

UCH-FC
MAG-B
B 242
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

Costos energéticos e implicancias sobre la morfología
renal y digestiva del consumo de compuestos secundarios
en dos aves (Passeriformes : Emberizoidea) con diferentes
hábitos dietarios

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Gonzalo Barceló Carvajal

Mayo, 2014
Santiago – Chile

Director de Tesis: Pablo Sabat Kirkwood



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

GONZALO FELIPE BARCELÓ CARVAJAL

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de abril de 2014.

Dr. Pablo Sabat Kirkwood
Director de Tesis

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals Lambarri
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Michel Sallaberry Ayerza
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



*Dedicado a Jonathan Salinas,
al finalizar el ciclo que juntos comenzamos.*

Biografía



Gonzalo nace el 15 de abril de 1986 durante una fría noche de otoño. En la comuna de Independencia desarrolla su infancia, momentos en los cuales comienza a esbozar interés y curiosidad por las ciencias naturales. Durante su paso por el

Instituto Nacional este interés crece cada vez más, hasta convencerse de que debe seguir su vocación y dedicar su vida a la biología. Esto lo lleva a tomar la decisión de estudiar Biología Ambiental en la Universidad de Chile. Es acá en donde comienza a hacerse de sus primeras herramientas e interiorizarse en el conocimiento, es así como llega a trabajar al laboratorio de Ecofisiología Animal lo que consecuentemente lo lleva a realizar el Magíster en Ciencias Biológicas. Sus actividades académicas en conjunto con su desarrollo profesional le han permitido trabajar en diversos lugares de Chile, haciendo lo que más le gusta, conocer la fauna y su entorno.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Pablo Sabat, mi tutor, por haber sido guía todos estos años en el desarrollo de las diversas actividades e investigaciones que he llevado a su lado, por su confianza y preocupación.

A Mauricio Canals y Michel Sallaberry, miembros de la comisión, por las sugerencias otorgadas para la corrección de esta tesis. A quienes colaboraron de distinta forma en la realización de esta tesis; Cecilia Rodríguez, por su simpatía y por facilitar el laboratorio de química en donde realicé los extractos; a Andrés Sazo, compañero de terrenos y por su siempre buena disposición; a Karin Maldonado, por los consejos, los terrenos y las enzimas; a Gabriela Píriz, por la ayuda con los chincoles y la compañía; a Pablo Negrete, por la asistencia gráfica y el empuje; a Juan Manuel Ríos, por la experiencia y ayuda en los experimentos; a Claudio Veloso, Grisel Cavieres, Cristóbal Narváez y Natalia Ramírez por sus asistencias.

Doy las gracias también a quienes de una u otra forma hicieron sentir su apoyo en la finalización de esta etapa, camino que partió inesperadamente ensombrecido, pero que se ha vuelto a llenar de luces gracias a mis amigos y amigas, a mi familia, a mis padres por su paciencia, cariño y esfuerzo, especialmente a mi madre por su dedicación total a mi y mis hermanos; y substancialmente a Valentina por caminar a mi lado con amor, apoyo, y consejos en todo momento.

Esta tesis fue financiada gracias al proyecto FONDECYT N° 1120272 y a la beca CONICYT para magíster nacional.

Índice de Contenidos

Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Lista de Abreviaturas	viii
Resumen	ixx
Abstract	ixx
Introducción	1
<i>Hipótesis</i>	6
<i>Objetivo General:</i>	7
Materiales y métodos	8
Resultados	14
Tasas de consumo	14
Tasa metabólica basal y pérdida de agua evaporativa.	18
Excreción de ácido glucurónico	21
Morfología y función digestiva	24
Morfología renal	31
Análisis de componentes principales	36
Discusión	43
<i>Digestión, costos energéticos y tolerancia</i>	43
<i>Morfología renal y balance hídrico</i>	48
<i>Conclusiones finales.</i>	51
Referencias	53

Índice de Tablas

- Tabla 1: Proporción de semillas consumidas anualmente por las especies *Z. capensis* y *D diuca*, datos expresan la abundancia relativa (%) y la clase a la cual pertenecen las semillas consumidas, Magnoliopsida (Dicotiledoneas) o Liliopsida (Monocotiledones). Modificado de López-Calleja (1995) 13
- Tabla 2: Análisis de componentes principales basado en características morfofisiológicas de *Zonotrichia capensis* aclimatados a dietas con distintas cargas de CS..... 38
- Tabla 3: Análisis de componentes principales basado en características morfofisiológicas de *Diuca diuca* aclimatados a dietas con distintas cargas de CS..... 39

Índice de Figuras

Figura 1: Cantidad de alimento ingerido y defecado diariamente en <i>Zonotrichia capensis</i> y <i>Diuca diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS. EO: Dieta con extractos de <i>Opuntia ficus-indica</i> al 0,5% de Fenoles Totales. AT: Dieta con ácido tánico al 2%.....	16
Figura 2: Digestibilidad de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.....	16
Figura 3: Consumo de agua en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS..	17
Figura 4: Tasa metabólica basal de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	19
Figura 5: Correlación entre la tasa metabólica basal y el consumo diario de alimento bajo dietas que difieren en la concentración de CS para <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i>	20
Figura 6: Residuos respecto a la TMB de la Perdida Total de Agua Evaporativa de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	21
Figura 7: Masa de ácido glucurónico excretada diariamente, estandarizada por masa, de <i>Z. capensis</i> y <i>D. Diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	22
Figura 8: Correlación estandariza por masa entre la tasa metabólica basal y la excreción diaria de ácido glucurónico en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i>	23
Figura 9: Tamaño del hígado de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS..	24
Figura 10: Correlación entre la digestibilidad del alimento consumido y la longitud de intestino delgado en <i>Z. capensis</i> y <i>Diuca diuca</i> frente a la variabilidad de compuestos secundarios en las tres distintas dietas.	27
Figura 11: Longitud del intestino delgado de los individuos de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	28

Figura 12: Masa del intestino delgado de los individuos de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	28
Figura 13: Longitud de la cloaca de los individuos de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	29
Figura 14: Masa de la cloaca de los individuos de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	29
Figura 15: Actividad enzimática total de la aminopeptidasa-N en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	30
Figura 16: inactividad enzimática total de la maltasa en individuos de <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	30
Figura 17: Masa del riñón izquierdo en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	33
Figura 18: Masa de la corteza renal en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	33
Figura 19: Masa de la médula renal en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	34
Figura 20: Masa de la médula renal en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	34
Figura 21: Conos medulares en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	35
Figura 22: Longitud de los conos medulares en <i>Z. capensis</i> y <i>D. diuca</i> bajo dietas que difieren en la concentración de CS.	35
Figura 23: Puntuaciones por tratamiento dietario para cada uno de los Componentes Principales de las variables morfofisiológicas de <i>Z. capensis</i>	40
Figura 24: Puntuaciones por tratamiento dietario para los Componentes Principales 1 y 2 de las variables morfofisiológicas de <i>D. diuca</i>	41
Figura 25: Puntuaciones por tratamiento dietario para el Componente Principal 3 de las variables morfofisiológicas de <i>D. diuca</i>	42

Lista de Abreviaturas

- CS: Compuestos secundarios de las plantas.
- AT: Dieta en base a trigo molido con adición de ácido tánico al 2% masa/masa.
- EO: Dieta en base a trigo molido con adición de extracto alcohólico de frutos de *Opuntia ficus-indica* al 0,5% masa/masa de fenoles totales ácido tánico equivalentes.
- C_{AL}: Consumo de alimento diario.
- FE: Fecas producidas diariamente.
- D_A: Digestibilidad aparente (%).
- AA_M: Masa total de alimento asimilado.
- C_{AG}: Consumo de agua diario.
- TMB: Tasa metabólica basal.
- PTAE: Pérdida total de agua evaporativa.
- PAC: Pérdida de agua cutánea
- PAR: Pérdida de agua respiratoria.
- M_b: Masa corporal.
- ID: Intestino delgado
- IG: Intestino grueso
- L_{ID}: Largo del intestino delgado.
- M_{ID}: Masa del intestino delgado.
- ACP: Análisis de componentes principales.

Resumen

La composición química del alimento y la amplitud de la dieta natural están estrechamente relacionadas con la fisiología y la capacidad de metabolizar los nutrientes. Aunque las aves que consumen semillas cuentan con un alimento de alta calidad nutricional, se enfrentan al desafío de lidiar con cantidades variables de compuestos secundarios (CS). Postulamos que la capacidad de detoxificación de un ave está asociada a un alto costo debido a que los órganos encargados de este proceso, hígado y riñón, aportan de manera significativa al metabolismo energético. A su vez esta capacidad de lidiar con los CS, estaría asociada a la historia evolutiva y al contexto ecológico de cada especie. Para poner a prueba esta hipótesis, analizamos el efecto del consumo crónico de dietas enriquecidas con fenoles en dos especies de aves con diferentes hábitos dietarios: el omnívoro *Zonotrichia capensis* y el granívoro *Diuca diuca*. Se utilizó ácido tánico (AT) como un fenol estándar, y extracto de *Opuntia ficus-indica* (EO) como un complejo de fenoles naturales. Luego de 5 semanas de aclimatación a dietas contrastantes en su composición de CS, se midió el consumo de alimento y agua, la tasa metabólica basal (TMB), la pérdida de agua evaporativa, la excreción de ácido glucurónico como producto de la detoxificación, la morfología digestiva y renal, y tasas de hidrólisis digestiva. Encontramos que en ambas especies las variables tienden a agruparse en un componente energético-digestivo y en un componente de la morfología renal. Los análisis realizados para las variables energéticas-digestivas dan cuenta de respuestas diferenciadas entre *Z. capensis* y *D. diuca* ante el consumo crónico de CS. La morfología renal presentó mayores modificaciones en *Z.*

capensis, aunque se presentaron diferencias contrastantes entre EO y AT. En ambas especies, la excreción de ácido glucurónico fue mayor en los individuos que consumieron dietas enriquecidas con fenoles respecto a la dieta control, no obstante, se presentaron valores mayores en *Z. capensis*. Asimismo, *Z. capensis* presentó un aumento de la TMB en el grupo alimentado con dietas enriquecidas con fenoles respecto del grupo control. Las diferencias interespecificas en la respuesta fisiológica al consumo de fenoles estarían determinadas por la historia evolutiva asociada a los distintos hábitos alimentarios. Si bien ambas especies pueden lidiar con dietas moderadas en fenoles, los costos energéticos pueden diferir debido a las distintas estrategias para enfrentar los CS que asume cada especie.

Abstract

The chemical composition of the food and the amplitude of the natural diet are closely related to the physiology and the ability to metabolize nutrients. Although seed-eating birds have a food of high nutritional quality, they face the challenge of dealing with variable amounts of plant secondary compounds (CS). We postulate that the detoxification capacity of a bird is associated with a high cost because the organs responsible for this process, liver and kidney, contribute significantly to the energetic metabolism. In turn, this ability to deal with the CS, would be associated with the evolutionary history and ecological context of each species. To test this hypothesis, we analyzed the effect of subchronic consumption of diets enriched with phenols on two birds species with different dietary habits: the omnivorous *Zonotrichia capensis* and the granivorous *Diuca diuca*. Three contrasting diets in their CS composition were created, besides a control diet, the other two diets were elaborated with tannic acid (AT) as a standard phenol and extract of *Opuntia ficus-indica* (EO) as a complex of natural phenols. After 5 weeks of acclimation, feed and water intake, basal metabolic rate (TMB), evaporative water loss, excretion of glucuronic acid as a product of detoxification, digestive and renal morphology and digestive hydrolysis rates were measured. We found that in both species the variables tend to cluster in an energy-digestive component and a renal component. Analyses for energy-digestive variables account for differential responses between *Z. capensis* and *D. diuca* to subchronic consumption of CS. The renal morphology showed greater changes in *Z. capensis*, although contrasting differences between EO and AT were presented. In both species,

glucuronic acid excretion was higher in individuals who consumed diets enriched with phenols compared to the control diet, however, higher values in *Z. capensis* were presented. Also *Z. capensis* showed an increase in BMR in the group fed with diets enriched with phenols compared to the control group. Interspecific differences in the physiological response to the consumption of phenols would be determined by the ecological context associated with different dietary habits. While both species can cope with moderate phenols diets, energy costs may differ due to different strategies to face the CS that assumes each species.

Introducción

La dieta natural de las aves se encuentra estrechamente relacionada con la morfología, fisiología y capacidad de metabolizar los nutrientes (Klasing, 1998; Karasov & Martínez del Río, 2007). Así, determinados alimentos requieren de ciertas características morfológicas y fisiológicas para ser adecuadamente incorporados. Por ejemplo, la capacidad enzimática para hidrolizar los nutrientes en el intestino (Ziswiler, 1986; Ramírez-Otárola et al, 2011), la capacidad de excreción de desechos para conservar el equilibrio osmótico (Richardson et al, 1991; Roxburgh & Pinshow, 2002; McWhorter et al, 2004; Sabat et al, 2006), la morfología y tamaño del culmen, son algunas de las características que explican las preferencias alimentarias de las aves (Landolt, 1985; Díaz, 1990).

Las aves granívoras cuentan con un alimento que es abundante y con una alta densidad de nutrientes (Klasing, 1998), sin embargo, a menudo presentan cantidades elevadas de compuestos secundarios (CS) tales como fenoles, terpenos y alcaloides (Wink, 1988; Díaz, 1996; Karasov & Martínez del Río, 2007). Estos compuestos permiten a las plantas protegerse de sus consumidores al actuar como aleloquímicos, provocando disuasión (Matson et al, 2004; Ríos & Mangione, 2010) o causando trastornos fisiológicos en los consumidores (Foley et al, 1995; Dearing et al, 2005; Kohl & Dearing, 2011). Entre estos trastornos, se han descrito a los taninos como reductores de la digestibilidad al formar complejos con proteínas de la dieta en el intestino, pero también como compuestos que actúan como toxinas siendo degradadas y absorbidas (Foley & McArthur, 1994). Un vez que los CS ingresan al organismo, su

biotransformación y eliminación tiene un alto costo energético para un animal (Thomas et al, 1988; Silva et al, 2004), Esto es congruente con que los órganos encargados de este proceso, riñón e hígado, aportan de manera significativa al metabolismo energético (Daan et al, 1990). Pese a esto, los animales han desarrollado distintas estrategias que les permiten lidiar con el consumo y los efectos negativos de los CS (Freeland & Janzen, 1974; Torregrosa & Dearing, 2010). Además, se ha demostrado que estas respuestas se manifiestan en función de las características ecológicas de las especies, por ejemplo en función de la amplitud y de la composición química de la dieta natural (Marsh et al, 2006; Ríos, 2011).

De acuerdo a Foley & McArthur (1994) Los costos frente al consumo de CS podrían ser evaluados a través de cuatro distintas maneras: energía no asimilada en la digestión, producción de calor o cambios en el metabolismo basal o máximo, costos de producción de metabolitos de conjugación (e.g. ácido glucurónico, ornitina, taurina) y límite de saturación de una determinada vía metabólica de detoxificación. El uso de cada una de estos métodos sería complementario y su idoneidad estaría determinada por el tipo de aleloquímico y sus propiedades fisicoquímicas (e.g. tamaño molecular, polaridad, grupos funcionales) como también por la fisiología del consumidor. Los CS en su mayoría, particularmente fenoles y terpenos, son absorbidos en el intestino (McLean & Duncan, 2006). Su vía de eliminación podría dividirse en dos etapas, primero la biotransformación regulada principalmente por la acción enzimática que aumenta la hidrosolubilidad de los CS, también llamada detoxificación (Pass et al, 1999; Marsh et al, 2006) y posteriormente la excreción de estos CS, en donde la función renal tiene un rol central (Foley et al, 1995).

