$\pm 11,04$	$\pm 15,56$	1,55		18,74		24,45	
U/P	1,51	1,73	1,81	2,26	(1,15)	0,592	(1,15)	<b>0,029</b>	(1,15)	<b>0,06</b>
	$\pm 0,38$	$\pm 0,42$	$\pm 0,52$	$\pm 0,49$	0,3		5,856		4,140	
Hematocrito %	45,12	<b>44,54<sup>d</sup></b>	45,66	<b>47,02<sup>d</sup></b>	(1,18)	0,315	(1,18)	<b>0,072</b>	(1,18)	0,493
	$\pm 2,86$	$\pm 3,77$	$\pm 1,79$	$\pm 2,92$	1,067		3,664		0,49	

<sup>a</sup> comparaciones en el tiempo en aves a salinidad baja para orina,  $p = 0,0191$ ; para plasma,  $p = 0,0007$ .

<sup>b</sup> comparaciones entre aves a salinidad baja y moderada para orina,  $p = 0,0001$ ; para plasma,  $p = 0,0003$ .

<sup>c</sup> comparaciones en el tiempo en aves a salinidad moderada para plasma,  $p = 0,055$ .

<sup>d</sup> comparaciones en el tiempo en aves a salinidad baja para PVC,  $p = 0,041$ .

Las demás comparaciones obtuvieron un  $p > 0,1$  para el análisis *a posteriori*.

**Tabla 4.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas del consumo de agua en función de la salinidad y temperatura. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.

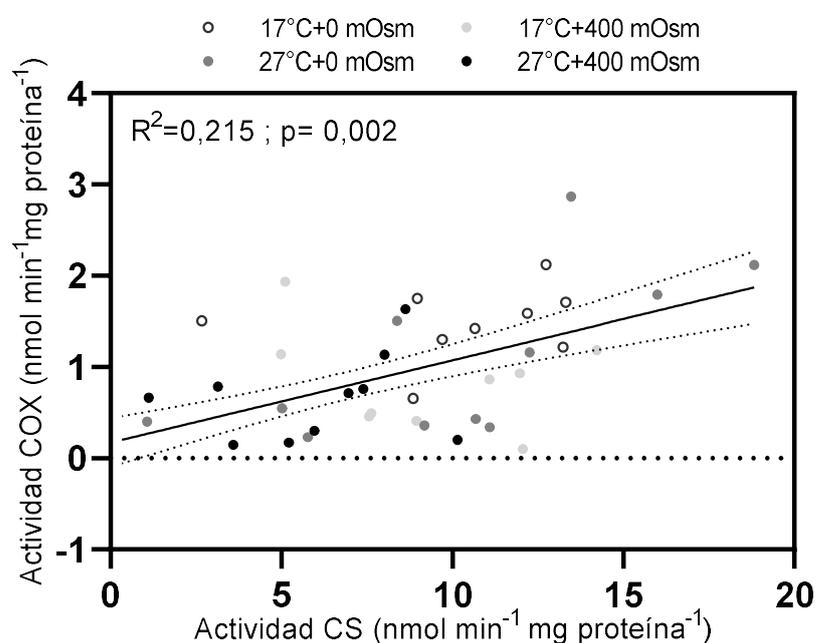
	Salinidad	Semana			TxS		T		S					
		1ra	3ra	4ta	F	p	F	p	F	P				
Consumo de agua (g)	400	<b>2,97<sup>a</sup></b>	2,33	2,65	(2,38)	0,3267	(2,38)	0,1563	(1,19)	<b>0,0313</b>				
		$\pm 0,81$	$\pm 0,80$	$\pm 0,73$	1,552		1,995				5,404			
	0	<b>2,25<sup>a</sup></b>	2,18	2,28										
		$\pm 0,59$	$\pm 0,69$	$\pm 0,51$										

<sup>a</sup> efecto de la salinidad al comparar la primera semana de aclimatación,  $p = 0,0038$ .

Los demás parámetros obtuvieron un  $p > 0,1$  para el análisis *a posteriori*.

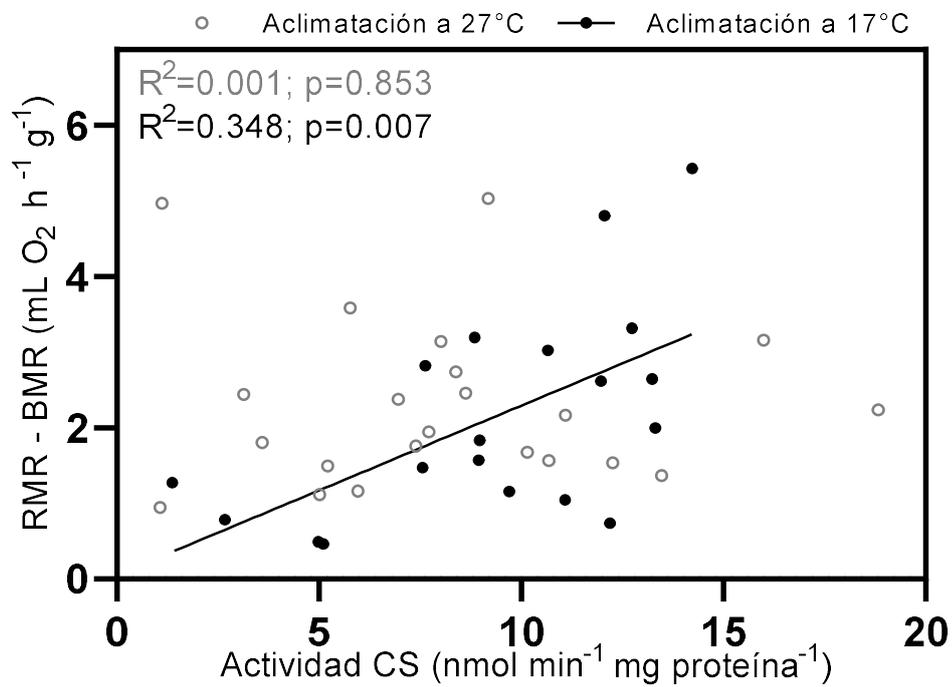
### 3.3 Metabolismo celular de eritrocitos durante la aclimatación térmica e hidrosalina y la relación con el metabolismo orgánico.

No se encontró evidencia de un efecto del tipo de hidratación, aclimatación térmica o su interacción sobre la variación en la actividad de las enzimas mitocondriales CS y COX (Tabla 5). Sin embargo, se encontró una evidencia fuerte de una correlación moderada y positiva entre COX y CS (Figura 2).



**Figura 2.** Relación entre la actividades de enzimas mitocondriales (CS y COX) de los eritrocitos de *Zonotrichia capensis*. Cada punto está categorizado por tratamiento de aclimatación salina y térmica.

