

Evaluación del comportamiento de *Tamandua tetradactyla* ante estímulos alimentarios (insecta: Formicidae y Termitidae), su valor nutricional y su digestibilidad *in vitro*.

Tesinista: Valentín Zárate

Director: Dr. Juan Manuel Busso

Codirectora: Dra. Romina Mufari

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Carrera de Ciencias Biológicas

Título de la tesina: Evaluación del comportamiento de *Tamandua tetradactyla* ante estímulos alimentarios (insecta: Formicidae y Termitidae), su valor nutricional y su digestibilidad *in vitro*.

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice

Resumen	5
1. Introducción	6
1.1. Hipótesis, predicciones y objetivos.....	10
2. Materiales y métodos	11
2. 1. Animales y condiciones de cría.....	11
2. 2. Diseño experimental.....	11
2. 2. 1. Sala de evaluación comportamental	11
2. 2. 2. Recolección y preparación de los estímulos alimentarios.....	12
2. 2. 3. Estudio de comportamiento.....	12
2. 2. 3. 1. Evaluación comportamental 1.....	15
2. 2. 3. 2. Evaluación comportamental 2.....	16
2. 2. 4. Diseño de las pruebas bioquímicas.....	17
2. 2. 4. 1. Preparación de los insectos.....	17
2. 2. 4. 2. Valoración nutricional.....	17
2. 2. 4. 3. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	17
2. 3. Análisis estadístico.....	18
3. Resultados	19
3. 1. Evaluaciones comportamentales.....	19
3. 1. 1. Evaluación comportamiento 1.....	19
3. 1. 2. Evaluación comportamiento 2.....	21
3. 2. Pruebas bioquímicas.....	23
4. Discusión	25
5. Conclusiones	30
Referencias bibliográficas	31
Anexo	34

Resumen

Los predadores pueden exhibir dietas altamente especializadas, esto ocurre en el caso de *Tamandua tetradactyla*, un mamífero que se alimenta casi exclusivamente de termitas y hormigas. Comprender la causalidad de los comportamientos alimentarios de los predadores puede ser útil para abordar diversos aspectos de su biología. Bajo condiciones controladas, la teoría de dieta óptima ha sido útil para explicar la presa de un predador basándose en una serie de factores, siendo algunos de ellos: la abundancia de la presa, su valor nutricional y su digestibilidad. En el presente trabajo se evaluó, bajo condiciones controladas, las actividades comportamentales de *T. tetradactyla* ante la presencia de hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae). A su vez, se evaluó el valor nutricional y la digestibilidad proteica *in vitro* de los insectos ofrecidos. Para ello, se estudiaron de 7 ejemplares adultos de *T. tetradactyla* que se encontraban en el Zoológico de Córdoba, Argentina. Los animales fueron expuestos en una sala acondicionada a comederos con termitas y hormigas en dos evaluaciones comportamentales, en la primera la proporción de insectos fue 1:1, y en la segunda fue 1:3, a favor de las hormigas. Previo a esto, se realizaron evaluaciones de habituación a la sala y de discriminación de estímulos olfatorios; paralelamente, en el transcurso de todo el estudio se midió la frecuencia respiratoria de los animales. Mediante métodos recomendados por la AOAC (1999), se determinó el valor nutricional y digestibilidad *in vitro* de los dos grupos de insectos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas. En la primera evaluación comportamental se detectó que los ejemplares estuvieron más tiempo con los comederos con insectos que en el control (sin insectos), mientras que en la segunda estuvieron más tiempo con los comederos con termitas que con la mayoría de los comederos con hormigas. A su vez, en todos los casos se detectó que el consumo de termitas fue mayor que el de hormigas. Por su parte, las pruebas bioquímicas indicaron que las hormigas presentaron mayor contenido de proteínas y lípidos que las termitas ($35,28 \pm 0,18$ vs $18,19 \pm 0,34\%$ y $16,95 \pm 0,13$ vs $6,54 \pm 0,31\%$), y con respecto carbohidratos y digestibilidad *in vitro* el mayor valor correspondió a las termitas ($33,07$ vs $9,66\%$ y $97,84 \pm 1,63$ vs $41,6 \pm 0,43\%$). Para cenizas no se detectaron diferencias. Bajo las condiciones del presente estudio se logró observar, en términos de consumo, una aparente selectividad de presa (termitas) por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla*. Estos consumieron más cantidad de estas aun cuando su abundancia fue menor; y si bien, estas mostraron bajo valor nutricional con respecto a las hormigas su digestibilidad *in vitro* fue significativamente mayor.

1. Introducción

El comportamiento animal está basado en acciones, pudiendo ser desde movimientos simples (reflejos) hasta secuencias de actividades complejas y conscientes. Estas acciones determinarán el modo en el que cada individuo enfrente diversas situaciones a lo largo de su vida. La respuesta a la pregunta ¿por qué un animal hace lo que hace? es el producto de la interacción de un sinnúmero de factores. Según la formulación clásica de Tinbergen (1963) para comprender de manera global la causalidad de un comportamiento este debe ser analizado desde cuatro niveles: su causalidad inmediata (mecanismos de control), mediata (ontogenia), su historia filogenética (evolución) y su significado adaptativo (función). Entre los factores que afectan el comportamiento, la alimentación es sin lugar a duda uno de los más importantes, conocer más sobre comportamientos alimentarios puede servir para comprender diversos aspectos de la biología del animal, pudiéndose abordar aspectos tanto fisiológicos y ecológicos como evolutivos (Logan y Fantino, 1979).

En el presente trabajo se estudiaron los comportamientos alimentarios de *Tamandua tetradactyla*, comúnmente conocido como oso melero (Hayysen, 2011). Esta especie se encuentra en el norte y centro de Sudamérica, llegando hasta Argentina (Hayysen, 2011); en Córdoba, hace pocos años se han efectuado las primeras observaciones documentadas (Torres, 2009). Estos mamíferos pertenecen al Superorden Xenarthra, Familia Myrmecophagidae, junto a especies como *Myrmecophaga tridactyla*, comúnmente conocido como oso hormiguero.

Los predadores exhiben principalmente dos estrategias para conseguir a sus presas, la búsqueda activa o caza al acecho, siendo la primera la táctica utilizada por *T. tetradactyla* (Hayysen, 2011). Estos animales son de hábitos arborícolas especializados en la alimentación a base de insectos sociales, principalmente hormigas y termitas (Hayysen, 2011). En vida silvestre se comportan como predadores individualistas nocturnos a crepusculares-diurnos (Montgomery 1985; Wetzel 1985) con ciclos de actividad continua de aproximadamente 8 horas diarias (Camilo-Alves y col., 2006) guiándose principalmente por su agudo sentido del olfato para percibir a sus presas (Hayysen, 2011). Los ejemplares de *T. tetradactyla* visitan hasta 80 colonias por ciclo de actividad (Montgomery, 1985) e invierten poco tiempo en cada nido, con un máximo

de aproximadamente 5 minutos, pero en la mayoría de los casos la alimentación es de 1 minuto o menos, usando en general los mismos caminos durante diferentes días (Montgomery y Lubin 1977). Para poder tener esta acotada dieta, *T. tetradactyla* cuenta con notables adaptaciones morfo-fisiológicas, como su hocico elongado y curvado hacia abajo, edéntulo (Hayysen, 2011) con una pequeña abertura distal por donde proyecta su larga lengua viliforme la cual se encuentra impregnada de saliva pegajosa ideal para capturar pequeños insectos como hormigas o termitas, dicha secreción es producida en una enorme glándula salival parótida (Dalquest y Werner, 1952). Además, cuenta con fuertes garras en sus extremidades anteriores, las cuales son utilizadas entre otras funciones, para desarmar los termiteros y hormigueros (Hayysen, 2011).

Para abordar el estudio de los comportamientos predadores de *T. tetradactyla* se tomarán algunas variables que surgen de trabajos basados en la Teoría de dieta óptima (Emlen, 1966; MacArthur y Pianka, 1966; Schoener, 1971; Werner y Hall 1974; Charnov 1976). Esta teoría ha sido útil en ecología para explicar y predecir la dieta de los predadores, basándose en una serie de factores que determinan la dieta en función de energía neta obtenida. Los factores más importantes o frecuentemente reconocidos son: la abundancia relativa de la presa, detectabilidad, vulnerabilidad, digestibilidad, valor nutricional, entre otras. Redford y Dorea (1984) han observado que los mamíferos insectívoros en su hábitat natural no parecen presentar patrones claros de selección de su presa en relación a variables como el valor nutricional de las mismas, sino en relación a su disponibilidad y otros factores semejantes. Para la especie de interés en el presente trabajo, en vida silvestre existen una serie de factores que dificultan la visualización de una real selectividad de presa en *T. tetradactyla*, como la notable heterogeneidad en la distribución espacial de las colonias de estos insectos y la gran variabilidad estacional de su disponibilidad (Montgomery, 1985; Kaspari, 2000), sumado a esto hormigas y termitas exhiben gran variedad de estrategias defensivas y maneras de construir sus nidos (Borrer y col., 1976) lo cual podría influenciar la selectividad por parte del predador (Lubin y Montgomery, 1981). Aunque se ha mencionado que *T. tetradactyla* en vida silvestre prefiere las termitas (Wetzel, 1982; Montgomery, 1985), en particular especies del género *Nasutitermes* (Termitidae) (Montgomery, 1985), característica posiblemente relacionada con el hábito arborícola de estas termitas, ya que Hayysen (2011) informó que los ejemplares de *T. tetradactyla* en Venezuela han sido encontrados un 64% sobre árboles y un 36% en el suelo. A su

vez, análisis de contenido estomacal muestran que dicha selectividad es cuestionable, habiéndose encontrado muestras de individuos con mayor abundancia de hormigas, de diversos géneros (*Camponotus* sp., *Atta* sp., *Acromyrmex* sp., *Pheidole* sp., *Azteca* sp., entre otros) (Redford, 1983; Montgomery, 1985; Jimeno y González, 2004; Hayysen, 2011; Sandoval, 2012).

Como se ha mencionado previamente, los ejemplares de *T. tetradactyla* perciben a través del olfato a las hormigas y a las termitas (Hayysen, 2011); estos grupos de insectos comparten la cualidad de establecer estructuras sociales muy complejas, lo que llevo a que sean categorizados como “insectos eusociales” (Wilson, 2008). Estos niveles de organización social, presentes tanto en hormigas como en termitas, se logran con un complejo sistema de comunicación basado en la emisión de una gran cantidad de compuestos llamados feromonas, las cuales son producidas en glándulas exocrinas altamente específicas (Hölldobler y Wilson, 2005), siendo la base química de dichas sustancias muy diferente entre hormigas y termitas (Morgan, 1990). Estas feromonas tienen una función esencial a nivel intraespecífico, pero en casos pueden actuar a modo de alelomonas (comunicación a nivel interespecífico) pudiendo ser un estímulo atractor para potenciales predadores (Borror y col., 1976). Estos volátiles podrían tener un rol importante en la relación predador/presa de *T. tetradactyla*/hormigas y termitas; bajo esta suposición, una evaluación sensorial con énfasis en el olfato podría evidenciar aspectos relevantes sobre la dieta del predador. Por lo tanto, este aspecto puede evaluarse por medio de evaluaciones sensoriales como las pruebas discriminatorias (Anzaldúa-Morales, 1994), las cuales son utilizadas para evidenciar las respuestas comportamentales cuando se ofrecen las muestras de interés en distintas cantidades relativas (Larmond, 1977). El campo de las pruebas sensoriales está ampliamente estudiado para el humano, siendo este muy utilizado en industrias de alimentos, farmacéutica, perfumería, etc. (Anzaldúa-Morales, 1994). Su aplicación es mucho más exacta y eficiente en personas, ya que es más sencillo conocer sus experiencias previas, pueden contestar encuestas, opinar de manera subjetiva, etc. Para efectuar una prueba sensorial de alimentos en animales, existen otras estrategias para obtener la información precisada, por ejemplo a través de la descripción y el análisis de los comportamientos desarrollados (Carranza, 1994) y/o cuantificando el consumo de las muestras ofrecidas. Otros factores pueden afectar la elección del estímulo alimentario, tales como la digestibilidad y el valor nutricional. El primero, principalmente por las características del tegumento de sus presas, compuesto en gran medida por proteínas y carbohidratos

difíciles de degradar (Borror y col., 1976; Redford, 1984). Este aspecto puede evaluarse por medio de pruebas *in vitro*; se ha observado que en otras especies de animales monogástricos con hábitos alimentarios semejantes a *T. tetradactyla* (Boisen y Fernández, 1995; Gull y col., 2015; Lin y col., 2015) las reacciones digestivas que ocurren en el tracto pueden ser simuladas de manera rápida y eficiente mediante técnicas *in vitro* (Ramos Talma, 1995; Malca, 2004). Por otro lado, se considera que para caracterizar de manera más completa los estímulos alimentarios se debe efectuar una valoración nutricional de los mismos. A modo de ejemplo, nuevos aportes asociados mamífero que incluye hormigas y termitas en su dieta (primates), indicarían que estos consumen las primeras según las oportunidades encuentro, y las segundas serían seleccionadas por los primates debido a la presencia de nutrientes específicos (Deblauwe y Janssens, 2008). Oyarzun y col. (1996) ha realizado una completa valoración del alimento en *T. tetradactyla*, aunque dicho estudio fue realizado solo en colonias de termitas arborícolas del género *Nasutitermes*.