Estudios realizados en aves, han descrito diversos efectos causados por los CS, los que comprometen el equilibrio interno del organismo: aumento en la excreción de amonio, ácido glucurónico y ornitina (Jakubas et al, 1993a y b; Gluglielmo et al, 1996; Ríos et al, 2012b) y del flujo de la orina (Jakubas et al, 1993a), aumento del consumo de agua (Jakubas et al. 1993a; Ríos et al, 2012b) y aumento de la geofagia (Gilardi et al, 1999). A pesar de esto, los efectos directos de los CS sobre la morfología y función renal no han sido particularmente estudiados. Sin embargo, recientemente se ha documentado que especies paseriformes granívoras poseen un mayor desarrollo de la médula renal que las insectívoras y omnívoras (Barceló et al, 2012). Debido a que las especies granívoras consumen dietas con un menor contenido proteico relativo, esta mayor capacidad renal podría deberse a una menor disponibilidad de agua preformada en la dieta y/o a una mayor actividad renal debido al proceso de detoxificación de CS de las semillas.

En este sentido, las especies consumidoras de CS requieren disminuir las concentraciones de los compuestos secundarios en la sangre para alimentarse de manera continua (Torregrosa & Dearing, 2009). Sin embargo, dada la baja disponibilidad hídrica de algunos ambientes, la escasa agua preformada en semillas (Díaz, 1996) y el grado de especialización de algunas aves granívoras a ambientes secos (Bartholomew & Cade, 1963; MacMillan, 1990), se produciría un compromiso entre la necesidad de eliminar desechos metabólicos y una hidratación adecuada, lo que llevaría eventualmente a un mayor desarrollo del sistema renal. Este desarrollo podría ocurrir mediante un aumento del número de nefrones del tipo mamiferianos (conos medulares) y/o el largo de las asas de Henle de dichos nefrones (o largo de los conos) logrando así

una mayor capacidad de concentración de la orina (Sturkie & Whittow, 2000). Este tipo de ajustes en las capacidades del riñón han sido documentados para aves que habitan regiones xéricas o desérticas, lo que constituye un alto grado de estrés hídrico (Casotti & Richardson, 1992; Sabat et al, 2006).

Por otro lado, en el proceso de detoxificación el mayor requerimiento de proteínas conlleva a que el producto de excreción aumente en forma de amonio (Jakubas et al, 1993; Foley et al, 1995). Esto se asocia a un mayor consumo de agua debido a su toxicidad, requiriendo de una cantidad 50 veces mayor que el ácido úrico para su eliminación (Roxburgh & Pinshow, 2002). Esta necesidad de un mayor consumo de agua podría dar lugar a una economía hídrica más ajustada, obligando a maximizar la concentración de orina. Alternativamente, si las necesidades hídricas son cubiertas, el consumo de CS produciría indirectamente una hipertrofia del riñón y de la estructura cortical, lo que es congruente con el mayor tamaño renal de individuos que habitan en regiones húmedas y/o consumen dietas con abundante agua preformada (Casotti et al 1992; Sturkie & Whittow, 2000; Sabat et al, 2009).

A su vez, son escasos los estudios realizados bajo una perspectiva sistémica y que evalúen los efectos del consumo de CS de una manera integrativa dentro de la fisiología animal. Así, resulta interesante establecer cómo la interacción entre i) la disponibilidad de agua, ii) la ingesta de CS y iii) la capacidad detoxificadora afectan a especies con distintas capacidades de osmorregulación y hábitos alimentarios.

Nuestra aproximación incluye el estudio de dos especies de la superfamilia Emberizoidea (Barker et al, 2013) de diferentes hábitos alimentarios, el chincol, *Zonotrichia capensis* (omnívoro) y la diuca, *Diuca diuca* (granívoro estricto). En este sentido, se ha criticado la validez de estudios comparativos con dos especies para inferir adaptación (Garland & Adolph 1994) debido a problemas asociados con la independencia estadística derivados de las relaciones filogenéticas entre las especies. En este sentido se ha propuesto el uso de herramientas analíticas que incorporen explícitamente esta variable. Sin embargo, estos métodos requieren el análisis de un gran número de especies y del conocimiento de sus relaciones filogenéticas. Esto último a menudo requiere de un trabajo enorme e inalcanzable si no se conocen las relaciones de parentesco. Alternativamente, es posible minimizar el error del uso de comparaciones entre pocas especies utilizando especies filogenéticamente relacionadas (e.g., Sabat & Martínez del Río 2002). Por otro lado, McNab (2009) plantea que son los ajustes fisiológicos los que presentan especies con características ecológicas diferentes los que permiten la supervivencia de éstas, independiente de si el origen de tales diferencias están asociados a la historia filogenética. En este sentido el estudio comparativo de dos especies no invalida, pero si limita, las conclusiones que pueden ser derivadas de este.

Hipótesis

El aumento en la concentración de los compuestos secundarios de las plantas (CS) en la dieta, inducirá cambios estructurales en la morfología del riñón. Entre estos esperamos i) un aumento en la proporción de médula renal, por la mayor cantidad de desechos y la necesidad de mantener una hidratación adecuada en las aves. ii) hipertrofia renal, en específico de la corteza renal, causada indirectamente por el proceso de detoxificación, debido a una mayor ingesta de agua.

A su vez, postulamos que los individuos que consuman dietas con mayores niveles de CS presentarán un aumento en la cantidad de compuestos de detoxificación (i.e., ácido glucurónico) en las excretas. Además, como consecuencia de un mayor consumo de CS, se espera encontrar un mayor costo energético asociado a la detoxificación y a los cambios morfológicos y fisiológicos, expresado en un aumento de la tasa metabólica basal.

Finalmente, se espera que la especie omnívora generalista posea una mayor flexibilidad fenotípica para lidiar con el consumo de CS; lo que se traduciría en un mayor costo energético comparado con la especie especialista.

Objetivo General:

Estudiar los efectos del consumo de compuestos secundarios de las plantas sobre la fisiología y la morfología digestiva y renal en aves bajo una aproximación integrada del proceso de detoxificación.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar las variaciones morfológicas del riñón frente al consumo de dietas de diferente concentración de CS fenólicos.
2. Evaluar las variaciones morfológicas del sistema digestivo y su función enzimática, frente al consumo de dietas de diferente concentración de CS fenólicos.
3. Evaluar los cambios en el gasto metabólico y el balance hídrico frente a dietas altas en CS fenólicos.
4. Evaluar diferencias en la respuesta al consumo crónico de dietas moderadas en CS fenólicos en dos modelos de aves (un generalista omnívoro y un especialista granívoro).

Materiales y métodos

Muestreo

Se utilizaron dos especies modelos con distintos hábitos dietarios, el omnívoro generalista *Zonotrichia capensis*, y el granívoro especialista *Diuca diuca*. Se sabe que la proporción de semillas e insectos difiere notablemente entre estas dos especies, *Diuca diuca* presenta consumos de semillas de alrededor del 98,5% contra un 1,5% de insectos, proporción que es constante durante el año. En tanto *Z. capensis* puede consumir hasta un 30% de insectos, dependiendo de la época del año (Sabat et al, 1998; Ramírez-Otárola et al, 2011). El detalle específico de las semillas consumidas también se ha documentado (Lopez-Calleja, 1995; Véase Tabla 1), presentando una variabilidad tanto en tipo como en la concentración de compuestos secundarios (Lis-Balchin & Hart, 1994; Saleem et al, 2006). Durante el otoño e invierno de 2012 se colectaron en total 21 individuos por especie en Quebrada de la Plata (33° 26' S, 70° 55' W), Chile central, utilizando redes de niebla (Ecotone). Los individuos fueron transportados hasta el laboratorio en Santiago, en donde se mantuvieron en jaulas de malla plástica de 40cm x 40cm x 40cm con un fotoperiodo de 12L:12O, a una temperatura de 25°C, con alimento y agua *ad libitum*.

Después de la habituación a las condiciones del laboratorio por 1-2 días, las aves fueron asignadas aleatoriamente a tres tratamientos (incluido un control), con un total de 7 individuos para cada uno, manteniendo los tratamientos dietarios por 5 semanas, tiempo suficiente para producir cambios morfológicos en el riñón (Sabat et al 2004; Aldea & Sabat, 2007). Los individuos fueron pesados regularmente para evaluar su estado físico.

Dietas Experimentales

Se confeccionaron dos dietas con compuestos secundarios en base a semillas de trigo comercial molidas (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm). La primera dieta (AT) se adicionó con ácido tánico (Sigma-Aldrich) como sustrato estándar o modelo, con una concentración de 2% masa-masa; se utilizó esta concentración debido a que representa una dosis sub-crónica que mantiene una alta probabilidad de supervivencia (Ríos, 2011). La segunda dieta experimental (EO) se realizó añadiendo concentraciones conocidas de un extracto de una especie vegetal, *Opuntia ficus-indica*, en donde la concentración final fue al 0,5% masa-masa de fenoles totales. Se utilizó esta concentración por ser la cantidad consumida aproximada por la especie *Diuca diuca* en estado natural. El extracto alcohólico de los frutos de *Opuntia ficus-indica* se realizó de acuerdo a Tequida-Meneses et al (2002) con frutos provenientes de la zona; los cuales fueron triturados y secados a 50°C. La materia seca (17% del total) se molió en un molinillo eléctrico (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm, Moulinex) y posteriormente se llevó a una solución al 6% masa-volumen con una mezcla metanol-etanol 30-70, se dejó macerar por 48 horas en oscuridad, luego la mezcla fue filtrada y puesta bajo campana para su destilación al vacío en un rotavapor hasta obtener un concentrado (7% del total), sobre el cual se calculó el contenido de fenoles totales mediante el método adaptado de Ainsworth & Gillespie (2007) con reactivo Folin-Ciocalteu (Merck) (0,27% de fenoles totales del total de tuna).

Las soluciones de ácido tánico y de extracto de *Opuntia ficus-indica* se prepararon pesando una cantidad conocida del compuesto y disolviéndola en Etanol 99,5%. Estas soluciones se aplicaron sobre la dieta a base de trigo molido seco, posteriormente siendo secadas bajo campana para evaporar el etanol, logrando la

concentración deseada de CS, finalmente fueron guardadas en oscuridad hasta su uso. Para la dieta control se hizo el mismo procedimiento aplicando solamente etanol absoluto, el cual era posteriormente evaporado. Las dietas fueron suplementadas con larvas de *Tenebrio molitor* en el caso de la especie omnívora.

Consumo y digestión

Luego de 4 semanas de aclimatación, a cada uno de los individuos se le determinó el consumo de alimento diario (C_{AL}) la cantidad de fecas producidas diariamente (FE), la digestibilidad aparente ($D_A = [C_{AL}-FE]/FE$); la asimilación aparente de materia ($AA_M = [C_{AL}-FE]$) y el consumo de agua diario en gramos (C_{AG}) corrigiendo la pérdida por evaporación utilizando bebederos no experimentales fuera de la jaula.

Morfología Renal y Digestiva

Finalizados los tratamientos experimentales, los individuos se sacrificaron mediante exposición a CO_2 , fueron diseccionados y sus órganos removidos y pesados. Los riñones se pesaron usando una balanza electrónica (± 0.1 mg), preservaron en paraformaldehído-glutaraldehído (4%) y procesaron para microscopía óptica. Una vez fijados los riñones se diseccionaron para evaluar la proporción de corteza y médula renal, la cantidad de conos medulares, su masa y largo (Barceló et al, 2012). Los intestinos fueron lavados, medidos longitudinalmente (± 0.05 cm) y pesados usando una balanza electrónica (± 0.1 mg). Para preparar el intestino delgado para las determinaciones enzimáticas se limpiaron los intestinos con una solución isotónica 0.9% NaCl, e inmediatamente fueron guardados a $-50^\circ C$ (Martínez del Río et al. 1995, Sabat et al. 1998).

Tasa Metabólica Basal y Balance Hídrico.

Al finalizar los tratamientos experimentales, se determinó la tasa de consumo de oxígeno (TMB) y pérdida de agua evaporativa (PTAE). Las mediciones se realizaron en una condición postabsortiva (4 horas de ayuno), y durante la fase de reposo (noche), utilizando métodos estándar de respirometría e higrometría de flujo abierto (Williams et al, 2001). Cada individuo fue ubicado en una cámara metabólica de 1L, la cual posee una grilla para mantener al animal en suspensión y bajo él se utilizó aceite mineral para capturar las excretas. El flujo utilizado durante la medición fue de 500 ml/h. Las mediciones fueron realizadas a 30 °C, dentro de la zona termoneutral. Los individuos se mantuvieron al interior de la cámara por 12 horas y se registró el consumo de oxígeno (VO₂) y de humedad absoluta en kg/m³ correspondiente al promedio de la última etapa de medición a través de un sistema computarizado de respirometría de flujo abierto (Sable Systems, Nevada), utilizando el programa Expedata.

Debido a que la PTAE está asociado con la TMB producto de la mayor pérdida de agua respiratoria al aumentar la frecuencia y/o volumen respiratorio (Williams & Tieleman, 2000), para los análisis de PTAE se utilizaron los residuos de la regresión lineal respecto a la TMB.

Función Digestiva y de Biotransformación.

Para los ensayos enzimáticos, el tejido intestinal fue descongelado y completamente homogenizado (30 segundos en homogenizador ULTRA TURRAX T25 Janke and Kunkel, Breisgau, Germany) en 20 volúmenes de solución NaCl 0,9%. Las determinaciones de Aminopeptidasa-N fueron hechas usando L-alanina-p-nitroanilida como sustrato. El ensayo comenzó añadiendo 1 mL de solución sustrato (2,04 mmol*L⁻¹

de L-alanina-p-nitroanilida en $0,2 \text{ mol} \cdot \mu\text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7) a $100 \mu\text{l}$ de tejido homogenizado. La reacción fue incubada por 10 minutos a 40°C y luego detenida usando 3 mL de ácido acético ($2 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$) a 5°C . La absorbancia fue medida a 384 nm.

La actividad de la maltasa fue determinada de acuerdo a Dahlqvist (1964), con modificaciones de Martínez del Río (1990). Brevemente, $100 \mu\text{L}$ de homogenizado de tejido fueron incubados a 40°C con $100 \mu\text{L}$ de 56 mmol L^{-1} de sustrato (maltosa) en $0,1 \text{ M}$ Maleato/NaOH buffer, pH 6,5. Después de un periodo de incubación de 3 minutos, la reacción se detuvo adicionando 3 ml de Trinder-Glucosa (Valtek, Santiago, Chile). La solución Trinder-Glucosa consiste en 250 mL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ TRIS/HCl, pH 7 con 250 mL de $0,5 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7. Luego de un periodo de revelado de 18 minutos a 20°C , la absorbancia fue medida a 505 nm con un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu UV mini-1240, Tokyo, Japón). En base a su absorbancia, fue calculada la actividad enzimática intestinal estandarizada.

El ácido glucurónico fue determinado en las excretas recolectadas en la etapa final de los tratamientos mediante el ensayo colorimétrico descrito en Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), modificado por Jakubas et al. (1993a). Brevemente, a 100 mg de excretas molidas y liofilizadas se les agregó 10 ml de buffer bórax $0,01 \text{ M}$ (pH 9.5) y luego de agitar la suspensión con vortex se colocaron durante 30 minutos en una centrifuga a 1000 rpm . Posteriormente se filtró el sobrenadante, y se tomó $20 \mu\text{l}$ de cada muestra. Esta fue diluida a $200 \mu\text{l}$. Los tubos de ensayo con las muestras fueron puestos en un baño de agua con hielo, más 3 ml de la solución reactivo de tetraborato de sodio-ácido sulfúrico $0,0125 \text{ M}$. Luego los tubos fueron calentados en baño maría a 100°C durante 10 minutos. Después de enfriarlos, a un set de muestras se les agregó $20 \mu\text{l}$ del reactivo 3-fenilfenol ($0,15\%$ 3-fenilfenol en NaOH $0,5\%$). Para las muestras blanco el

reactivo fue reemplazado por 20 µl de NaOH 0.5%. Las determinaciones en cada muestra de excreta se realizaron por duplicado. Se confeccionó una curva estándar con concentraciones conocidas de ácido glucurónico. La absorbancia fue medida a 520 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Mini-UV.