El análisis de correlación reveló una relación positiva entre la expansibilidad metabólica y la actividad de citrato sintasa, sólo durante la aclimatación a 17°C, pero ausente a 27°C (Figura 3).



**Figura 3.** Relación entre la expansividad metabólica y la actividad de la citrato sintasa. La medida de expansividad metabólica fue calculada como RMR – BMR y se categorizó según la aclimatación térmica a 27°C y 17°C.

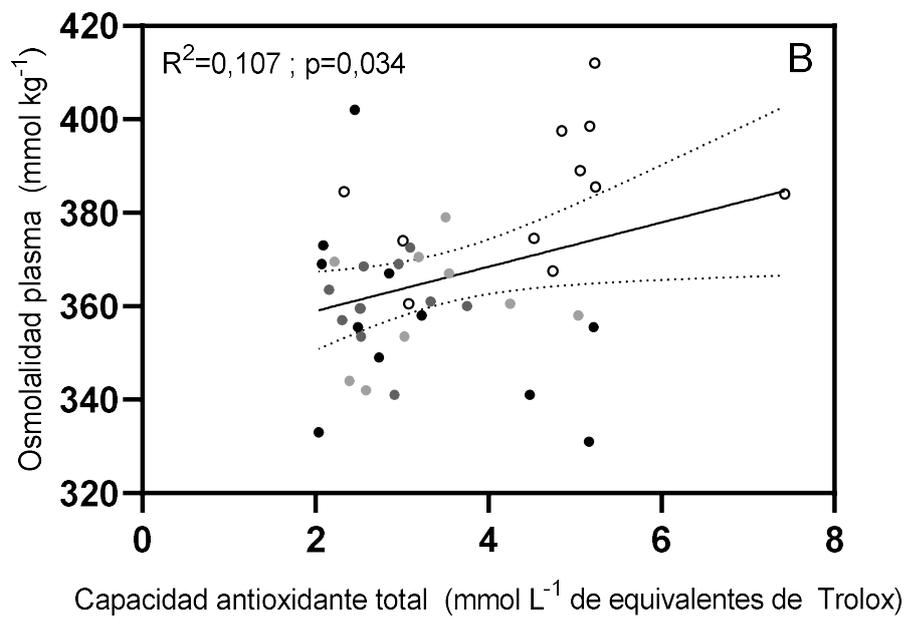
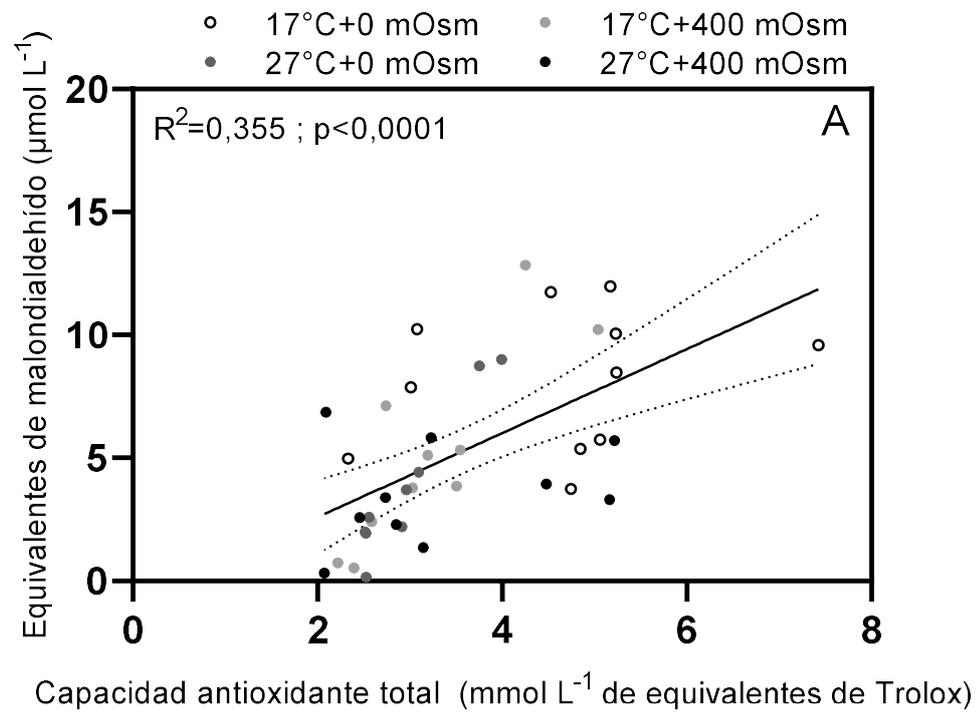
**Tabla 5.** Medidas de resumen (media ± DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas de la actividad de enzimas mitocondriales de los eritrocitos.

					TxS		T		S	
Variable	27-400	27-0	17-400	17-0	F	p	F	p	F	P
CS	6,02	9,41	9,28	8,93	(1,16)	0,102	(1,16)	0,203	(1,16)	0,214
nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup>	±2,78	±4,73	±3,25	±4,24	3,016		1,758		1,673	
COX	0,87	1,00	0,92	1,47	(1,17)	0,476	(1,17)	0,397	(1,17)	0,097
nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup>	±0,67	±0,90	±0,58	±0,41	0,531		0,755		3,089	

### **3.4 Estado oxidativo durante la aclimatación térmica e hidrosalina.**

Se encontró evidencia moderada de un efecto de la temperatura de aclimatación y de la interacción entre salinidad y temperatura de aclimatación en los niveles de TAC, así como una evidencia débil de un efecto de la salinidad. El análisis de comparaciones múltiples indicó una evidencia muy fuerte de un incremento niveles de TAC desde 27°C a 17°C en las aves aclimatadas a baja salinidad (Tabla 6). En cambio, las aves aclimatadas a alta salinidad no mostraron variación en sus niveles de TAC debido a un efecto de la temperaturas de aclimatación. Además, se encontró evidencia muy fuerte de que, a 17°C, las aves aclimatadas a baja salinidad presentaron niveles de TAC más altos que las aves aclimatadas a salinidad moderada (Tabla 6). Por otro lado, los niveles de MDA no mostraron evidencia de haber sido afectados por los factores de salinidad, temperatura, ni interacción (Tabla 6). Asimismo, no se encontró evidencia de un efecto de estos factores en la variabilidad del índice TAC/MDA (Tabla 6).

Por último, se encontró que la variabilidad de TAC se explica en un 35,5% por la variabilidad de MDA (Figura 5A). Finalmente, se encontró que la variabilidad de la osmolalidad de la orina se explica en un 10,7% debido a la variación de TAC en plasma (Figura 5B).