La información sobre la biología trófica de *T. tetradactyla* y otras especies de la Familia Myrmecophagidae es escasa y difusa (Sandoval, 2012), por lo cual se considera necesaria la realización del presente estudio, planteado en una situación controlada y homogénea donde se han realizado otros estudios de fisiología y comportamiento (ej. Eguizabal y col., 2013), y en el cual se abordarán nuevos estudios de comportamientos alimentarios, valor nutricional y digestibilidad *in vitro* de dos componentes de su dieta en vida silvestre. Sumado a esto, considerando que la conservación *ex situ* o equivalente (categorizado a nivel global como LC (Least Concern) por la IUCN (2014) y a nivel provincial, Córdoba, en peligro de extinción) enfrenta un manejo difícil de los ejemplares de *T. tetradactyla* principalmente por sus especializadas características de alimentación, siendo muy frecuentes los problemas digestivos y nutricionales (Meritt, 1970; Cuarón, 1987; Ward y col., 1995; Gallegos, 1998; Valdés, 2000). El presente trabajo podría contribuir al manejo de ejemplares mantenidos en condiciones controladas y futuros estudios en vida silvestre, en temas tales como ecología trófica de predadores insectívoros especialistas.

1.1. Hipótesis, predicciones y objetivos

Hipótesis: Las características de los insectos ofrecidos como estímulos alimentarios, hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae), afectan las respuestas comportamentales de los ejemplares de *T. tetradactyla*.

Predicciones: 1- En cantidades iguales, los ejemplares de *T. tetradactyla* se dirigirán primero hacia las termitas y consumirán mayor cantidad de éstas; 2- El patrón observado se mantendrá aun cuando la cantidad relativa de termitas sea menor; 3- La digestibilidad y el valor nutricional serán mayores en el alimento asumido como preferido.

Objetivos generales: 1- Evidenciar potenciales factores vinculados con la causalidad de los rasgos conductuales en *T. tetradactyla* como predador y 2- Validar una metodología de análisis sensorial con énfasis en el olfato para evaluar comportamientos alimentarios en mamíferos insectívoros bajo condiciones de manejo controlado.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar la actividad comportamental ante la presencia de hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae) bajo condiciones de manejo controlado.
- 2) Evaluar el valor nutricional y la digestibilidad *in vitro* de los insectos ofrecidos como estímulos alimentarios

2. Materiales y Métodos

2.1. Animales y condiciones de manejo: Se estudiaron ejemplares de *T. tetradactyla* (n=7, 4♀ y 3 ♂) que se encontraban en habitáculos individuales (de volúmenes semejantes), bajo condiciones de temperatura, fotoperiodo y humedad naturales en el Jardín Zoológico de Córdoba (31°12', 32°S; 64°16,84'W; Argentina). Siguiendo las recomendaciones de Superina y col (2008), los habitáculos en su interior contaban con un refugio de madera (calefaccionado con lámpara infrarroja en época invernal) y una caseta de cemento; la ambientación estaba constituida por sustrato de tierra, vegetación escasa, varias ramas, troncos y plataformas de madera colgando, así como también algunos troncos y piedras distribuidos en el suelo. Brevemente, como en estudios previos (ej. Eguizábal y col 2013), el alimento suministrado era un batido de leche entera en polvo reducida en lactosa, cereales infantiles, alimento balanceado canino para cachorros y agua corriente. A cada individuo se le ofrecía alimento en tres vasos colocados en altura y en un comedero de mayor tamaño. Además, se administraba 2mL de Vitamina K en la dieta, 3 veces por semana. Con frecuencia se les ofrecía enriquecimiento alimenticio: frutas, miel, tenebrios y hormigas (*Camponotus rufipes*, *Pheidole* sp. y en mayor medida *Acromyrmex lundii*) y ocasionalmente termitas (Termitidae) recolectadas de nidos naturales ubicados en el departamento de Pocho, Córdoba.

Las tareas de limpieza del recinto (10-13hs) y provisión de alimento (14-16hs) y agua eran diarias. Además, los animales fueron mensualmente trasladados al laboratorio contiguo a los recintos para llevar a cabo controles de peso corporal; este laboratorio fue acondicionado para realizar las pruebas comportamentales (ver sección 2.2.1). El trabajo con los animales fue desarrollado en los meses de noviembre y diciembre de 2017 y febrero de 2018.

2.2. Diseño experimental

2.2.1. Sala de evaluación comportamental: A fin de evaluar las actividades comportamentales a los estímulos alimentarios, se trabajó en una sala acondicionada (3 x 3 mts), con cuatro paredes homogéneas, suelo de cemento y un único ingreso a través de una puerta. La temperatura (°C) se mantuvo con aire acondicionado en $24 \pm 1,1$, y no difirió de la temperatura ambiental medida en los habitáculos ($24,5 \pm 1,4$). La luz de la sala fue artificial por medio de una única lámpara ubicada en posición central en el techo de la misma. Las actividades comportamentales fueron registradas a través de dos cámaras de filmación (HIKVISION Turbo HD- IR Turret Camera- DS 2CE56C2T IRM), una ubicada en posición central (cámara 1) y otra hacia la pared izquierda con respecto a la puerta de ingreso (cámara 2) (ver fotos en

Ilustraciones 1 y 2). Los videos fueron guardados en un DVR (HIKVISION Turbo HD DVR- DS 7200 Series) para ser luego analizados.

2.2.2. Recolección y preparación de los estímulos alimentarios: Los estímulos alimentarios fueron hormigas (Formicidae: *Acromyrmex lundii*) y termitas (Termitidae). Las hormigas fueron recolectadas de nidos naturales ubicados en el predio del Zoológico, y las termitas de nidos naturales ubicados en el Departamento de Pocho, Córdoba (31° 22,20'S, 65° 18,37''W, Argentina). Las recolecciones se realizaron en dos ocasiones (noviembre y febrero), durante los días previos a las evaluaciones comportamentales para contar con los insectos vivos. La preparación de los estímulos alimentarios se realizó el día previo a cada evaluación comportamental, separando del sustrato de los nidos y pesando en promedio $1,07 \pm 0,01$ gr de insectos vivos en vasos estériles. Además, para las pruebas bioquímicas (ver sección 2.2.4), se separó la cantidad necesaria de insecto en vasos estériles y los mismos fueron guardados en congelador (-20°C) durante 24 hs.

2.2.3. Estudio del comportamiento: Los ejemplares de *T. tetradactyla* fueron sujetos a dos evaluaciones comportamentales entre los horarios 17-20hs (cuando están habitualmente activos; Eguizábal y col, 2017), cada una consistió en tres sesiones (3 días consecutivos), cada una de 10 minutos por animal. La evaluación 1 tuvo como fecha de comienzo el 1 de diciembre de 2017 y la evaluación 2 el 9 de febrero de 2018 (que contó con 6 individuos).

Antes del ingreso de cada ejemplar de *T. tetradactyla*, la sala se limpió usando agua con 5mL de



Foto 1: Cuadrícula de la sala de evaluación comportamental, imagen registrada desde la cámara 1.

hipoclorito de sodio (40-60 gr/L). En el caso de las evaluaciones comportamentales en las que se ofrecieron los estímulos alimentarios, los comederos (plato metálico de 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad) fueron lavados con agua y secados papel.

En todos los casos, los animales fueron trasladados (por el tésinista) en menos de 60 segundos desde sus habitáculos hasta la sala de evaluación, sujetándolos por la cola como habitualmente los manejan los cuidadores.

A fin de analizar los videos de las actividades

de los animales en las evaluaciones comportamentales, de manera similar a lo hecho en otros estudios con otras especies (Prut y Belzung, 2003), el área de la sala fue dividida en una cuadrícula compuesta por cuadrados de 50x50 cm (Foto 1), esta área se consideró arbitrariamente en función del tamaño del animal (Hayysen, 2011) y el área de la sala de evaluación. La cuadrícula se marcó con cinta adhesiva en el suelo de la sala, se marcaron en el monitor donde se observaron las evaluaciones comportamentales y luego se quitaron las cintas.

Las actividades que se registraron en ambas evaluaciones comportamentales (ver secciones 2.2.3.1 y 2.2.3.2) fueron:

- Latencia a ambular (segundos): Se midió el tiempo transcurrido desde que el animal fue ubicado en la sala (sus cuatro extremidades contactaron el suelo) hasta que la cabeza completa del animal sale del cuadrado.
- Latencia de visita al primer comedero (segundos): Se midió el tiempo transcurrido desde que el animal fue ubicado en la sala (sus cuatro extremidades contactaron el suelo) y el ingreso del mismo al cuadrado en el que se encontraba el comedero (desde que su cabeza ingreso completamente). En los casos que el animal ingresó al cuadrado, pero este no contactó el comedero no fueron considerados como visita al estímulo.
- Orden de visita de los comederos: se enumeró el orden en el que el animal visitó los comederos en el transcurso de la sesión.
- Cantidad de visitas a los comederos: Se registró la cantidad de veces que el animal visitó cada comedero. Considerando como visita cada vez que el ejemplar ingresaba al cuadrado y a su vez este contactaba el comedero.
- Duración de cada visita (segundos): Se midió el tiempo que cada animal estuvo dentro del cuadrado donde se ubicaban los comederos. Considerando como visita cada vez que el ejemplar ingresaba al cuadrado y a su vez este contactaba el comedero. Con esta información se calculó la duración total de visita por comedero.
- Consumo de los insectos (gramos): se cuantificó la cantidad de insectos consumidos por cada ejemplar en cada sesión a través de la diferencia del peso de las muestras de insectos antes de la evaluación y el peso después de transcurrida la misma.

Es relevante mencionar que los ejemplares de *T. tertadactyla* fueron previamente habituados durante la semana del 13 de noviembre al ambiente (sala de evaluación comportamental; ver detalles anexo). Además, en la misma sala se efectuó una prueba de discriminación de olores a fin de continuar con el proceso de habituación y evaluar las actividades de los animales en relación a estímulos olfatorios (ver detalles en anexo; Yang y Crawley, 2009; Arbuckle y col.,

2015). Brevemente, como plantea Arbuckle y col (2015) falsos positivos en evaluaciones de las actividades comportamentales pueden evitarse al establecer a priori que los animales pueden detectar y discriminar distintos olores. Además, previo al comienzo de las evaluaciones comportamentales se destinó un día (30 de noviembre de 2017) para habituar a los individuos a la presencia del soporte de los comederos, para ello cada animal permaneció 10' en la sala con los comederos con sus bordes superiores impregnados con Silicona AK-100 (para evitar en las evaluaciones comportamentales que los insectos escapen de los comederos).

Además, considerando la frecuencia respiratoria como un indicador del estado de ansiedad, se realizaron mediciones de esta variable (respiraciones por minuto) en los ejemplares de *T. tetradactyla*, los registros se realizaron en el momento previo a ingresar a la evaluación correspondiente (en el habitáculo; Tiempo 0), una vez finalizada la evaluación (en la sala de evaluación comportamental; Tiempo 10) y 10 minutos después de haber finalizada la evaluación (en el habitáculo; Tiempo 20).

Tabla 1. Evaluación de la frecuencia respiratoria de los ejemplares de *T. tetradactyla* a lo largo de las evaluaciones comportamentales.

Frecuencia respiratoria (resp./minuto)	Serie de tiempo (minuto)		
	0	10	20
Evaluación comportamental 1	19,90 ± 1,04	21,60 ± 0,99	20,63 ± 0,88
Evaluación comportamental 2	19,61 ± 0,67	21,06 ± 0,68	20,00 ± 0,87

Los valores están expresados como media ± EEM

Por otra parte, en tabla 2 se resume la línea temporal del manejo de los animales, ordenada con respecto a la evaluaciones comportamentales 1 (día de estudio 0).

Tabla 2: Línea temporal del manejo de los ejemplares de *T.tetradactyla*.

Fecha	Día de estudio	Actividad
13 de noviembre	-18 a -13	Habitación a la sala de evaluación
21 de noviembre	-10 a -3	Prueba discriminatoria de olores
30 de noviembre	-1	Habitación con los comederos
1 de diciembre	0 a +2	Evaluación comportamental 1
9 de febrero	+69 a +71	Evaluación comportamental 2

2.2.3.1. Evaluación comportamental 1:

A fin de evaluar las actividades comportamentales de los ejemplares de *T. tetradactyla* ante la presencia de los estímulos alimentarios se realizó la siguiente evaluación: los animales fueron expuestos individualmente a tres comederos colocados sobre un soporte de madera (Ilustración 1). Un comedero con termitas, otro con hormigas y otro vacío a modo de control. Todos los comederos se impregnaron con Silicona AK-100 para evitar el escape de los insectos, y en el momento previo al ingreso de cada animal se realizó el llenado de los comederos con 1 gr insectos.