Tabla 1: Proporción de semillas consumidas anualmente por *Z. capensis* y *D. diuca*, datos expresan la abundancia relativa (%) y la clase a la cual pertenecen las semillas consumidas, Magnoliopsida (Dicotiledoneas) o Liliopsida (Monocotiledones). Modificado de López-Calleja (1995).

<i>Zonotricha capensis</i>			<i>Diuca diuca</i>		
		(%)			(%)
Semillas		94,0	Semillas		98,5
<i>Opuntia sp.</i>	Magnoliopsida	31,7	<i>Erodium cicutarium</i>	Magnoliopsida	47,3
<i>Erodium cicutarium</i>	Magnoliopsida	22,6	Asteraceae	Magnoliopsida	16,0
<i>Echinoçloa crus-galli</i>	Liliopsida	9,5	<i>Opuntia sp.</i>	Magnoliopsida	13,9
Asteraceae	Magnoliopsida	9,5	<i>Cynareae sp.</i>	Magnoliopsida	11,1
Gramineae	Liliopsida	7,9	Gramineae	Liliopsida	8,6
Otras	Magnoliopsida	7,3	Otras	Magnoliopsida	1,5
Otras	Liliopsida	5,5			



Resultados

Tasas de consumo

Después de 5 semanas de aclimatación a las dietas experimentales la masa final de las aves no fue afectada significativamente por los distintos tratamientos, aun cuando en el caso del chicol, las diferencias estuvieron al borde de la significancia (*Zonotrichia capensis*: $F_{(2, 17)}=3,03$, $p=0,075$ y *Diuca diuca*: $F_{(2, 14)}= 0,057$, $p=0,95$). En el caso de *Z. capensis* el test a posteriori reveló que M_b fue significativamente mayor en individuos que consumieron la dieta EO respecto a los aclimatados a la dieta AT (LSD; $p=0,043$) y marginalmente mayor al control (LSD; $p=0,058$).

El consumo de alimento fue significativamente mayor en los individuos de *Z. capensis* mantenidos con dietas con compuestos secundarios (AT y EO) ($F_{(2, 13)}=13,2$; $p<0,001$). En tanto, no se observó variación significativa entre los tratamientos en la especie *D. diuca* ($F_{(2, 11)}=1,24$; $p=0,33$). Además existió una interacción entre la especie y el tratamiento para esta variable, aun cuando ésta no alcanzó a ser significativa ($F_{(2, 23)}=3,28$; $p=0,055$). La egesta de alimento aumentó en todas las aves con las dietas AT y EO ($F_{(2, 24)}=12,2$; $p<0,001$), sin existir interacción de los factores especie*dieta ($F_{(2, 24)}=0,83$; $p=0,47$, véase Figura 1).

Por otro lado, no se observó una variación significativa en la D_A por efecto de la dieta en ambas especies ($F_{(2,25)}= 0,98$; $p=0,39$), como tampoco un efecto significativo de la interacción especie*dieta ($F_{(2, 25)}=0,49$; $p=0,62$). Sin embargo, se debe notar que *D. diuca* presentó una tendencia a disminuir la D_A conforme aumentó la cantidad de CS en la dieta, siendo la digestibilidad de la dieta con ácido tánico en promedio un 9% menor respecto al control (LSD; $p=0,15$, Figura 2). La asimilación aparente mostró una

interacción entre dieta y especie ($F_{(2, 24)}=3,59$; $p=0,043$) existiendo variación significativa solo en *Z. capensis*. En esta especie se encontró que AA_M fue mayor en los individuos consumiendo las dietas experimentales AT y EO ($F_{(2,13)}=5,65$; $p=,017$). En *D. diuca* no hubo efecto de la dieta sobre la asimilación del alimento ($F_{(2, 11)}=0,94$, $p=0,42$).

Por su parte, no se observó un efecto significativo de los CS sobre el consumo de agua en ambas especies ($F_{(2, 24)}=0,61$; $p=0, 55$). Sin embargo se observó un efecto significativo de la interacción especie*dieta ($F_{(2, 24)}=3,61$; $p=,043$). El resultado más notable resultó ser el consumo de agua en diucas del tratamiento EO que resultó ser el doble al observado en los individuos control (LSD, $p=0,018$; Figura 3).

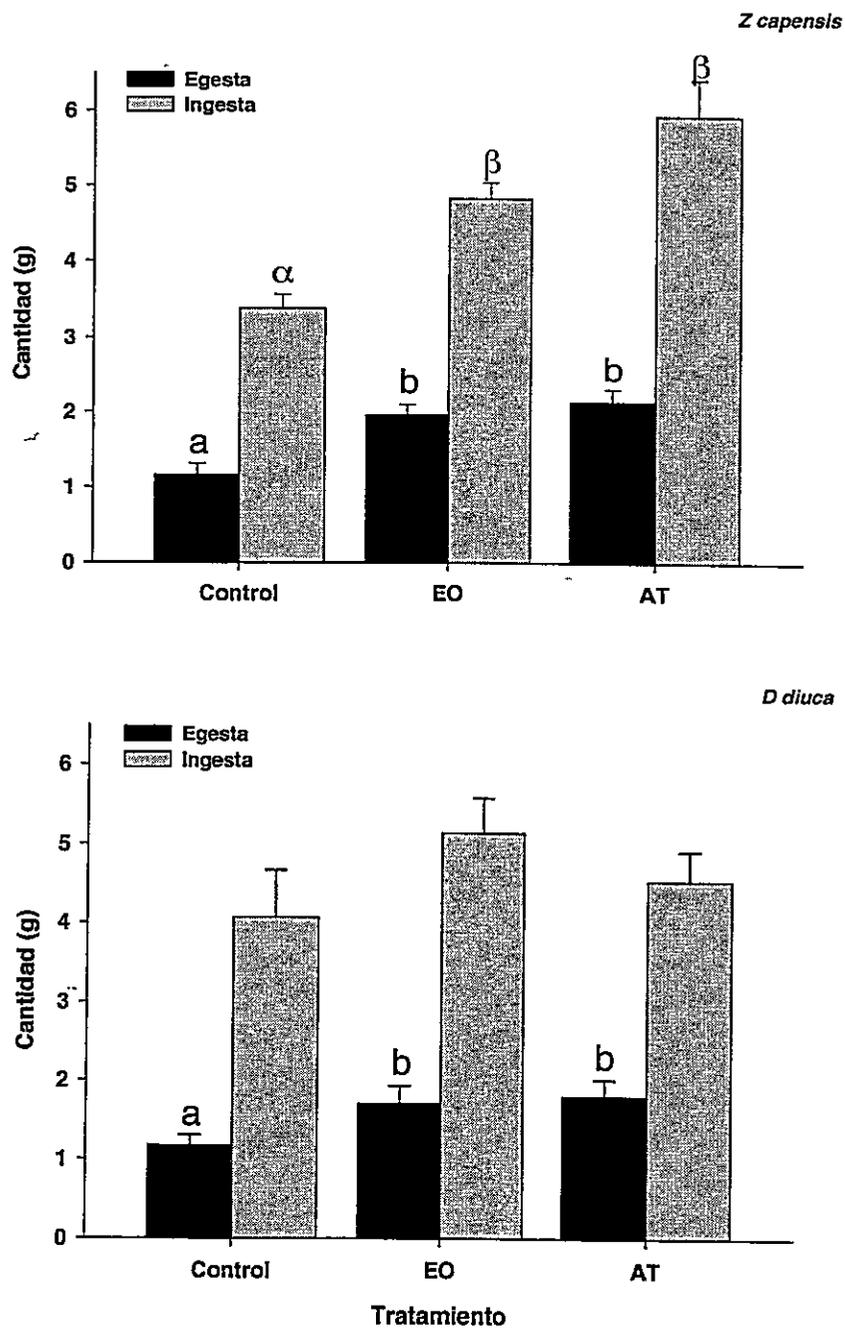


Figura 1: Cantidad de alimento ingerido (gris) y defecado (negro) diariamente en *Zonotrichia capensis* (arriba) y *Diuca diuca* (abajo) consumiendo dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada variable letras distintas denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. EO: Dieta con extractos de *Opuntia ficus-indica* al 0,5% de Fenoles Totales. AT: Dieta con ácido tánico al 2%.

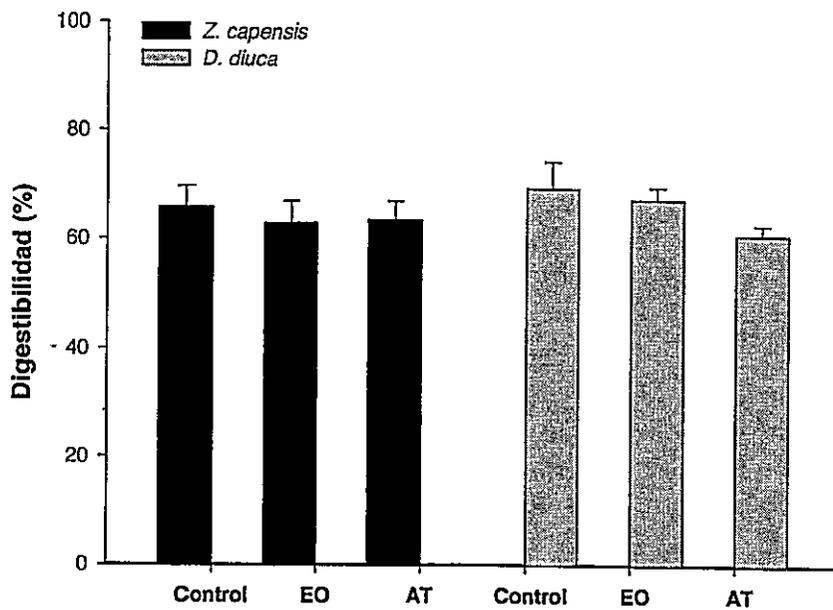


Figura 2: Digestibilidad de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) consumiendo dietas que difieren en la concentración de CS. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

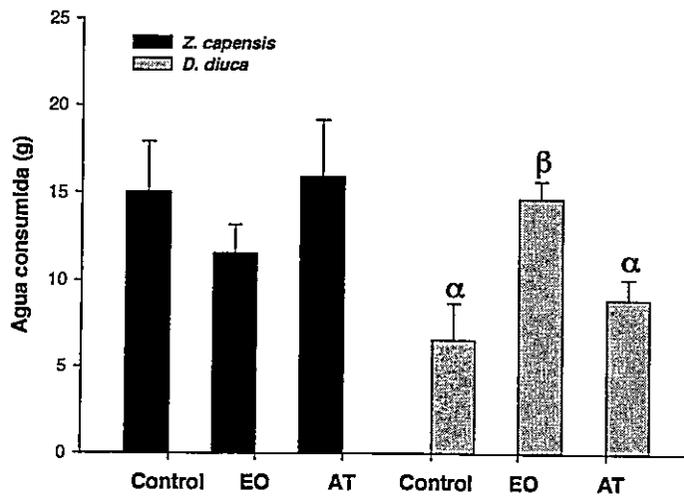


Figura 3: Consumo de agua en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Letras indican diferencias significativas dentro de cada especie. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

Tasa metabólica basal y pérdida de agua evaporativa.

Los resultados del ANCOVA revelaron que la TMB no fue afectada por la interacción entre especies y dieta ($F_{(2, 33)}=0,042$; $p=0,96$) y tampoco hubo un efecto significativo de las dietas sobre la tasa metabólica basal ($F_{(2, 33)}=1,90$; $p=0,17$). Analizando específicamente a cada especie mediante ANCOVA los resultados fueron similares ($F_{(2, 16)}=1,18$; $p=0,333$ para *Z. capensis*, y $F_{(2, 16)}=0,43$; $p=0,66$ para *D. Diuca*). Sin embargo, se observó cierta tendencia a una mayor actividad metabólica en las aves con dietas AT y EO (Véase Figura 4). Efectivamente, el análisis *a posteriori* reveló que la TMB fue significativamente mayor en los individuos de *Z. capensis* aclimatados a la dieta EO respecto a los individuos control (LSD, $p= 0,033$); no así en el caso de los individuos con dieta AT en donde su mayor valor respecto al control solo bordeó la significancia (LSD, $p= 0,094$).

Al realizar las asociaciones entre la TMB y las variables de ingesta de alimento (C_{AL} y AA_M) en chincoles, se observó una correlación positiva y significativa entre la TMB y el consumo de alimento ($R= 0,5977$; $p=0,014$) y entre la TMB y AA_M ($r= 0,5677$; $p=0,022$). Por su parte, estas asociaciones no fueron significativas para el caso de *D. diuca* ($r= 0,44$; $p=0,13$ y $r=0,30$; $p=0,32$ respectivamente; Figura 5). No obstante, se observó una correlación positiva entre la TMB y la masa fecal de ambas especies ($r= 0,39$; $p=0,03$).

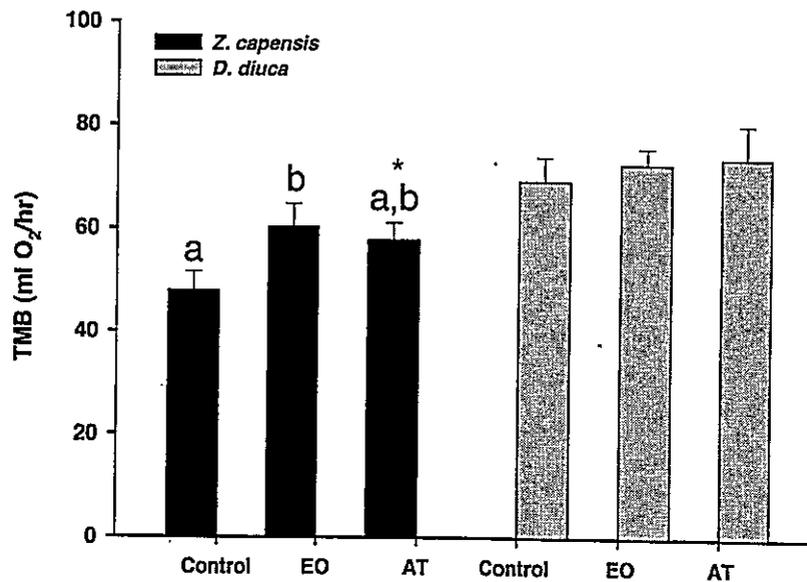


Figura 4: Tasa metabólica basal de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Letras distintas dentro de cada especie indican diferencias significativas según análisis de ANCOVA. Asterisco denota diferencia con $p < 0,1$ respecto al control. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

La pérdida total de agua evaporativa (PTAE), resultó ser significativamente mayor en *D. diuca* que en *Z. capensis* ($F_{(1, 31)} = 5,64$; $p = 0,024$), pero no entre tratamientos ($F_{(2, 31)} = 2,95$; $p = 0,067$). Tampoco se observó un efecto significativo de la interacción entre la dieta y especies ($F_{(2, 31)} = 1,79$; $p = 0,18$). Sin embargo, los test *a posteriori* mostraron que en *D. diuca* es el tratamiento control el que presenta un mayor valor, por sobre los individuos alimentados con dietas enriquecidas con CS. (Véase Figura 6).