**Figura 4.** Capacidad antioxidante y su relación con el estrés oxidativo (a) y los parámetros osmorregulatorios (b).

**Tabla 6.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) y resultado del ANOVA de medidas repetidas los parámetros de estado oxidativo. Superíndices denotas diferencias entre grupos mediante el análisis *a posteriori*.

					TxS			T		S	
Variable	27-400	27-0	17-400	17-0	F	p	F	p	F	P	
<b>TAC</b>	3,16	<b>2,87<sup>b</sup></b>	<b>3,25<sup>a</sup></b>	<b>4,77<sup>ab</sup></b>	(1,19)	<b>0,035</b>	(1,19)	<b>0,039</b>	(1,19)	<b>0,088</b>	
mM	$\pm 1,16$	$\pm 0,60$	$\pm 0,88$	$\pm 1,36$	5,133		4,937		3,229		
<b>MDA</b>	3,56	3,80	5,19	8,19	(1,14)	0,325	(1,14)	<b>0,093</b>	(1,14)	0,224	
$\mu$ M	$\pm 2,07$	$\pm 3,29$	$\pm 3,95$	$\pm 2,99$	1,042		3,240		1,619		
<b>TAC/MDA</b>	1,09	0,93	0,92	0,65	(1,12)	0,566	(1,12)	0,603	(1,12)	0,344	
$\times 10^3$	$\pm 0,59$	$\pm 0,39$	$\pm 0,82$	$\pm 0,30$	0,349		0,285		0,971		

<sup>a</sup> comparaciones entre aves a salinidad moderada y baja para TAC,  $p = 0,0029$

<sup>b</sup> comparaciones en el tiempo para aves a salinidad baja para TAC,  $p = 0,0042$

Las demás comparaciones obtuvieron un  $p > 0,1$  para el análisis *a posteriori*

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Flexibilidad metabólica y osmorregulatoria por la aclimatación térmica y salina

Se ha documentado que la aclimatación a temperaturas bajas y salinidades altas en *Z. capensis*, producen un incremento de la tasa metabólica basal (BMR), que podría estar asociado a mayor capacidad osmorregulatoria y termogénica (Peña-Villalobos et al., 2013; Sabat et al., 2017; Maldonado et al., 2009; Peña-Villalobos et al., 2014). Sin embargo, en este estudio no se observó una variación de la tasa metabólica (de BMR ni RMR) por un efecto de la aclimatación térmica ni hidrosalina (Tabla 1). Esto podría deberse que no hay variación de la capacidad osmorregulatoria y en el caso de la aclimatación térmica puede explicarse porque el periodo de aclimatación y la intensidad (i.e., magnitud de la temperatura) de la aclimatación no habrían alcanzado un umbral necesario para producir un cambio fenotípico (Cavieres & Sabat 2008; Bozinovic et al., 2014; Pollock et al., 2019).

Se ha propuesto que el cambio en BMR durante la aclimatación al consumo de sales es una respuesta a un mayor gasto energético en el proceso de osmorregulación (Gutiérrez et al. 2012; Sabat et al., 2017; Sabat et al., 2019). Dado que no hay variación de la capacidad osmorregulatoria encontrada en este estudio (Tabla 3, índice U/P), la ausencia de la variación en BMR entre tratamientos no es sorprendente. En este sentido, es posible que las aves presenten un “margen de tolerancia” (e.g., *sensu* Diamond & Hammond 1992) de la capacidad osmorregulatoria que permite procesar la

concentración salina aplicada (Layton et al., 2000; Casotti et al., 2000; Sabat et al. 2009; Peña-Villalobos et al. 2013; Sabat et al. 2017; Sabat et al. 2019) (Tabla 3). De esta manera, se infiere que la concentración de sal en este estudio podría no ser un desafío osmorregulatorio significativo.

Hay estudios que sugieren que el periodo de interacción del organismo con el ambiente térmico puede modular la respuesta plástica del BMR en situaciones experimentales. En este sentido, en *Z. capensis* la expresión de cambio (i.e., flexibilidad) de BMR depende del periodo de la aclimatación de al menos cuatro semanas anteriores (Barceló et al., 2009). Además, se ha reconocido que la intensidad de la temperatura puede producir cambios en BMR y Mmax (i.e., máxima capacidad termogénica) en aves (Stager et al., 2021; Oboikovitz & Swanson, 2022). En el caso de *Z. capensis*, se ha observado que el aumento en el BMR está vinculado con la aclimatación a 15 °C en comparación con 30 °C (Cavieres & Sabat, 2008; Maldonado et al., 2009; Peña-Villalobos et al., 2014). Sin embargo, algunos estudios indican que la variación en la tasa metabólica no es siempre una respuesta ante la aclimatación o aclimatización térmica en temperaturas por debajo de la zona termoneutral (véase Sabat et al., 2006a). Por ejemplo, en *Z. capensis*, no se observan cambios en el BMR cuando se realiza una comparación entre verano e invierno (Maldonado et al., 2009; Peña-Villalobos et al., 2014). Paralelamente, poblaciones de *Z. capensis* de diferentes climas presentan variaciones en la flexibilidad metabólica frente a la aclimatación térmica, es más, poblaciones de climas áridos presentan ausencia de flexibilidad del BMR (Cavieres & Sabat, 2008). Hipotetizamos que el incremento de la temperatura y la sequía en climas mediterráneos en las últimas décadas (Boisier et al., 2016; Burger et al., 2018) podría haber tenido un impacto sobre la capacidad de aclimatación térmica (e.g., Cavieres et

al., 2017). A partir de esto, no sabemos si este tiempo de aclimatación fue adecuado para cambiar el BMR y RMR (ver Tabla 1), o cómo influyó en la adaptabilidad metabólica de *Z. capensis*, teniendo en cuenta las variaciones climáticas recientes.

#### **4.2 Ajustes de eficiencia energética según las aclimatación térmica e hidrosalina**

Proponemos que ante la ausencia de cambios en BMR y RMR durante la aclimatación térmica e hidrosalina, se pudieron generar cambios en la eficiencia energética, es decir, modificaciones en el aprovechamiento de nutrientes y energía. De esta manera los ajustes en la eficiencia energética permiten hacer frente a condiciones que impactan sobre el gasto energético sin la necesidad de recurrir a cambios en BMR (Peña-Villalobos et al., 2014; Navarrete et al., 2023).

