



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**Costo metabólico y osmorregulatorio de la
deshidratación crónica en el paseriforme *Zonotrichia
capensis*: Respuesta enzimática en eritrocitos.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

Lucas Navarrete Parra

Director del Seminario de Título: Pablo Sabat Kirkwood

Codirector: Isaac Peña-Villalobos

Mayo, 2020

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

Lucas Navarrete Parra

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biología con Mención en Medio Ambiente.

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

Director Seminario de Título

Dr. Isaac Peña-Villalobos

Codirector Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

David Véliz

Presidente

Claudio Veloso

Evaluador

Santiago de Chile, mayo de 2020

Índice de Contenidos

| | |
|---|----|
| Índice de Tablas | 5 |
| Índice de Figuras | 6 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 8 |
| 1. Introducción | 9 |
| 1.1. Respuestas fisiológicas de los passeriformes a la deshidratación | 9 |
| 1.2. Metabolismo del glóbulo rojo en respuesta al estrés hídrico | 11 |
| 2. Hipótesis | 13 |
| 3. Objetivos | 14 |
| 3.1. Objetivo general | 14 |
| 3.2. Objetivos específicos | 14 |
| 4. Materiales y métodos | 15 |
| 4.1. Captura de individuos | 15 |
| 4.2. Aclimatación y tratamiento | 15 |
| 4.3. Tasa metabólica basal | 17 |
| 4.4. Análisis enzimático | 18 |
| 4.5. Análisis estadístico | 19 |
| 5. Resultados | 20 |
| 5.1 Morfología y masa corporal | 20 |
| 5.1.1 Masa corporal | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.2 Masa de órganos | 22 |
| 5.2 Parámetros osmorregulatorios | 23 |
| 5.2.1. Concentración de plasma | 23 |
| 5.2.2. Concentración de excreta | 23 |
| 6. Discusión | 32 |
| 6.1. Ajustes morfológicos y osmorregulatorios | 33 |
| 6.2. Costo metabólico de la deshidratación y cambios en la actividad metabólica del eritrocito | 36 |
| 6.3 Proyecciones | 40 |
| 7. Conclusiones | 42 |
| 8. Bibliografía | 43 |

Abreviaturas

H: Tratamiento “hidratado”.

DH: Tratamiento “deshidratado”.

mb: Masa corporal.

TMB: Tasa metabólica basal.

ZTN: Zona termoneutral.

COX: Enzima Citocromo c Oxidasa.

CS: Enzima Citrato Sintasa.

PTAE: Pérdida total de agua evaporativa.

Índice de Tablas

Tabla 1. Configuración temporal del tratamiento de restricción hídrica de dos períodos. En blanco se muestran los días que tuvieron disponible el bebedero y en negro los días que fueron restringidos de agua. Se indican los días en que fueron masados y se obtuvo muestras de excreta.

Tabla 2. Masa de órganos de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones contrastantes de hidratación por 2 semanas (H = hidratado; n = 9 y DH = deshidratado; n = 9). El análisis de covarianza (ANCOVA) se realizó utilizando la masa corporal de los individuos como covariable. Los valores se muestran como promedios \pm desviación estándar y entre paréntesis el porcentaje de agua para intestino y músculo pectoral.

Índice de Figuras

Figura 1. Masa corporal de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones de deshidratación por 15 días. Letras muestran diferencias en el tiempo y para cada tratamiento después de un ANOVA de medidas repetidas y una prueba de Tukey *a posteriori*. Los valores muestran el promedio \pm desviación estándar.

Figura 2. Osmolaridad de la excreta y el plasma para ambos tratamientos de restricción hídrica en *Z. capensis* al finalizar los 15 días de aclimatación. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la concentración de la excreta.

Figura 3. Tasa metabólica basal en función de la masa corporal en individuos de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones de hidratación durante dos semanas (véase texto para detalles). Las líneas continuas indican ajuste lineal para cada grupo H: $y = 8,67x - 96,52$; $r^2 = 0,63$, $p = 0,0100$ y DH: $y = 6,408x - 46,07$; $r^2 = 0,35$, $p = 0,0946$. La línea segmentada indica ajuste lineal para todo el conjunto de datos $y = 3,56x - 2,83$; $r^2 = 0,39$; $p = 0,0052$.

Figura 4. Promedio de la Tasa Metabólica Basal ajustada a la masa de los individuos de ambos grupos. ANCOVA $F(1,15) = 6,96$; $p = 0,0186$). El asterisco denota diferencias significativas para la tasa metabólica ajustada para ambos grupos aclimatados a distintos regímenes de disponibilidad hídrica. Se muestra el promedio más la desviación estándar.

Figura 5. Actividad enzimática de COX y CS presentes en los eritrocitos de *Z. capensis* para un grupo control (H) y un grupo en dos semanas de restricción hídrica (DH). Asterisco denota diferencia significativa entre ambos grupos. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Figura 6. Actividad de COX en eritrocitos de *Z. capensis* en función de la masa corporal luego de dos semanas de aclimatación a distintos regímenes de hidratación. Línea segmentada indica el ajuste lineal (véase texto).

Figura 7. Los residuales de la TMB y de la actividad de COX en función de la masa corporal presentan una correlación positiva y significativa en *Z. capensis* aclimatados por dos semanas a distintos regímenes de restricción hídrica. La línea segmentada representa el ajuste lineal utilizando ambos grupos experimentales.

RESUMEN

El escenario de cambio climático predice una disminución en las precipitaciones y un aumento en las olas de calor, lo que provocaría que muchas aves del clima mediterráneo pasen por períodos de alta temperatura y sequía extrema en los meses de verano, aumentando la probabilidad de muerte para las especies más pequeñas. En este seminario se evaluó experimentalmente, el efecto de una deshidratación crónica sobre algunas variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en el passeriforme *Zonotrichia capensis*. Junto con una disminución en la masa corporal, el grupo deshidratado presentó un aumento en la masa del riñón, tasa metabólica basal masa específica (TMB) y en la osmolalidad de la excreta, sin embargo, no se observaron cambios en la concentración del plasma. Paralelamente, se evaluó la actividad de dos enzimas metabólicas presentes en los eritrocitos de las aves, en donde destaca el aumento de la actividad de citocromo-c-oxidasa (COX) en el grupo deshidratado. La TMB y actividad metabólica de COX en eritrocitos se correlacionaron positiva y significativamente luego de remover el efecto de la masa corporal. Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que las aves deshidratadas podrían aumentar la tasa metabólica basal masa-específica y aumentar el catabolismo de proteínas para producir agua metabólica. Aun cuando las razones de un aumento en la actividad enzimática mitocondrial de los eritrocitos son controversiales, se sugiere que este aumento es por la contribución de los eritrocitos a la difusión y transporte del oxígeno a tejidos metabólicamente demandantes en respuesta al aumento de un alto consumo energético en situaciones de deshidratación. Finalmente se propone que la evaluación de la actividad enzimática en el glóbulo rojo podría constituir un método efectivo y mínimamente invasivo para el estudio de la energética de aves en terreno. **Palabras claves:** Deshidratación, metabolismo, osmorregulación, actividad enzimática, eritrocito.

ABSTRACT

The climate change scenario predicts a decrease in rainfall and an increase in heat waves, which would cause many birds of the Mediterranean climate to go through periods of high temperature and extreme drought in the summer months, increasing the probability of death for the smallest. In this seminar, the effect of chronic dehydration on some morphological, physiological and biochemical variables in the passerine *Zonotrichia capensis* was experimentally evaluated. Along with a decrease in body mass, the dehydrated group had an increase in kidney mass, basal specific mass metabolic rate (BMR), and excreta osmolality, however, no changes in plasma were observed. In parallel, the activity of two metabolic enzymes active in the bird erythrocytes was evaluated, where the increased activity of cytochrome-c-oxidase (COX) in the dehydrated group stands out. BMR and COX metabolic activity in erythrocytes were positively and significantly correlated after removing the effect of body mass. These results suggest that dehydrated birds may increase basal mass-specific metabolic rate and increase protein catabolism to produce metabolic water. Although the reasons for an increase in the mitochondrial enzymatic activity of erythrocytes are controversial, it is suggested that this increase is due to the contribution of erythrocytes to the diffusion and transport of oxygen to metabolically demanding tissues in response to the increase in high energy consumption in dehydration situations. Finally, it is proposed that the evaluation of the enzymatic activity in the red blood cell could constitute an effective and less invasive method for the study of the energetics of birds in the field.

Keywords: Dehydration, metabolism, osmoregulation, enzymatic activity, erythrocyte.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Respuestas fisiológicas de los passeriformes a la deshidratación*

La variación en los regímenes de precipitación y temperatura ambiente asociadas al cambio climático generan un impacto en los ecosistemas, específicamente a través de efectos sobre la fenología, conducta, distribución, abundancia y fisiología de los animales y plantas. (Collins et al., 2013; Hughes, 2000; McCarty, 2001). Para algunas regiones del hemisferio sur se ha documentado una disminución en las precipitaciones en alrededor de un 3% por década desde 1960 (IGP, 2005) mientras que la temperatura promedio del planeta se ha elevado aproximadamente 0,85°C en los últimos 100 años (NOAA, 2016). Estos cambios ocurren por un incremento en la frecuencia, duración y severidad de olas de calor y la disminución de los eventos de frío (Albright et al., 2017; Walther et al., 2002).

La gran cantidad de información registrada gracias a programas de monitoreo empleados para el seguimiento de aves durante las últimas décadas ha permitido asociar la variación en los patrones climáticos con la fenología de algunas poblaciones de aves a nivel global; y en particular a una escala regional, se han documentado efectos negativos sobre características fisiológicas de aves passeriformes por exposición a altas temperaturas, deshidratación y/o limitada disponibilidad de alimento (Gardner et al., 2011). Efectivamente, estas modificaciones del clima han ejercido una presión sobre ciertos rasgos de historia de vida asociados al éxito reproductivo (Huntley et al., 2008), tales como el retraso o antelación de la temporada de cría; cambios en los tamaños poblacionales (Dunn & Møller, 2014) y distribución geográfica en algunas especies y poblaciones (Hitch & Leberg, 2007).

Es probable que mediante cambios estacionales cada vez más marcados, este escenario incierto provoque un aumento en el estrés fisiológico de aves passeriformes (Maddocks &

Geiser, 2000) que, por su tamaño reducido, sus elevadas tasas metabólicas y de evaporación masa-específica y por presentar períodos de mayor actividad durante el día, son particularmente sensibles a períodos estivales de sequía y altas temperaturas en comparación a aves de mayor tamaño (Albright et al., 2017; Gardner et al., 2011; Yom-Tov, 2001). Esto se acrecentaría en aquellas especies con una plasticidad fenotípica limitada (Charmantier et al., 2008). Específicamente y respecto a la probabilidad de supervivencia, McKechnie & Wolf (2010) sugieren que el aumento en el requerimiento de agua en días muy calurosos de verano reducirá los tiempos de supervivencia para muchas aves, especialmente en las de menor tamaño.