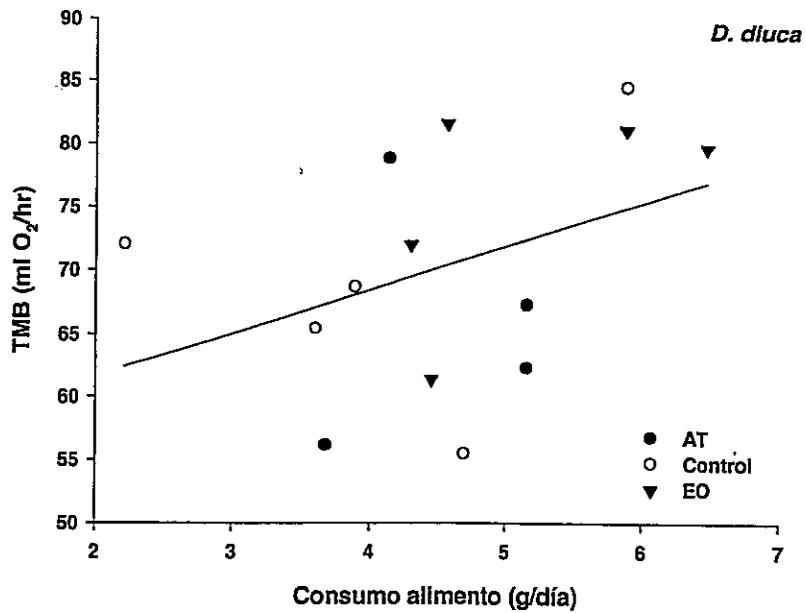
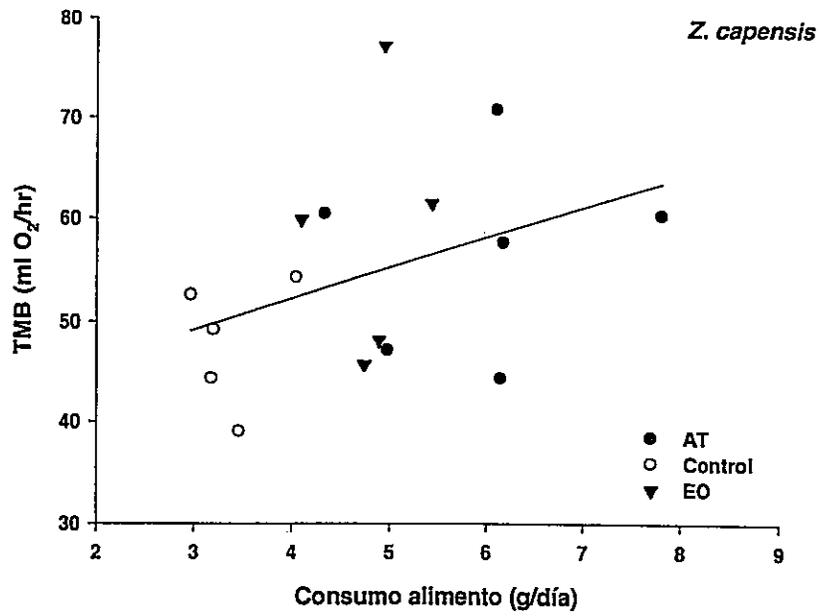


Figura 5: Correlación entre la tasa metabólica basal y el consumo diario de alimento bajo dietas que difieren en la concentración de CS. para *Z. capensis* (arriba) y *D. diuca* (abajo). Siglas como en Figura 1.

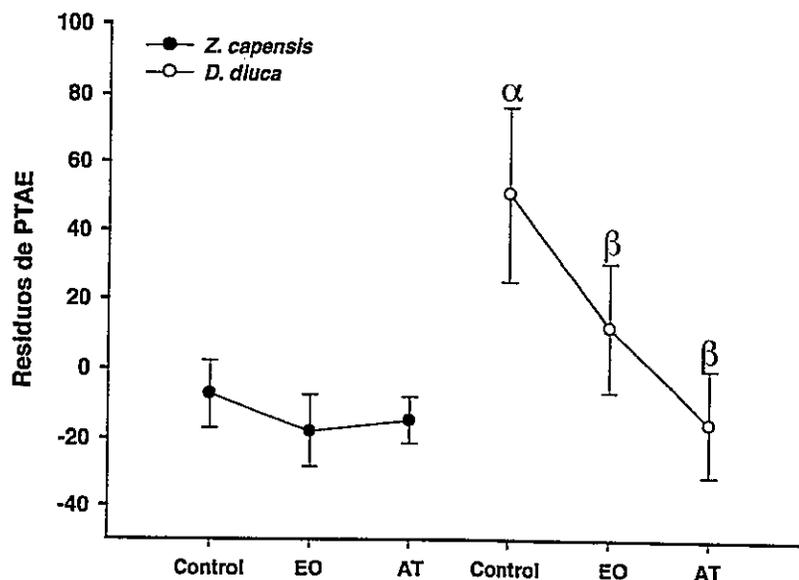


Figura 6: Residuos respecto a la TMB de la Perdida Total de Agua Evaporativa de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) bajo dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio ± error estándar. Siglas como en Figura 1.

Excreción de ácido glucurónico

La cantidad de ácido glucurónico eliminado diariamente resultó ser significativamente mayor en los individuos con dietas ricas en CS (AT y EO), en ambas especies ($F_{(2, 24)}=14,4$; $p<0,001$). No se observó un efecto significativo de la interacción especie*dieta ($F_{(2, 24)}=0,77$; $p=0,47$). Tampoco se encontró diferencias significativas entre las dietas AT y EO (véase Figura 7).

Al realizar un análisis de regresión lineal entre TMB masa-específica y la producción diaria de ácido glucurónico masa-específica en ambas especies, se observó una correlación débil pero significativa ($r=0,3671$; $p=0,042$). Sin embargo, estas asociaciones se pierden cuando los datos son analizados para cada especie por separado (*Z. capensis*: $r=0,28$; $p=0,30$ y *D. diuca*: $r=0,28$; $p=0,31$; Figura 8).

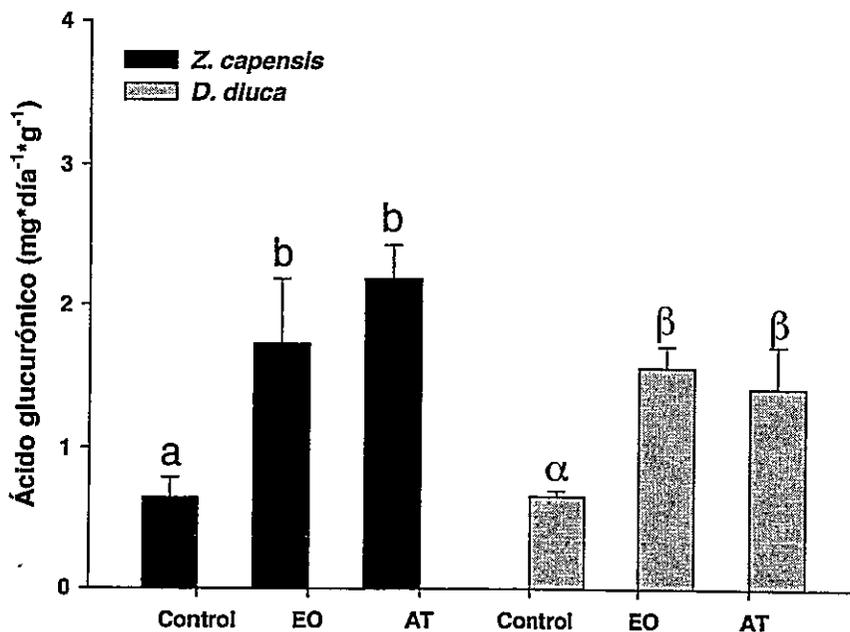


Figura 7: Masa de ácido glucurónico excretada diariamente, estandarizada por masa, de *Z. capensis* (negro) y *D. Diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas en los análisis de ANCOVA para los tratamientos en cada especie. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

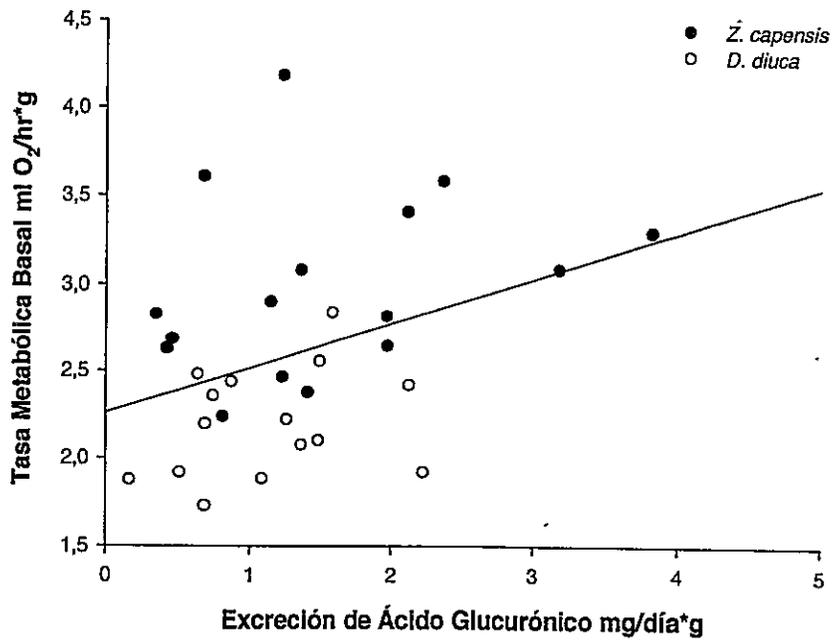


Figura 8: Correlación estandariza por masa entre la tasa metabólica basal y la excreción diaria de ácido glucurónico en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (blanco). Las regresiones especie-específicas no son significativas (véase texto para mas detalle).

Morfología y función digestiva

Luego de corregir por el tamaño corporal, el tamaño del hígado fue similar entre especies (ANCOVA $F_{(1, 30)} = 0,06$; $p=0,80$) y no se evidenció un efecto significativo de la dieta sobre este órgano (ANCOVA $F_{(2, 30)} = 0,05$; $p=0,95$). Sin embargo, se observó una interacción significativa entre ambos factores (ANCOVA $F_{(2, 30)} = 2,55$; $p=0,09$). El análisis *a posteriori* reveló que el grupo de *Zonotrichia capensis* expuesto a una dieta con ácido tánico presentó hígados más pequeños, siendo estos significativamente menores que los aclimatados a una dieta con extractos de *Opuntia ficus-indica* (LSD, $p=0,042$, Figura 9).

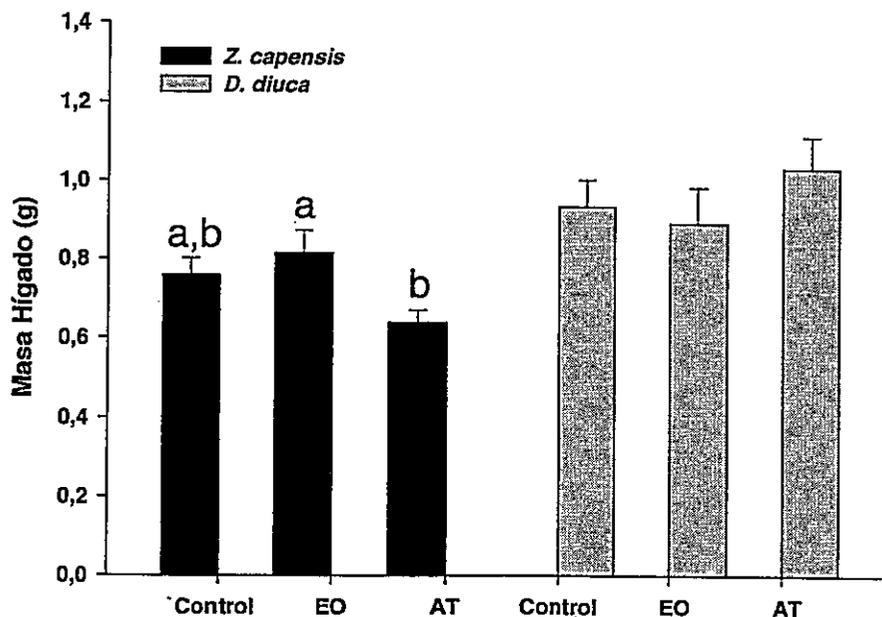


Figura 9: Tamaño del hígado de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS.. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

Para el largo y la masa del intestino delgados se encontraron resultados contrastantes, evidenciándose una interacción fuerte entre especies y dieta para la masa (ANCOVA $F_{(2, 30)}=5,07$; $p=0,01$) y para el largo (ANCOVA $F_{(2, 30)}=2,97$; $p=0,06$). En *Diuca diuca* los animales aclimatados a las dietas AT y EO, presentaron menores masas (LSD, $p=0,025$) (LSD, $p=0,18$) y largos (LSD, $p<0,01$) (LSD, $p=0,028$) del intestino delgado, respectivamente, que la dieta control. Por el contrario los individuos de *Z. capensis* con una dieta con ácido tánico presentaron una mayor masa (LSD; $p=0,01$) y largo (LSD; $p=0,16$) del intestino delgado que el grupo control (véase Figuras 11 y 12). Además, la digestibilidad aparente en diucas se relacionó positivamente con la masa total del intestino ($r=0,54$; $p=0,045$) y largo del intestino delgado ($r=0,56$; $p=0,037$, Figura 10). En tanto, en chincoles no se observó ningún tipo de correlación entre estas variables (LSD $r=0,15$; $p=0,6$; M_{ID} $r=0,44$; $p=0,11$).

Por su parte, no se encontraron diferencias de los tratamientos dietarios en el largo de la cloaca (ANCOVA Factorial: $F_{(2, 30)}=0,21$; $p=0,80$) pero si una fuerte interacción entre la dieta y la especie (ANCOVA Factorial: $F_{(2, 30)}=6,19$; $p<0,01$) en donde la principal diferencia fue entre los grupos de *Z. capensis* con dieta EO con mayores largos respecto al control (LSD, $p=0,028$) y largos menores en *D. diuca* EO respecto al control (LSD, $p=0,017$). En cada especie los individuos aclimatados a la dieta AT, mantuvieron una tendencia a tener una cloaca más larga en *Z. capensis* y más corta en *D. diuca*, pero sin llegar a mostrar diferencias significativas (Figura 13). En tanto, la masa no fue afectada por los tratamientos experimentales (ANCOVA Factorial $F_{(2, 30)}=0,46$; $p=0,63$) y tampoco mostró efecto de la interacción entre la dieta y la especie (ANCOVA Factorial: $F_{(2, 30)}=1,96$; $p=0,16$). No obstante, se observa que en *D. diuca* la masa de la cloaca

tiende a ser menor en individuos aclimatados al consumo de dietas AT que en el tratamiento control (LSD, $p=0,17$) y EO (LSD, $p=0,08$; Figura 14).

La actividad de enzimas digestivas no presentó diferencias entre los tratamientos experimentales. Efectivamente, la actividad enzimática total de maltasa, expresada como UI (u moles hidrolizados por minuto) fue similar entre los tratamientos dietarios ($F_{(2, 29)}=0,43$; $p=0,66$) y tampoco se observó una interacción significativa entre los factores especie*dieta ($F_{(2, 29)}=0,54$; $p=0,59$). El mismo escenario se repitió para la aminopeptidasa, en donde no hubo variación entre las distintas dietas experimentales ($F_{(2, 29)}=0,41$; $p=0,66$), ni tampoco efecto de interacción entre la dieta y las especies ($F_{(2, 29)}=0,97$; $p=0,38$; Figuras 15 y 16).