La variación de la masa corporal es un indicador del balance energético, dado que esta es afectada negativamente por el gasto de energía (Klaassen et al., 2004) y positivamente por ajustes en la eficiencia energética (Bateson et al., 2021). En este caso, el incremento en la masa corporal sólo durante la aclimatación a baja temperatura es consistente en que este factor podría impactar en mayor medida el gasto energético en comparación a la salinidad (ver Sabat et al., 2006a; Briga & Verhulst, 2017). En este trabajo estimamos que la tasa metabólica en reposo incrementa 120 a 280% respecto la tasa metabólica basal (Tabla 1), mientras que en la literatura se reporta que la aclimatación hidrosalina puede incrementar la tasa metabólica basal entre 15-20% (Sabat et al., 2017; Sabat et al., 2019). En este sentido, la variación de la masa corporal y ausencia de variación del gasto energético, puede ser un indicador de ajustes en la eficiencia a partir de la aclimatación térmica dado el mayor impacto de la temperatura ambiental sobre el gasto energético.

La evidencia de ajustes de la eficiencia energética se infiere a partir de dos aspectos: En primer lugar, el acoplamiento entre BMR y RMR sólo en la aclimatación a baja temperatura (17°C) (Tabla 2), indica un ajuste en el gasto energético sólo a baja temperatura. Además, se infiere que el ajuste del gasto energético está limitado por condicionantes del BMR, lo que podría afectar la capacidad termogénica y tener un impacto sobre la regulación de la temperatura corporal (Tabla 2). En este sentido, Barceló et al., (2017) muestra que, en aves, el BMR se relaciona con la capacidad digestiva de adquisición de nutrientes. De esta manera, es posible que el ajuste metabólico a baja temperatura se deba a la variabilidad y a restricciones en los procesos de adquisición de energía (e.g., Koteja, 1996a; Koteja, 1996b). Sin embargo, cierta cautela se debe tener al interpretar esta respuesta y su extrapolación hacia la vida libre, ya que existe evidencia que en animales de terreno hay una baja correlación entre la BMR y RMR (Briga & Verhulst, 2017), de manera que otras variables pueden estar en juego.

Se ha documentado que la evidencia de variabilidad interindividual de la temperatura corporal a lo largo de la vida podría reflejar diferencias en los componentes de la dinámica energética (Tapper et al. 2021), es decir, de la aislación térmica, pérdida y/o producción de calor (McNab, 1980). Los ajustes en el gasto energético también pueden involucrar la modulación de la dinámica energética, lo que configura diferentes estrategias de termorregulación. En este contexto, pareciera que los individuos de *Z. capensis* pueden termorregular sin que exista una variación significativa en la capacidad termogénica (e.g., BMR y RMR) (Peña-Villalobos et al., 2014; Navarrete et al., 2023). Nuestros resultados sugieren que la estrategia de termorregulación en *Z. capensis* se ve modulada por la interacción de la aclimatación térmica e hidrosalina, en tanto, las aves aclimatadas a una salinidad moderada disminuyeron la conductancia térmica con el

tiempo (entre 27°C y 17°C) en comparación con las aves de salinidad baja (Tabla 1). Esto podría indicar una respuesta asociada al principio de asignación de energía, en el que las aves de salinidad moderada expresan un fenotipo ahorrador de energía al reducir la pérdida de energía, lo que posiblemente redirige la ganancia de energía hacia otros procesos, tales como la osmorregulación. De esta manera, los organismos parecieran presentar una estrategia de ajuste en la eficiencia energética frente a la aclimatación a baja temperatura, como una alternativa a la variación de la capacidad metabólica. En particular, pueden reducir el costo energético de la termorregulación y/o modificar el aislamiento térmico para evitar la pérdida de energía en forma de calor

#### **4.3 Capacidad metabólica de eritrocitos durante la aclimatación térmica y salina y predicción de la capacidad termogénica**

La ausencia de variación de actividad enzimática sugiere que la aclimatación térmica y salina en este trabajo no conlleva ajustes en el metabolismo energético. Por un lado, la ausencia de un estrés osmótico puede deberse a la cantidad de sal consumida por las aves es inferior al que se requiere para modificar la concentración del plasma, en comparación con la cantidad de sal suministrada a otros estudios (e.g., Bollinger et al., 2005). Por otro lado, la ausencia de variación de actividad metabólica de los eritrocitos asociado a la temperatura puede deberse a la ausencia de variación de las capacidades termogénicas entre tratamientos experimentales (Tabla 5). La variación en la capacidad termogénica, influenciada por la cantidad de hormonas moduladoras del gasto energético circulantes en el plasma, como las hormonas tiroideas (Pani & Bal, 2022), podría afectar la bioquímica de los eritrocitos. Sin embargo, es importante destacar que, bajo las condiciones de aclimatación utilizadas, no se observó flexibilidad a nivel del gasto energético general, lo que se correlaciona funcionalmente con la ausencia de

cambios a nivel bioquímico, expresados como modificaciones en la actividad de enzimas metabólicas de los eritrocitos.

El metabolismo energético orgánico es un proceso que se integra a cada escala de organización biológica, desde las células al organismo completo y obedece a la sumatoria de los niveles de gasto energético de todos los tejidos metabólicamente activos (Savage et al. 2007; Miettinen et al., 2016). En este sentido, es muy probable que los eritrocitos contribuyan al metabolismo orgánico (Malkok et al., 2021). Aunque este trabajo no se centró más allá de la contribución, se infiere que la capacidad bioquímica de los eritrocitos puede actuar como un predictor de la capacidad de expansión del metabolismo (Figura 3). Lo cual es interesante que se refleja a través de la enzima citrato sintasa, dado que se ha observado que esta enzima puede ser un predictor de la capacidad oxidativa máxima de un tejido (Vézina et al., 2005). De esta manera, los ajustes energéticos orgánicos asociados a la habituación térmica podrían verse reflejados a través de la capacidad bioquímica de los eritrocitos. Estos ajustes metabólicos en los eritrocitos podrían, a su vez, predecir las limitaciones fisiológicas de los organismos para enfrentar desafíos termorregulatorios. Esta capacidad de predicción podría deberse al efecto de señales sistémicas, tales como los niveles de moduladores hormonales (ej. corticosterona, hormonas tiroideas) que participan en la coordinación de remodelaciones sistémicas y que modulan tanto la maquinaria de producción de energía (Jimeno et al., 2018; Jimeno et al., 2020), y la tasa metabólica (ver revisión de Pani & Bal, 2022). En este sentido, un aspecto que vale la pena explorar en el futuro es si la capacidad metabólica de los eritrocitos se corresponde con la actividad metabólica de otros tejidos. Es importante determinar si el metabolismo de los eritrocitos realmente representa los ajustes bioquímicos a escala sistémica en órganos como el corazón,

cerebro, hígado, riñones y músculo esquelético, ya que estos órganos representan la mayor parte del metabolismo de reposo (Wang et al., 2001; Müller et al., 2011).