A nivel fisiológico, un incremento en la temperatura por olas de calor y una disminución en la disponibilidad de agua dulce afecta a las tasas metabólicas y de evaporación, masa corporal (mb), tolerancia y conductancia térmicas (Maldonado et al., 2009), y dado que la capacidad de concentración de la orina en aves es limitada (Goldstein & Skadhauge, 2000), estos ajustes podrían ser muy costosos (Gardner et al., 2011; Noakes & McKechnie, 2020; Sabat et al., 2006, 2009; Smit & McKechnie, 2010). Específicamente en aves paseriformes, se ha demostrado que la deshidratación puede provocar aumento en la concentración de ácido úrico y osmolalidad del plasma, hipovolemia y pérdida de masa corporal, tanto por pérdida de agua evaporativa como por un aumento en el catabolismo de proteínas (Gerson & Guglielmo, 2011). Paralelamente, varios autores (Smit & McKechnie, 2010; Tieleman et al., 2002, 2003) han demostrado que aves de ambientes áridos que viven bajo regímenes de temperaturas extremas, escasa humedad relativa y precipitación se han especializado minimizando la tasa metabólica basal (TMB) y la pérdida de agua evaporativa (PTAE). Dichos parámetros fisiológicos se habrían seleccionado dando como resultado tasas reducidas de flujo hídrico y gasto energético, acercándose al límite de su capacidad de retención de agua y reducción del metabolismo basal respectivamente.

En este sentido, y aun cuando se ha demostrado que las estrategias fisiológicas y conductuales de regulación hídrica a nivel sistémico implican un alto costo en aves que viven en hábitats secos y/o salobres, es poco conocido el efecto de la deshidratación sobre las tasas de gasto de energía a nivel de los tejidos y de los mecanismos bioquímicos involucrados en su regulación.

1.2. *Metabolismo del glóbulo rojo en respuesta al estrés hídrico.*

Una de las respuestas celulares más conspicuas a la deshidratación aguda y en respuesta al aumento de la osmolalidad del plasma sanguíneo (Gerson & Guglielmo, 2011) es la inducción de crenación de las células sanguíneas, sin embargo los eritrocitos pueden mantener constante su volumen mediante de un sistema de regulación por intercambio de iones, presumiblemente costoso energéticamente (Hoffmann et al., 2009). Por otro lado, la exposición crónica a un medio hipertónico altera algunos factores de transcripción de genes osmorreguladores que están involucrados en la absorción y síntesis de osmolitos, los cuales tienen un papel clave en el mantenimiento del volumen celular (Hoffmann et al., 2009).

Con respecto a la energía necesaria para realizar la actividad regulatoria, se ha documentado que las aves cuentan con mitocondrias funcionales en sus células sanguíneas (Stier et al., 2013). En este sentido, estudios recientes en aves han documentado la existencia de una variación interindividual significativa en las tasas de gasto energético de las mitocondrias de eritrocitos en el pingüino rey (*Aptenodytes patagonicus*) y que esta variación en el metabolismo mitocondrial responde a los niveles de actividad de las enzimas metabólicas Citrato Sintasa (CS) y Citocromo C Oxidasa (COX) en el músculo esquelético (Stier et al., 2015, 2017). Esto es relevante pues estas dos enzimas son

responsables de la producción de energía (e.g. ATP) cumpliendo un rol fundamental en la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs, respectivamente. Además, se ha descrito que la actividad de estas enzimas metabólicas, tanto en el músculo como en eritrocitos, se asocia positivamente con los niveles de consumo de oxígeno masa específico en aves (Gutiérrez et al., 2019; Peña-Villalobos et al., 2014). Así, es posible que el metabolismo de las mitocondrias, por medio de la expresión de enzimas involucradas en el gasto de energía a nivel tisular y periférico, se asocien a las modificaciones fisiológicas que ocurren en aves sometidas a estrés hídrico.

En síntesis, el objetivo de este estudio es evaluar respuestas energéticas y bioquímicas de las mitocondrias de los glóbulos rojos (eg. COX, CS) y orgánsmica (TMB), ante la deshidratación, en un ave paseriforme que habita la zona central de Chile, el chincol (*Zonotrichia capensis*). En particular se buscará establecer la posible asociación entre TMB y la actividad de las enzimas mitocondriales de los eritrocitos, lo que constituiría además un método menos invasivo y práctico que entregue información de la función mitocondrial y orgánsmica para el estudio de la energética de vertebrados no mamíferos en terreno.

2. HIPÓTESIS

La deshidratación en aves requiere de respuestas fisiológicas que permitan la regulación y mantención del balance hídrico de los distintos tejidos a expensas de energía. Dado que las aves poseen glóbulos rojos con mitocondrias funcionales las cuales responden activamente, se espera que exista una relación entre las tasas de gasto de energía del organismo y la actividad catabólica de los eritrocitos en función del grado de deshidratación.

Predicción: Los ejemplares de *Zonotrichia capensis* restringidos de agua presentarán una mayor actividad en las enzimas mitocondriales COX y CS y una mayor tasa metabólica basal masa específica en comparación al grupo que puede beber agua *ad libitum*.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la deshidratación sobre los niveles de gasto de energía a nivel celular y orgánico en una especie de ave paseriforme.

Establecer una relación entre la tasa metabólica basal (TMB) y metabolismo enzimático mitocondrial (COX, CS) de los glóbulos rojos en un ave paseriforme en respuesta al estrés hídrico.

3.2. *Objetivos específicos*

Determinar la respuesta de la TMB y la actividad enzimática de CS y COX en eritrocitos de individuos del paseriforme *Zonotrichia capensis* sometidos a un tratamiento de dos semanas de deshidratación.

Determinar y comparar la concentración del plasma sanguíneo y de excreta en dos grupos con distintos niveles de deshidratación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Captura de individuos

Se capturó un total de 18 individuos de la especie *Zonotrichia capensis* (Paseriformes: Emberizidae), especie que posee un amplio rango de distribución en Chile desde Arica hasta la región de Magallanes. Las aves fueron capturadas en la Estación Agronómica Experimental Germán Greve Silva en Rinconada de Maipú (33° 30' S, 70° 54' O) en Chile central. El proceso se llevó a cabo durante el mes de noviembre de 2018 entre las 8:00 y 14:00 horas mediante redes niebla. Las aves fueron trasladadas al laboratorio ubicado en Ñuñoa, Santiago para realizar la aclimatación a las condiciones de cautiverio y los respectivos tratamientos experimentales. La captura se realizó con el permiso del SAG, Chile (N°3138/2017) y los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

4.2 Aclimatación y tratamiento

Las aves capturadas fueron mantenidas por dos semanas en condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (dentro de su zona termoneutral, ZTN) (Sabat et al., 2009), en jaulas plásticas individuales (35x35x35 cm) y con un fotoperiodo 12L:12O.

Las aves se alimentaron con una dieta que consistió en semillas de alpiste y larvas de *Tenebrio molitor ad libitum* y agua vitaminada *ad libitum*. Luego, las aves fueron separadas aleatoriamente en dos grupos experimentales: Un grupo control (H), fue mantenido con agua y semillas *ad libitum* y un grupo experimental (DH), con alimento seco *ad libitum* y

sometido a una restricción hídrica de dos períodos alternados: el primero fue dividido en tres subperíodos de 24 horas sin agua, y el segundo en tres subperíodos de 48 horas sin agua, en un total de 15 días de tratamiento tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Configuración temporal del tratamiento de restricción hídrica de dos períodos. En blanco se muestran los días que tuvieron disponible el bebedero y en negro los días que fueron restringidos de agua. Se indican los días en que fueron masados y se obtuvo muestras de excreta.

| | L | M | M | J | V | S | D |
|------------|------|---------|---|---|---|---|----------------|
| 1° Período | Masa | Excreta | | | | | Masa |
| 2° Período | | Masa | | | | | Excreta + Masa |

Para comprobar el estado de deshidratación, se masó a los individuos con una balanza ($\pm 0,001g$) los días 1, 7, 9 y 15 (véase resultados, Figura 1), que corresponden al inicio y término de cada período. El agua fue dispuesta en bebederos plásticos de 20 ml procurando que siempre estuviera el recurso disponible. Durante el primer período del tratamiento, al grupo DH se le removió el bebedero entre las 8:00 am y las 10:00 pm y fue devuelto al día siguiente (24 h) en el mismo horario. El segundo período de tratamiento consistió en remover el bebedero entre las 8:00 am y las 10:00 pm y devolverlo a los dos días (48 h). La muestra de excreta se tomó durante el primer día de restricción hídrica y al finalizar el tratamiento, utilizando una bandeja con vaselina líquida bajo la jaula, de manera que la excreta queda embebida para su posterior extracción con una pipeta.

4.3 Tasa metabólica basal

Después de la aclimatación, a cada individuo se le determinó la tasa metabólica basal (TMB) a través del consumo de oxígeno en condiciones post-absortivas (> 4 h sin alimento), y dentro de la zona termoneutral (ZTN) mediante respirometría estándar de flujo abierto utilizando respirómetros FMS (Sable Systems, Henderson, Nevada). La medición de metabolismo se realizó durante el período de reposo entre las 23:00 pm y las 7:00 am del día 15 de tratamiento, por lo que durante la medición los individuos cumplieron 48 h sin beber agua. Para ello, las aves fueron masadas e introducidas en una cámara metabólica metálica de 2 L y luego dentro de una cabina termostregulada (Sable System, Henderson, Nevada) a una temperatura ambiente de $30\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, dentro de su ZTN según lo descrito por Maldonado et al. (2009). La cámara metabólica recibió aire seco a un flujo de 500 mL min^{-1} de un controlador de flujo mediante tubos Bev-A-Line (Thermoplastic Processes Inc.). El aire entrante a la cámara con el animal pasó previamente por columnas de absorbente de agua (Diedrita) y gránulos absorbentes de CO_2 (Baralime). El aire exhalado fue analizado por un higrómetro (Sable System, Henderson, Nevada) y luego secado antes de dirigirse al lector de O_2 del respirómetro, que se configuró para obtener una muestra cada 5 segundos durante 8 horas. El consumo de oxígeno fue calculado según la siguiente ecuación (Withers, 1977: p 122): $\text{VO}_2 = [\text{FR} \times 60 \times (\text{F}_i\text{O}_2 - \text{F}_e\text{O}_2)] / (1 - \text{F}_e\text{O}_2)$, donde FR es el flujo en ml/min y F_i y F_e son las concentraciones fraccionales de O_2 de entrada y salida respectivamente. Las lecturas se realizaron a través del software EXPEDATA (Sable Systems International, NV, USA).