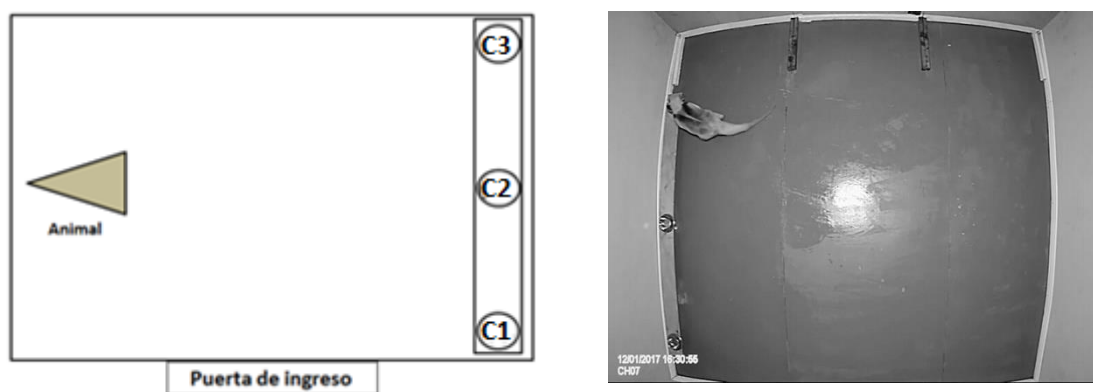


Ilustración 1: (Izquierda) Esquema de la posición de los comederos sobre el soporte de madera en evaluación comportamental 1. C1, C2 y C3: Comederos. (Derecha) Foto registrada por la cámara 1 durante la evaluación comportamental 1.

Los ejemplares de *T. tetradactyla* fueron trasladados por el tesinista y se los ubicó en una posición lateral de la sala, con la cabeza en dirección opuesta al soporte con los comederos (ver ilustración 1).

Luego de transcurrir los 10 minutos correspondientes a la sesión, se trasladó el animal a su respectivo habitáculo, y luego se recuperaron los insectos de los comederos a fin de cuantificar el consumo de los mismos. El orden de evaluación de los animales fue al azar entre las sesiones y la ubicación de los insectos en los comederos para cada sesión siguió el diseño propuesto en las pruebas sensoriales discriminatorias (Anzaldúa-Morales, 1994).

La ubicación de los insectos en los comederos fue la siguiente:

- Día 1: C1: Termitas, C2: Control, C3: Hormigas.
- Día 2: C1: Hormigas, C2: Control, C3: Termitas.
- Día 3: C1: Control, C2: Termitas, C3: Hormigas.

2.3.2.2. Evaluación comportamental 2:

En base a los resultados obtenidos en la evaluación comportamental 1, se evaluó la actividad de los animales ante una variación en la abundancia de los estímulos alimentarios.

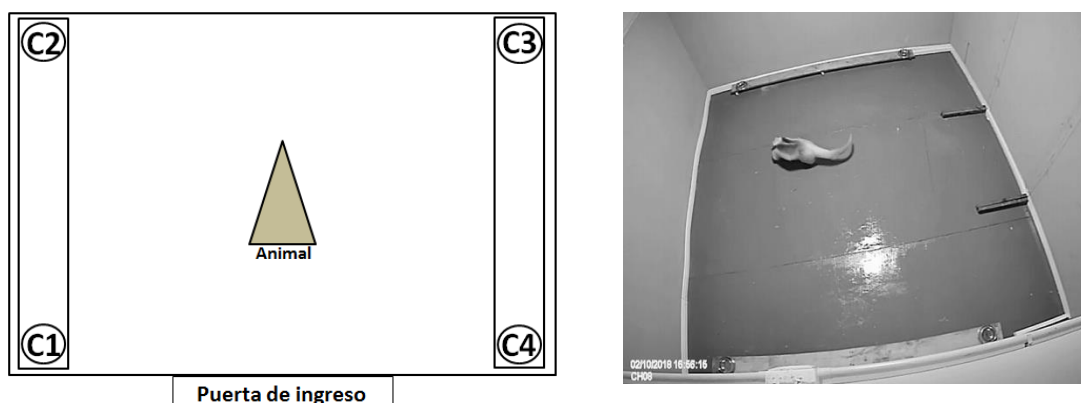


Ilustración 2: (Izquierda) Esquema de la posición de los comederos en los soportes de madera en la evaluación comportamental 2. C1, C2, C3, C4: Comederos. (Derecha) Foto registrada con la cámara 2 durante la evaluación comportamental 2.

En relación al consumo de los insectos en la evaluación previa, se colocaron los insectos en una proporción 1:3 (1 comedero con termitas: 3 con hormigas). Con este esquema experimental se procuró evaluar si el animal ante el insecto más consumido (termitas) mantenía el patrón cuando se variaba la abundancia. En cada sesión, los animales estuvieron expuestos por 10 minutos a 4 comederos con insectos (2 soportes de madera, cada uno con dos comederos en sus extremos) ubicados en las esquinas de la sala de evaluación. Los animales comenzaron desde una posición central de la sala, con la cabeza en dirección opuesta a la puerta de ingreso (Ilustración 2). Del mismo modo que en la primera evaluación comportamental, previo al ingreso de cada animal los comederos fueron lavados, sus bordes fueron impregnados con silicona AK-100 y se realizó el llenado con 1 gr de insectos. Una vez finalizada la evaluación se trasladó el animal a su respectivo habitáculo, y luego se recuperaron los insectos de los comederos a fin de cuantificar el consumo de los mismos. El orden de evaluación de los animales fue al azar y la ubicación de los insectos en los comederos para cada sesión siguió el diseño propuesto en las pruebas sensoriales discriminatorias (Anzaldúa-Morales, 1994). Siendo la ubicación de los estímulos la siguiente:

- Día 1: C1: Hormigas (H1), C2: Hormigas (H2), C3: Hormigas (H3), C4: Termitas (T).
- Día 2: C1 Hormigas (H1);, C2: Termitas (T), C3: Hormigas (H2), C4: Hormigas (H3).
- Día 3: C1: Termitas (T), C2: Hormigas (H1), C3: Hormigas (H2), C4: Hormigas (H3).

2.2.4. Diseño de las Pruebas Bioquímicas

2.2.4.1. Preparación de los insectos: Muestras de hormigas y termitas (ver sección 2.2.2), se secaron durante 24hs en muffla y se porfirizaron para lograr una harina. A fin de determinar las características de los estímulos alimentarios consideradas como relevantes se efectuaron las correspondientes pruebas, con métodos recomendados por la AOAC (1999).

2.2.4.2. Valoración nutricional: a) Contenido de humedad por método indirecto (AOAC 934.01): se pesó en cápsulas de aluminio 5 g de insectos, las cuales fueron previamente secadas a 100-105 °C en estufa de circulación forzada por 24 hs; los resultados se expresan como porcentaje de agua en base húmeda; b) Contenido de grasa total libre: se realizó por el método gravimétrico, previa extracción con Soxhlet utilizando n-hexano como solvente (AOAC 920.39), los resultados se expresan como porcentaje de grasas totales en base seca; c) Análisis de proteína bruta: se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 984.13), con un factor de conversión general 6,25, los resultados se expresan como porcentaje de proteína bruta en base seca; d) Contenido de cenizas: por calcinación en mufla a 550°C (AOAC 923.03), los resultados se expresan como porcentaje de cenizas en base seca.; e) Hidratos de carbono (HC): se calculó por diferencia según la fórmula: $HC = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos})$, los resultados se expresan como porcentaje de carbohidratos en base seca. Todas las determinaciones de composición centesimal, fueron realizadas por triplicado. A fin de presentar los resultados en proporciones más similares a las presentes en los insectos vivos se calculará el porcentaje en base húmeda, mediante la fórmula: $\% \text{ base húmeda} = (\% \text{ base seca} / (100 + \% \text{ base seca})) * 100$.

2.2.4.3. Digestibilidad proteica *in vitro*: Se determinó la digestibilidad proteica *in vitro* según la técnica de Dierick y col. (1985), con modificaciones. Se incubaron 400 mg de cada muestra con 20 mL de HCl 0,075 M, 20 mg de pepsina (P7000, Sigma®). Se ajustó el pH a 2 y se dejó en baño termostático a 37,5 °C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionaron 25 mL de buffer fosfato 0,2 M (pH 7,5) y 20 mg de pancreatina (P7545, Sigma®). El pH se ajustó a 7,5 y se dejó en baño a 37,5 °C por 60 minutos. Al finalizar el segundo tiempo de incubación se tomaron 5 mL del extracto digerido y se adicionaron 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 36% P/V para precipitar las proteínas no digeridas y las enzimas. Luego de centrifugar a 1100 g se determinó el contenido de nitrógeno total en el sobrenadante por el método de Kjeldahl, método 984.13 (AOAC, 1999).

Paralelamente se realizó un blanco de reactivos y la determinación de digestibilidad de una proteína patrón (caseína) en las mismas condiciones de trabajo. El porcentaje de digestibilidad (D) se determinó según la fórmula:

$$D(\%) = \frac{Nd \times f}{Nt} \times 100$$

Dónde:

- Nt (nitrógeno total) = % nitrógeno muestra × masa digerida (g)
- Nd (nitrógeno digerido) = % N sobrenadante – % N blanco
- f= 90, es el factor de dilución.

Los resultados se expresan como porcentaje de digestibilidad en base seca.

2.3. Análisis estadístico: Las evaluaciones comportamentales se analizaron considerando las actividades de los ejemplares de *T. tetradactyla* por triplicado (3 sesiones). Para cada evaluación comportamental, las variables latencia a ambular y latencia de visita al primer comedero fueron analizadas mediante un análisis de la varianza a una vía, siendo los distintos ejemplares de *T. tetradactyla* la estructura factorial. Estos datos fueron evaluados por medio de la prueba de Shapiro-Wilks modificado (normalidad) y Levene (homocedasticidad) y transformados (\log_{10}) debido a que su variación afectó los supuestos del análisis de la varianza; se realizó una prueba a posteriori de LSD Fisher. Para las variables cantidad de visitas a los comederos, duración total de las visitas y el consumo de insectos se empleó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, los distintos comederos constituyeron la estructura factorial del análisis estadístico. Particularmente, en la evaluación comportamental 2, se hizo la sumatoria de los consumos correspondientes a hormigas (tres comederos) de cada sesión y se comparó este valor con la cantidad de termitas consumidas de cada sesión, por medio de la prueba Wilcoxon (Mann-Whitney).

Para las pruebas bioquímicas, se aplicó una prueba de T de Student verificando la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos. Los datos obtenidos por triplicado fueron analizados para las siguientes variables en base húmeda: Humedad (%), lípidos (%), proteínas (%) y digestibilidad proteica *in vitro* (%). Dado que no se cumplió el supuesto de homegeneidad de varianza, de aplicó la prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney) para cenizas (%). Todas las pruebas fueron ejecutadas con el programa Infostat (Infostat, Grupo Infostat, FCA-UNC, Argentina). Se consideraron diferencias significativas cuando el valor fue $p \leq 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media.

3. Resultados

3.1 Evaluaciones comportamentales:

3.1.1. Evaluación comportamental 1: Las tres sesiones realizadas para determinar las actividades de los ejemplares de *T. tetradactyla* ante la presencia de los insectos permitieron analizar los siguientes resultados. Mediante un análisis de la varianza se determinó que las unidades experimentales no mostraron diferencias significativas con respecto a la variable latencia a ambular ($p=0,2346$; $F=1,56_{6,13}$), observándose que exhibieron $5,45 \pm 0,73$ segundos en comenzar a ambular. En la variable latencia de visita al primer comedero, el análisis de la varianza determinó que existieron diferencias significativas entre los ejemplares ($p=0,0343$; $F=3,28_{6,13}$). La prueba a posteriori LSD Fisher determinó que uno de los animales mostró diferencia significativa en comparación a los otros seis, presentando la latencia de visita al primer comedero más baja ($14,67 \pm 4,18$ vs el resto con valores medios superiores a $38,67$ segundos). Considerando que en las tres sesiones los ejemplares de *T. tetradactyla* podían visitar tres comederos, se observó que el primer comedero visitado en 8 oportunidades tenía termitas, en 7 hormigas y en 5 no tenía insectos.

Mediante una prueba de Kruskal-Wallis no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de visitas a los comederos ($p=0,2482$; $H=2,63$), en las tres sesiones los animales visitaron en promedio $3,65 \pm 0,49$ veces el comedero sin insectos, $4,10 \pm 0,49$ veces el comedero con termitas y $3,05 \pm 0,32$ veces el comedero con hormigas. Los ejemplares de *T. tetradactyla* mostraron diferencias altamente significativas en la duración total de visita a los comederos ($p<0,0001$; $H=2,63$), observándose que exhibieron un tiempo similar para los comederos con insectos y superior al comedero sin insectos (Hormigas: $52,55 \pm 5,88$ segundos y Termitas: $88,40 \pm 15,83$ segundos > Control: $29,30 \pm 2,95$ segundos; Figura 1).