Por otro lado, la relación positiva entre actividad las enzimas COX y CS (Figura 2) sugiere que la variación de la actividad mitocondrial es un proceso coordinado entre distintas vías metabólicas (e.g., ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones). Un aspecto importante en la regulación de la actividad mitocondrial se relaciona con la dependencia de la actividad de COX en la composición de ácidos grasos de la membrana mitocondrial. El aumento de actividad depende de una mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de la membrana mitocondrial (Seebacher et al., 2010). Las semillas del alpiste, principal alimento utilizado, tiene bajos niveles de lípidos (respecto a proteínas y carbohidratos), incluidos los ácidos grasos poliinsaturados (Maldonado et al., 2012; Cogliatti et al., 2014). Con lo cual, la dieta podría haber tenido un papel más importante que los posibles efectos de la salinidad y la temperatura en la regulación de la actividad mitocondrial (Guderley et al., 2005; Hulbert et al., 2005; Hulbert et al., 2006).

En resumen, el estudio de la capacidad bioquímica de los eritrocitos y su relación con la habituación térmica y las señales hormonales abre nuevas vías de investigación que podrían enriquecer nuestra comprensión de cómo los organismos se adaptan y regulan su metabolismo para enfrentar los desafíos del entorno cambiante. Estos hallazgos podrían tener implicaciones significativas para la ecología, fisiología y conservación de las especies en un mundo en constante cambio.

#### **4.4 Capacidad osmorregulatoria y estrés oxidativo durante la aclimatación térmica y salina.**

El impacto de la salinidad sobre la variación de la función osmorregulatoria es contrario a lo esperado (Goldstein & Zahedi 1990; Dawson et al. 1991; Sabat, 2000).

Nuestros resultados mostraron un efecto de la aclimatación térmica e hidrosalina por efectos independientes (Tabla 3), lo que solo ocurre en aves sometidas a una baja salinidad y temperatura de aclimatación, mostrando un incremento en la capacidad de concentración de la orina (razón U/P) (Tabla 3). La causa de esta contradicción puede estar dado por cambios en el funcionamiento basal del sistema osmorregulatorio entre regímenes salinos. Se observa que la magnitud basal de la osmolalidad del plasma determina en una parte la osmolalidad de la orina (Figura 1). Sin embargo, es posible que la variación no tenga un impacto significativo la capacidad de homeostasis osmorregulatoria y el balance hídrico, debido a que no encontramos un efecto de la aclimatación térmica ni régimen salino sobre la magnitud de la tasa de hidratación o en el metabolismo energético total (Tabla 4) (Hawkins & Corbit, 1973).

Por otro lado, la variación de la capacidad de concentración de la orina pudo deberse a la influencia de los niveles de antioxidantes circulantes sobre la osmolalidad del plasma (Figura 4B), tal que aves sometidas a una baja salinidad y temperatura incrementan los niveles de antioxidantes. En este sentido, los niveles de antioxidantes no enzimáticos se han reportado que pueden responder fuertemente a los niveles de ácido úrico en el plasma (Costantini, 2010), principal desecho nitrogenado en aves (Dawson et al. 1991; Sabat et al. 2004; Aldea & Sabat, 2007). El aumento de ácido úrico circulante puede incrementar debido al aumento del catabolismo proteico asociado a al gasto energético de la actividad muscular (contracción) y locomotora (Alan & McWilliams, 2013; Dick & Guglielmo, 2019; Gutierrez et al., 2019). De este modo, es posible que los animales aclimatados a una baja salinidad y a baja temperaturas tuviesen mayor actividad muscular y catabolismo proteico que los animales aclimatados al régimen salino moderado.

Al mismo tiempo, la variación en los niveles de moléculas prooxidantes podría constituir un indicador de la actividad metabólica. Como consecuencia de esta actividad metabólica, los niveles de antioxidantes aumentan, lo que compensa el incremento de los niveles de prooxidantes (Tabla 6 y Figura 4A). En este sentido, se ha observado una interacción entre la actividad locomotora y el estado oxidativo (Fletcher et al., 2015). Además, se ha evidenciado que el ácido úrico puede inhibir la liperoxidación (Smith & Lawing, 1983; Ames et al., 1991), lo que podría explicar la ausencia de variación en el estado oxidativo (razón MDA/TAC) entre los tratamientos experimentales (Costantini & Verhulst, 2009).

## 5 CONCLUSIONES

En resumen, no se cumplieron las hipótesis propuestas dado la ausencia de variación en la tasa metabólica orgánica, de las capacidades termogénicas y osmorregulatorias y del metabolismo del eritrocito asociado a la carga salina. Contrario con lo observado en la mayoría de la literatura, se destaca la falta de variación en el BMR debido a la aclimatación al consumo de sales, lo cual sugiere la presencia de un margen de seguridad de la capacidad osmorregulatoria para enfrentar el consumo de soluciones salinas moderadas a altas. Los ajustes en la eficiencia energética durante la aclimatación térmica podrían tener un impacto más significativo en el gasto energético en comparación con la salinidad. Esta adaptación posiblemente permite afrontar desafíos sin requerir cambios en la tasa metabólica basal, lo que pone de relieve el posible papel crucial de la dieta en la regulación de la actividad mitocondrial. Además, la capacidad metabólica de los eritrocitos emerge como un potencial predictor de la capacidad termogénica, sugiriendo que las adaptaciones bioquímicas en los eritrocitos reflejan ajustes energéticos a nivel del organismo en respuesta a la aclimatación térmica. Los resultados revelan hallazgos inesperados en cuanto a la capacidad osmorregulatoria, con aves sometidas a baja salinidad y temperatura exhibiendo una mayor capacidad de concentración de la orina. Se sugiere que los niveles de antioxidantes circulantes puedan influir en esta variabilidad. En conjunto, los procesos de aclimatación térmica y salina pueden influir de manera diversa en el metabolismo energético y la capacidad osmorregulatoria de las aves. Estos resultados abren nuevas avenidas de investigación para comprender cómo los organismos se adaptan en un entorno en constante cambio.