4.4. Análisis enzimático

Una vez concluidas las determinaciones metabólicas, las aves se sacrificaron mediante exposición a CO₂ para luego ser masados y diseccionados vía abdominal. Luego, se colectó toda la sangre posible utilizando tubo capilar heparinizado (HIRSHMANN, Alemania); se removieron sus órganos (corazón, hígado, músculo pectoral y riñones) los que fueron masados y congelados a -80° para su posterior análisis enzimático.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C (Boeco M240R, Alemania) para separar los elementos figurados del plasma. Una porción de los elementos figurados fue masada y homogenizada en 4 volúmenes de *buffer* de fosfato 0,1 M con EDTA 0,002 M (pH 7,3). Para romper las membranas y liberar las proteínas insertas en ella, las muestras mantenidas en hielo fueron sonicadas a 130 W por 90 s en intervalos de 10 s usando un sonicador Ultrasonic Processor VCX-130 (Connecticut, USA). Luego se centrifugaron a 14,000 g por 15 minutos a 4°C para finalmente utilizar el sobrenadante cuyo contenido proteico fue determinado mediante el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar. La actividad de ambas enzimas metabólicas, Citocromo c Oxidasa (COX; E.C. 1.9.3.1) y citrato sintasa (CS; E.C. 4.1.3.7) se determinaron a 25°C por colorimetría usando un lector de multiplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA). Para COX, 5 uL de muestra se homogenizó en *buffer* 10mM Tris/HCl pH 7,0 que contiene 120 mM NaCl, 250 mM de sacarosa y se añadió citocromo que fue reducido con ditiotreitól en un volumen final de 200 uL. La disminución en la densidad óptica fue determinada a una longitud de onda de 550 nm a 25°C. La actividad enzimática en unidad por gramo de muestra se calculó utilizando un coeficiente de extinción de 21,84 mM⁻¹ cm⁻¹ a 550 nm para citocromo. Para determinar la actividad de CS, 5 uL de muestra se homogenizó en *buffer* 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM 5,5'ditiobis-(2 nitrobenzoico) (DTNB),

al que se añadió acetil coenzima A (acetil-CoA) 30 mM y oxaloacetato 10 mM en un volumen final de 200 uL. La enzima citrato sintasa cataliza la reacción entre Acetil-CoA y oxaloacetato formando ácido cítrico. El incremento en la densidad óptica fue determinado a una longitud de onda de 412 nm a 25°C. La actividad enzimática fue calculada usando un coeficiente de extinción de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm, acorde a Peña-Villalobos et al. (2016).

4.5 Análisis Estadístico

Para evaluar diferencias significativas en mb entre los tratamientos experimentales se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas y una prueba de Fisher *a posteriori* para detectar diferencias específicas en el tiempo, mientras que las diferencias en la actividad enzimática entre tratamientos se comprobaron mediante un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para establecer las diferencias en la osmolaridad de la excreta y el plasma, se utilizó una prueba T de student, y para remover el efecto de la mb sobre la masa de los órganos y la TMB entre grupos se realizó un Análisis de Covarianza (ANCOVA) con la mb como covariable. Para establecer una correlación entre la actividad de COX y la TMB, se utilizaron los residuales de la regresión simple entre la mb y ambos parámetros. Para todos los análisis se utilizó el software STATISTICA 10 (StatSoft & Dell, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Morfología y masa corporal

5.1.1 Masa corporal

El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo del tiempo experimental sobre la mb ($n = 18$), ($F_{(3,48)} = 47,48$; $p < 0,0001$). La prueba *a posteriori* de Tukey mostró una disminución significativa de la mb entre cada medición en el grupo DH, mientras que el grupo H sólo disminuyó significativamente en la última medición (Figura 1). Por otro lado, el tratamiento experimental sobre la mb mostró que las masas de ambos grupos difirieron entre si desde la segunda medición en adelante ($F_{(1,16)} = 25,82$; $p = 0,0001$). Finalmente, la interacción de los factores tiempo y tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la mb ($F_{(3,48)} = 12,05$; $p < 0,0001$) siendo el grupo DH el más afectado, llegando a perder hasta un 17,72% en comparación al grupo H que solo disminuyo un 6,44% respecto a la masa inicial (Figura 1).

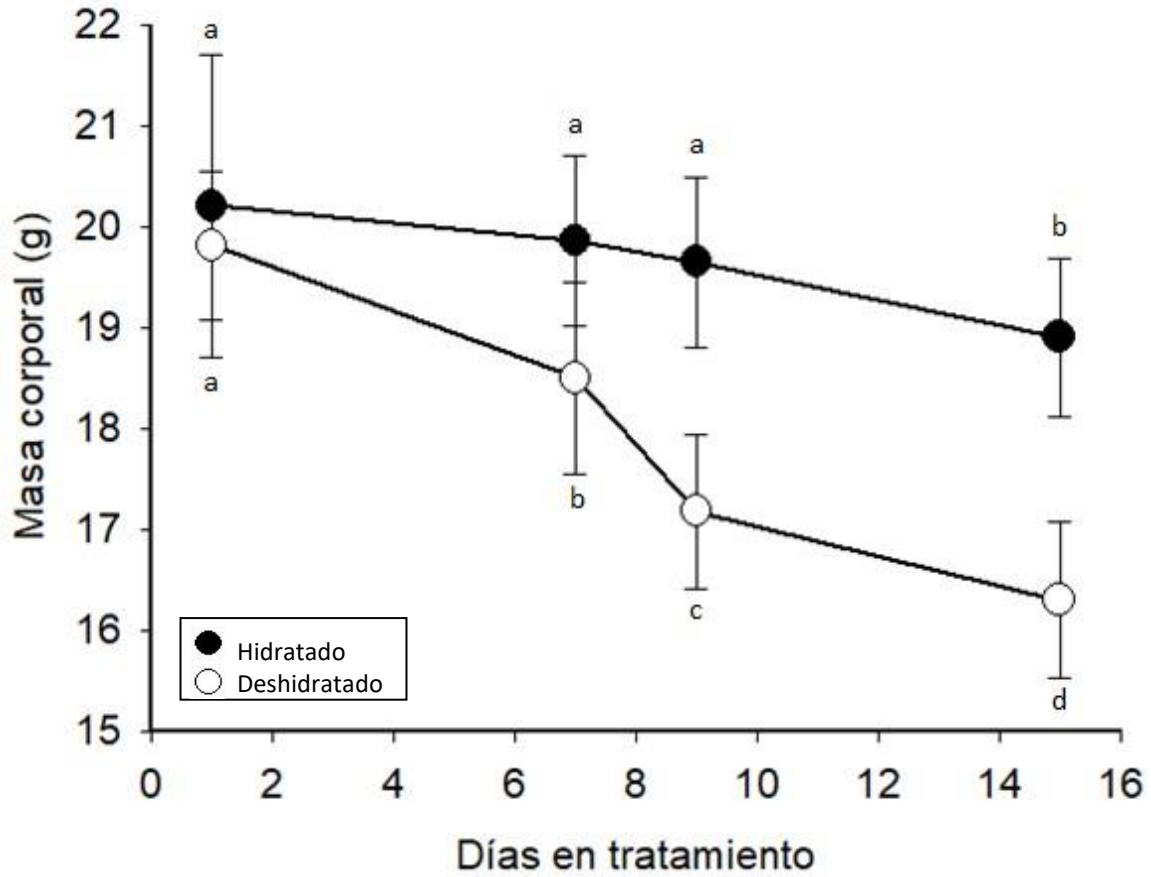


Figura 1. Masa corporal de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones de deshidratación por 15 días. Letras muestran diferencias en el tiempo y para cada tratamiento después de un ANOVA de medidas repetidas y una prueba de Tukey *a posteriori*. Los valores muestran el promedio \pm desviación estándar.

5.1.2 Masa de órganos

La masa de los órganos internos fue afectada por el tratamiento experimental y en general los individuos del grupo DH presentaron órganos más pequeños, a excepción del riñón. Sin embargo, al estandarizar por mb, se observó una tendencia al aumento en la masa del corazón y un aumento significativo en la masa del riñón. La masa del músculo pectoral, hígado e intestino delgado no se vio afectada por el tratamiento experimental. (véase Tabla 2 para valores y estadística).

Tabla 2. Masa de órganos de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones contrastantes de hidratación por 2 semanas (H = hidratado; n = 9 y DH = deshidratado; n = 9). El análisis de covarianza (ANCOVA) se realizó utilizando la masa corporal de los individuos como covariable. Los valores se muestran como promedios \pm desviación estándar y entre paréntesis el porcentaje de agua para intestino y músculo pectoral.

| Órgano | H (g \pm DS) | DH (g \pm DS) | F (1,15) | p |
|---------------|--------------------------|--------------------------|----------|-------|
| Corazón | 0,23 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,02 | 4,521 | 0,051 |
| Hígado | 0,57 \pm 0,12 | 0,41 \pm 0,04 | 1,385 | 0,258 |
| Intestino | 0,46 \pm 0,08 (71,28%) | 0,34 \pm 0,05 (72,56%) | 0,128 | 0,725 |
| Riñón | 0,19 \pm 0,01 | 0,21 \pm 0,01 | 9,927 | 0,007 |
| Pectoral | 0,85 \pm 0,34 (76,77%) | 0,63 \pm 0,09 (75,50%) | 3,011 | 0,103 |
| Masa corporal | 17,96 \pm 0,83 | 15,52 \pm 0,82 | -- | -- |

5.2. Parámetros osmorregulatorios

5.2.1. Concentración de plasma

Finalizado el período de aclimatación, la osmolalidad del plasma sanguíneo no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos experimentales ($t_{(16)} = -1,45$; $p = 0,1660$; Figura 2).

5.2.2. Concentración de excreta

Al concluir las dos semanas de aclimatación, se registró un aumento significativo ($t_{(16)} = 7,75$; $p < 0,0001$) de un 56,96% en la concentración de excreta para el grupo DH en comparación al grupo H (Figura 2).