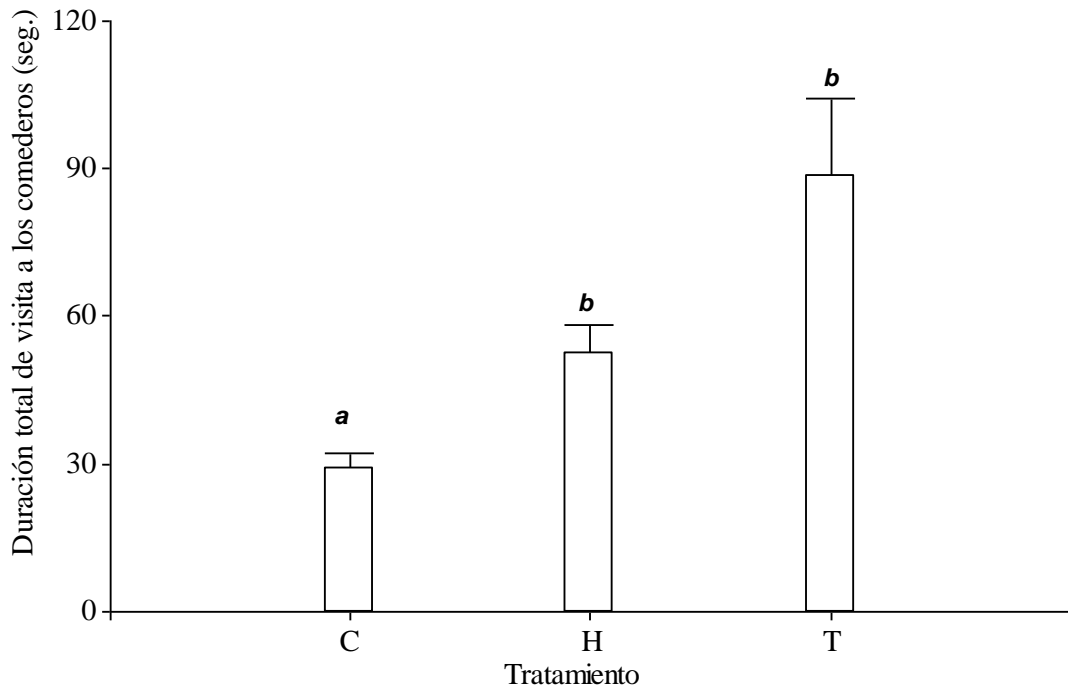


Figura 1: duración total de las visitas a los comederos por los ejemplares de *T. tetradactyla* (n=7). Se ilustra el promedio de las tres sesiones de la evaluación comportamental 1 (tratamiento = C: comedero sin insectos, H: comedero con hormigas, T: comedero con termitas). Letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$; los valores se expresan como media \pm EEM).

Además, la prueba de Kruskal-Wallis indicó que el consumo de los insectos (gramos) por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla* fue significativamente muy diferente entre los niveles del factor ($p < 0,0001$; $H = 44,97$), a partir de una comparación de rangos a posteriori se obtuvo la siguiente patrón: Termitas: $0,89 \pm 0,04 >$ Hormigas: $0,53 \pm 0,07 >$ Control; similarmente la variable porcentaje de insectos consumidos mostró el mismo patrón ($p < 0,0001$; $H = 45,77$; (Figura 2).

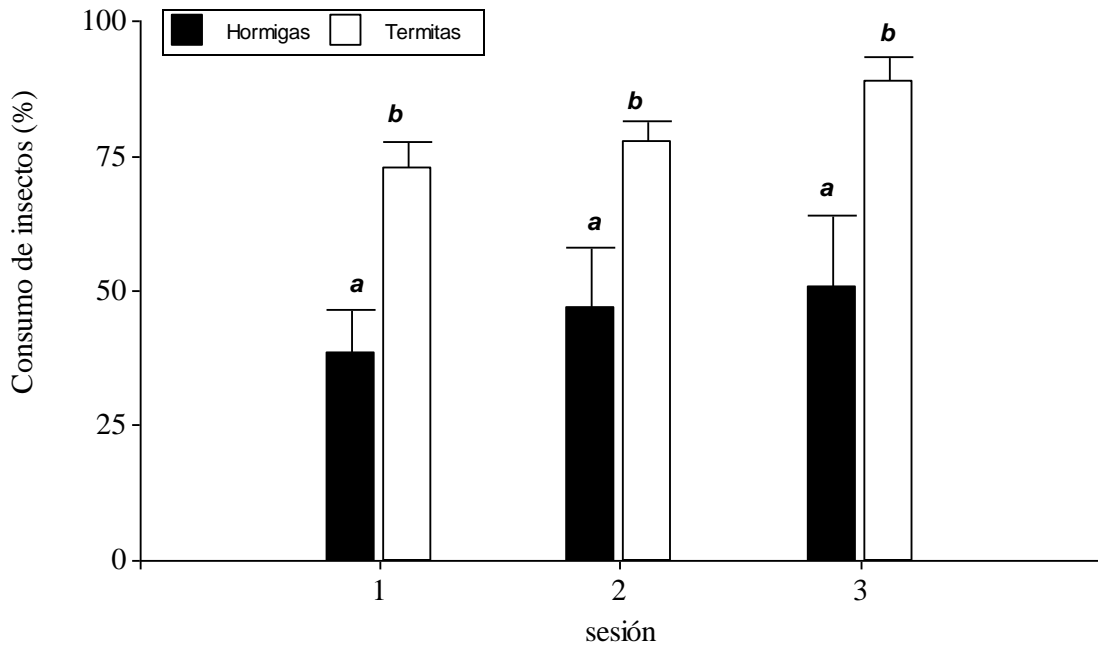


Figura 2: porcentaje de los insectos consumidos por los ejemplares *T. tetradactyla* (n=7) en las tres sesiones de la evaluación comportamental 1. Se ilustran las sesiones (de 10' cada una) por separado para mostrar el mismo patrón de respuesta comportamental. Letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$; los valores se expresan como media \pm EEM).

3.1.2. Evaluación comportamental 2: Las sesiones realizadas para determinar las actividades de los ejemplares de *T. tetradactyla* ante la presencia de hormigas y termitas en una proporción 3:1 respectivamente, permitieron el análisis de los siguientes resultados. Mediante un análisis de la varianza a una vía, se determinó que la variable latencia a ambular no mostró diferencias significativas entre los ejemplares de *T. tetradactyla* ($p=0,1565$; $F=1,96_{6,12}$); observándose que los animales exhibieron $4,11 \pm 0,73$ segundos en comenzar a ambular. En la variable latencia de visita al primer comedero el análisis de la varianza indicó que no existieron diferencias entre los ejemplares ($p=0,6954$; $F=0,6954_{5,12}$), exhibiendo $16,85 \pm 3,77$ segundos. Considerando que en las tres sesiones los ejemplares *T. tetradactyla* podían visitar cuatro comederos, en 3 oportunidades el primer comedero visitado tenía termitas y en 15 oportunidades tenía hormigas. Mediante una prueba de Kruskal-Wallis no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de visitas a los comederos ($p=0,3146$; $H=3,36$), en las tres sesiones los animales visitaron $3,89 \pm 0,89$ veces H1, $3,28 \pm 0,29$ veces H2, $3,33 \pm 0,44$ veces H3 y $4,17 \pm 0,43$ veces T. Además, los ejemplares de *T. tetradactyla* mostraron diferencias significativas en la duración total de visita a

los comederos ($p < 0,0001$; $H = 16,31$), en figura 3 se ilustra el patrón de la duración de las visitas a los comederos.

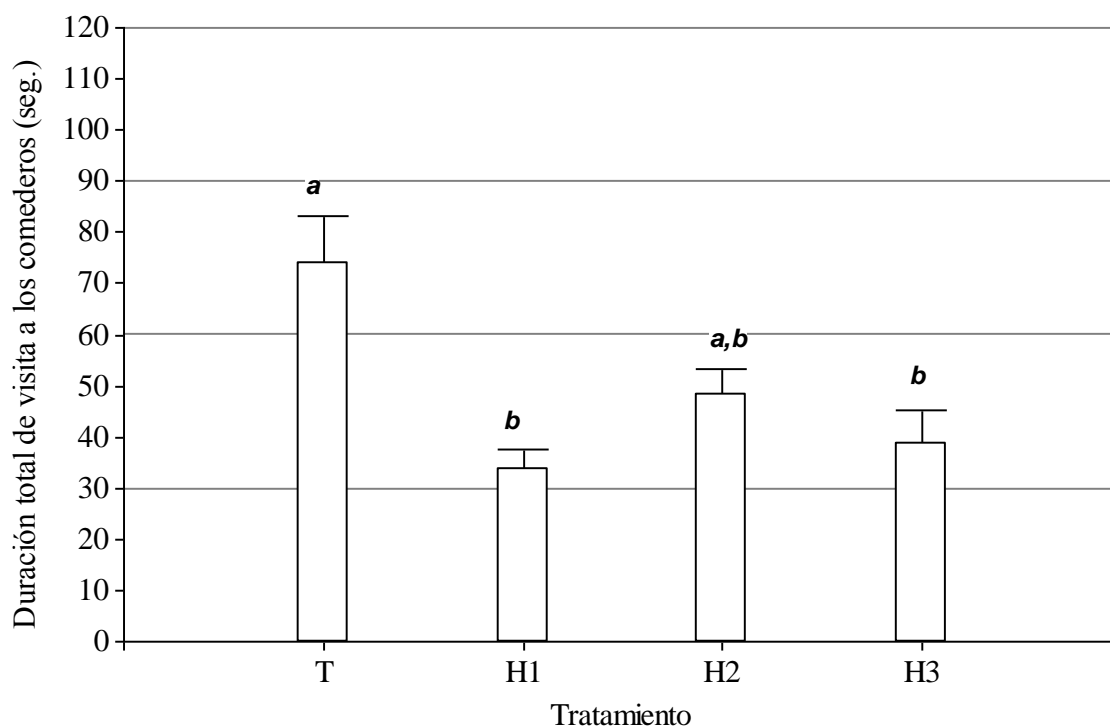


Figura 3: duración total de las visitas a los comederos por los ejemplares de *T. tetradactyla* ($n=6$). Se ilustra el promedio de las tres sesiones de la evaluación comportamental 2 (tratamiento = T: comedero con termitas, H1: comedero con hormigas, H2: comedero con hormigas, H3: comedero con hormigas). Letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$; los valores se expresan como media \pm EEM).

Además, la prueba de Kruskal-Wallis indicó que el consumo de los insectos (gramos) por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla* fue significativamente muy diferente ($p < 0,0001$; $H = 36,45$), a partir de una comparación de rangos a posteriori se obtuvo el siguiente patrón: T: $1,05 \pm 0,03$; H1: $0,46 \pm 0,07$, H2: $0,42 \pm 0,07$ y H3: $0,55 \pm 0,07$; similarmente la variable porcentaje de insectos consumidos mostró el mismo patrón ($p < 0,0001$; $H = 33,15$; Figura 4). Finalmente en esta sección, el análisis estadístico de Wilcoxon indicó que no hubo diferencias ($W = 383$, $p = 0,1135$) en la cantidad total consumida de hormigas ($1,43 \pm 0,17$ gr ; sumatoria de los tres comederos) y la de termitas ($1,06 \pm 0,03$ gr.).

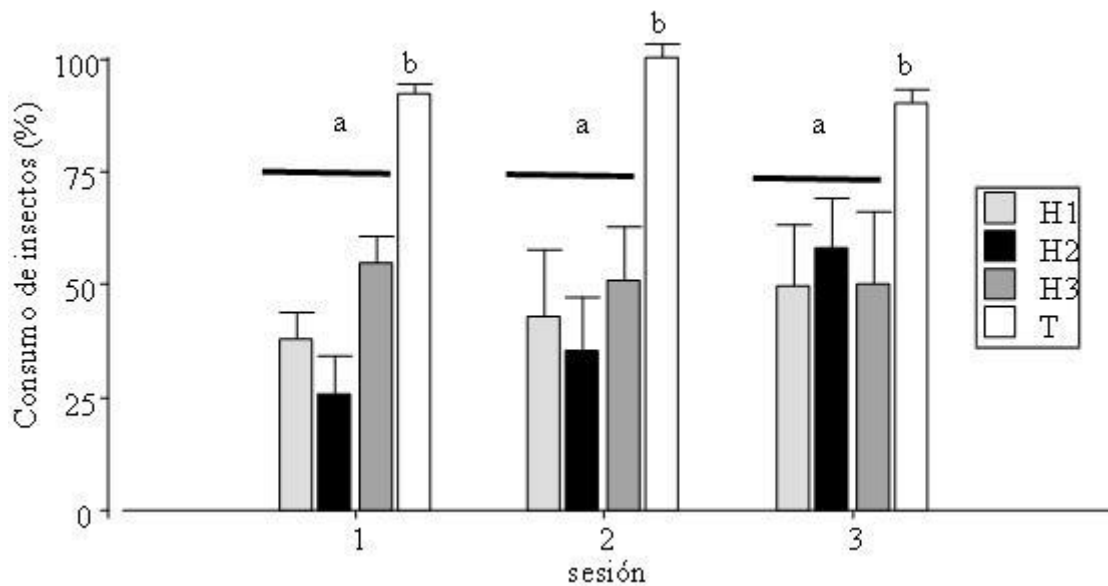


Figura 4: porcentaje de los insectos consumidos por los ejemplares *T. tetradactyla* (n=6) en las tres sesiones de la evaluación comportamental 2 (tratamiento = T: comedero con termitas, H1: comedero con hormigas, H2: comedero con hormigas, H3: comedero con hormigas). Se ilustran las sesiones (de 10' cada una) por separado para mostrar el mismo patrón de respuesta comportamental. Letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$; los valores se expresan como media \pm EEM).

3.2. Pruebas bioquímicas:

El análisis estadístico de T de Student indicó que los valores de humedad, lípidos, proteínas y digestibilidad proteica *in vitro* de los insectos mostraron diferencias significativas, mientras que el análisis de Wilcoxon indicó que los valores de cenizas de los insectos no mostraron diferencias, detalles se observan en tabla 3. Además surge del análisis bioquímico que las hormigas presentaron 9,66% de carbohidratos en base húmeda y las termitas 33,07% de carbohidratos en base húmeda.

Tabla 3: Análisis nutricional y digestibilidad proteica *in vitro* de los insectos utilizados en las evaluaciones comportamentales.