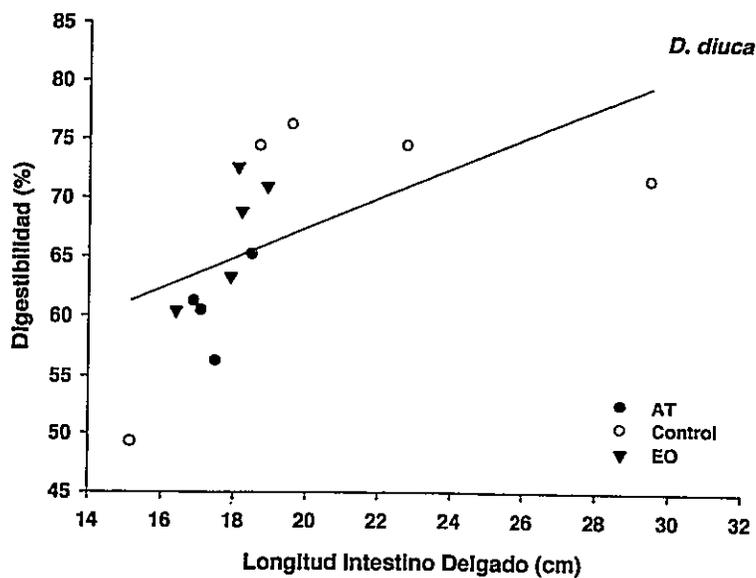
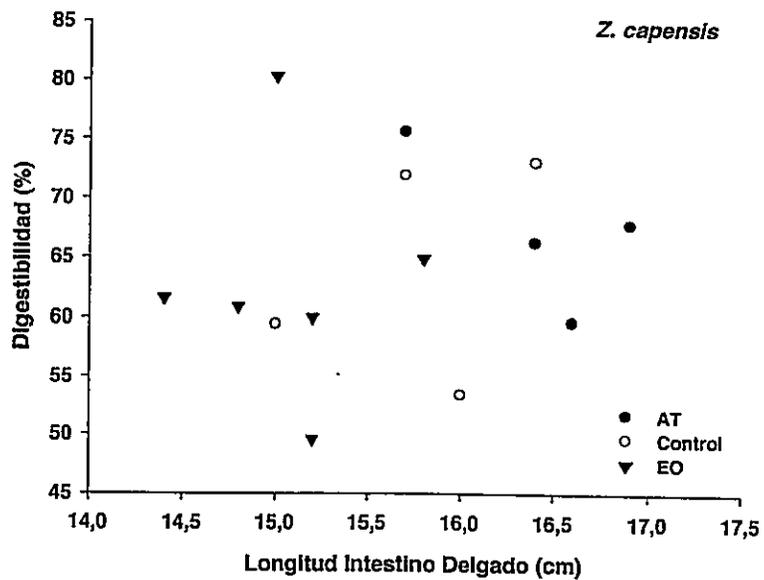


Figura 10: Correlación entre la digestibilidad del alimento consumido y la longitud de intestino delgado en *Z. capensis* (arriba) y *Diuca diuca* (abajo) frente a la variabilidad de compuestos secundarios en las tres distintas dietas. Siglas como en Figura 1.

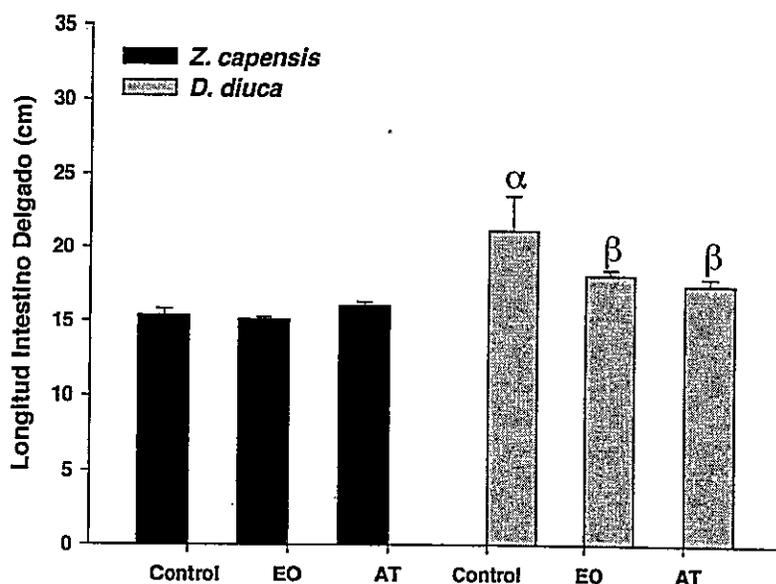


Figura 11: Longitud del intestino delgado de los individuos de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

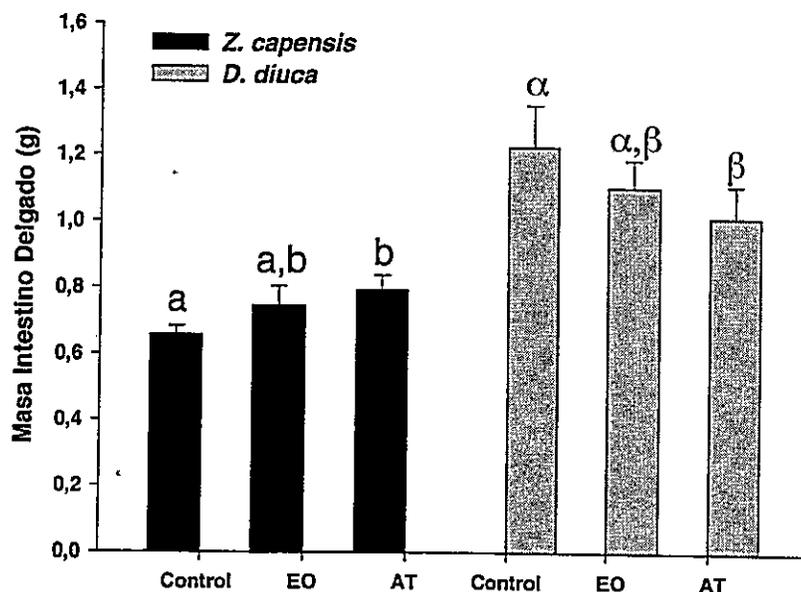


Figura 12: Masa del intestino delgado de los individuos de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

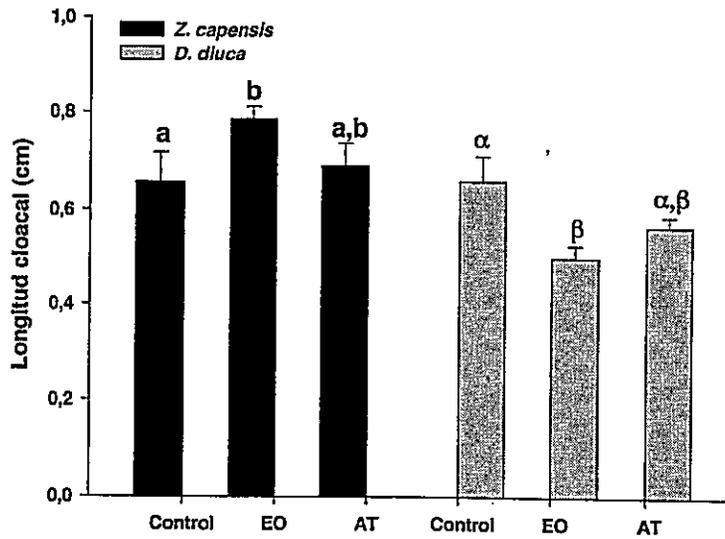


Figura 13: Longitud de la cloaca de los individuos de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos para cada especie. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

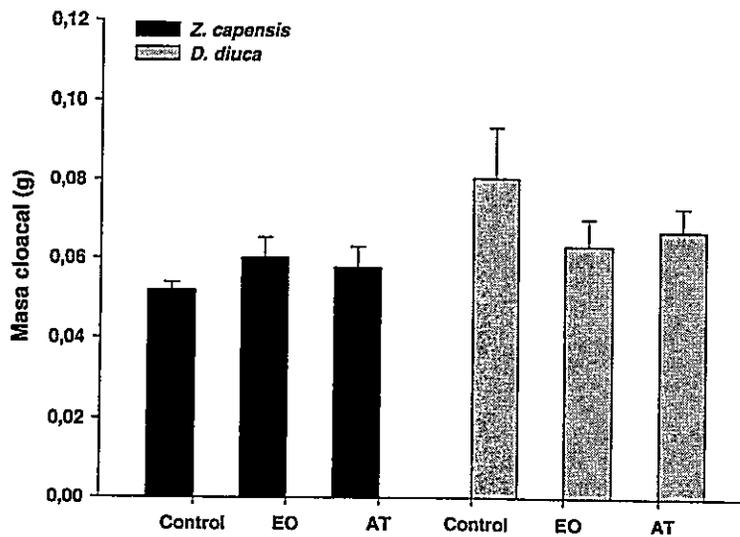


Figura 14: Masa de la cloaca de los individuos de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

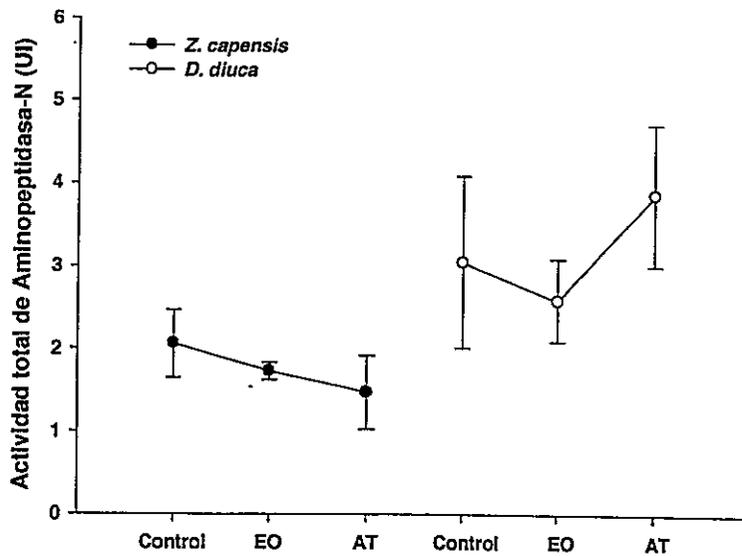


Figura 15: Actividad enzimática total de la Aminopeptidasa-N en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (blanco) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

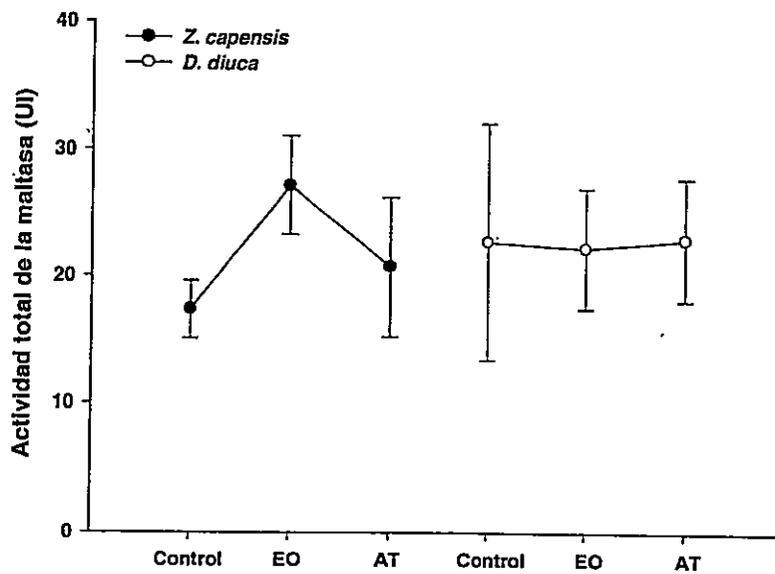


Figura 16: inactividad enzimática total de la maltasa en individuos de *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (blanco) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

Morfología renal

No se encontraron diferencias significativas en la masa renal relativa entre tratamientos dietarios (ANCOVA $F_{(2, 24)}=2,51$; $p=0,10$) como tampoco un efecto significativo de la interacción dieta*especie (ANCOVA $F_{(2, 24)}=1,45$; $p=0,25$). Sin embargo, en *Z. capensis* es evidente el contraste entre las dietas experimentales AT y EO, en donde los individuos aclimatados a la dieta ET responden con un aumento en la masa renal respecto a los individuos aclimatados a la dieta AT (LSD, $p=0,012$; Figura 17).

Los distintos tratamientos dietarios indujeron diferencias significativas en la masa de la médula (ANCOVA $F_{(2, 24)}=7,85$; $p<0,01$) y de la corteza renal (ANCOVA $F_{(2, 24)}=5,18$; $p=0,013$) pero no hubo un efecto de la interacción especie*dieta (Masa médula: ANCOVA $F_{(2, 24)}=1,42$; $p=0,26$; Masa corteza: ANCOVA $F_{(2, 24)}=1,67$; $p=0,21$). Las diferencias se presentaron mayormente en chincoles aclimatados a la dieta EO, los que presentaron hipertrofia de la médula renal en comparación al grupo control (LSD; $p=0,024$) y mayor aun en comparación al grupo aclimatado a ácido tánico (LSD; $p<0,001$; Figura 18). Además, los individuos aclimatados a la dieta EO presentaron una mayor masa de la corteza renal que el grupo aclimatado a ácido tánico (LSD, $p<0,01$). Por su parte los chincoles aclimatados a la dieta con ácido tánico presentaron menor cantidad de tejido de la corteza renal que el grupo control (LSD; $p<0,05$, Véase Figura 19), mientras que los chincoles aclimatados a la dieta EO presentaron un mayor porcentaje de médula que el grupo aclimatado a AT (LSD; $p<0,01$, Figura 20). En tanto, en *D. diuca* no se registraron diferencias significativas entre tratamientos dietarios en los mencionados análisis de la morfología renal. Por otra parte, el porcentaje de médula

renal, resultó ser significativamente mayor en la especie granívora *Diuca diuca* que en el omnívoro *Zonotrichia capensis* ($F_{(1, 25)}=8,36$; $p<0,01$).

El número relativo de conos medulares presentó diferencias entre ambas especies, aun cuando ésta no fue significativa (ANCOVA $F_{(1, 24)}=4,01$; $p=0,056$; Figura 21). Además se observó una interacción significativa entre la especie y la dieta (ANCOVA $F_{(2, 24)}=5,97$, $p<0,01$). El análisis *a posteriori* reveló que los individuos de *Z. capensis* aclimatados a la dieta EO presentaron mayor número de conos medulares que el grupo control (LSD; $p<0,01$) y que el grupo AT (LSD; $p<0,01$, Figura 21). El largo de los conos medulares no presentó diferencias entre las especies ($F_{(1, 23)}=2,65$; $p=0,12$), pero se observó una interacción entre especie y dieta (ANCOVA $F_{(2, 23)}=3,83$; $p=0,036$): En tanto, el efecto de la dieta se manifestó solamente en *Diuca diuca*, siendo el grupo control el que presentó conos mas largos respecto al grupo aclimatado a los extractos de *Opuntia ficus-indica* (LSD; $p=0,032$) y al grupo aclimatado a ácido tánico (LSD; $p=0,037$, Figura 22).