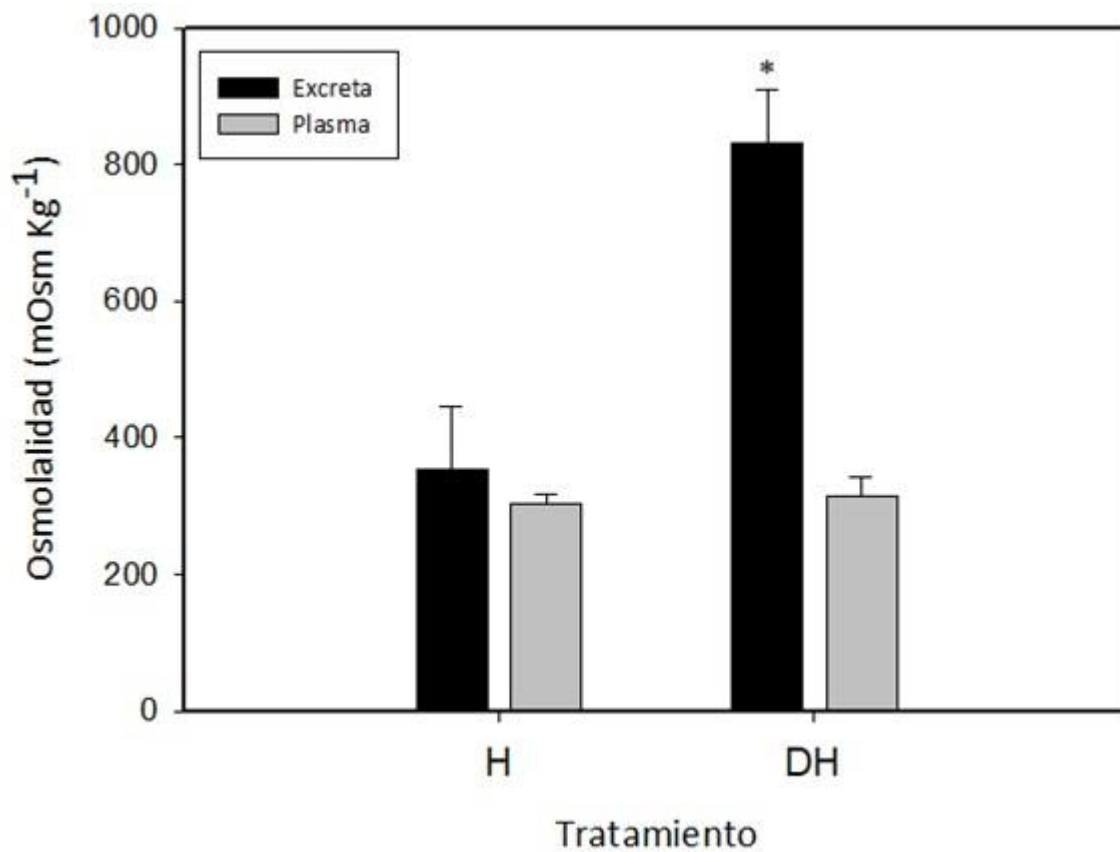


Figura 2. Osmolaridad de la excreta y el plasma para ambos tratamientos de restricción hídrica en *Z. capensis* al finalizar los 15 días de aclimatación. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. El asterisco denota diferencias significativas en la concentración de la excreta.

5.3. Balance energético

5.3.1 Tasa metabólica basal

Al analizar los promedios de las TMB total de ambos grupos, se observó que DH (54,29 mL O₂ h⁻¹) fue un 8,11% menor al grupo H (59,09 mL O₂ h⁻¹) ($F_{(1,16)} = 1,51$; $p = 0,2375$). Sin embargo, considerando que TMB y la mb se correlacionan positivamente, (Figura 3), se utilizó la mb como covariable para considerar la varianza de este factor en un análisis de covarianza. Este análisis reveló que efectivamente existe una diferencia entre las aves sometidas a restricción hídrica, con un promedio de TMB ajustada por masa un 21% mayor al grupo control (ANCOVA $F(1, 15) = 6,9631$, $p = 0,0186$; Figura 4).

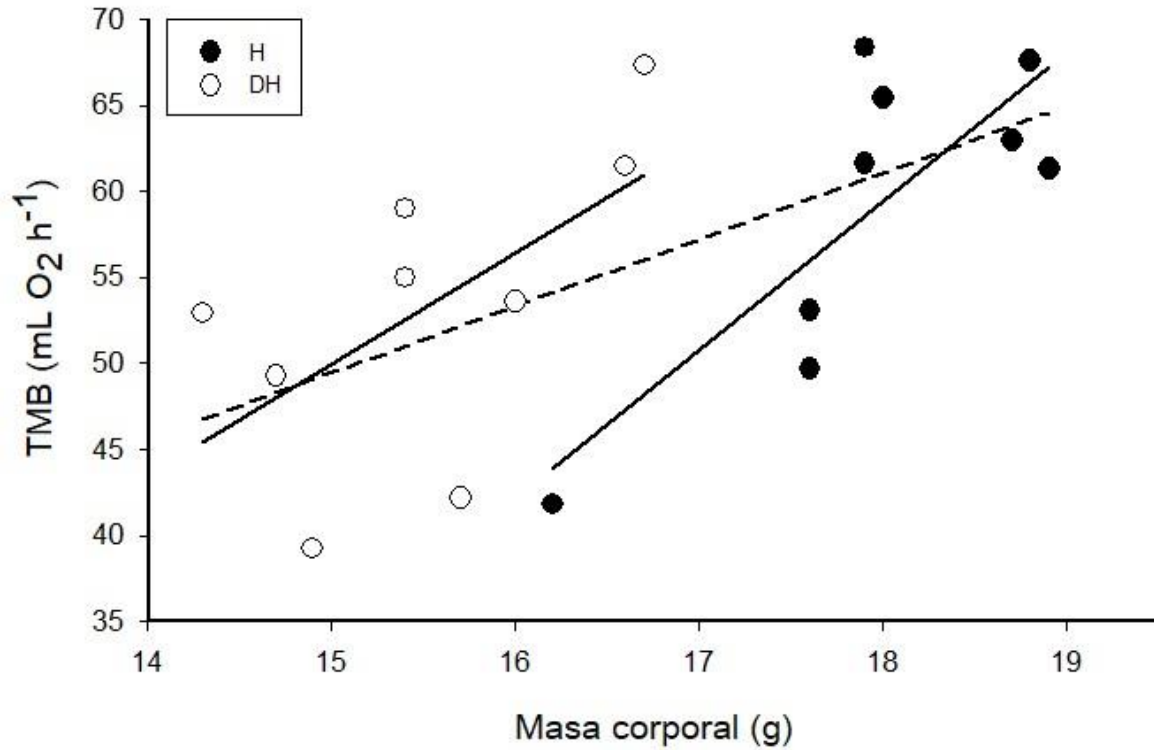


Figura 3. Tasa metabólica basal en función de la masa corporal en individuos de *Z. capensis* aclimatados a dos condiciones de hidratación durante dos semanas (véase texto para detalles). Las líneas continuas indican ajuste lineal para cada grupo H: $y = 8,67x - 96,52$; $r^2 = 0,63$, $p = 0,0100$ y DH: $y = 6,408x - 46,07$; $r^2 = 0,35$, $p = 0,0946$. La línea segmentada indica ajuste lineal para todo el conjunto de datos $y = 3,56x - 2,83$; $r^2 = 0,39$; $p = 0,0052$.

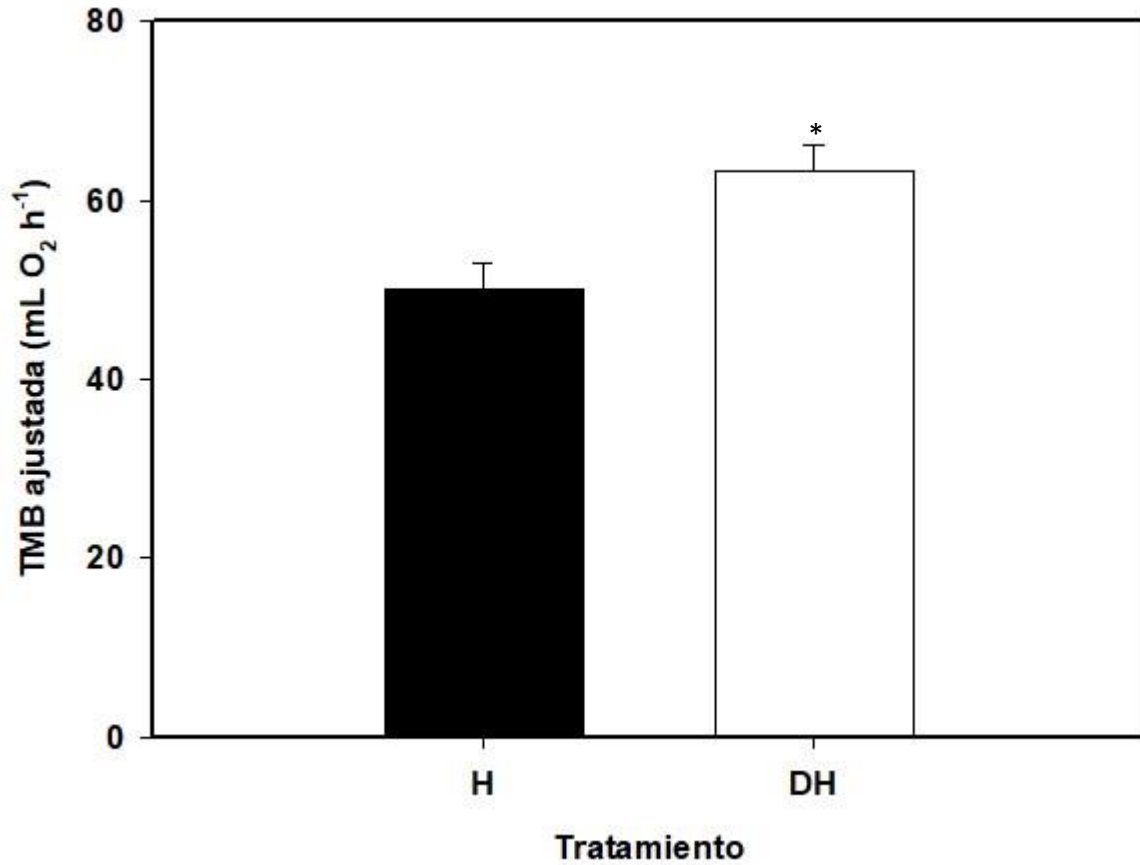


Figura 4. Promedio de la Tasa Metabólica Basal ajustada a la masa de los individuos de ambos grupos (ANCOVA $F(1,15) = 6,96$; $p = 0,0186$). El asterisco denota diferencias significativas para la tasa metabólica ajustada para ambos grupos aclimatados a distintos regímenes de disponibilidad hídrica. Se muestra el promedio más el error estándar.