Variable (%)	Insectos		Valor de p	Valor del estadístico
	Hormigas	Termitas		
Humedad	47,37 ± 0,52	42,19 ± 0,73	0,0002	T= 3,47
Lípidos	16,95 ± 0,13	6,54 ± 0,31	<0,0001	T= 31,40
Proteínas	35,28 ± 0,18	18,19 ± 0,34	<0,0001	T= 44,32
Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	41,66± 0,43	97,84±1,63	<0,0001	T= -33,32
Cenizas	11,22 ± 0,05	15,08 ± 0,45	0,1000	W= 6,00

Los valores se presentan en base húmeda. El número de muestras/ insecto evaluados para todas las variables = 2; excepto Cenizas (n=1). T = t de Student y W= Wilcoxon (Mann- Whitney)

4. Discusión

En el presente trabajo se logró determinar que las actividades comportamentales de los ejemplares de *T. tetradactyla* bajo condiciones controladas son afectadas por la presencia de hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae). En las evaluaciones realizadas se determinó que las termitas fueron más consumidas que las hormigas, aun cuando las abundancias de los insectos fueron diferentes. Por su parte, se logró determinar que los insectos presentaron diferencias en las variables nutricionales y la digestibilidad *in vitro*. Las evaluaciones realizadas permitieron detectar que las hormigas presentaron mayor cantidad de proteínas y lípidos, mientras que en cenizas no se detectaron diferencias entre los insectos; por su parte, la digestibilidad *in vitro* fue mayor en las termitas.

En cada una de las evaluaciones comportamentales realizadas se pudo detectar que cuando el animal fue llevado a la sala la latencia a ambular no difirió entre los distintos individuos, siendo ligeramente menor en la evaluación comportamental 2, lo cual podría deberse a la presentación de los tratamientos. En tal sentido, la posición inicial del animal fue diferente entre las evaluaciones, así como la distancia entre el animal y los comederos (evaluación comportamental 1 > evaluación comportamental 2), ya que la disposición y el número de los comederos en la sala fue diferente. A su vez, en general los ejemplares de *T. tetradactyla* no mostraron diferencias con respecto a la latencia en visitar el primer comedero.

La presencia de insectos, ya sea en proporciones iguales o diferentes, no afectó la cantidad de veces que los individuos visitaron cada comedero durante las evaluaciones. Resulta notorio indicar que aun cuando se presentó un comedero sin insectos, éste no difirió de los que tenían insectos con respecto al número de visitas; si bien se esperaba que por la emisión de volátiles por parte de los insectos y la capacidad olfatoria de los ejemplares de *T. tetradactyla* el número de visitas fuese diferente entre los comederos, al presente no se tienen explicaciones para este resultado. Sin embargo, quizás otros mecanismos sensoriales, como por ejemplo la vista, podrían haber tenido un rol más preponderante. Si bien los ejemplares de *T. tetradactyla* en promedio visitaron los comederos un número semejante de veces, el tiempo que estos estuvieron con cada uno fue diferente. En la evaluación comportamental 1 los ejemplares exhibieron una duración total de visita menor en el comedero sin insectos con respecto a los comederos con insectos. Por otra parte, el análisis estadístico indicó que en la evaluación comportamental 2 los comederos con termitas fueron visitados por más tiempo que la mayoría de los comederos con hormigas (H1 y H3). Sin embargo, hay que expresar que la prueba a posteriori indicó que H2

fue similar tanto a H1 y H3 como a T. Si se considera cualitativamente lo observado en la Figura 3, entre las líneas de corte de 30 a 60 encontramos los valores medios de todos los comederos con hormigas, mientras que el valor medio del comedero con termitas se ubica entre 60 y 90; por lo cual, se plantean las siguientes hipótesis: a) la potencia de la prueba no paramétrica a posteriori podría estar afectando el análisis de las diferencias biológicas y/o b) la heterogeneidad natural en las categorías sociales de las hormigas obtenidas en un mismo nido podría afectar la variable observada. Un aumento en las unidades experimentales/ sesiones y/o una evaluación discriminando castas sociales, respectivamente, podrían contribuir a la puesta a prueba de estas hipótesis.

El consumo de los insectos en ambas evaluaciones comportamentales fue significativamente diferente, observándose que los ejemplares de *T. tetradactyla* consumieron más termitas que hormigas. Es relevante indicar que este patrón fue evidente incluso cuando se aumentó la abundancia de hormigas. A su vez, en la evaluación comportamental 2 se detectó que los comederos con hormigas presentaron consumos similares; Además, la sumatoria de estas cantidades fue similar a la cantidad de termitas consumidas. Por lo tanto, aun teniendo mayor cantidad de hormigas (el triple), los ejemplares consumieron cantidades semejantes de ambos insectos.

En el presente estudio se demostró que los insectos presentados como estímulos alimentarios a los ejemplares de *T. tetradactyla* difieren con respecto a las variables nutricionales y a su digestibilidad proteica *in vitro*. Las hormigas presentaron mayor porcentaje de proteínas y lípidos, mientras que para la variable cenizas no se detectaron diferencias entre los insectos. Del análisis nutricional surge que las termitas presentaron carbohidratos en mayor porcentaje. La digestibilidad *in vitro* de las proteínas de las termitas fue la más elevada. Considerando que esta última diferencia podría compensar en alguna medida el aporte nutricional (Bozinovic, 1993) de las termitas, y que a su vez la digestibilidad *in vitro* podría simular eficientemente la digestibilidad *in vivo* (Ramos Talma, 1995; Malca, 2004), es posible plantear la hipótesis que las características nutricionales de los insectos (Formicidae y Termitidae) y su digestibilidad *in vivo* afectan el consumo de estos insectos en ejemplares de *T. tetradactyla*.

En estudios previos, Redford (1981) determinó que las termitas presentan valores nutricionales (cenizas, lípidos y proteínas) muy variables entre los distintos géneros, especies y las diferentes castas, los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de dichos rangos. A su vez, Oyarzun y col. (1996) valoró las características nutricionales de termitas *Nasutitermes sp.*

(Familia: Termitidae) como alimento para *T. tetradactyla*, observándose similitudes y diferencias con respecto a nuestro estudio. Los valores correspondientes a lípidos fueron semejantes en ambos trabajos (6,5 vs $6,54 \pm 0,31$ %). En cambio, el valor de las proteínas fue notablemente superior en el estudio de Oyarzun (1996; al igual que Morales, 2010) con respecto al presente trabajo, con valores de 59% vs $18,19 \pm 0,34$ % respectivamente, mientras que los valores de cenizas fueron mayores en nuestro estudio ($4,42$ vs $15,08 \pm 1,12$ %). Por un lado, al presente no tenemos explicaciones en las diferencias en proteínas, considerando que las técnicas empleadas no explican las diferencias. Por el otro lado, las termitas analizadas en el estudio de Oyarzun (1996) fueron exclusivamente arborícolas mientras las que se analizaron en el presente trabajo presentan hábitos terrícolas, construyendo nidos parcialmente subterráneos compuestos de sustrato inorgánico, esta diferencia podría verse reflejada en los valores de cenizas (compuestos inorgánicos). De hecho, McNab (1984) informó que a través del color de las heces de ejemplares del género *Tamandua* se puede inferir el color del nido de termitas.

La teoría de dieta óptima se ha utilizado para predecir el comportamiento predador de animales bajo condiciones controladas, considerando la variación de la abundancia de la presa, tanto relativa como absoluta, como un factor determinante en la relación predador-presa (Schulter, 1981); en tal sentido, un predador que consume mayor cantidad de una presa aun cuando esta es igual o menos abundante que otras, se plantea la existencia de una selección de esta presa por parte del predador (Emlen, 1966; MacArthur y Pianka 1966; Schoener, 1971; Werner y Hall, 1974; Charnov, 1976).. En el presente estudio, se hizo hincapié en esta variable, observándose un consumo desproporcional de termitas en lugar de hormigas, incluso cuando variamos la abundancia relativa en las termitas. Según lo predicho por la teoría de dieta óptima esto podría estar indicando una posible selectividad por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla*. Las causas de esta selectividad merecen mayores estudios. Aunque podríamos plantear que la detectabilidad de los insectos (favorecida por la capacidad olfatoria de los ejemplares de *T. tetradactyla* y la emisión de volátiles) no se ve soportada por los resultados obtenidos en relación a la cantidad de visitas a los comederos con diferentes insectos (como tampoco por el tipo de insecto presente en la primera visita). Es decir, el mayor consumo de termitas no se explica por la cantidad de veces que los ejemplares visitaron los comederos con diferentes tipos de insectos.

Otra cuestión que nos parece interesante en el presente estudio son las diferencias detectadas tanto en el valor nutricional como en la digestibilidad proteica *in vitro* entre los insectos. Brevemente, la digestibilidad de un alimento determina cuanta energía metabolizable es

aprovechable por el animal, fijando los límites a procesos productivos como el crecimiento, mantenimiento y reproducción (Karasov, 1986). A su vez Bozinovic (1993) remarca la importancia de la fisiología del sistema digestivo como factor que modula los procesos conductuales de alimentación. Existen a grandes rasgos dos formas de medir la digestibilidad, *in vivo* o *in vitro*, siendo esta última una aproximación validada por diferentes estudios para inferir lo que ocurriría *in vivo* (Ramos Talma, 1995; Malca, 2004). En el presente estudio, los valores de digestibilidad *in vitro* mayores en termitas y sus valores nutricionales bajos con respecto a las hormigas explicarían porque que los ejemplares de *T. tetradactyla* consumieron diferencialmente los insectos, observándose mayor consumo de termitas en todas las evaluaciones. La relación entre el consumo, el valor nutricional y la digestibilidad proteica *in vitro* de los distintos insectos, podría indicar que los ejemplares de *T. tetradactyla* habrían exhibido una conducta alimentaria balanceada el transcurso de los periodos evaluados, consumiendo más alimento, con bajo valor nutricional y alta digestibilidad (termitas) y consumiendo menos alimento, con mayor valor nutricional y baja digestibilidad (hormigas).

Finalmente, valorar la selectividad alimentaria en esta especie de forma más holística, tanto en condiciones controladas como en otros espacios naturales, requiere de mayores estudios; con lo cual futuros trabajos podrían ser útiles para explorar con mayor profundidad la temática. En tal sentido, frecuentemente los estudios de la biología trófica de mamíferos insectívoros en vida silvestre como *Tamandua tetradactyla*, *Tamandua mexicana*, *Myrmecophaga tridactyla* y *Manis pentadactyla* se abordan mediante el análisis de contenido estomacal y de heces (Sandoval, 2012; Oyarzun y col., 1996; Montgomery, 1981; Wen Yang y col., 2007), por lo cual es relevante considerar en futuros estudios la posible existencia de una digestibilidad proteica diferencial. Estudios previos han planteado en el género *Tamandua* y en especies emparentadas como *M. tridactyla* la existencia de una selectividad de termitas u hormigas (Wetzel, 1982; Montgomery, 1985; Montgomery, 1981; Redford, 1984; Coles, 1980), observándose en casos selectividad hacia un grupo y en otros casos selectividad hacia el otro. A su vez, Montgomery (1981) plantea que en el género *Tamandua* algunos individuos particulares se especializan en el consumo de termitas y otros en el consumo de hormigas. Es evidente que resulta dificultoso evidenciar una selectividad en *T. tetradactyla*, en especial en vida silvestre, en gran medida a causa de la notable heterogeneidad de estos dos grupos de insectos (Borrer y col., 1976; Montgomery, 1985; Kaspari, 2000). Abordar esta interacción predador-presa bajo una situación controlada, permitió observar una diferencia significativa en el consumo de los tipos de insecto

por parte los ejemplares de *T. tetradactyla*, indicando una posible selectividad al menos bajo las condiciones planteadas en el presente estudio.

5. Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, los ejemplares adultos de *T. tetradactyla* bajo cuidado humano y los insectos hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae) obtenidos a campo en Córdoba, se concluye:

- Las actividades comportamentales de los ejemplares de *T. tetradactyla* fueron afectadas por la presencia de hormigas (Formicidae) y termitas (Termitidae), afectando la dinámica temporal con los insectos y el consumo de los mismos, que a su vez presentaron valores nutricionales y digestibilidad diferente.
- Los ejemplares de *T. tetradactyla* consumieron mayor cantidad de termitas independientemente de su abundancia relativa.
- Los ejemplares de hormigas y termitas analizados presentaron diferentes valores nutricionales y digestibilidad proteica *in vitro*. Las hormigas presentaron mayor cantidad de lípidos, proteínas y humedad, mientras que las termitas presentaron mayor cantidad de carbohidratos. Además, el contenido de cenizas fue similar. Por su parte, la digestibilidad proteica *in vitro* de las termitas fue mayor que las hormigas.