## 6 REFERENCIAS

- Alan, R. R., & McWilliams, S. R. (2013). Oxidative stress, circulating antioxidants, and dietary preferences in songbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(3), 185-193.
- Aldea, P., & Sabat, P. (2007). Osmoregulatory responses to dietary protein and water intake in the granivorous *Zonotrichia capensis* (Passerine, Emberizidae). *Revista chilena de historia natural*, 80(4), 447-454.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6858-6862.
- Amores, M. J., Verones, F., Raptis, C., Juraske, R., Pfister, S., Stoessel, F., ... & Hellweg, S. (2013). Biodiversity impacts from salinity increase in a coastal wetland. *Environmental science & technology*, 47(12), 6384-6392.
- Apak, R., Glüclüç, K. G., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981. doi: 10.1021/jf048741x
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4).
- Aw, M., Armstrong, T. M., Nawata, M., Bodine, S. N., Oh, J. J., Wei, G., ... & Pannabecker, T. (2018). Body Mass-Specific Na, K-ATPase Activity in the Medullary Thick Ascending Limb—Implications for Species-Dependent Urine Concentrating Mechanisms. *The FASEB Journal*, 32, 862-3.
- 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*. *Journal of Thermal Biology*, 34(8), 415-419.
- Barceló, G., Love, O. P., & Vézina, F. (2017). Uncoupling basal and summit metabolic rates in white-throated sparrows: digestive demand drives maintenance costs, but changes in muscle mass are not needed to improve thermogenic capacity. *Physiological and Biochemical Zoology*, 90(2), 153-165.
- Bartholomew, G.A. & Cade, T.J., (1963). The water economy of land birds. *Auk* 80, 504–539

- Bateson, M., Andrews, C., Dunn, J., Egger, C. B., Gray, F., Mchugh, M., & Nettle, D. (2021). Food insecurity increases energetic efficiency, not food consumption: an exploratory study in European starlings. *PeerJ*, 9, e11541.
- Boisier, J. P., Rondanelli, R., Garreaud, R. D., & Muñoz, F. (2016). Anthropogenic and natural contributions to the Southeast Pacific precipitation decline and recent megadrought in central Chile. *Geophysical Research Letters*, 43(1), 413-421.
- Bollinger, T. K., Mineau, P., & Wickstrom, M. L. (2005). Toxicity of sodium chloride to house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of wildlife diseases*, 41(2), 363-370.
- Bozinovic, F., Ferri-Yáñez, F., Naya, H., Araújo, M. B., & Naya, D. E. (2014). Thermal tolerances in rodents: species that evolved in cold climates exhibit a wider thermoneutral zone. *Evolutionary Ecology Research*, 16(2), 143-152.
- Braun, E. J., & Scanes, C. G. (2015). Chapter 12: Osmoregulatory Systems of Birds. *Sturkies Avian Physiology*, 6, 285-299.
- Briga, M., & Verhulst, S. (2017). Individual variation in metabolic reaction norms over ambient temperature causes low correlation between basal and standard metabolic rate. *Journal of Experimental Biology*, 220(18), 3280-3289.
- Buckley, L.B., Ehrenberger, J.C., Angilletta, M.J., 2015. Thermoregulatory behaviour limits local adaptation of thermal niches and confers sensitivity to climate change. *Funct. Ecol.* 29, 1038–1047
- Burger, F., Brock, B., & Montecinos, A. (2018). Seasonal and elevational contrasts in temperature trends in Central Chile between 1979 and 2015. *Global and Planetary Change*, 162, 136-147.
- Carter, M. J., Flores, M., & Ramos-Jiliberto, R. (2020). Geographical origin determines responses to salinity of Mediterranean caddisflies. *PloS one*, 15(1), e0220275.
- Casotti, G., & Braun, E. J. (2000). Renal anatomy in sparrows from different environments. *Journal of Morphology*, 243(3), 283-291.
- Cavieres, G., & Sabat, P. (2008). Geographic variation in the response to thermal acclimation in rufous-collared sparrows: are physiological flexibility and environmental heterogeneity correlated? *Functional Ecology*, 22(3), 509-515.
- Cavieres, G., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F., & Sabat, P. (2017). Early life experience drives short-term acclimation of metabolic and osmoregulatory traits in the leaf-eared mouse. *Journal of Experimental Biology*, 220(14), 2626-2634.

- CEA (2020) Informe Final Diagnóstico del caudal ambiental del río Loa, región de Antofagasta
- Cogliatti, M., Bodega, J., Dalfonso, C. (2014). El cultivo del alpiste (*Phalaris canariensis* L.). 1a ed. - Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 158 pp
- Costantini, D., & Verhulst, S. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology*, 23(3), 506-509.
- Costantini, D. (2010). On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *MethodE in Ecology and Evolution*, 2(3), 321-325.
- Costantini, D. (2019). Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. *Journal of Experimental Biology*, 222(13), jeb194688.
- Dawson, T. J., Maloney, S. K., & Skadhauge, E. (1991). The role of the kidney in electrolyte and nitrogen excretion in a large flightless bird, the emu, during different osmotic regimes, including dehydration and nesting. *Journal of Comparative Physiology B*, 161, 165-171.
- Diamond, J., & Hammond, K. (1992). The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia*, 48, 551-557.
- Dick, M. F., & Guglielmo, C. G. (2019). Flight muscle protein damage during endurance flight is related to energy expenditure but not dietary polyunsaturated fatty acids in a migratory bird. *Journal of Experimental Biology*, 222(5), jeb187708.
- Estades, C. F., Vukasovic, M. A., & Aguirre, J. (2017). Bird in Coastal Wetland of Chile. In *The Ecology and Natural History of Chilean Saltmarshes* (pp. 47-70). Springer, Cham.
- Fair, J., Whitaker, S., & Pearson, B. (2007). Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis*, 149(3), 535-552.
- Fletcher, K. L., Whitley, B. N., Treidel, L. A., Thompson, D., Williams, A., Noguera, J. C., ... & Hausmann, M. F. (2015). Voluntary locomotor activity mitigates oxidative damage associated with isolation stress in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biology letters*, 11(7), 20150178.
- Garland Jr, T., Downs, C. J., & Ives, A. R. (2022). Trade-offs (and constraints) in organismal biology. *Physiological and biochemical zoology*, 95(1), 82-112.

- Gerson, A. R., & Guglielmo, C. G. (2011). House sparrows (*Passer domesticus*) increase protein catabolism in response to water restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(4), R925-R930.
- Goldstein, D. L., & Zahedi, A. (1990). Variation in osmoregulatory parameters of captive and wild house sparrows (*Passer domesticus*). *The Auk*, 107(3), 533-538.
- Guderley, H., Turner, N., Else, P. L., & Hulbert, A. J. (2005). Why are some mitochondria more powerful than others: insights from comparisons of muscle mitochondria from three terrestrial vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 142(2), 172-180.
- Gutierrez, J. S., Abad-Gomez, J. M., Sanchez-Guzman, J. M., Navedo, J. G., & Masero, J. A. (2012). Avian BMR in marine and non-marine habitats: a test using shorebirdDE.
- Gutiérrez, J. S. (2014). Living in environments with contrasting salinities: a review of physiological and behavioural responses in waterbirdDE. *Ardeola*, 61(2), 233-256.
- Gutiérrez, J. S., Sabat, P., Castañeda, L. E., Contreras, C., Navarrete, L., PeñaVillalobos, I., et al. (2019). Oxidative status and metabolic profile in a long-lived bird preparing for extreme endurance migration. *Sci. Rep.* 9:17616. doi: 10.1038/s41598-019-54057-6
- Hawkins, R. C., & Corbit, J. D. (1973). Drinking in response to cellular dehydration in the pigeon. *Journal of comparative and physiological psychology*, 84(2), 265
- Holmes, W. N., & Phillips, J. G. (1985). The avian salt gland. *Biological Reviews*, 60(2), 213-256.
- Hughes, M. R. (2003). Regulation of salt gland, gut and kidney interactions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(3), 507-524.
- Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H., & Else, P. L. (2005). Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological Reviews*, 80(1), 155-169.
- Hulbert, A. J., Turner, N., Hinde, J., Else, P., & Guderley, H. (2006). How might you compare mitochondria from different tissues and different species?. *Journal of Comparative Physiology B*, 176, 93-105.