5.3.2. Actividad enzimática

La actividad de citrato sintasa en eritrocitos de *Z. capensis* no presentó diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $F_{(1,16)} = 1,05$, $p = 0,3216$; Figura 5). Sin embargo, el promedio de la actividad de la enzima metabólica citocromo-c-oxidasa del grupo DH fue significativamente mayor que el promedio obtenido para el grupo H (ANOVA $F_{(1,16)} = 8,30$, $p = 0,0109$, Figura 5) y esta actividad se correlacionó negativamente con la mb ($y = -1,90x + 40,4$; $r^2 = 0,45$, $p < 0,001$; Figura 6).

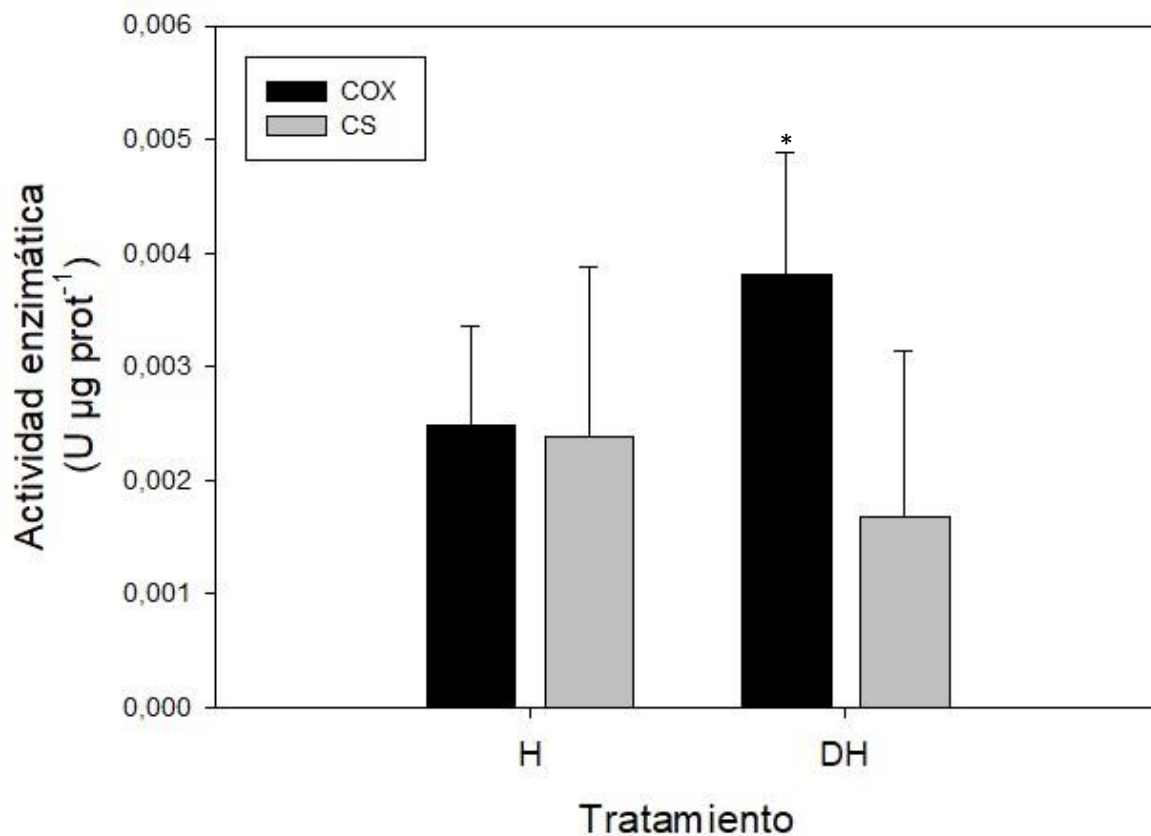


Figura 5. Actividad enzimática de COX y CS presentes en los eritrocitos de *Z. capensis* para un grupo control (H) y un grupo en dos semanas de restricción hídrica (DH). Asterisco denota diferencia significativa entre ambos grupos. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar.

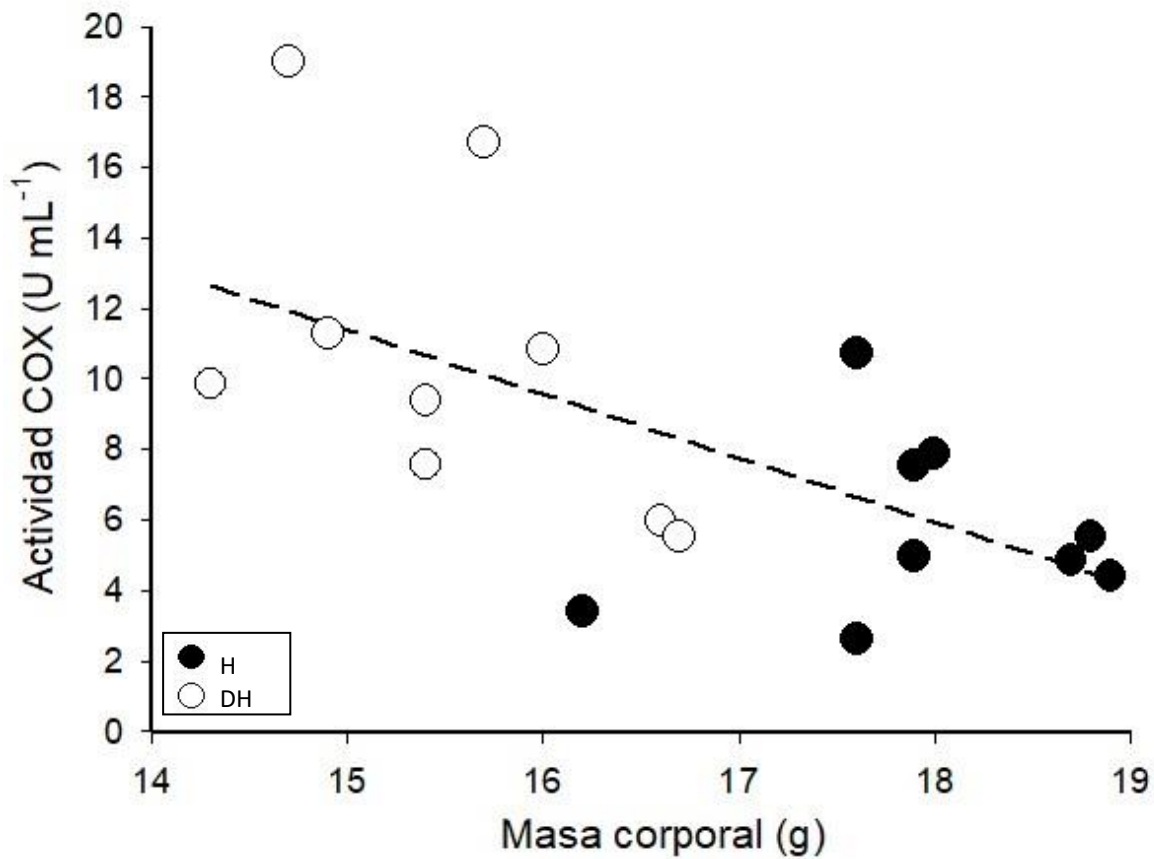


Figura 6. Actividad de COX en eritrocitos de *Z. capensis* en función de la masa corporal luego de dos semanas de aclimatación a distintos regímenes de hidratación. Línea segmentada indica el ajuste lineal (véase texto).

Al remover el efecto de la masa sobre TMB y la actividad de COX realizando un análisis de residuales, se observa una correlación positiva entre ambas variables ($y = 0,72x + 0,00$; $r^2 = 0,69$, $p < 0,001$) (Figura 7).

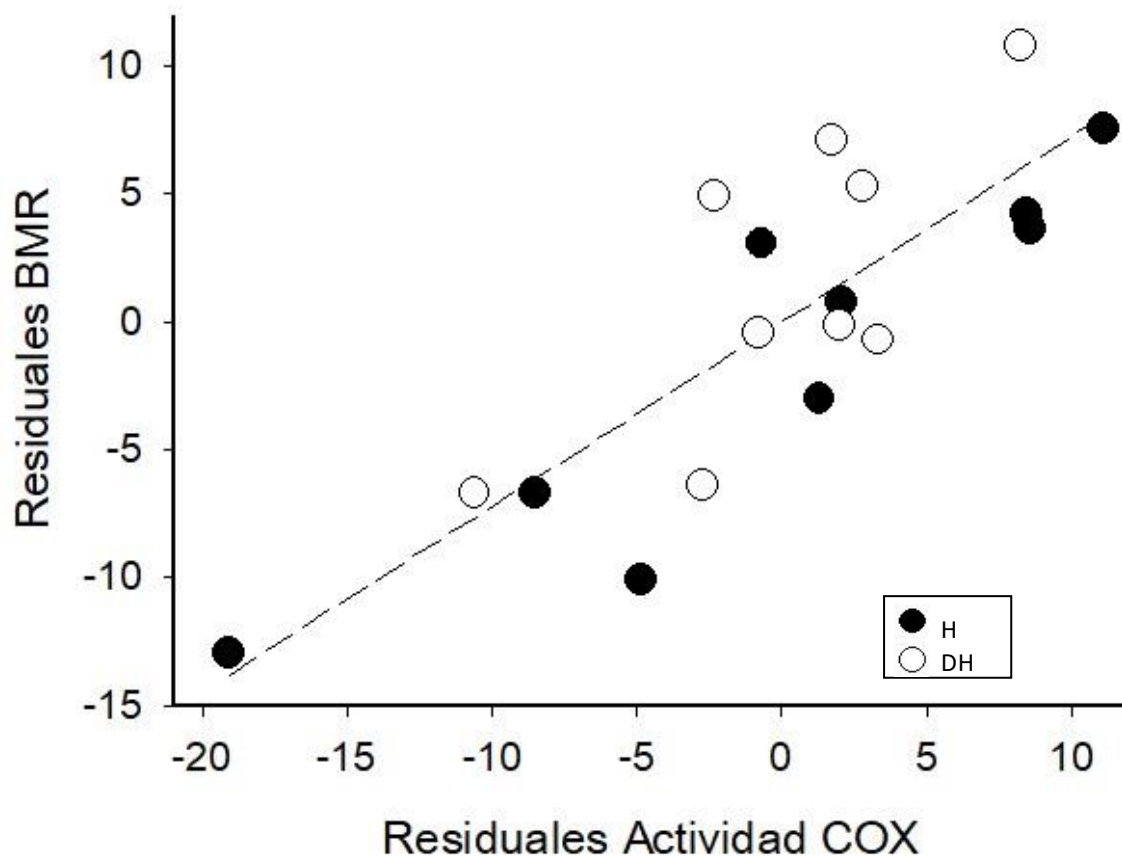


Figura 7. Los residuales de la TMB y de la actividad de COX en función de la masa corporal presentan una correlación positiva y significativa en *Z. capensis* aclimatados por dos

semanas a distintos regímenes de restricción hídrica. La línea segmentada representa el ajuste lineal utilizando ambos grupos experimentales.