Referencias Bibliográficas

- ❖ Altamann, J., 1974. Observational study of behavior: sampling methods, *Behaviour*; vol. 49, partes 3 4, pp. 227- 267.
- ❖ Anzaldúa, A., Morales, A., 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Editorial Acriba, Zaragoza España.
- ❖ AOAC., 1999. Official methods of analysis, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- ❖ Arbuckle, E.P., Smith, G.D., Gomez, M.C., Lugo, J.N, 2015. Testing for Odor Discrimination and Habituation in Mice. *J. Vis. Exp.* (99), e5261 doi:10.3791/52615.
- ❖ Bassett, L., Buchanan-Smith, H. M., McKinley, J., & Smith, T. E., 2003. Effects of training on stress-related behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in relation to coping with routine husbandry procedures. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 6, 221–233.
- ❖ Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R., 1990. *Ecology: individuals, populations and communities*, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ❖ Boisen, S., Fernandez, J. A., 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and aminoacids in feed stuffs and feed mixtures for pigs by an in vitro analysis. *Anim Feed Sci Tech.* 51:29.
- ❖ Borror, D.J., Delong's, D., Triplehorn CH., 1976. *An Introduction to the Study of Insects*. Holt, Rinehard and Winston, New York: 536-607.
- ❖ Bozinovic, F., 1993. Fisiología ecológica de la alimentación y digestión en vertebrados: modelos y teorías. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 66: 375–382.
- ❖ Camilo-Alves, P., Sampaio, C., Miranda Moura, G., 2006. Responses of a specialized insectivorous mammal (*Myrmecophaga tridactyla*) to variation in ambient temperature. *Biotropica* 38, 52 – 56.
- ❖ Carranza, J. (ed.), 1994. *Etología: Introducción a la Ciencia del Comportamiento*. Publicaciones de la universidad de Extremadura, Cáceres, pp. 19-24.
- ❖ Cedeño, A., 1984. Los bachacos. Aspectos de su ecología. Caracas, Fondo Editorial. 73.
- ❖ Charnov, E. L., Orians, G. H., Hyatt, K., 1976. Ecological implications of resource depression. *Am. Nat.* 110: 247-259.
- ❖ Coles, H. R., 1980. Defensive strategies in the ecology of neotropical termites. Dissertation. Southampton University, Southampton, England.
- ❖ Cuarón, A. 1987. Hand-rearing a Mexican anteater (*Tamandua mexicana*) at Tuxtla Gutiérrez Zoo. *Int. Zoo Yb.* 26: 255–260.
- ❖ Dalquest, W.W., Werner, H. J., 1952. The parotid gland of an anteater, *Tamandua tetradactyla*. *The American Midland Naturalist* 48:251–252).
- ❖ Deblauwe, I., Janssens, G.P.J., 2008. New insights in insect prey choice by chimpanzees and gorillas in southeast Cameroon: The role of nutritional value. *American Journal of Physical Anthropology*, 135, 42–55
- ❖ Dierick, N., Vervaeke, I., Decuyper, J., Henderickx, H., 1985. Protein digestion in Pig measured in vivo and in vitro. *Proceedings of the 3rd International Seminar of Digestive Physiology in the Pig* (A. Just, H Jorgensen y J A Fernández, ed). Copenhagen, pp. 329-332.
- ❖ Eguizábal, G. V.; Palme, R.; Villarreal, D.; Dal Borgo, C.; Di Rienzo, J. A.; Busso, J. M., 2013: Assessment of adrenocortical activity and behavior of the collared anteater (*Tamandua tetradactyla*) in response to food-based environmental enrichment. *Zoo Biology* 32, 632–640.
- ❖ Eguizábal, G.V., Von Fersen L., García Capocasa, M.C., Busso, J.M., 2017. Análisis del patrón de actividad/inactividad de *Tamandua tetradactyla* para validar la aplicación de nuevas tecnologías: acelerómetro. Congreso de la Asociación Latinoamericana de Parques Zoológico y Acuarios. Edición, 2017, 29 de mayo al 02 de junio, Cuba. Edición XXII. www.alpza.com.
- ❖ Emlen, J. M., 1966. The role of time and energy in food preference. *Am. Nat.* 100:611-617.
- ❖ Fantino, E., Logan. C. A., 1979. *The experimental analysis of behavior. A biological perspective*, W. H. Freeman and Company. San Francisco, US.
- ❖ Gallegos, M. J., 1998. Notas y experiencias de la crianza a mano del primer tamandúa nacido en cautiverio en el ZooMAT. En: *Memorias del XVI Congreso de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana A.C*, pp. 1–4. Playa del Carmen, Q. Roo, México.
- ❖ Gull, J.M., Stahl, M., Osmann, C., Ortmann, S., Kreuzer, M., Hatt, J.M., Clauss, M., 2015. Digestive physiology of captive giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*): determinants of faecal dry matter content. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 99, 565-576.
- ❖ Hayssen, V., 2011. *Tamandua tetradactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Mammalian Species* 43(875): 6474.

- ❖ Hofer, M. D., 1970. Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobilization in wild rodents. *Psychosomatic Medicine*, 32, pp. 633-647.
- ❖ IUCN, 2012. The IUCN red list of threatened species, v. 2012.1. Cambridge: IUCN Red List Unit. Available from: <http://www.iucnredlist.org/>.
- ❖ Jimeno, G.P., González, G.G., 2004. Evaluación de una Dieta para Tamandúas (*Tamandua* spp.) Utilizada en el Jardín Zoológico de Rosario, Argentina y el Zoológico La Aurora, Guatemala. *Edentata* 6, 43.
- ❖ Jørgensen, H., Zhao, X. Q., B., Eggum O., 1996. The influence of dietary fiber and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hindgut and energy metabolism in pigs. *Br. J. Nutr.* 75:365-378.
- ❖ Karasov, W.H., 1986. Energetics, physiology and vertebrate ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 101-104.
- ❖ Kaspari, M., S. O'Donnell, Alonso, L., 2000. Three energy variables predict ant abundance at a geographic scale. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 267: 485-490.
- ❖ King, T., Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., 2003. Fear of novel and startling stimuli in domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 82, 45-64.
- ❖ Larmond, E. 1977. Laboratory methods for sensory evaluations of foods. *Can. Dept. Agr., Publ.* 1637.
- ❖ Lin, M.F., Chang, C.Y., Yang, C.W., Dierenfeld, E.S., 2015. Aspects of digestive anatomy, feed intake and digestion in the Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*) at Taipei zoo. *Zoo biology* 34, 262-270.
- ❖ Lubin, Y.D.; Montgomery, G.G.; Young, O.P., 1977. Food resources of anteaters (Edentata: Myrmecophagidae). I. A year's census of arboreal nests of ants and termites on Barro Colorado Island, Panama Canal Zone. *Biotropica* 9:26-34.
- ❖ Lubin, Y. D., Montgomery, G. G., 1981. Defenses of *Nasutitermes* termites (Isoptera, Termitidae) against *Tamandua* anteaters (Edentata, Myrmecophagidae). *Biotropica* 13:66-76.
- ❖ MacArthur, R.H., Pianka, E.R., 1966. On optimal use of a patchy environment. *Amer. Natur.* 100:603-609.
- ❖ Malca Osores, S. V., 2004. Comparación de dos técnicas para determinar la Digestibilidad Proteica de Insumos y Alimentos Comerciales para Caninos. Universidad Nacional de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, E.A.P. de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
- ❖ Mariconi, F.A.M., 1970. *As saúvas*. Editora Agronómica "CERES". Sao Paulo, 167.
- ❖ Meritt Jr., D. A., 1970. Edentate diets currently in use at Lincoln Park. *Int. Zoo Yb.* 10: 136-138.
- ❖ Meritt Jr., D. A., 1976. The nutrition of edentates. *International Zoo Yearbook* 16: 38-46.
- ❖ Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress*. CABI Publishing.
- ❖ Montgomery, G. G., Lubin, Y. D., 1977. Prey influences on movements of Neotropical anteaters. Pp. 103-131 in *Proceedings of the 1975 Predator Symposium* (R. L. Phillips and C. Jonkel, eds.). Montana Forest and Conservation Experiment Station, University of Montana, Missoula.
- ❖ Montgomery, G. G., 1985. Movements, foraging and food habits of the four extant species of Neotropical vermilinguas (Mammalia: Myrmecophagidae). Pp. 365-377 in *The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas* (G. G. Montgomery, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- ❖ Morales, V., 2010. Caracterización Nutricional de la Dieta de Tamandua mexicana en el Zoológico "Miguel Álvarez del Toro" (ZooMAT) Chiapas, México. *BioOne*. Anteaters, Sloth and Armadillo Specialist Group. [En línea] <http://www.bioone.org/doi/full/10.1896/020.011.0108> [Consulta: Junio 2011].
- ❖ Morgan, E.D., 1990. Insect trail pheromones: a perspective of progress. In: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones* (A.R. McCaffery and I.D. Wilson, Eds.), Plenum press, New York and London, pp, 259-270.
- ❖ Oyarzun, S. E., Crawshaw, G. J., Valdes, E. V., 1996. Nutrition of the tamandua: I. Nutrient composition of termites (*Nasutitermes* spp.) and stomach contents from wild tamanduas (*Tamandua tetradactyla*). *Zoo Biology* 15(5): 509-524.
- ❖ Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal Pharmacology*, 463, 3-33.
- ❖ Ramos Talma, M. A., 1996. Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión *in vitro* a la valoración nutritiva de piensos de conejos. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Dpto. de Nutrición y Bromatología III.
- ❖ Redford, K.H., 1983. *Mammalian myrmecophagy: feeding, foraging and food preference*. PhD dissertation, Harvard University, Boston, Massachusetts.
- ❖ Redford K.H., Dorea J., 1984. The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *J Zool (London)*.
- ❖ Rodrigues, F. H. G., Medri, i. M., De Miranda, G. H. B., Camilo-Alves, C., Mourao, G., 2008. Anteater behavior and ecology. Pp. 257-268 in *The biology of the Xenarthra* (S. F. Vizcaino and W. J. Loughry, eds.). University Press of Florida, Gainesville.
- ❖ Schoener, T. W., 1971. Theory of feeding strategies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2:369-404.
- ❖ Servicio Meteorológico Nacional. 2016. Url: <http://www.smn.gov.ar>. Consultado el 18 de Julio de 2017
- ❖ Tinbergen, N., 1969. Etología, *En Estudios de Etología* 2, Trabajos generales. Madrid, España.
- ❖ Torres, R., Monguillot, J., Bruno, G., Michelutti, P. and Ponce, A., 2009. Ampliación del límite austral de la distribución del oso melero (*Tamandua tetradactyla*) en la Argentina. *Nótulas Faunísticas - Segunda Serie* 39: 1-5.

- ❖ Tokuda, N. G., Watanabe, H., 2011. Evolution and Function of Endogenous Termite Cellulases. In Bignell D.E., Roisin Y. & Lo N. Eds., *Biology of Termites: a New Synthesis*. Springer, 51-67.
- ❖ Valdés, E., 2000. El rol de la nutrición animal en los programas de medicina preventiva de los parques zoológicos. *Nozootros (Boletín Informativo de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana)* 8(6): 6–12.
- ❖ Ward, A. M., Crissey, S. D., Cassaro, K., Frank, E., 1995. Formulating diets for tamandua (*T. tetradactyla*) in Brazilian zoos. En: *Proceedings of the First Annual Conference of the Nutrition Advisory Group of the American Zoo and Aquarium Association*, May 1–2, 1995, Toronto, Ontario, Canada, E. Dierenfeld, J. Atkinson y E. V. Valdes (eds.), pp.159–169. Metro Toronto Zoo and the University of Guelph, Toronto.
- ❖ Wen Yang, C.C.S., Chang, C.Y., Fong Lin, M., Block, E., Lorentsen, R., Chin, J.S.C., Dierenfeld, E.S., 2007. History and dietary husbandry of pangolins in captivity. *Zoo Biol* 26:223–230.
- ❖ Werner, E. E., Hall, D. J., 1974. Optimal foraging and size selection of prey by the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology* 55:1042-1052.
- ❖ Wetzel, R. M., 1982. Systematics, distribution, ecology, and conservation of South American Edentates. Pp. 345–375 in: *Mammalian biology in South America*. Volume 6 (M. Mares & H. H. Genoways, eds.). Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, Pittsburgh.
- ❖ Wetzel, R. M., 1985. The identification and distribution of recent Xenarthra (= Edentata). Pp. 5-21 in *The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas* (G. G. Montgomery, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- ❖ Wilson, E. O., 2008. One giant leap: how insects achieved altruism and colonial life. *Bioscience* 58, 17–25.
- ❖ Wilson, E. O., Holldobler, B., 2005. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13367-13371.
- ❖ Yang, M., Crawley, J. N., 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* 8, 24.

Anexo: Actividades de habituación de los ejemplares *T. tetradactyla* y resultados del monitoreo de las actividades comportamentales y de la respiración

En el marco de la presente tesina de grado se realizaron actividades para que los ejemplares de *T. tetradactyla* se habitúen a la sala de evaluación comportamental. Primero, se los traslado individualmente a la sala de evaluación comportamental, permaneciendo en esta por 30'. La habituación tuvo como fecha de comienzo el 13 de noviembre de 2017, realizándose durante las tardes (entre 17-20hs) durante una semana. Por la duración de cada sesión (30 minutos) los animales fueron divididos al azar en dos grupos, (uno de 3 animales y otro de 4), alternando los días de ingreso de cada grupo y el orden de entrada, en total cada animal ingresó a la sala 3 veces. Previo al ingreso de cada animal la sala fue lavada con agua y 5 mL de hipoclorito de sodio (40-60 gr/L). En todos los casos, los animales fueron trasladados (por el tesinista) en menos de 60 segundos desde sus habitáculos hasta la sala de evaluación, sujetándolos por la cola (como los sujetan los cuidadores en sus tareas habituales, tales como cambio de habitáculos, transporte para pesaje, traslados para control veterinario), los mismos fueron ubicados en una posición central de la sala. Todas las actividades fueron grabadas por dos cámaras (HIKVISION Turbo HD- IR Turret Camera- DS 2CE56C2T IRM) (ver Ilustraciones 1 y 2, sección 2.2.1.1 y sección 2.2.1.2, respectivamente).