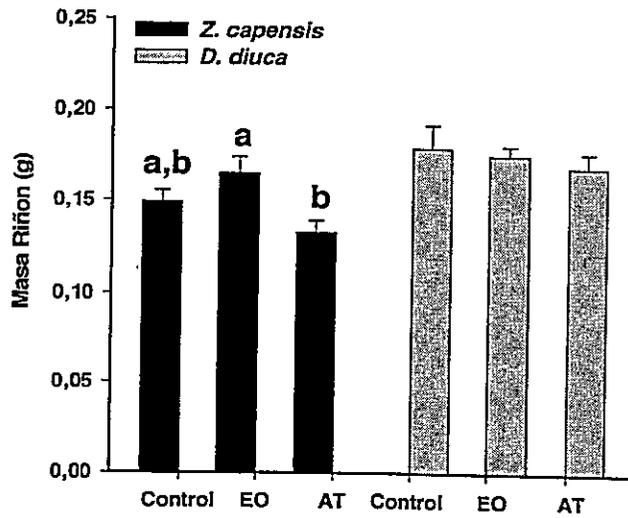


Figura 17: Masa del riñón en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

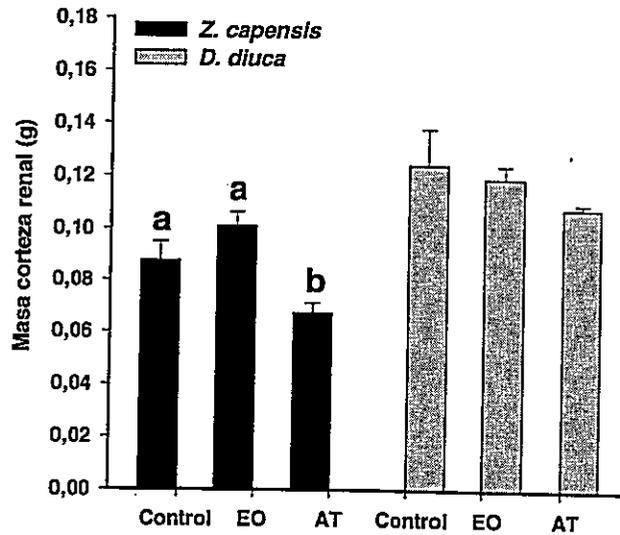


Figura 18: Masa de la corteza renal en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

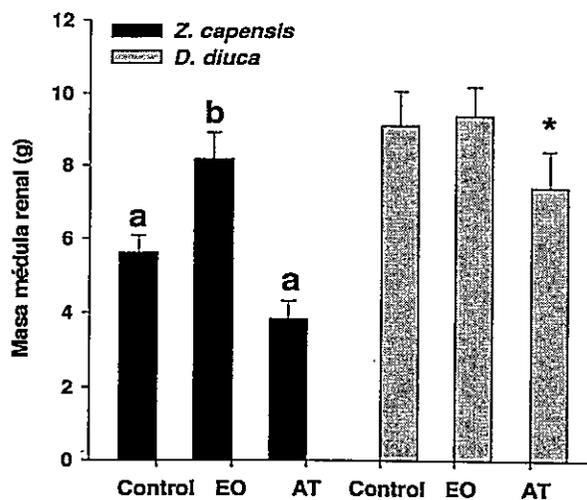


Figura 19: Masa de la médula renal en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Letras diferentes denotan diferencias significativas. Asterisco indica $p < 0,09$ respecto al control. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

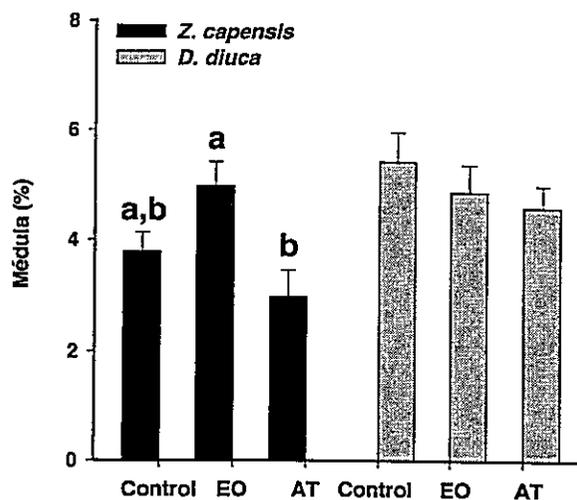


Figura 20: Masa de la médula renal en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

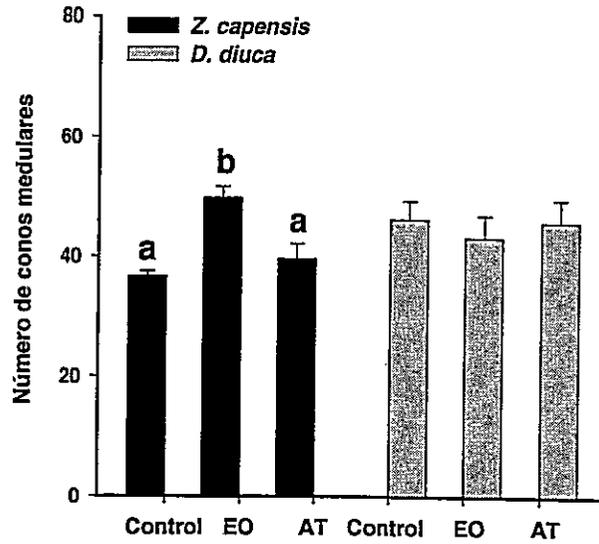


Figura 21: Conos medulares en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) aclimatados a dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

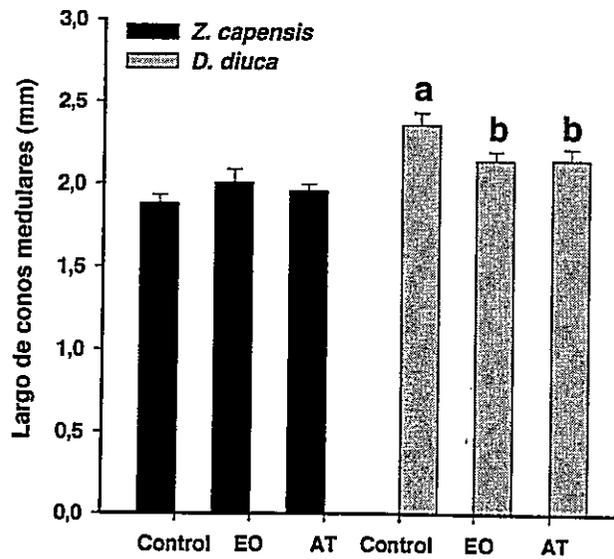


Figura 22: Longitud de los conos medulares en *Z. capensis* (negro) y *D. diuca* (gris) bajo dietas que difieren en la concentración de CS. Para cada especie, letras diferentes denotan diferencias significativas. Resultados expresados como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

Análisis de componentes principales

Zonotrichia capensis

El análisis de componentes principales (ACP) utilizando las características energéticas, de consumo, digestivas y morfométricas de los individuos de *Z. capensis* sometidos a los distintos tratamientos dietarios, identificó dos componentes que dieron cuenta del 41% de la varianza total (Tabla 2). El primer componente (ZCP1), el cual representó el 21,9% de la varianza, estuvo positivamente asociado con la masa del riñón, médula y corteza renal, con el número de conos medulares y el porcentaje de médula renal. El segundo componente (ZCP2) dio cuenta de un 19,4% de la varianza y presentó altas cargas positivas para la TMB, consumo total de alimento, asimilación, y la masa de intestino delgado. En el ANOVA realizada sobre las puntuaciones obtenidas del ZCP1 (asociado a la morfología renal), se observó un contraste notable entre los individuos aclimatados a una dieta EO y aquellos aclimatados al consumo de ácido tánico al 2%, en donde los primeros presentaron valores superiores ($F_{(2, 21)}=45,6$, $p<0,0001$). El grupo control presentó valores intermedios. Por otra parte el ZCP2, asociado a la energética y consumo, mostró ser mucho mayor para ambos grupos con dietas con CS por sobre el grupo control ($F_{(2, 21)}=15,67$; $p<0,0001$; Véase Figura 23)

Diuca diuca

El análisis de componentes principales en *Diuca diuca* agrupó las mismas variables analizadas anteriormente en 3 componentes principales que dan cuenta del 51,4% de la varianza total (Tabla 3). El componente principal 1 (DCP1) se relaciona positivamente al largo y masa de la cloaca y negativamente al consumo de agua y alimento y la egesta. El segundo componente (DCP2) se asoció positivamente con el largo del intestino

delgado, la asimilación de energía y la D_A . Por último el tercer componente (DCP3) se debió a una asociación negativa con la masa medular, sin embargo, la masa de la corteza y el porcentaje de médula también son rasgos que aportaron a la varianza explicada por este componente. Las puntuaciones para el DCP1 resultaron ser menores en las dietas con CS, respecto a la dieta control ($F_{(2, 17)}=9,75$; $p<0,01$), es decir menores tamaños de cloacas y un mayor consumo de agua y alimento; y una mayor egesta asociado al consumo de CS. En tanto las puntuaciones del DCP2 no mostraron diferencias significativas entre dietas ($F_{(2, 17)}=2,08$; $p=0,16$), aunque se observa que individuos de *D. diuca* con dieta AT poseen valores menores (i.e. digestibilidad, asimilación y largo de intestino) que bordean la significancia respecto al control (LSD, $p=0,059$). El tercer componente principal en *D. diuca*, asociado a la morfología renal, mostró diferencias entre tratamientos dietarios ($F_{(2, 17)}=5,79$; $p<0,05$) particularmente entre las dos dietas con CS, en donde la dieta control presentó valores intermedios (véase Figuras 24 y 25).

Tabla 2: Análisis de componentes principales basado en características morfofisiológicas de *Zonotrichia capensis* aclimatados a dietas con distintas cargas de CS. Valores de las variables más fuertes > 0,75 para cada componente son mostradas en negrita.

Características de <i>Z. capensis</i>	ZCP1	ZCP2
Masa corporal	-0,0525	0,4216
PTAE	0,0952	0,5930
TMB	0,0866	0,7360
Alimento consumido	-0,0052	0,8212
Fecas producidas	0,0350	0,6628
Digestibilidad	-0,1077	0,2547
Agua Consumida	-0,3605	-0,2543
Asimilación	-0,0175	0,7722
Corazón	0,4521	0,2029
Molleja	-0,0351	0,3808
Hígado	0,6500	-0,2850
ID masa	-0,0731	0,7036
IG masa	-0,0604	0,3425
Largo ID	-0,4989	0,2634
Largo IG	0,3705	0,5550
Larg cloaca	0,2074	0,1396
Masa Riñón Izq	0,7951	-0,2343
Masa médula	0,9378	-0,0914
Masa corteza	0,8391	-0,2832
Nº Conos	0,7097	0,3614
Largo Conos	0,3782	0,1283
% Médula	0,7828	-0,0239
Glucurónico mg/día	0,0064	0,4921
Autovalores	5,93	5,25
Varianza (%)	21,97	19,47

Tabla 3: Análisis de componentes principales basado en características morfofisiológicas de *Diuca diuca* aclimatados a dietas con distintas cargas de CS. Valores de las variables más fuertes > 0,75 para cada componente son mostradas en negrita.

Características de <i>D. diuca</i>	DCPI	DCP2	DCP3
Masa corporal	0,4673	0,3585	0,2843
PTAE	0,1461	0,0549	0,0583
TMB	-0,2134	0,0629	0,4702
Alimento consumido	-0,7642	0,5118	-0,1093
Fecas producidas	-0,7818	-0,1244	0,1272
Digestibilidad	0,1830	0,8001	-0,3500
Agua Consumida	-0,7784	0,1926	-0,3148
Asimilación	-0,5512	0,7508	-0,2196
Hígado	0,0753	0,0935	0,3857
ID masa	0,1324	0,6234	-0,3263
IG masa	0,3618	0,3385	-0,0823
Cloaca masa	0,7115	0,1577	-0,0992
Largo ID	0,0807	0,8364	0,2048
Largo IG	0,0676	0,3904	0,2244
Larg cloaca	0,7203	-0,1282	0,2008
Masa Riñón Izq	0,4951	-0,1344	-0,5014
Masa médula	0,1654	-0,1816	-0,8071
Masa corteza	0,5660	0,0244	-0,6302
Nº Conos	-0,0353	0,0460	0,3260
Largo Conos	0,4107	0,5060	0,1313
% Médula	-0,0333	-0,1140	-0,6809
Glucurónico mg/día	-0,6602	-0,1456	-0,4306
Autovalores	4,8135	3,4032	3,0800
Varianza (%)	21,88	15,47	14,00

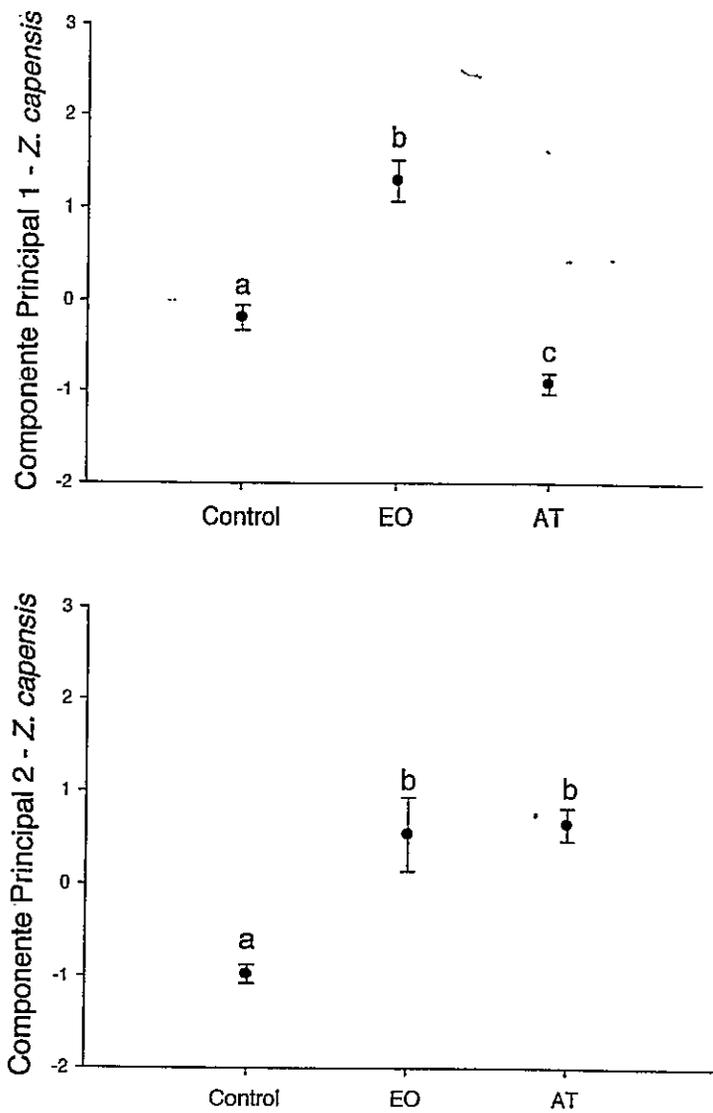


Figura 23: Puntuaciones por tratamiento dietario para cada uno de los Componentes Principales de las variables morfofisiológicas de *Z. capensis*. Letras denotan diferencias significativas. Puntuaciones mostradas como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

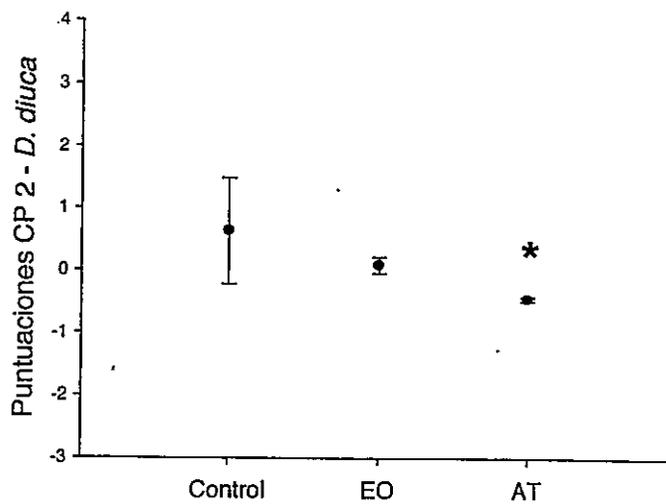
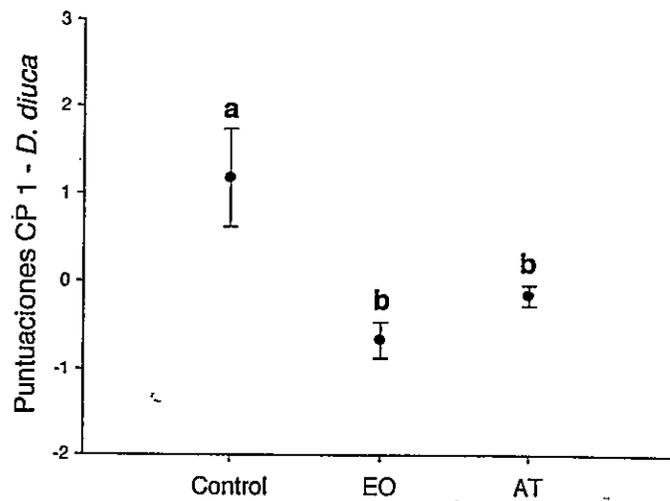