- Jimeno, B., Hau, M., & Verhulst, S. (2018). Corticosterone levels reflect variation in metabolic rate, independent of 'stress'. *Scientific reports*, 8(1), 13020
- Jimeno, B., Prichard, M. R., Landry, D., Wolf, C., Larkin, B., Cheviron, Z., & Breuner, C. (2020). Metabolic rates predict baseline corticosterone and reproductive output in a free-living passerine. *Integrative Organismal Biology*, 2(1), obaa030.
- Klaassen, M., Oltrogge, M., & Trost, L. (2004). Basal metabolic rate, food intake, and body mass in cold-and warm-acclimated Garden Warblers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(4), 639-647.
- Kregenow, F. M. (1971a). The Response of Duck Erythrocytes to Hypertonic Media: Further evidence for a volume-controlling mechanism. *The Journal of General Physiology*, 58(4), 396-412.
- Kregenow, F. M. (1971b). The response of duck erythrocytes to nonhemolytic hypotonic media: evidence for a volume-controlling mechanism. *The Journal of General Physiology*, 58(4), 372-395.
- Koteja, P. (1996a). Limits to the energy budget in a rodent, *Peromyscus maniculatus*: does gut capacity set the limit?. *Physiological Zoology*, 69(5), 994-1020.
- Koteja, P. (1996b). Limits to the energy budget in a rodent, *Peromyscus maniculatus*: the central limitation hypothesis. *Physiological Zoology*, 69(5), 981-993.
- Landys MM, Ramenofsky M, Wingfield JC. 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and comparative Endocrinology* 148: 132– 149
- Layton, H. E., Davies, J. M., Casotti, G., & Braun, E. J. (2000). Mathematical model of an avian urine concentrating mechanism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(6), F1139-F1160.
- Linek, N., Volkmer, T., Shipley, J. R., Twining, C. W., Zúñiga, D., Wikelski, M., & Partecke, J. (2021). A songbird adjusts its heart rate and body temperature in response to season and fluctuating daily conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1830), 20200213.
- Malkoc, K., Casagrande, S., and Hau, M. (2021). Inferring whole-organism metabolic rate from red blood cells in birds. *Front. Physiol.* 12:691633. doi: 10.3389/fphys.2021.691633

- Maldonado, K. E., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M., & Sabat, P. (2009). Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal acclimatization. *Journal of Comparative Physiology B*, 179, 335-343.
- Maldonado, K., Bozinovic, F., Cavieres, G., Fuentes, C. A., Cortés, A., & Sabat, P. (2012). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate is associated with rainfall variability among populations of rufous-collared sparrow. *Zoology*, 115(2), 128-133.
- McNab, B. K. (1980). On estimating thermal conductance in endotherms. *Physiological zoology*, 53(2), 145-156.
- McNab, B. K. (2009). Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(1), 22-45.
- Miettinen, T. P., & Björklund, M. (2016). Cellular allometry of mitochondrial functionality establishes the optimal cell size. *Developmental cell*, 39(3), 370-382.
- Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Tsuchiya, N., Filburn, C., and Hansford, R. G. (1997). Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* 272, C1345–C1351.
- Muff, S., Nilsen, E. B., O'Hara, R. B., & Nater, C. R. (2022). Rewriting results sections in the language of evidence. *TrenDE in ecology & evolution*, 37(3), 203-210.
- Navarrete, L., Bozinovic, F., Peña-Villalobos, I., Contreras-Ramos, C., Sanchez-Hernandez, J. C., Newsome, S. D., Nespolo R. & Sabat, P. (2021). Integrative Physiological Responses to Acute Dehydration in the Rufous-Collared Sparrow: Metabolic, Enzymatic, and Oxidative Traits. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 787.
- Navarrete, L., Lübcker, N., Alvarez, F., Nespolo, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Maldonado, K., ... & Sabat, P. (2023). A multi-isotope approach reveals seasonal variation in the reliance on marine resources, production of metabolic water, and ingestion of seawater by two species of coastal passerine to maintain water balance. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1120271.
- Nord, A., Metcalfe, N. B., Page, J. L., Huxtable, A., McCafferty, D. J., & Dawson, N. J. (2021). Avian red blood cell mitochondria produce more heat in winter than in autumn. *The FASEB Journal*, 35(5), e21490.
- Norin, T., & Metcalfe, N. B. (2019). Ecological and evolutionary consequences of metabolic rate plasticity in response to environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1768), 20180180

- Oboikovitz, P., & Swanson, D. L. (2022). Seasonal metabolic flexibility is correlated with microclimate variation in horned larks and house sparrows. *Current zoology*, 68(2), 199-210.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Orlov, S. N., Kolosova, I. A., Cragoe, E. J., Gurlo, T. G., Mongin, A. A., Aksentsev, S. L., & Konev, S. V. (1993). Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-induced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport and K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransport in rat erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1151(2), 186-192.
- Pani, P., & Bal, N. C. (2022). Avian adjustments to cold and non-shivering thermogenesis: whats, wheres and hows. *Biological Reviews*, 97(6), 2106-2126
- Peña-Villalobos, I., Valdés-Ferranty, F., and Sabat, P. (2013). Osmoregulatory and metabolic costs of salt excretion in the Rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 164, 314–318. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.10.027
- Peña-Villalobos, I., Nuñez-Villegas, M., Bozinovic, F., & Sabat, P. (2014). Metabolic enzymes in seasonally acclimatized and cold acclimated rufous-collared sparrow inhabiting a Chilean Mediterranean environment. *Current Zoology*, 60(3), 338-350.
- Pollock, H. S., Brawn, J. D., Agin, T. J., & Cheviron, Z. A. (2019). Differences between temperate and tropical birds in seasonal acclimatization of thermoregulatory traits. *Journal of Avian Biology*, 50(4).
- Poulson TL & Bartholomew GA (1962) Salt balance in the savannah sparrow. *Physiol Zool* 35:109–119
- Purdue, J. R., & Haines, H. (1977). Saltwater tolerance and water turnover in the snowy plover. *The Auk*, 94(2), 248-255.
- Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., & Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27255-27264.