6. DISCUSIÓN

Las aves cuentan con un presupuesto energético limitado y dentro de las actividades que más energía requieren se encuentra el crecimiento, la locomoción, reproducción, termorregulación y osmorregulación (McNab, 2002; McNab, 2009). En el actual escenario de cambio climático que ha producido severas modificaciones de los factores abióticos y bióticos resulta relevante evaluar los cambios y ajustes fenotípicos que permiten a las aves enfrentar dichos desafíos. Entre estos ajustes, las tasas de gasto energético (e.g. TMB) y sus mecanismos bioquímicos subyacentes (e.g. actividad de enzimas mitocondriales, PTAE) han sido utilizados comúnmente en estudios de ecofisiología. En particular, este estudio se hizo cargo de la escasa información existente sobre el efecto de la disponibilidad hídrica sobre variables metabólicas a nivel enzimático, específicamente en la sangre de aves. En este sentido, el presente trabajo documenta por primera vez la existencia de variación significativa en la TMB y en la actividad de la enzima metabólica COX en glóbulos rojos en aves sometidas experimentalmente a condiciones contrastantes de disponibilidad hídrica.

6.1. Ajustes morfológicos y osmorregulatorios

Ambos grupos disminuyeron significativamente su masa corporal durante el segundo período de tratamiento (Figura 1), lo que podría explicarse en parte por la dieta hipoproteica utilizada en este diseño experimental (véase Aldea & Sabat, 2007). A diferencia del grupo Hidratado, el grupo Deshidratado perdió masa durante ambos períodos de tratamiento (Figura 1), probablemente debido a una combinación de varios factores que responden simultáneamente a la restricción hídrica. A continuación, se proponen tres factores, no excluyentes, que podrían explicar la disminución observada de la masa corporal.

En primer lugar, la reducción en la mb puede deberse a la pérdida de agua. Existe evidencia de diferencias y ajustes entre la proporción de agua perdida por medio de la excreta y por la pérdida total de agua evaporativa (PTAE) ante una situación de deshidratación. Por ejemplo, un estudio demostró que aves (*Taeniopygia guttata*) sometidas a una restricción hídrica reducen la tasa de evaporación cutánea, demostrando además que la principal fuente de evaporación en esta especie de paseriforme es a través de la respiración y secundariamente la perdida a través de la piel (45%). Además, estos autores concluyeron que la excreta no aporta significativamente a la pérdida de agua (véase Lee et al., 1971). Concordante a esto, estudios inter poblacionales en alondras (Muñoz-García & Williams, 2005; Tieleman & Williams, 2002) muestran que la evaporación cutánea es menor en especies que habitan el desierto en comparación a las que habitan lugares más húmedos y sugieren que esto podría ser un ajuste adaptativo mediante cambios en la composición del estrato corneo de la piel. En este sentido, es probable que los individuos de *Z. capensis*

sometidos al tratamiento de deshidratación presentaran algún grado de ajuste en la tasa de PTAE, lo que pudiera haber compensado la menor ingesta de agua para y disminuir al mínimo el nivel de deshidratación en los tejidos. Esto es consistente con la constancia en el porcentaje de agua observado en al menos dos órganos luego del tratamiento experimental (véase Tabla 2).

En segundo lugar, la disminución de mb en aves deshidratadas podría estar asociada a un aumento en el catabolismo de proteínas. Efectivamente, se ha demostrado en aves que el tejido proteico entrega una mayor cantidad neta de agua por unidad de masa al ser metabolizado, en comparación al que se obtiene al metabolizar lípidos, (véase Gerson & Guglielmo, 2011). De esta manera, la facultad de las aves de utilizar preferentemente tejido proteico por sobre las reservas de lípidos ayudaría a la mantención del balance hídrico, a expensas de perder masa muscular y por ende masa corporal. El tercer y último factor que modularía la pérdida de masa, correspondería a la disminución en la ingesta de alimento cuando aves son sometidas a una restricción hídrica, fenómeno que ha sido reportado al menos en aves de corral (*Gallus domesticus*) sujetas a una deshidratación aguda (> 48 h) (Koike et al., 1983). En resumen, la deshidratación crónica de los animales parece no haber afectado la proporción de agua de los órganos (véase Tabla 2 para músculo pectoral y el intestino), por lo que probablemente este factor no influyó de manera determinante sobre la disminución de la masa corporal en el grupo deshidratado. De acuerdo con esto, el tratamiento crónico de deshidratación probablemente redujo la ingesta de alimento en el grupo DH respecto al grupo H, y en conjunto con un aumento del catabolismo de proteínas podría explicar la mayor reducción de la masa corporal. Sin embargo, la ausencia de mediciones de ingesta de alimento, PTAE y de la composición corporal, impiden decidir cuál de los mecanismos propuestos es el principal responsable de la disminución de masa en el tratamiento de deshidratación.

La masa de los órganos internos también fue afectada por el tratamiento de deshidratación. Así, tanto el hígado como el intestino disminuyeron su tamaño en las aves deshidratadas, lo que es consistente con una probable disminución del consumo de alimento.

Efectivamente, estudios han documentado cambios en la estructura, función y tamaño de estos órganos en función del consumo de alimento en aves (Ankey 1977, Karasov et al., 2004). Por el contrario, las aves deshidratadas respondieron con un aumento en el tamaño relativo del riñón (Tabla 2). Esta respuesta al estrés hídrico probablemente se relaciona con cambios en la estructura renal que resulta en una capacidad de producción de excreta más concentrada (Figura 2). Este resultado es similar al encontrado en *Z. capensis* sometido a una deshidratación moderada por 21 días y aclimatados a una dieta rica en proteínas (Aldea & Sabat, 2007). Al igual que en el presente caso, los individuos de *Z. capensis* presentaron un aumento cercano a un 13% y estos cambios morfológicos se asociaron a un aumento en la concentración de la orina. Si bien en la literatura se encuentra descrito que las aves cuentan con una capacidad limitada para concentrar la orina (Goldstein & Skadhauge, 2000), estos resultados coinciden con lo documentado anteriormente para *Z. capensis* y otros passeriformes (Peña-Villalobos et al., 2013; Sabat et al., 2004) aclimatados a distintos regímenes de deshidratación o de concentración de sales. Sin embargo, resultados opuestos se observan a nivel de poblaciones sometidas a distintos niveles de disponibilidad hídrica a lo largo de un gradiente ambiental en Chile, en donde *Z. capensis* presenta riñones más pequeños en localidades xéricas (Copiapó) y mayor tamaño renal en localidades húmedas (Valdivia) (Sabat et al., 2009). Efectivamente, aun cuando el patrón encontrado a nivel geográfico en el tamaño renal contrasta con los resultados a nivel experimental, la concentración de la orina sigue un patrón similar en ambos casos, siendo mayor en animales deshidratados en el laboratorio y en individuos de localidades secas (véase McNab 2002 para una revisión).

Paralelamente, la osmolalidad del plasma en chincoles no cambió entre ambos grupos experimentales, lo que se corresponde con resultados anteriores en *Z. capensis* deshidratados (Aldea & Sabat, 2007) y además ambos valores se encuentran dentro de lo esperado para passeriformes (Sabat et al., 2004, 2009, 2017). No obstante, Gerson & Guglielmo (2011) y Brischoux et al. (2020) han reportado aumentos significativos en la osmolalidad del plasma en gorriones (*Passer domesticus*) aclimatados a una deshidratación aguda (18-20 h), lo que sugiere que las respuestas a la deshidratación no son siempre similares en todas las especies de aves (véase Goldstein & Braun, 1988 y Skadhauge, 1977). De este modo, los resultados corroboran la respuesta plástica que esta especie suele presentar en rasgos morfo-fisiológicos que probablemente le permiten una mayor eficiencia en la conservación de agua y electrolitos en respuesta al estrés hídrico. Sin embargo, un estrés crónico desde el punto de vista metabólico podría ser costoso y afectar significativamente al presupuesto energético limitado con el que cuentan las aves.

6.2. Costo metabólico de la deshidratación y cambios en la actividad metabólica del eritrocito

Como se mencionó, nuestros resultados sugieren que *Z. capensis* puede tolerar una deshidratación moderada por al menos dos semanas, sin embargo, esta condición puede ser costosa dado que se ha observado que los cambios en rasgos morfológicos y fisiológicos relacionados con la deshidratación y estrés osmótico están asociados a cambios en la tasa metabólica (Vézina & Williams, 2005, Gutierrez et al. 2011). En términos comparativos, el valor promedio de la TMB observado para ambos grupos experimentales fue aproximadamente de un 20% y un 25% (para los grupos H y DH, respectivamente) menor al promedio reportado para *Z. capensis* capturados en invierno (Sabat et al., 2006).

Esta diferencia podría deberse principalmente a que en este estudio los animales se aclimataron a una temperatura que se ubica dentro de la zona termoneutral, lo que disminuye la necesidad de un gasto de energía adicional para termorregulación, situación que sería distinta en los animales en las condiciones climáticas de invierno, en donde la necesidad de termogénesis aumenta (Maldonado et al., 2009).

Luego del tratamiento experimental, la tasa metabólica basal total fue similar en ambos grupos experimentales, pero debido a las diferencias en la masa final entre ambos grupos, la TMB corregida por la masa (o TMB ajustada) fue mayor en los animales sometidos al tratamiento de deshidratación crónica. Además del efecto de la masa corporal, diversos factores se han propuesto para explicar las diferencias en las tasas metabólicas tanto a nivel inter como intraespecífico en aves, entre los cuales destacan la dieta, el clima, latitud, altitud y características conductuales (Burton et al., 2011; Bushuev et al., 2018; Sabat et al., 2009; Swanson, 2010). Paralelamente, la diferencia en la tasa metabólica suele estar asociada a cambios en tasas de gasto de energía de los órganos internos, lo que a su vez dependerían tanto de la masa de órganos como de las tasas de gasto de energía tejidospecífica, vía un aumento en la densidad mitocondrial y/o actividad de las enzimas presentes en ellas (McKechnie, 2008; Sabat et al., 2019; Vézina & Williams, 2005). Algunas de las actividades enzimáticas mitocondriales también pueden responder a cambios ambientales asociados a la termorregulación, donde un incremento de su actividad en tejidos que participan en la producción de calor (e.g. músculo o hígado) presenta una asociación, probablemente funcional, con la tasa metabólica basal (Peña-Villalobos et al., 2014). En particular, los resultados observados apoyan la idea de que el grado de deshidratación reduce el tamaño corporal y a su vez genera un aumento en el tamaño relativo de algunos órganos, tales como el riñón y el corazón (Tabla 2). Esto resulta interesante pues se ha reportado que estos órganos internos poseen tasas metabólicas

masa-específicas elevadas y que la variación en el metabolismo masa-independiente refleja el tamaño relativo de esta maquinaria metabólicamente activa (Daan et al., 1990).