Figura 24: Puntuaciones por tratamiento dietario para los Componentes Principales 1 y 2 de las variables morfofisiológicas de *D. diuca*. Letras denotan diferencias significativas. Asterisco denota $p < 0,06$. Puntuaciones mostradas como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

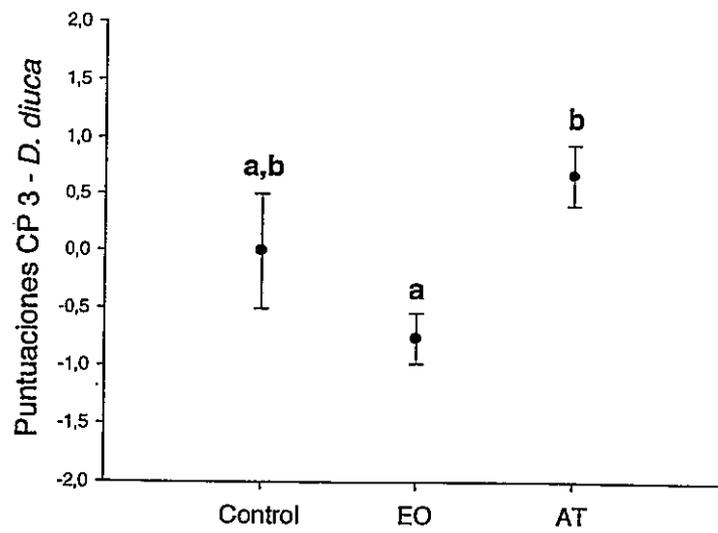


Figura 25: Puntuaciones por tratamiento dietario para el Componente Principal 3 de las variables morfofisiológicas de *D. diuca*. Letras denotan diferencias significativas. Puntuaciones mostradas como promedio \pm error estándar. Siglas como en Figura 1.

Discusión

Los resultados del ACP revelaron similitudes entre ambas especies en cuanto a que los componentes se separan entre dos categorías: a) los parámetros digestivos y energéticos, y b) la morfología renal. Debido a esto, resulta conveniente analizar los resultados en base a este patrón.

En primer lugar se pueden establecer equivalencias entre el ZCP2 y DCP1 y DCP2 como componentes que explican las variaciones en torno a la capacidad digestiva y energética en cada especie. A su vez estos componentes que llamaremos "capacidad de procesamiento de energía" contrastan significativamente entre los tratamientos con CS y la dieta control. Sin embargo, las variaciones ocurren de manera opuesta para cada especie. Por otro lado los componentes ZCP1 y DCP3, establecen las variaciones en torno a la morfología renal o el "componente de osmorregulación", en los cuales se puede destacar: la mayor variabilidad en *Z. capensis*, y en ambas especies un efecto contrastante entre las dietas con compuestos secundario, AT y EO.

Digestión, costos energéticos y tolerancia

Los parámetros de la capacidad de procesamiento de energía muestran que existe una respuesta totalmente diferenciada entre *Diuca diuca* y *Zonotrichia capensis* ante el consumo de CS. Según Foley & McArthur (1994) los animales pueden utilizar dos tipos de estrategias para enfrentar el consumo de CS, la estrategia pre-absortiva y la post-absortiva, las cuales corresponderían a *D. diuca* y *Z. capensis*, respectivamente. Los efectos pre-absortivos se definen como aquellos en los cuales los CS diluyen la calidad

de la dieta o impiden su correcta absorción. En este caso, individuos de *D. diuca* expuestos a dietas con CS poseen menores largos y masas totales de su intestino, lo que podría resultar en una menor superficie expuesta a los xenobióticos impidiendo su absorción. Este fenómeno se puede explicar por la mayor permeabilidad paracelular que existe en aves (Caviedes-Vidal et al, 2007), la cual permite una absorción facilitada de compuestos solubles en agua, tanto nutrientes como CS (Karasov et al, 2012). Nuestros resultados sugieren la existencia de un compromiso constante entre la energía de los nutrientes pasivamente absorbidos y los costos metabólicos de eliminar los CS absorbidos colateralmente.

Paralelamente, este menor tamaño del intestino tendría un costo asociado, que se traduce en una cantidad de nutrientes no absorbidos o defecados, frente a una ingesta similar entre los tres tratamientos experimentales. Esto se evidencia al observar una tendencia a la disminución de la digestibilidad en diucas que consumen mayor cantidad de CS, y además en la presencia de una correlación positiva y significativa entre el largo del intestino y la digestibilidad aparente (Figura 10). Sin embargo, en la actividad enzimática total no encontramos diferencias entre tratamientos, por lo que la adquisición de energía no se vería limitada por la hidrólisis enzimática de un intestino de menor tamaño, lo que a su vez explicaría la constancia del tamaño corporal entre los tratamientos experimentales.

Una hipótesis alternativa a los costos que tendría el menor tamaño del intestino supone que efectivamente la adquisición de energía se vea limitada, no por la tasa de hidrólisis enzimática total que se mantiene estable, sino por un menor tiempo de retención del alimento en el tracto gastrointestinal producto de los menores largos del intestino en individuos de *D. diuca* sometidos a la ingesta de CS. De esta manera el



presupuesto energético podría disminuir y afectar a otras actividades del individuo. En este sentido, Sorensen et al (2005) llega a conclusiones similares al estudiar dos especies aclimatadas al consumo de CS, en la cual el presupuesto energético de la especie especialista en CS duplica al de la especie no adaptada a su consumo. Cabe destacar que si bien en *Diuca diuca* la TMB no varía entre tratamientos, ésta no debe ser tomada como una medida de gasto energético total, de modo que la disminución del presupuesto energético podría ser observado en el gasto energético en actividad (Ricklefs et al, 1996; Wiersma et al, 2005).

Por otro lado, los efectos post-absortivos se relacionan con costos en la excreción de las toxinas (i.e detoxificación), los que son más evidentes en *Z. capensis*. Así, frente a las diferentes dietas experimentales, esta especie mantiene su digestibilidad aparentemente constante, sin embargo, aumenta la ingesta de alimento diario, la asimilación neta de energía y su metabolismo basal cuando son alimentados con una mayor carga de compuestos secundarios. Hagerman et al (1992) señala que el ácido tánico puede ser degradado antes de formar complejos con proteínas en el intestino, siendo absorbido por el organismo. El que un aleloquímico sea absorbido permitiría mantener la digestibilidad del animal, permitiendo el consumo de plantas con estos compuestos secundarios, pero pagando un costo energético al tener que procesar dicha toxina. La tolerancia a la absorción de los CS estaría relacionada a un aumento en la síntesis de proteínas relacionadas con el proceso de detoxificación, provocando el aumento del metabolismo (Foley & McArthur, 1994; Silva et al, 2004). En *Z. capensis* observamos que ante el consumo de dietas con CS los individuos elevan su consumo de alimento y metabolismo basal, pero sin esclarecer la relación causal entre estas dos variables. En este sentido,

Illius & Jessop (1995) proponen un modelo en el cual un organismo enfrentado al consumo de ácido tánico, debería aumentar la ingesta debido a que de esta manera se obtendría una mayor cantidad de energía disponible para los mecanismos de detoxificación. La respuesta plástica de *Z. capensis* apoya esta hipótesis, sin embargo, *D. diuca* no responde de la misma manera. La respuesta propuesta por este modelo podría ser sostenida solamente bajo el límite de saturación de la vía metabólica del ácido glucurónico, el cual es mucho mayor en *Z. capensis*. (Ríos et al, 2012b). Según el modelo de Illius & Jessop (1995) el porcentaje de aumento del costo metabólico sería marginal, la disminución en el rendimiento energético debido a los CS no sería sustancial y la disuasión tendría un efecto mayor en animales bajo estrés nutricional. Por ejemplo, la reducción de la ingesta de determinados aminoácidos en ratas reduce la capacidad de conjugación de toxinas (Glazenburg et al, 1983). Con esta estrategia, *Z. capensis* obtendría la energía necesaria para el gasto asociado a la detoxificación a través del aumento en la ingesta de alimento y sería capaz de mantener su presupuesto energético de actividad sin una alteración evidente en su desempeño biológico.

Cabe destacar que la excreción de ácido glucurónico existente en las dos especies da cuenta de que no existiría una dicotomía absoluta entre las estrategias pre y post abortivas ya que ambas especies incorporan CS, aunque en diferentes cantidades. Es importante tener en cuenta que en nuestra experiencia, la mayor cantidad de ácido glucurónico excretado por *Z. capensis* se debe a una mayor tasa de consumo de alimento con compuestos fenólicos; lo que a su vez se explicaría debido a que los límites de saturación para la vía del ácido glucurónico son notablemente mayores en *Z. capensis* que en *D. diuca* (Ríos et al, 2012b), permitiéndole consumir más fenoles provenientes de

la dieta generalista que presenta esta especie y evidenciando su estrategia post-absortiva. Esta mayor tolerancia a fenoles mostrada por *Z. capensis* podría estar acompañada por otros mecanismos de detoxificación que pueden operar en las aves, tales como la conjugación con ornitina (Jakubas et al, 1993a; Guglielmo et al, 1996) y/o la acción de glicoproteínas-P en las membranas de los enterocitos intestinales (Green et al, 2005). Estas glicoproteínas-P expulsan a los CS hacia la luz del intestino evitando así la absorción de toxinas. Algunos estudios, han evaluado este mecanismo en otras aves omnívoras como *Gallus gallus* y *Turdus migratorius* (Green et al, 2005) lo que plantea la necesidad de realizar más estudios experimentales.

Según Bartholomew & Cade (1963), MacMillen (1990) y lo que hemos establecido en estudios previos (Barceló et al, 2012), las especies granívoras estrictas, como *D. diuca*, tendrían una mayor tolerancia a la deshidratación y un mayor desarrollo de la estructura y función renal. Esta capacidad permitiría a esta especie no depender de alimentos altos en contenido de agua preformada en la época estival, tales como frutos de *O. ficus-indica*, lo que sí ocurre en *Z. capensis* (López-Calleja, 1995). Esta presión osmorregulatoria sobre *Z. capensis* explicaría su mayor plasticidad dietaria en la cual asumiría los costos por el mayor consumo de frutos de tuna, habiendo generado una maquinaria fisiológica para hacer frente al consumo de CS, común en esta especie. En esta vía, Ríos et al. (2012a y b) describen que especies generalistas como *Z. capensis* serían más tolerantes a los CS que especies especialistas graminívoras (i.e. sólo se alimenta de semillas de gramíneas las cuales contienen menor concentración de CS), al poder expresar mayor cantidad de ácido glucurónico ante un evento agudo de intoxicación. Sin embargo, este escenario podría revertirse si se compara a *Z. capensis*

contra un especialista granívoro que consumiera mayormente semillas con alto contenido en CS.

Morfología renal y balance hídrico

En *Z. capensis* los efectos de las dietas con CS sobre la morfología del riñón son más pronunciados que en *D. Diuca*, probablemente por la estrategia post-absortiva presente en *Z. capensis*. El mayor consumo de CS debe ser filtrado y excretado a través del riñón (Foley et al, 1995) lo que produciría un mayor impacto sobre el órgano. En este sentido en esta especie se observan variaciones considerables en todas las variables del componente e excreción (ZCP1, i.e.: tamaño de riñón, masa de la médula y corteza renal, porcentaje de la médula y el número de conos medulares). Sin embargo, el efecto sobre el componente de excreción difiere entre ambas dietas con CS. Esto podría explicarse por la distinta naturaleza de los CS administrados en cada una de las dietas, en donde la dieta EO comprende una mayor variedad de compuestos fenólicos, además de algunos alcaloides y terpenos (Lee et al, 2003; Saleem et al, 2006). Si bien la concentración de fenoles totales es menor en la dieta EO que en la dieta AT, un tipo diferente de CS podría producir un efecto mayor sobre la morfología renal. Esta diferencia en la respuesta morfológica del riñón antes dos distintas dietas con CS esta presente también en *D. Diuca*, aunque en menor medida debido al menor consumo y absorción de los CS y en donde el resultado solamente se hace evidente en el ACP (Figura 25). Por otra parte, en *D. diuca* se observan efectos en distintos atributos relacionados a la homeostasis hídrica, tales como el largo de los conos medulares, el consumo de agua, la pérdida de agua evaporativa y el largo y masa de la cloaca.

La atrofia del intestino en su totalidad para evitar una mayor absorción de CS en *D. diuca* (Figura 10) podría tener también consecuencias sobre el balance hídrico. Junto con una atrofia intestinal también disminuye el largo y la masa de la cloaca (Figuras 15 y 16), lo que podría afectar la capacidad de absorción de agua, que en aves depende también de esta sección del sistema digestivo (Schmit-Nielsen, 1997; Braun, 2003). A su vez, esto afecta la capacidad de mantener la homeostasis hídrica y por lo tanto sobre la estructural renal. La disminución de la PTAE y/o el aumento en la ingesta de agua en diucas bajo dietas con CS, sería una forma de compensación a la disminución de la capacidad de absorción de agua en la cloaca, siendo una respuesta indirecta a la cantidad de CS en su dieta.

De acuerdo a esta evidencia, resulta contraintuitivo el que se observe un menor largo de los conos medulares en los individuos aclimatados a dietas con CS, lo que se relacionaría directamente con menores largos de la asa de Henle y una menor capacidad de concentrar la orina (Peña-Villalobos et al, 2013). Esto podría explicarse porque las otras estrategias para la mantención adecuada del balance hídrico, las cuales son un mayor consumo de agua en el tratamiento EO y una menor PTAE en las dos dietas con CS (EO y AT), actuarían antes y de manera sobrecompensatoria, de modo que el menor largo de conos podría estar relacionado a un balance hídrico positivo para esas aves.

Si bien una estrategia conductual (i.e. aumento del consumo de agua), puede ser concebida que ocurra antes que modificaciones morfológicas, no es claro cómo la flexibilidad en la PTAE podría ser generada y los mecanismos que llevan a una menor pérdida de agua evaporativa no son del todo claros en nuestro estudio. La PTAE se divide en la pérdida de agua respiratoria (PAR) y pérdida de agua cutánea (PAC), siendo esta última la de mayor importancia, representando en promedio un 65,1% de la PTAE

(Ro & Williams, 2010). La modulación de la PAR se ha asociado principalmente a la variación de la frecuencia respiratoria a consecuencia de cambios en la actividad metabólica (Coopers & Withers, 2009) o por conductas termorregulatorias (McKechnie & Wolf, 2004). En tanto se ha demostrado que la PAC puede ser afectada por cambios en el flujo sanguíneo de la piel (Ophir et al, 2004) y se ha reportado que algunas aves sometidas a estrés hídrico pueden incrementar la capa lipídica del estrato corneo, reduciendo así la pérdida de agua a través de la piel (Williams et al, 2012). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios respecto a la flexibilidad de la PTAE se refieren a condiciones de aridez-humedad asociada a la temperatura, y no a la restricción hídrica *per se*. Excepciones a esto son los estudios experimentales con aclimataciones a humedades contrastantes y temperatura constante publicados por Moen et al (2005) en donde evidencian respuestas plásticas a corto plazo (i.e. 10 días) de la PTAE en serpientes vipéridas; y de manera similar, Muñoz-García et al (2008) observan variaciones de la pérdida de agua cutánea en *Passer domesticus* tras 3 semanas de aclimatación. Así, la existencia de respuestas diferenciadas para la mantención del balance hídrico entre los tres tratamientos dietarios resulta aun compleja, y los mecanismos que subyacen y explicarían cada respuesta debiesen ser investigados con mayor detalle. En este sentido, el efecto diurético de muchos CS incide en una posterior ingesta de agua (Mangione et al, 2004) lo cual puede verse facilitado en condiciones de laboratorio o en ambientes húmedos, pero representa un severo desafío para aves de ambientes áridos. En este caso, modificaciones estructurales para la conservación del balance hídrico responderían ante lo requerido en ambientes con baja disponibilidad de agua.