- Rivera, C., Quiroga, E., Meza, V., & Pastene, M. (2019). Evaluation of water quality and heavy metal concentrations in the RAMSAR Wetland El Yali (Central Chile, 33 45' S). *Marine pollution bulletin*, 145, 499-507.
- Sabat, P. (2000). Birds in marine and saline environments: living in dry habitats. *Revista Chilena de Historia Natural*. 73: 243-252
- Sabat, P., Maldonado, K., Rivera-Hutinel, A., & Farfan, G. (2004a). Coping with salt without salt gland: osmoregulatory plasticity in three species of coastal songbirds (ovenbirds) of the genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 174, 415-420.
- Sabat, P., Sepulveda-Kattan, E., & Maldonado, K. (2004b). Physiological and biochemical responses to dietary protein in the omnivore passerine *Zonotrichia capensis* (Emberizidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(2), 391-396
- Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C., & Canals, M. (2006a). Water and energy economy of an omnivorous bird: population differences in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(4), 485-490.
- Sabat, P., Maldonado, K., Farina, J. M., & Del Rio, C. M. (2006b). Osmoregulatory capacity and the ability to use marine food sources in two coastal songbirds (Cinclodes: Furnariidae) along a latitudinal gradient. *Oecologia*, 148, 250-257.
- Sabat, P., Maldonado, K., Canals, M., & Del Rio, C. M. (2006c). Osmoregulation and adaptive radiation in the ovenbird genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *Functional Ecology*, 20(5), 799-805.
- Sabat, P., Gonzalez-Vejares, S., & Maldonado, K. (2009). Diet and habitat aridity affect osmoregulatory physiology: An intraspecific field study along environmental gradients in the Rufous-collared sparrow. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(3), 322-326.
- Sabat, P., Narváez, C., Peña-Villalobos, I., Contreras, C., Maldonado, K., SanchezHernandez, J. C., et al. (2017). Coping with saltwater habitats: metabolic and oxidative responses to salt intake in the rufous-collared sparrow. *Front. Physiol.* 8:654. doi: 10.3389/fphys.2017.00654
- Sabat, P., Bozinovic, F., Contreras-Ramos, C., Nespolo, R. F., Newsome, S. D., Quirici, V., et al. (2019). The interplay between ambient temperature and salt intake affects oxidative status and immune responses in a ubiquitous Neotropical

passerine, the rufous-collared sparrow. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 234, 50–59. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.04.01

- Savage, V. M., Allen, A. P., Brown, J. H., Gillooly, J. F., Herman, A. B., Woodruff, W. H., & West, G. B. (2007). Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4718-4723.
- Seebacher, F., Brand, M. D., Else, P. L., Guderley, H., Hulbert, A. J., & Moyes, C. D. (2010). Plasticity of oxidative metabolism in variable climates: molecular mechanisms. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(5), 721-732.
- Sidell, B. D., Driedzic, W. R., Stowe, D. B., and Johnston, I. A. (1987). Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. *Physiol. Zool.* 60, 221–232. doi: 10.1086/physzool.60.2.30158646
- Simon, E. (1982). The osmoregulatory system of bird with salt gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 71(4), 547-556.
- Singh, S., Ponnappan, N., Verma, A., & Mittal, A. (2019). Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Smith, R.C. & Lawing, L. (1983) Antioxidant activity of uric acid and 3-N-ribosyluric acid with unsaturated fatty acid and erythrocyte membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232, 166–172.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., & Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols*, 7(6), 1235-1246.
- Stager, M., Senner, N. R., Swanson, D. L., Carling, M. D., Eddy, D. K., Greives, T. J., & Cheviron, Z. A. (2021). Temperature heterogeneity correlates with intraspecific variation in physiological flexibility in a small endotherm. *Nature Communications*, 12(1), 4401.
- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., ... & Criscuolo, F. (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birDE as animal models in the study of ageing. *Frontiers in zoology*, 10(1), 1-9.
- Stier, A., Romestaing, C., Schull, Q., Lefol, E., Robin, J. P., Roussel, D., & Bize, P. (2017). How to measure mitochondrial function in birDE using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. *MethodE in Ecology and Evolution*, 8(10), 1172-1182.

- Sugie, J., Intaglietta, M., & Sung, L. A. (2018). Water transport and homeostasis as a major function of erythrocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 314(5), H1098-H1107.
- Tapia-Monsalve, R., Newsome, S. D., Sanchez-Hernandez, J. C., Bozinovic, F., Nespolo, R., & Sabat, P. (2018). Terrestrial birDE in coastal environments: metabolic rate and oxidative status varies with the use of marine resources. *Oecologia*, 188(1), 65-73.
- Treberg, J. R., Quinlan, C. L., & Brand, M. D. (2011). Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27103-27110.
- Vézina, F., & Williams, T. D. (2005). Interaction between organ mass and citrate synthase activity as an indicator of tissue maximal oxidative capacity in breeding European starlings: implications for metabolic rate and organ mass relationships. *Functional Ecology*, 119-128.
- Vézina F, Jalvingh KM, Dekinga A, Piersma T, (2006). Acclimation to different thermal conditions in a northerly wintering shorebird is driven by body mass-related changes in organ size. *J. Exp. Biol.* 209: 3141–3154.
- Vézina, F., Gerson, A. R., Guglielmo, C. G., & Piersma, T. (2017). The performing animal: causes and consequences of body remodeling and metabolic adjustments in red knots facing contrasting thermal environments. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 313(2), R120-R131.
- Wang, Z., O'Connor, T. P., Heshka, S., & Heymsfield, S. B. (2001). The reconstruction of Kleiber's law at the organ-tissue level. *The journal of nutrition*, 131(11), 2967-2970.
- Weiner, J., 1992. Physiological limits to sustainable energy budgets in birDE and mammals: ecological implications. *Trends Ecol. Evol.* 7, 384–388.
- Withers, P.C., 1977. Measurement of VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, and evaporative water loss with a flowthrough mask. *J. Appl. Physiol.* 42, 120–123.
- Yap, K. N., & Zhang, Y. (2021). Revisiting the question of nucleated versus enucleated erythrocytes in birDE and mammals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 321(4), R547-R557.
- Zheng WH, Li M, Liu JS, Shao SL, (2008). Seasonal acclimatization of metabolism in Eurasian tree sparrows *Passer montanus*. *Comp. Biochem. Phys. A* 151(4):519–25.

Zheng WH, Lina L, Liu JS, Pana H, Cao MT et al., (2013). Physiological and biochemical thermoregulatory responses of Chinese bulbuls *Pycnonotus sinensis* to warm temperature: Phenotypic flexibility in a small passerine. *J. Therm. Biol.* 38: 240–246