Además, cuando las aves son sometidas a una situación de restricción hídrica, la pérdida de agua debería ser compensada con algún mecanismo alternativo. Por ejemplo Gerson & Guglielmo (2011) sugieren que el aumento del catabolismo en la masa magra de aves en reposo sometidos a restricción hídrica compensaría la PTAE; en este sentido, la disminución de la masa y el aumento de la TMB masa específica observada en *Z. capensis* (Figuras 1 y 4) sugiere que las aves efectivamente podrían aumentar el catabolismo de proteínas y con ello la producción de agua metabólica mediante la oxidación mayoritaria de tejido muscular y en menor medida lipídica. Si bien este rasgo podría ser adaptativo y conducir a una mayor independencia del recurso hídrico, resulta costoso por la pérdida significativa de masa corporal que esto exige.

Una de las características únicas de las aves y largamente ignorada en el ámbito de la fisiología ecológica y evolutiva es la presencia de glóbulos rojos nucleados con mitocondrias funcionales. Sólo recientemente, esta característica ha llamado la atención a fisiólogos y se ha encontrado la existencia de variación en su función, particularmente entre individuos de la misma especie (Stier et al. 2013, 2017). El presente estudio reveló que aves aclimatadas a distintos niveles de deshidratación presentan una modulación de la actividad catalítica de las mitocondrias presentes en eritrocitos. Efectivamente, *Zonotrichia capensis* presentó un aumento en la actividad de COX en los eritrocitos de aves aclimatadas a una condición de deshidratación crónica comparada con animales sin restricción hídrica y además esta variación se asoció a los niveles de la TMB ajustada. Este aumento de la actividad de la enzima COX sugiere la existencia de una modulación de vías metabólicas productoras y demandantes de ATP. Hace décadas, algunos autores sugirieron que la producción de ATP en eritrocitos está involucrada en el mantenimiento del balance iónico (Na y K) entre los eritrocitos y el plasma (Hunter & Hunter, 1957) mientras otros han sugerido que su presencia

podría estar asociada a mecanismos regulatorios de volumen celular utilizando proteínas transportadoras de iones (e.g., Na^+/H^+ , cotransporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y canales de Na^+) mediados por proteínas de membrana (e.g. NHEs, KCC y NKCC) dependientes de ATP (Hoffmann et al., 2009). Como este intercambio iónico en glóbulos rojos es sensible al oxígeno (Bogdanova et al., 2009) la relación observada entre TMB y la actividad catabólica de COX en eritrocitos también podría deberse a un aumento en la actividad de dos cotransportadores en particular que promueven el incremento de volumen celular (NHE y NKC), los cuales pueden ser activados por crenación o un decrecimiento en la tensión de oxígeno (Muzyamba et al., 1999). Sin embargo, los resultados observados en *Z. capensis* no apoyarían necesariamente la hipótesis de que el aumento de la actividad oxidativa mitocondrial en el eritrocito sea determinado exclusivamente por la regulación del volumen celular, dado que en este estudio la concentración del plasma se mantuvo estable entre ambos grupos experimentales, por lo que la presión osmótica a la que fueron expuestos los eritrocitos fue probablemente similar entre grupos. Aun cuando no existen suficientes datos comparativos que permitan proponer una explicación clara respecto a esta relación, al menos existe un estudio reciente que puede ser comparado con los resultados obtenidos en el presente estudio. Efectivamente, luego de remover el efecto de la masa corporal, la actividad de COX se correlaciona positiva y significativamente con la TMB masa- específica, lo que es coincidente a lo descrito recientemente por Gutiérrez et al. (2019), quienes documentaron una relación similar en un estudio del Zarapito de pico recto (*Limosa haemastica*) en un transecto temporal previo a una migración de larga distancia. En dicho estudio se planteó que la tasa de gasto de energía en esa especie estaría compuesta en parte por demandas metabólicas de algunos tejidos específicos, incluyendo la sangre.

Hasta el momento, los resultados obtenidos no permiten explicar de manera concluyente la relación encontrada entre la TMB ajustada y la actividad de COX en eritrocitos de *Z. capensis* sometidos a distintos grados de deshidratación. Sin embargo, se pueden plantear

al menos dos alternativas no excluyentes; una de ellas es que el incremento en la capacidad catabólica en eritrocitos sea en respuesta a una vasoconstricción producto de la restricción hídrica. Se ha reportado que la deshidratación, produce la vasoconstricción de capilares sanguíneos, privando de oxígeno a muchos tejidos (Kreimeier, 2000) y junto con ello los eritrocitos pueden censar la tensión de oxígeno vía microcirculación, regulando el tono vascular de capilares en tejidos específicos (Jensen, 2009). En el caso de una hipoxia producida por una vasoconstricción asociada a la deshidratación, los eritrocitos podrían aumentar la liberación de compuestos vasodilatadores (e.g. NO, ATP), promoviendo localmente un incremento en la perfusión sanguínea de tejidos que requieren oxígeno (Ellsworth et al., 1995) y aumentando así su actividad oxidativa. Por otro lado, es probable que los cambios de actividad metabólica en la sangre sean por consecuencia del aumento en el metabolismo de los tejidos *per se*. Se ha reportado que algunos sensores nutricionales (e.g. Sirtuinas, complejo TOR), en función del estado energético del organismo y ante elevados requerimientos de oxígeno, pueden generar una respuesta que incremente la utilización de nutrientes por parte de tejidos de mayor metabolismo (e.g. riñón) (Gaur et al., 2017; H. J. Lee & Yang, 2017) pero con un efecto general sobre otros tejidos (e.g., sangre). Entonces, la relación observada entre TMB y COX en glóbulos rojos, podría constituir incluso una respuesta sinérgica a favor de un correcto mantenimiento de la homeostasis vascular y respiratoria, ya sea por el hecho que los glóbulos contribuyan con el flujo sanguíneo regulando el tono vascular y/o que se encuentren bajo el control de las mismas vías reguladoras que censan los requerimientos de tejidos de alto gasto energético y por lo tanto esta asociación estaría reflejando la situación metabólica del organismo completo.

6.3. Proyecciones

Independiente de los factores próximos que expliquen la asociación entre el metabolismo del organismo y la actividad de COX, en este estudio se presentan por primera vez cambios experimentales en el metabolismo de mitocondrias de los eritrocitos nucleados en aves en función al grado de deshidratación, lo que abre una ventana de oportunidad de estudios en fisiología ecológica, tanto de campo como experimentales. Efectivamente, correlacionar la actividad catabólica de estas enzimas mitocondriales con la tasa de consumo de oxígeno, podría otorgar nuevas metodologías mínimamente invasivas para el estudio del balance energético en aves de vida libre. En particular, estimar la tasa metabólica *in situ* a través de la actividad metabólica en la sangre abre una novedosa oportunidad de investigación en aves, específicamente aquellos paseriformes cuyos números poblacionales se encuentran bajo algún grado de amenaza. En este sentido estudios futuros podrían evaluar el efecto de los cambios en la temperatura ambiente u otras variables ambientales, a una escala temporal (interanual o estacional) o en gradientes ambientales para evaluar los efectos de la escasez hídrica y aumento en olas de calor en el contexto de cambio global. Además, resulta interesante esclarecer el rol de la mitocondria en la regulación del volumen celular de aves asociadas a cursos de agua salada o climas desérticos, dado que estos hábitats podrían generar una presión selectiva sobre este rasgo. Paralelamente, no solo las aves poseen eritrocitos nucleados, por lo que estudios en reptiles y en anfibios aparecen como una avenida de estudio muy prometedora.

7. Conclusiones

Entender la relación entre las tasas de gasto energético a nivel organismo y sus correlatos bioquímicos podría ayudar a identificar los rasgos fisiológicos que moldean la plasticidad fenotípica y los atributos asociados a la tolerancia a la deshidratación; información que actualmente es escasa para la mayoría de las especies de passeriformes. Este estudio evidenció que el aumento en la tasa metabólica ajustada, inducida por la restricción hídrica, aparentemente va acompañada de modificaciones en el presupuesto energético (catabolismo de proteína), cambios morfológicos (aumento de la masa del riñón) y fisiológicos (aumento en la concentración de excreta). Sin embargo, este estudio no apoya la hipótesis de que el aumento en el catabolismo del eritrocito se debe a la mantención del volumen celular en respuesta a una restricción hídrica. Además, en el presente estudio fue posible establecer experimentalmente una asociación entre TMB y metabolismo enzimático mitocondrial en glóbulos rojos en una especie de ave passeriforme. En este sentido, tenemos la oportunidad de identificar y mitigar posibles amenazas que enfrentan las especies de aves en el nuevo escenario de cambio global, en el que los enfoques experimentales que evalúen el efecto de los estresores ambientales sobre la biología de las especies ferales pueden contribuir de modo significativo.

8. Bibliografía

- Albright, T. P., Mutiibwa, D., Gerson, A. R., Smith, E. K., Talbot, W. A., O'Neill, J. J., ... Wolf, B. O. (2017). Mapping evaporative water loss in desert passerines reveals an expanding threat of lethal dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), 2283–2288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613625114>
- Aldea, P., & Sabat, P. (2007). Osmoregulatory responses to dietary protein and water intake in the granivorous *Zonotrichia capensis* (Passerine, Emberizidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 80(4), 447–454. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2007000400006>
- Bogdanova, A., Berenbrink, M., & Nikinmaa, M. (2009). Oxygen-dependent ion transport in erythrocytes. *Acta Physiologica*, 195(3), 305–319. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01934.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Crop Journal*, 5(5), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brischoux, F., Beaugeard, E., Mohring, B., Parenteau, C., & Angelier, F. (2020). Shortterm dehydration influences baseline but not stress-induced corticosterone levels in the house sparrow (*Passer domesticus*). *The Journal of Experimental Biology*, 223(January). <https://doi.org/10.1242/jeb.216424>
- Burton, T., Killen, S. S., Armstrong, J. D., & Metcalfe, N. B. (2011). What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological

consequences? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1724), 3465–3473. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1778>

Bushuev, A., Tolstenkov, O., Zubkova, E., Solovyeva, E., & Kerimov, A. (2018). Basal metabolic rate in free-living tropical birds: the influence of phylogenetic, behavioral, and ecological factors. *Current Zoology*, 64(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/cz/zox018>

Charmantier, A., McCleery, R. H., Cole, L. R., Perrins, C., Kruuk, L. E. B., & Sheldon, B. C. (2008). Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5877), 800–803. <https://doi.org/10.1126/science.1157174>

Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P., ... Booth, B. B. B. (2013). Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility (pp. 1029–1136). pp. 1029–1136. Retrieved from <https://research.monash.edu/en/publications/long-term-climate-change-projectionscommitments-and-irreversibil>

Daan, S., Masman, D., & Groenewold, A. (1990). Avian basal metabolic rates: Their association with body composition and energy expenditure in nature. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 259(2 28-2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.259.2.r333>

Dunn, P. O., & Møller, A. P. (2014). Changes in breeding phenology and population size of birds. *Journal of Animal Ecology*, 83(3), 729–739. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12162>

Ellsworth, M. L., Forrester, T., Ellis, C. G., & Dietrich, H. H. (1995). The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory*

- Physiology*, 269(6 38-6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.6.h2155>
- Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: A third universal response to warming? *Trends in Ecology and Evolution*, 26(6), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.005>
- Gaur, U., Tu, J., Li, D., Gao, Y., Lian, T., Sun, B., ... Yang, M. (2017). Molecular evolutionary patterns of NAD⁺/ Sirtuin aging signaling pathway across taxa. *PLoS ONE*, 12(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182306>
- Gerson, A. R., & Guglielmo, C. G. (2011). House sparrows (*Passer domesticus*) increase protein catabolism in response to water restriction. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 300(4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00701.2010>
- Goldstein, D. L., & Braun, E. J. (1988). Contributions of the kidneys and intestines to water conservation, and plasma levels of antidiuretic hormone, during dehydration in house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 158(3), 353–361. <https://doi.org/10.1007/BF00695334>
- Goldstein, D. L., & Skadhauge, E. (2000). Renal and Extrarenal Regulation of Body Fluid Composition. In *Sturkie's Avian Physiology* (Fifth Edit). <https://doi.org/10.1016/b978-012747605-6/50012-2>
- Gutiérrez, J. S., Masero, J. A., Abad-Gómez, J. M., Villegas, A., & Sánchez-Guzmán, J. M. (2011). Understanding the energetic costs of living in saline environments: Effects of salinity on basal metabolic rate, body mass and daily energy consumption of a longdistance migratory shorebird. *Journal of Experimental Biology*, 214(5), 829–835. <https://doi.org/10.1242/jeb.048223>
- Gutiérrez, J. S., Sabat, P., Castañeda, L. E., Contreras, C., Navarrete, L., Peña-Villalobos,

- I., & Navedo, J. G. (2019). Oxidative status and metabolic profile in a long-lived bird preparing for extreme endurance migration. *Scientific Reports*, 9(1), 17616.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54057-6>
- Hitch, A. T., & Leberg, P. L. (2007). Breeding Distributions of North American Bird Species Moving North as a Result of Climate Change. *Conservation Biology*, 21(2), 534–539.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00609.x>
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiological Reviews*, 89(1), 193–277.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
- Hughes, L., Hughes, L., & Hughes, L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*, 15(2), 56–61.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01764-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01764-4)
- Hunter, A. S., & Hunter, F. R. (1957). A comparative study of erythrocyte metabolism. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(3), 479–502.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030490307>
- Huntley, B., Collingham, Y. C., Willis, S. G., & Green, R. E. (2008). Potential Impacts of Climatic Change on European Breeding Birds. *PLoS ONE*, 3(1), e1439.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001439>
- Instituto Geofísico del Perú. (2005). Vulnerabilidad actual y futura ante el cambio climático y medidas de adaptación en la Cuenca del Río Mantaro: Volumen III. *Repositorio Institucional - IGP*. Retrieved from <https://repositorio.igp.gob.pe/handle/IGP/742>
- Jensen, F. B. (2009). The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: Oxygen carriers and regulators of local blood flow. *Journal of Experimental Biology*, 212(21), 3387–3393. <https://doi.org/10.1242/jeb.023697>

Karasov, W. H., Pinshow, B., Starck, J. M., & Afik, D. (2004). Anatomical and histological changes in the alimentary tract of migrating blackcaps (*Sylvia atricapilla*): A comparison among fed, fasted, food-restricted, and refed birds. *Physiological and*

Biochemical Zoology, 77(1), 149–160. <https://doi.org/10.1086/381465>

Koike, T. I., Pryor, L. R., & Neldon, H. L. (1983). Plasma volume and electrolytes during progressive water deprivation in chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative*

Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology, 74(1), 83–87.

[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90716-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90716-8)

Kreimeier, U. (2000, March). Pathophysiology of fluid imbalance. In *Critical Care* (Vol. 4, No. 2, p. S3). BioMed Central.

Lee, H. J., & Yang, S. J. (2017). Aging-Related Correlation between Serum Sirtuin 1

Activities and Basal Metabolic Rate in Women, but not in Men. *Clinical Nutrition*

Research, 6(1), 18. <https://doi.org/10.7762/cnr.2017.6.1.18>

Lee, P., & Schmidt-Nielsen, K. (1971). Respiratory and cutaneous evaporation in the zebra finch: effect on water balance. *The American Journal of Physiology*, 220(6), 1598–

1605. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.6.1598>

Maddocks, T. A., & Geiser, F. (2000). Seasonal variations in thermal energetics of

Australian silvereyes (*Zosterops lateralis*). *Journal of Zoology*, 252(3), 327–333.

<https://doi.org/10.1017/S0952836900000066>

Maldonado, K. E., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M., & Sabat, P. (2009). Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal

acclimatization. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and*

Environmental Physiology, 179(3), 335–343. [https://doi.org/10.1007/s00360-008-](https://doi.org/10.1007/s00360-008-0317-1)

0317-1

McCarty, J. P. (2001). Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology*, 15(2), 320–331. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015002320.x>

McKechnie, A. E. (2008). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(3), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0218-8>

McKechnie, A. E., & Wolf, B. O. (2010). Climate change increases the likelihood of catastrophic avian mortality events during extreme heat waves. *Biology Letters*, 6(2), 253–256. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0702>

McNab, Brian K. (2002). Short-term energy conservation in endotherms in relation to body mass, habits, and environment. *Journal of Thermal Biology*, 27(6), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00016-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00016-5)

McNab, Brian Keith. (2009). Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(1), 22–45. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2008.08.021>

Moritz, K. M., Bee Lim, G., & Wintour, E. . (1997). Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. 1–1. <https://doi.org/10.1109/islc.2004.1382723>

Muñoz-García, A., & Williams, J. B. (2005). Cutaneous water loss and lipids of the stratum corneum in house sparrows *Passer domesticus* from arid and mesic environments. *Journal of Experimental Biology*, 208(19), 3689–3700. <https://doi.org/10.1242/jeb.01811>

Muzyamba, M. C., Cossins, A. R., & Gibson, J. S. (1999). Regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in turkey red cells: The role of oxygen tension and protein phosphorylation. *Journal of Physiology*, 517(2), 421–429. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0421t.x>

- Noakes, M. J., & McKechnie, A. E. (2020). Seasonal Metabolic Acclimatization Varies in Direction and Magnitude among Years in Two Arid-Zone Passerines. *Physiological and Biochemical Zoology*, 93(2), 140–152. <https://doi.org/10.1086/707679>
- 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, 338–350. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.3.338>
- Peña-Villalobos, I., Valdes-Ferranty, F., & Sabat, P. (2013). Osmoregulatory and metabolic costs of salt excretion in the Rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis*.
- Sabat, P. (2000). Birds in marine and saline environments: living in dry habitats. *Revista Chilena de Historia Natural*, Vol. 73. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2000000300004>
- Sabat, P., Bozinovic, F., Contreras-ramos, C., Nespolo, R. F., Newsome, S. D., Quirici, V., ... Sanchez-hernandez, J. C. (2019). The interplay between ambient temperature and salt intake affects oxidative status and immune responses in a ubiquitous Neotropical passerine, the rufous-collared sparrow. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 234(March), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.016>
- Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C., & Canals, M. (2006). Water and energy economy of an omnivorous bird: Population differences in the Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(4), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.016>
- Sabat, P., Cavieres, G., Veloso, C., Canals, M., & Bozinovic, F. (2009). Intraspecific basal metabolic rate varies with trophic level in rufous-collared sparrows. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 154(4), 502–507. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2009.08.009>

Sabat, P., Gonzalez-Vejares, S., & Maldonado, K. (2009). Diet and habitat aridity affect osmoregulatory physiology: An intraspecific field study along environmental gradients in the Rufous-collared sparrow. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(3), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.003>

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

Sabat, P., Narváez, C., Peña-Villalobos, I., Contreras, C., Maldonado, K., SanchezHernandez., J. C., ... Bozinovic, F. (2017). Coping with salt water habitats: Metabolic and oxidative responses to salt intake in the rufous-collared sparrow. *Frontiers in Physiology*, 8(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00654>

Skadhauge, E. (1977). Solute composition of the osmotic space of ureteral urine in dehydrated chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 56(3), 271-274.

Smit, B., & McKechnie, A. E. (2010). Avian seasonal metabolic variation in a subtropical desert: Basal metabolic rates are lower in winter than in summer. *Functional Ecology*, 24(2), 330–339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01646.x>

- Stier, A., Bize, P., Schull, Q., Zoll, J., Singh, F., Geny, B., Criscuolo, F. (2013). Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in Zoology*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-33>
- Stier, A., Reichert, S., Criscuolo, F., & Bize, P. (2015). Red blood cells open promising avenues for longitudinal studies of ageing in laboratory, non-model and wild animals. *Experimental Gerontology*. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.001>
- Stier, A., Romestaing, C., Schull, Q., Lefol, E., Robin, J. P., Roussel, D., & Bize, P. (2017). How to measure mitochondrial function in birds using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1172–1182. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12724>
- Swanson, D. L. (2010). Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. In *Current Ornithology Volume 17* (pp. 75-129). Springer, New York, NY.
- Tieleman, B. I., & Williams, J. B. (2002). Cutaneous and respiratory water loss in larks from arid and mesic environments. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(6), 590–599. <https://doi.org/10.1086/344491>
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., & Buschur, M. E. (2002). Physiological adjustments to arid and mesic environments in larks (Alaudidae). *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(3), 305–313. <https://doi.org/10.1086/341998>
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., Buschur, M. E., & Brown, C. R. (2003). Phenotypic variation of larks along an aridity gradient: Are desert birds more flexible? *Ecology*, 84(7), 1800–1815. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[1800:PVOLAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[1800:PVOLAA]2.0.CO;2)

- 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*, 19(1), 119–128. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2005.00942.x>
- Walther, G., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., ... Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416, 389–395. <https://doi.org/10.1038/416389a>
- Yom-Tov, Y. (2001). Global warming and body mass decline in Israeli passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1470), 947–952. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1592>