Conclusiones

Esta tesis establece que existen distintos mecanismos que se podrían gatillar para enfrentar el consumo crónico de CS en aves. Estas distintas estrategias, estarían relacionadas con la ecología y la historia evolutiva de cada especie. En este sentido, Ríos et al, (2012b) establece que *Diuca diuca* sería una especie poco tolerante a la ingesta de CS, sin embargo, esto podría variar de acuerdo a adaptaciones locales que estén relacionadas con la dieta natural, como lo demuestran estudios previos (Mangione et al, 2000). Tal es el caso de las poblaciones trasandinas de Quebrada de la Plata y Mendoza que varían considerablemente en el consumo de dicotiledóneas y por lo tanto de CS. En el presente estudio, bajo los niveles de consumo de CS analizados no se puede establecer con claridad cual de las especies tendría una mejor respuesta al consumo de CS. En este sentido, las distintas estrategias usadas por el chincol y la diuca para hacer frente el consumo de CS les permite mantenerse sin mayores problemas consumiendo de manera crónica alimentos con compuestos secundarios.

El impacto del consumo de CS es multisistémico y existen diversos parámetros que escaparon de nuestro análisis y que por lo tanto debieran ser incluidos en futuras investigaciones. Una mayor profundización en los gastos de energía a través de mediciones de gasto energético diario, gasto en actividad y metabolismo máximo; así también como un estudio del balance hídrico mediante métodos que permitan la determinación de la concentración y composición de la orina, podrían ser útiles para el mejor entendimiento de los efectos fisiológicos del consumo de CS en aves y las limitaciones fisiológicas que su consumo supone. Por último nuestros resultados

revelaron que la respuesta orgánica puede ser diferenciada tanto en sentido como en magnitud dependiendo de los CS consumidos y de la fisiología del consumidor, por lo que es importante realizar los estudios con otros aleloquímicos de relevancia ecológica. Dichos estudios podrán contribuir al conocimiento específico de los efectos del consumo de dietas con compuestos secundarios y explicar en parte las preferencias alimentarias de las aves.

Referencias

- Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2:875-877.
- Aldea P, Sabat P. 2007. Osmoregulatory responses to dietary protein and water intake in the granivorous *Zonotrichia capensis* (Passerine, Emberizidae). *Rev Chil Hist Nat* 80:447-454.
- Barker FK, Burns KJ, Klicka J, Lanyon S, Lovette IJ. 2013. Going to extremes: contrasting rates of diversification in a recent radiation of new world passerine birds. *Systematic biology* 62: 298-320.
- Barceló G, Salinas J, Sabat P. 2012. Body mass, phylogeny and diet composition affects kidney morphology in passerine birds. *Journal of Morphology* 273:842-849
- Bartholomew G, Cade T. 1963. The Water Economy of Land Birds. *The Auk* 80:504-539
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54:484-489.
- Braun EJ. 2003. Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 136: 499-505.
- Casotti G, Richardson K. 1992. A stereological analysis of kidney structure of honeyeater birds (Meliphagidae) inhabiting either arid or wet environments. *Journal of Anatomy* 180:281-288
- Cavjedes-Vidal E, McWhorter TJ, Lavin SR, Chediack JG, Tracy CR, Karasov WH. 2007. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:19132-19137.
- Cooper CE, Withers PC. 2009. Effects of Measurement Duration on the Determination of Basal Metabolic Rate and Evaporative Water Loss of Small Marsupials: How Long Is Long Enough? *Physiological and Biochemical Zoology* 82: 438-446
- Daan S, Masman D, Groenewold A. 1990. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *Am J Physiol* 259:333-340
- Dahlqvist A. 1964. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Analytical biochemistry*. 7:18-25.

- Dearing MD, Mangione A, Karasov WH. 2001. Plant Secondary Compounds as Diuretics: An Overlooked Consequence. *American Zoology*. 41(4):890-901.
- Dearing MD, Foley WJ, McLean S. 2005. The Influence of Plant Secondary Metabolites on the Nutritional Ecology of Herbivorous Terrestrial Vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36(1):169-189.
- Díaz M. 1996. Food choices by seed-eating birds in relation to seed chemistry. *Comp Biochem Physiol A* 113:239-246.
- Foley W, McArthur C. 1994. The effects and costs of allelochemicals for mammalian herbivores: an ecological perspective. In: Chivers D, Langer P, eds. *The digestive system in mammals: food, form and function*. Cambridge University Press; 370-391.
- Foley W, McLean S, Cork S. 1995. Consequences Of Biotransformation Of Plant Secondary Metabolites On Acid-Base Metabolism In Mammals - A Final Common Pathway? *Journal of Chemical Ecology* 21:721-743.
- Freeland WJ, Janzen DH. 1974. Strategies in herbivory by mammals: The role of plant secondary compounds. *Am. Nat.* 108:269-289.
- Garland TJr, Adolph SC. 1994. Why not to do two-species comparative studies: limitations on inferring adaptation. *Physiological Zoology* 67:797-828
- Gilardi JD, Duffey SS, Munn CA, Tell LA. 1999. Biochemical functions of geophagy in parrots: detoxification of dietary toxins and cytoprotective effects. *Journal of Chemical Ecology*, 25:897-922.
- Glazenburg EJ, Jekel-Halsema IM, Scholtens E, Baars AJ, Mulder GJ. 1983. Effects of variation in the dietary supply of cysteine and methionine on liver concentration of glutathione and Active sulfate (PAPS) and serum levels of sulfate, cystine, methionine and taurine: relation to the metabolism of acetaminophen. *The Journal of nutrition*, 113(7), 1363-1373.
- Green AK, Barnes DM, Karasov WH. 2005. A new method to measure intestinal activity of P-glycoprotein in avian and mammalian species. *Journal of Comparative Physiology B*, 175: 57-66.
- Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. 2009. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc* 4:1245-1251
- Hagerman AE, Robbins CT, Weerasuriya Y, Wilson T, McArthur C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of range management* 45:57-62.
- Illius AW, Jessop NS. 1995. Modeling metabolic costs of allelochemical ingestion by foraging herbivores. *Journal of Chemical Ecology*. 21:693-719.

Jakubas W, Karasov WH, Guglielmo C. 1993a. Ruffed grouse tolerance and biotransformation of the plant secondary metabolite coniferyl benzoate. *Condor*. 95:625-640.

Jakubas WL, Karasov WH, Guglielmo CG. 1993b. Coniferyl benzoate in quaking aspen (*Populus tremuloides*)--its effect on energy and nitrogen digestion and retention in ruffed grouse (*Bonasa umbellus*). *Physiol. Zool.* 66:580-601.

Karasov WH, Martínez del Río C. 2007. *Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton: Princeton University Press.

Karasov WH, Caviedes-Vidal E, Bakken BH, Izhaki I, Samuni-Blank M, Arad Z. 2012. Capacity for absorption of water-soluble secondary metabolites greater in birds than in rodents. *PLoS one*, 7:e32417.

Kohl KD, Dearing MD. 2011. Induced and constitutive responses of digestive enzymes to plant toxins in an herbivorous mammal. *The Journal of experimental biology*. 214:4133-4140.

Klasing KC. 1998. *Comparative avian nutrition*. CAB International. Wallingford, UK,

Landolt R. 1985. A comparative morphological study of the gizzard in the Columbidae. *Fortschritte der Zoologie* 30:225-268

Lee, E. H., Kim, H. J., Song, Y. S., Jin, C., Lee, K. T., Cho, J., & Lee, Y. S. 2003. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Archives of pharmacal research*, 26(12), 1018-1023.

Lis-Balchin MT, Hart SL. 1994. A Pharmacological Appraisal of the Folk Medicinal Usage of *Pelargonium grossularioides* and *Erodium cicutarium*

López-Calleja MV. 1995. Dieta de *Zonotrichia capensis* (Emberizidae) y *Diuca diuca* (Fringillidae): efecto de la variación estacional de los recursos tróficos y la riqueza de aves granívoras en Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 68:321-331.

MacMillen RE. 1990. Water economy of granivorous birds: a predictive model. *Condor* 92:379-392.

Mangione A, Dearing M, Karasov WH. 2000. Interpopulation differences in tolerance to creosote bush resin in desert woodrats (*Neotoma lepida*). *Ecology* 81:2067-2076.

Mangione A, Dearing M, Karasov WH. 2004. Creosote bush (*Larrea tridentata*) resin increases water demands and reduces energy availability in desert woodrats (*Neotoma lepida*). *Journal of Chemical Ecology*, 30:1409-1429.

- Marsh KJ, Wallis IR, Andrew RL, Foley WJ. 2006. The detoxification limitation hypothesis: where did it come from and where is it going? *Journal of chemical ecology*. 2006;32(6):1247-66.
- Martínez del Río, C. 1990. Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology* 63: 987-1011.
- Martínez del Río C, Brugger KE, Ríos JL, Vergara ME, Witmer M. 1995. An experimental and comparative study of dietary modulation of intestinal enzymes in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Physiological Zoology* 68:490-511.
- Matson KD, Millam JR, Klasing KC. 2004. Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) reject very low levels of plant secondary compounds. *Applied Animal Behaviour Science* 85: 141-156.
- McLean S, Duncan AJ. 2006. Pharmacological perspectives on the detoxification of plant secondary metabolites: implications for ingestive behavior of herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1213-1228
- McNabb F, McNabb R, Prather I, Conner R, Adkisson C. 1980. Nitrogen excretion by turkey vultures. *Condor* 82: 219-223.
- McNab BK, 2009. Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR. *Comparative Biochemistry and Physiology* 152A: 22-45
- McWhorter TJ, Martínez del Río C, Pinshow B, Roxburgh L. 2004. Renal function in Palestine sunbirds: elimination of excess water does not constrain energy intake. *The Journal of experimental biology* 207:3391-3398.
- Moen, D. S., Winne, C. T., & Reed, R. N. 2005. Habitat-mediated shifts and plasticity in the evaporative water loss rates of two congeneric pit vipers (Squamata, Viperidae, Agkistrodon). *Evolutionary Ecology Research* 7: 759-766
- Muñoz-García A, Cox RM, Williams JB. 2008. Phenotypic flexibility in cutaneous water loss and lipids of the stratum corneum in house sparrows (*Passer domesticus*) following acclimation to high and low humidity. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:87-96.
- Ophir E, Arieli Y, Marder J. 2004. The effect of α_2 -adrenergic receptors on cutaneous water evaporation in the rock pigeon (*Columba livia*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139: 411-415.
- Pass GJ, Mclean S, Stupans I. 1999. Induction of xenobiotic metabolising enzymes in the common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, by Eucalyptus terpenes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 124:239-246.

- Peña-Villalobos I, Valdés-Ferranty F, & Sabat P. 2013. Osmoregulatory and metabolic costs of salt excretion in the Rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 164:314-318.
- Ramírez-Otárola N, Narváez C, Sabat P. 2011. Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: dietary and phylogenetic correlates. *J Comp Physiol B* 181:817-827
- Ricklefs RE, Konarzewski M, Daan S. 1996. The relationship between basal metabolic rate and daily energy expenditure in birds and mammals. *American Naturalist*, 1047-1071.
- Ríos JM, Mangione A. 2010 Respuesta disuasiva del granívoro *Zonotrichia capensis* (Paseriformes: Emberizidae) frente a fenoles comunes en las semillas. *Ecología Austral*. 20:215-221.
- Ríos JM. 2011. Ecología nutricional de aves granívoras del desierto del monte central. Tesis Doctoral Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.
- Ríos JM, Mangione A, Marone LM. 2012a. Effects of nutritional and anti-nutritional properties of seeds on the feeding ecology of seed-eating birds of the Monte desert, Argentina. *The Condor* 114:44-55.
- Ríos JM, Mangione A, & Marone L. 2012b. Tolerance to dietary phenolics and diet breadth in three seed-eating birds: Implications for graminivory. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317: 425-433.
- Ro J, Williams JB. 2010. Respiratory and cutaneous water loss of temperate-zone passerine birds. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156: 237-246.
- Roxburgh L, Pinshow B. 2002. Ammonotely in a passerine nectarivore: the influence of renal and post-renal modification on nitrogenous waste product excretion. *The Journal of experimental biology* 205:1735-1745.
- Sabat P, Novoa F, Bozinovic F, Martínez del Río C. 1998. Dietary flexibility and intestinal plasticity in birds: a field and laboratory study. *Physiological and Biochemical Zoology* 71:226-236.
- Sabat P, Sepúlveda-Kattan E, Maldonado K. 2004 Physiological and biochemical responses to dietary protein in the omnivore passerine *Zonotrichia capensis* (Emberizidae). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 137: 391-396.
- Sabat P, Maldonado K, Canals M, Martínez Del Río C. 2006. Osmoregulation and adaptive radiation in the ovenbird genus *Cinclodes* (Passeriformes: Furnariidae). *Funct Ecol* 20:799-805.

- Sabat P, González-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* 152:322-326.
- Saleem M, Kim HJ, Han CK, Jin C, Lee YS. 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Phytochemistry*. 67:1390-1394.
- Silva SI, Jaksic FM, Bozinovic F. 2004. Interplay between metabolic rate and diet quality in the South American fox, *Pseudalopex culpaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 137(1):33-38.
- Schmidt-Nielsen K. 1997. *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge University Press.
- Sturkie P, Whittow GC. 2000. *Sturkie's avian physiology*. 5th Edition. Academic Press.
- Tequida-Meneses M, Cortez-Rocha M, Rosas-Burgos C, Lopez-Sandoval S, Corrales-Maldonado C. 2002. Efecto de extractos alcoholicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoamericana de Micología* 19:84-88.
- Thomas DW, Samson C, Bergeron JM. 1988. Metabolic Costs Associated with the Ingestion of Plant Phenolics by *Microtus pennsylvanicus*. *Journal of Mammalogy* 69:512-515
- Torregrossa A, Dearing MD. 2009. Nutritional toxicology of mammals: regulated intake of plant secondary compounds. *Functional Ecology* 23:48-56.
- Wiersma P, Salomons H, Verhulst S. 2005. Metabolic adjustments to increasing foraging costs of starlings in a closed economy. *Journal of Experimental Biology*, 208: 4099-4108.
- Williams JB, Tieleman BI. 2000. Flexibility in basal metabolic rate and evaporative water loss among hoopoe larks exposed to different environmental temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 203:3153-3159.
- Williams JB, Ostrowski S, Bedin E, Ismail K. 2001. Seasonal variation in energy expenditure, water flux and food consumption of Arabian oryx *Oryx leucoryx*. *J Exp Biol* 204:2301-2311
- Williams JB, Muñoz-García A, Champagne A. 2012. Climate change and cutaneous water loss of birds. *The Journal of Experimental Biology*, 215:1053-1060.
- Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*. 75(2), 225-233.

Ziswiler V. 1986. Comparative morphology of the avian digestive tract. Acta XIX
Congress of International Ornithology 19:2436-2444