Se grabaron vídeos durante 30 minutos, y se luego se analizaron realizando observaciones cada 30 segundos de los comportamientos exhibidos por cada individuo, asignando también la ubicación del animal; para esto se utilizaron las cuadrículas empleadas en las evaluaciones comportamentales 1 y 2. Se evaluó la latencia a ambular de los individuos (variable descripta en sección 2.2.3). Además, a fin de evaluar los comportamientos y las actividades realizadas según las zonas del área se asignó una letra y un número a los cuadrados 50 x 50 cm y se delimitaron 3 zonas en base a la cuadrícula de la sala (ver figura 5).

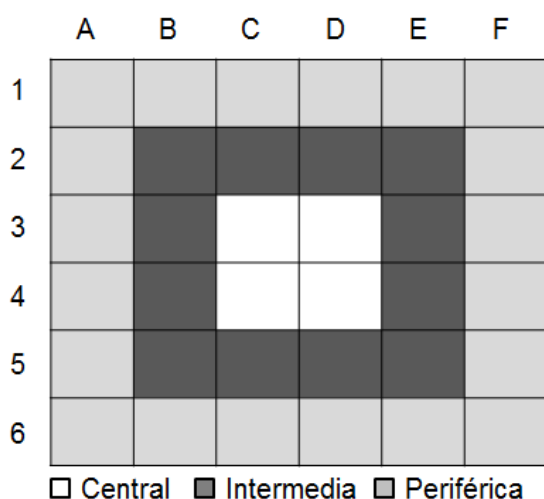


Figura 5: Sala de evaluación comportamental dividida para evaluar las actividades de los ejemplares de *T. tetradactyla*. La puerta de ingreso a la sala se encuentra entre los cuadrados C1 y D1.

Para la evaluación de los comportamientos se definió un etograma, como se muestra en tabla 4.

Tabla 4: Comportamientos registrados en el transcurso de la evaluación de habituación.

Comportamiento	Descripción
Inmóvil (I)	Sin cambio de posición de las partes del cuerpo. Posición del animal variable: Cuadrúpeda, Trípede o Bípeda.
Recostarse (RE)	Sin cambio de posición de las partes del cuerpo. Posición del animal variable: vientre en contacto con el sustrato, dorso en contacto con el sustrato o enrollado sobre sí mismo
Desplazamiento con movimiento de cabeza (DC)	Al menos una extremidad (patas) en contacto con el sustrato cambian su ubicación, ya sea en dirección lineal o rotando sobre el eje del animal. La cabeza se mueve con respecto al plano corporal. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede o bípeda
Desplazamiento (D)	Al menos una extremidad (patas) en contacto con el sustrato cambian su ubicación, ya sea en dirección lineal o rotando sobre el eje del animal. La cabeza permanece en el mismo plano corporal. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede o bípeda
Rascarse (RA)	Frota repetidas veces alguna extremidad contra otra región de su cuerpo. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede o bípeda
Movimiento de cabeza (MC)	Ninguna de las extremidades (patas) en contacto con el sustrato cambia su ubicación. La cabeza se mueve con respecto al plano corporal. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede o bípeda
Manipulación de elementos (ME)	Las extremidades anteriores contactan 3 o más veces algún elemento de la sala: zócalos, paredes o hierros. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede o bípeda
Frotarse (F)	Restregar alguna región de su cuerpo (excepción de las extremidades) contra el sustrato o algún elemento de la sala. Posición del animal variable: cuadrúpeda, trípede, bípeda, vientre contra el sustrato o dorso contra el sustrato.

Además, se registró la frecuencia respiratoria de los animales en el habitáculo (tiempo 0 min), justo antes de entrar a la sala de evaluación comportamental. Luego se registraron los valores al finalizar la prueba de habituación (tiempo 30 min), cuando el animal todavía estaba en la sala y a posteriori de la prueba (tiempo 60 min), cuando el animal ya estaba en su habitáculo. Dado que por la duración de cada sesión los animales fueron divididos al azar en dos grupos, (uno de 3 animales y otro de 4), estos registros se hicieron también en animales que no fueron sometidos a la prueba de habituación. Por lo tanto, hay registros para la serie de tiempo para animales que entraron y animales que no entraron, los resultados se expresan como frecuencia respiratoria (número por minuto).

Además, se han recolectados heces diariamente para analizar la concentración de metabolitos de glucocorticoides fecales, aunque los datos todavía no han sido analizados.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó por medio de un análisis de la varianza ajustando un modelo lineal mixto, donde el efecto fijo fueron las sesiones y el aleatorio los ejemplares de *T. tetradactyla*. Se analizó el número de registros en cada zona (central, intermedia o periférica) como variable, además el tiempo de latencia ambular y el número de registros por comportamiento a lo largo de las tres sesiones. Similarmente, se realizó un análisis estadístico para la variable frecuencia respiratoria.

Los resultados indican que el número de veces que los animales fueron registrados en la zona periférica de la sala fue significativamente diferente entre las 3 sesiones ($F_{2,12}=25,32$; $p<0,0001$). La prueba a posteriori Fisher LSD indicó que para esta variable el patrón de los valores medio fue el siguiente: Sesión 1>Sesión 2>Sesión 3. Mientras que el patrón para las otras áreas a lo largo de las sesiones fue opuesto. En las zonas Central e Intermedia se detectaron diferencias significativas entre las sesiones ($F_{2,12} =7,88$, $p=0,0065$ y $F_{2,12} =12,02$, $p=0,0014$, respectivamente). En figura 6 se ilustran los resultados para las actividades observadas según las zonas demarcadas en la sala experimental.

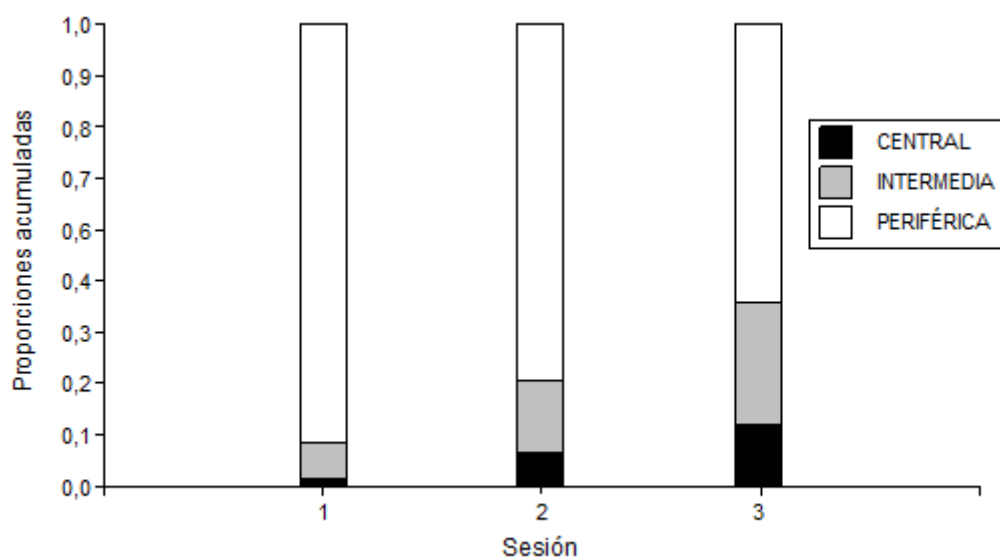


Figura 6: Proporciones acumuladas de los registros de ubicación durante el tiempo de habituación de los ejemplares *T. tetradactyla*, datos correspondientes a cada zona de la sala de evaluación comportamental. Diferencias estadísticas entre las sesiones: En zona periférica Sesión 1>Sesión 2>Sesión 3, en zona intermedia Sesión 1=Sesión 2<Sesión 3 y en zona central Sesión 1≤Sesión 2≤Sesión 3.

Con respecto a la frecuencia absoluta de los comportamientos realizados por los ejemplares de *T. tetradactyla* no se observaron diferencias entre las tres sesiones (en todos los casos $p>0,05$). En tabla 4, se muestran los resultados observados para los registros según las sesiones realizadas en la prueba de habituación. Los comportamientos registrados con mayor frecuencia fueron “Desplazamiento con movimiento de cabeza”, “Desplazamiento” y “movimiento de cabeza”, los valores medios de las frecuencias absolutas en las tres sesiones fueron $87,33 \pm 5,66$, $84 \pm 7,94$, y $118 \pm 5,29$, respectivamente. Estos valores representan el 21,30%, 20,48% y 28,78% de todos los comportamientos realizados por los ejemplares de *T. tetradactyla* en el transcurso de las 3 sesiones. Considerando los comportamientos que incluyen movimientos de la cabeza como una posible exploración olfatoria, es relevante notar que los registros indicarían que el 49,27% del tiempo los animales habrían estado explorando la sala de evaluación comportamental. La latencia a ambular (segundos) no difirió entre las sesiones (Sesión 1= $16,14 \pm 5,62$; Sesión 2= $14,71 \pm 4,96$; Sesión 3= $10,86 \pm 0,74$; $p=0,6817$; $F_{2,12}= .04$).

Tabla 5: Registros de los comportamientos observados en los ejemplares de *T. tetradactyla* en la prueba de habituación a la sala experimental para las evaluaciones 1 y 2.

Variable	Sesión		
	1	2	3
MC	17,14±1,92	17,43±1,50	16,00±2,42
ME	6,29±2,21	8,43±3,38	5,86±1,68
DC	12,86±2,65	10,71±1,77	12,43±2,05
D	11,57±2,72	12,71±2,45	13,14±2,72
RE	7,00±5,23	2,57±1,63	2,43±1,36
RA	1,57±1,07	1,57±1,25	1,43±1,11
F	0,29±0,29	0,71±0,71	1,00±0,65
I	3,11±1,26	4,14±1,52	3,00±1,15

Los significados de las siglas son: MC= movimiento de cabeza; ME= manipulación de elementos; DC= desplazamiento con movimiento de cabeza; D= desplazamiento; RE= recostarse; RA= rascarse; F= frotarse; y I= inmóvil.

Por su parte, no se observaron diferencias significativas en el monitoreo de la frecuencia respiratoria cuando los animales estuvieron en sus habitáculos a lo largo de la serie de tiempo ($F_{2,12} = 1.85$; $p=0.1999$). En cambio, los datos provenientes de los animales expuestos a la sala de evaluación comportamental mostraron diferencias significativas ($F_{2,33} = 10,09$; $p=0.0004$), observándose de acuerdo al test a posteriori LSD Fisher que la frecuencia respiratoria aumentó en el tiempo 30 min con respecto a los otros momentos de muestreo (Figura 7).

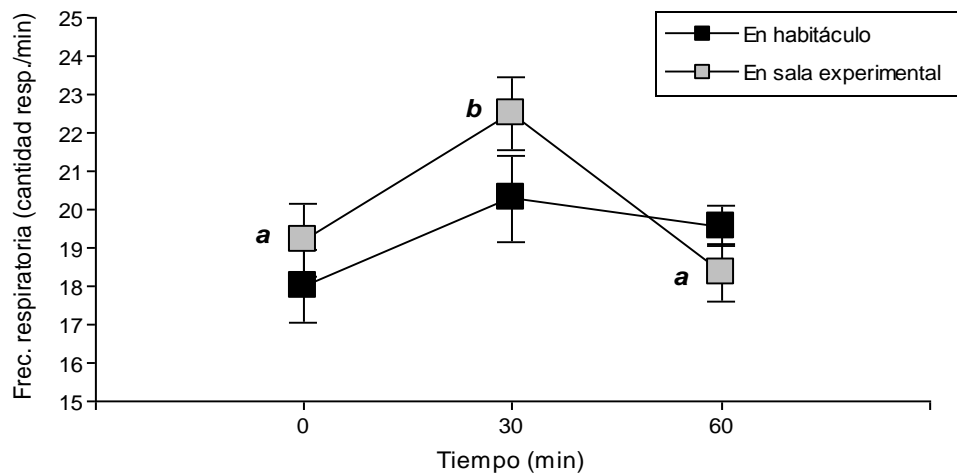


Figura 7: Monitoreo de la frecuencia respiratoria (cantidad de respiraciones/minuto) en los ejemplares de *T. tetradactyla* expuestos a la habituación o en los habitáculos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. En la serie de tiempo sala experimental: letras diferentes indican diferencias estadísticas.

Del análisis de los resultados surgen las siguientes consideraciones de esta prueba de habituación: Los resultados obtenidos indican que los ejemplares de *T. tetradactyla* fueron registrados un mayor número de veces en zonas no periféricas (centrales e intermedias) a medida que transcurrían las sesiones. Estudios previos en especies de roedores evaluados en pruebas de campo abierto, han demostrado que un aumento en el tiempo que los animales se encuentran en zonas no periféricas es un indicador de ansiólisis (Prut y Belzung, 2003). Si bien, la sala de evaluación comportamental podría considerarse un espacio para pruebas de campo abiertos, la escala temporal utilizada fue mayor con el objeto de que se favorezca habituación. Por lo tanto, en términos de uso de espacio, consideramos que es posible plantear la hipótesis de que los ejemplares de *T. tetradactyla* habrían manifestado signos de habituación a la sala. Por otra parte con respecto a los comportamientos registrados no se observaron diferencias entre las sesiones. Finalmente, al considerar la frecuencia respiratoria, como era de esperar los ejemplares mostraron un incremento en el momento que finalizaba la prueba (tiempo 30), a su vez los valores previo (tiempo 0) y posterior (tiempo 60) fueron similares, indicando que los animales, luego de las actividades en la sala, restablecieron en el habitáculo los valores iniciales. Además, si consideramos el perfil de la frecuencia respiratoria de los animales cuando no fueron expuestos a la prueba de habituación, se observa que en el habitáculo no se detectaron alteraciones a lo largo del tiempo.

Actividades de discriminación olfatoria de los ejemplares *T. tetradactyla* y resultados del monitoreo de las actividades comportamentales y de la respiración

A fin de evaluar las actividades de los animales ante estímulos olfatorios se realizó una evaluación de discriminación de habituación/deshabituación según el procedimiento planteado por Arbuckle y col. (2015) con leves modificaciones. Se utilizaron tres estímulos olfatorios según el procedimiento planteado por Arbuckle y col. (2015) y se adicionó otro estímulo (Olor 4); estos fueron: Olor 1: Agua (5mL), Olor 2: Esencia de almendras (5mL), Olor 3: Esencia de banana (5mL), Olor 4: Agua con heces de yagüareté (*Panthera onca*) (5mL). La prueba tuvo comienzo el día 21 de noviembre de 2017, los ejemplares de *T. tetradactyla* ingresaron uno por día (a fin de reducir la presencia de olores tanto de los estímulos olfatorios como de los otros ejemplares en la sala), las evaluaciones se realizaron entre los horarios 17-20hs y el orden de ingreso de los animales fue definido al azar. Previo al ingreso de cada animal la sala fue lavada con agua y 5 ml de hipoclorito de sodio (40-60 gr/L).

Preparación de los estímulos: 7 horas antes a la evaluación, el líquido correspondiente a los olores fue colocado con jeringa sobre un algodón compacto (3x3 cm). Los algodones permanecieron en vasos estériles individuales cerrados herméticamente hasta su presentación. El olor 4, se obtuvo a partir de la recolección de heces frescas de un ejemplar macho de *P. onca* que se encontraba en el zoológico de Córdoba, se colocaron 10 gr de heces en un vaso estéril y se enrasó con agua hasta los 60mL, permaneciendo estacionado por 24 hs antes de la primera separación del líquido con la jeringa.

Presentación de los estímulos: al comienzo de cada evaluación, cada animal estuvo 5 minutos de habituación con un vaso sin ninguno de los olores previamente mencionados. Cada vaso fue colocado en una arandela metálica para evitar que el animal lo moviera. Todos los vasos fueron presentados en un mismo lugar, el cual se posicionó en una esquina de la sala a nivel del suelo (posición A1, ver figura 8). A continuación, los estímulos se presentaron en 3 periodos de 2 minutos, entre períodos se retiraba el vaso por 5 segundos por medio de la puerta corrediza de 35 x 20 cm que se encontraba de manera adyacente a la posición del vaso plástico. Entre cada estímulo se dejó transcurrir 1 minuto, por lo que la duración total de cada evaluación fue de 32 minutos para cada animal (5min+ 2minx3+1min+2minx3+1min +2minx3+ 1min +2minx3).

Todas las evaluaciones fueron grabadas por dos cámaras (HIKVISION Turbo HD- IR Turret Camera- DS 2CE56C2T IRM) (ver Ilustraciones 1 y 2, sección 2.2.1.1 y sección 2.2.1.2, respectivamente).

Posteriormente, en los videos se evaluaron cada 15 segundos los comportamientos exhibidos por los ejemplares de *T. tetradactyla* (ver tabla 3) y la ubicación de los ejemplares en la sala. A fin de evaluar las actividades de los animales en relación al estímulo olfatorio se definieron dos zonas en la sala: olfatoria o no olfatoria (ver figura 8).

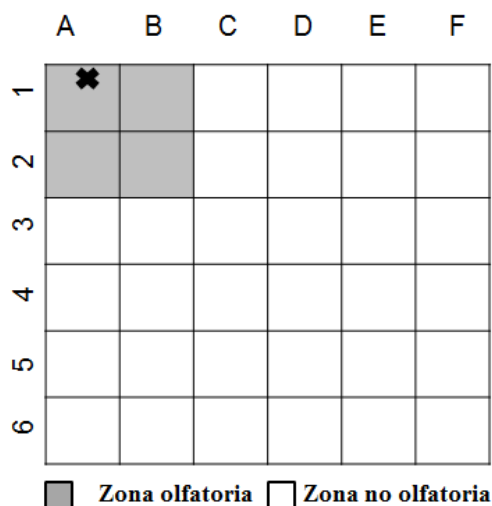


Figura 8: Sala de evaluación comportamental dividida en dos zonas. La cruz indica la ubicación del vaso plástico con el estímulo olfatorio. La puerta de ingreso a la sala se encuentra entre los cuadrados C1 y D1.

Además, se registró la frecuencia respiratoria de los animales en el habitáculo (tiempo 0 min), justo antes de entrar a la sala de evaluación comportamental. Luego se registraron los valores al finalizar la prueba de discriminación (tiempo 32 min), cuando el animal todavía estaba en la sala y a posteriori de la prueba (tiempo 60 min), cuando el animal ya estaba en su habitáculo.

Los registros obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de la varianza, ajustando un modelo lineal mixto y particionando el análisis según el estímulo olfatorio. Entonces, se analizaron los datos comparando los registros correspondientes a habituación y los 3 niveles de cada factor (agua, almendra, banana o yagueté). A posteriori se empleó la prueba LSD de Fisher. La frecuencia respiratoria se evaluó mediante un análisis de la varianza ajustando un modelo lineal mixto, donde el efecto fijo fueron las sesiones (0, 32 y 60 min) y el aleatorio los ejemplares de *T. tetradactyla*.

Los resultados obtenidos en la evaluación de discriminación olfatoria indican que el número de registros realizados para las distintas zonas de la sala se detectaron diferencias significativas entre los cuatro niveles del factor esencia de almendra (Habituación y sus tres presentaciones; $p=0,0016$, $F_{(3,18)}=7,69$), la primer presentación de este estímulo mostró un mayor número de registros con respecto al periodo de habituación y a la segunda y tercera presentación de la

esencia de almendra. Con respecto a los niveles del factor esencia de banana (Habitación y sus tres presentaciones) también se detectaron diferencias ($p=0,0001$, $F_{(3,18)}=12,44$), la primer presentación de este estímulo mostró un mayor número de registros con respecto al periodo de habitación y a la segunda y tercera presentación del estímulo olfatorio. Por otro lado, los otros dos estímulos olfatorios (agua y agua con heces de yaguareté) no presentaron diferencias entre las tres presentaciones y el periodo de habitación de los ejemplares de *T. tetradactyla*. (agua, $p=0,0773$, $F_{(3,18)}=2,69$; agua con heces de yaguareté, $p=0,0590$, $F_{(3,18)}=2,98$).

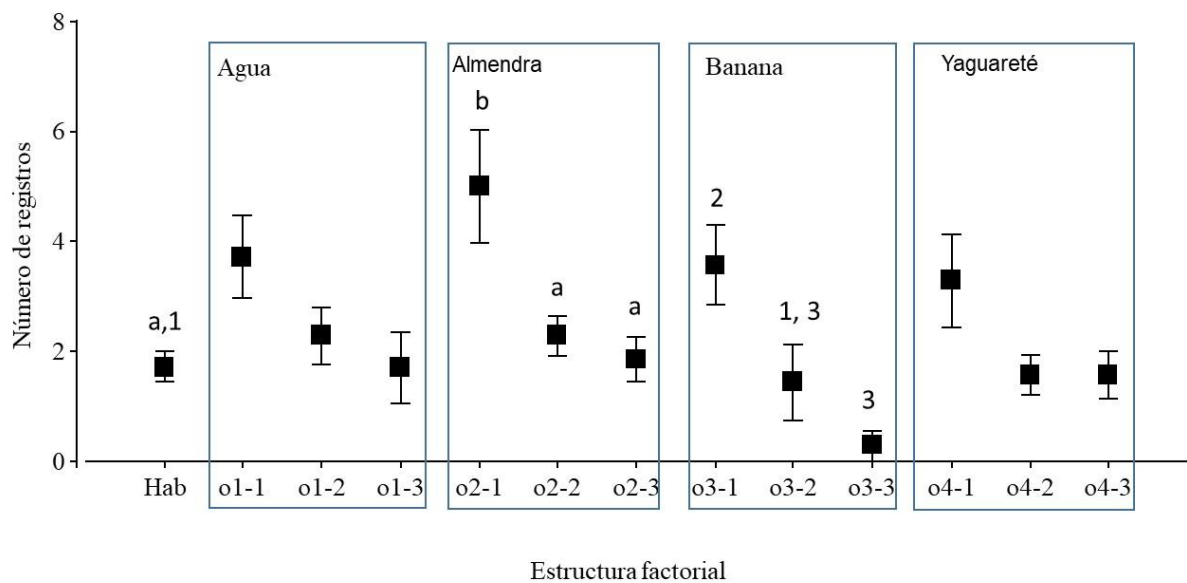


Figura 9: Registros de los ejemplares de *T. tetradactyla* ($n=7$) en la zona olfatoria. Se ilustra el número de registros de los ejemplares en el periodo de habitación y en las tres presentaciones de cada estímulo olfatorio. A su vez, se particionó con respecto a cada estímulo olfatorio. Hab= periodo de habitación; o1-1, o1-2 y o1-3= agua, presentaciones 1, 2 y 3, respectivamente; o2-1, o2-2 y o2-3= esencia de almendras, presentaciones 1, 2 y 3, respectivamente; o3-1, o3-2 y o3-3= esencia de banana, presentaciones 1, 2 y 3, respectivamente; o4-1, o4-2 y o4-3= agua estacionada en heces de yaguareté, presentaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Letras y números diferentes significan diferencias estadísticas ($p<0,05$; los valores se expresan como media \pm EEM).

Con respecto a las mediciones de la frecuencia respiración de los ejemplares de *T. tetradactyla* en la semana en la que se realizó la evaluación de discriminación olfatoria no se observaron diferencias (en todos los casos $p>0,05$). Indicando que la evaluación de discriminación olfatoria no habría afectado la frecuencia respiratoria de los ejemplares.

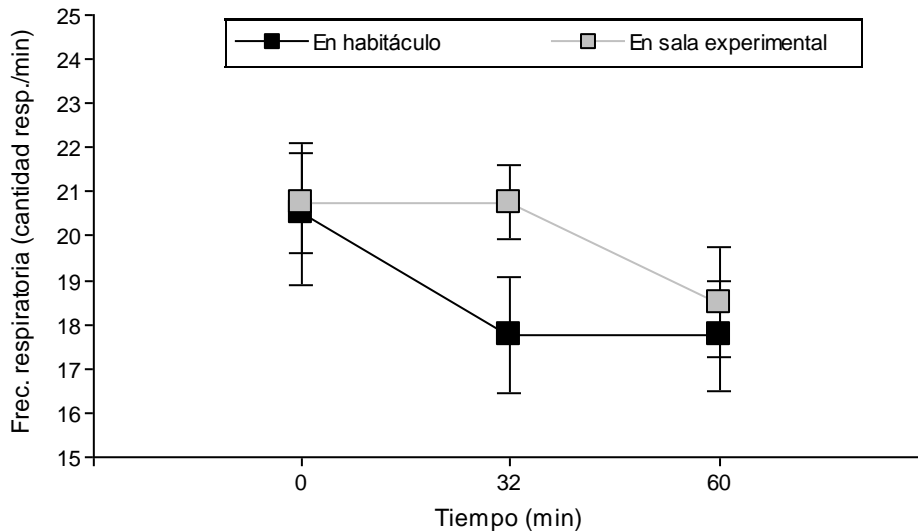


Figura 10: Monitoreo de la frecuencia respiratoria (cantidad de respiraciones/minuto) en los ejemplares de *T. tetradactyla* expuestos a la prueba de discriminación olfatoria (en la sala experimental) o en los habitáculos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. En la serie de tiempo sala experimental: letras diferentes indican diferencias estadísticas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de discriminación olfatoria indican que los animales estuvieron más tiempo en cuadrados circundantes al estímulo olfatorio (Zona olfatoria) la primera vez que se les presentó esencia de almendra con respecto a la segunda y tercera presentación, lo mismo ocurrió con la esencia de banana. A su vez, el periodo de habituación presentó un número de registros menor con respecto a la primera presentación de estos dos estímulos alimentarios. Por su parte, el primer estímulo olfatorio (agua) y el cuarto (agua con heces de yagareté) no mostraron diferencias entre las tres presentaciones y el periodo de habituación. Sin embargo, consideramos que en la figura 10, cualitativamente se percibe una tendencia de un mayor número de registros en la primera presentación con respecto a las otras presentaciones del estímulo y al periodo de habituación. Según lo observado por Arbuckle y col. (2015) en ratones, el patrón observado en esencia de almendra y banana indicaría una discriminación olfatoria de estos estímulos por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla*. Ante la presencia de un nuevo estímulo se detectó un aumento en el número de registros en la zona olfatoria, seguido de un menor número de registros cuando se presentó el mismo estímulo olfatorio, según lo planteado por Arbuckle y col. (2015) esto podría indicar una posible habituación al estímulo presentado. Estos resultados indicarían que los ejemplares de *T. tetradactyla* exhibieron diferentes actividades con respecto a dos de los estímulos olfatorios (esencia de almendra y esencia de banana) y con respecto a los otros dos estímulos por más

que no se percibieron diferencias estadísticas, se considera que los ejemplares presentaron un patrón de respuesta semejante. En tal sentido, se considera que bajo las condiciones de la evaluación realizada existiría una posible discriminación olfatoria por parte de los ejemplares de *T. tetradactyla*.