

UFMS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

**Partição de proteínas e detecção de atividade trípica em
morcegos filostomídeos em regiões de savana**

Fernando Gonçalves

Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Partição de proteínas e detecção de atividade trípica em morcegos filostomídeos em regiões de savana

Fernando Gonçalves

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Orientadora: Maria Ligia Rodrigues Macedo
Co-orientador: Erich Fischer

Campo Grande – Mato Grosso do Sul
2014

EPÍGRAFE

‘Ecology is Nice, behavior is good, but first you have to know the anatomy and physiology’

Horst Schwassman

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ângela e Dorival, que sempre acreditaram no estudo como a maior herança deixada aos filhos. Ao meu irmão Diego que caminha nos mesmos passos...

AGRADECIMENTOS

Ao Erich e Lígia pelos ensinamentos, motivações, orientação, paciência e grande amizade. Aos membros da minha banca de avaliação da tese. Ao Alan Fredy pela grande ajuda nas análises estatísticas. À todos os integrantes do laboratório de purificação de proteínas e suas funções biológicas (LPPFB-UFMS) pelo companheirismo e ajuda nos experimentos. À todos os integrantes do Projeto Morcegos do Pantanal pela amizade, discussões e ajuda na coleta do material. À todos os alunos, professores, funcionários e freqüentadores do laboratório de ecologia pela ótima convivência. À Rose, secretária do PPGECC pela ajuda nos assuntos acadêmicos e no agendamento de viagens. À UFMS pelo apoio logístico. Agradeço também à CAPES pelo apoio e ao FUNDECT-MS e CNPQ pelo apoio indireto.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	7
OBJETIVOS GERAIS	11
LITERATURA CITADA	12
CAPÍTULO 1	17
RESUMO	17
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
<i>LOCAIS DE ESTUDO</i>	21
<i>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS INTESTINAIS</i>	22
<i>ELETROFORESE SDS-PAGE</i>	23
<i>ANÁLISE DE DADOS</i>	23
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	30
LITERATURA CITADA	34
CAPÍTULO 2	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
<i>LOCAIS DE ESTUDO</i>	42
<i>COLETAS DE DADOS</i>	43
<i>EXTRAÇÃO DE CONTEÚDO INTESTINAL</i>	47
<i>ENSAIO PAR DETERMINAR A ATIVIDADE DA ENZIMA TRIPSINA</i>	44
<i>ANÁLISE DE DADOS</i>	45
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	49
LITERATURA CITADA	50

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de proteínas como ferramenta para estudar ecologia se desenvolveu a partir do final dos anos 60 com o uso generalizado de isoenzimas (Murphy et al. 1996). Algumas técnicas de separação de proteínas, como a eletroforese SDS-PAGE, se desenvolveram por volta de 1970 (Laemmli 1970) e inicialmente eram utilizadas para estudos com fisiologia e bioquímica humanas, dada a complexidade e custo econômico do método. A metodologia se baseia na migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Com isso as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho, ou seja, as proteínas de menor massa molecular irão migrar mais rapidamente que as de maior massa.

A possibilidade de isolar, quantificar e seqüenciar proteínas mediante a técnica de eletroforese é uma excelente ferramenta para os estudos de um amplo espectro de processos ecológicos desde que sejam abordados por uma perspectiva comparativa. Pela primeira vez foi possível identificar as proteínas de um modo relativamente fácil e econômico, e associar estas identificações a processos fisiológicos e vias metabólicas. Muitos dos trabalhos anteriores a era genômica são basicamente descritivos, enfocando a caracterização de proteínas e organismos de interesse comercial (López 2005), como pragas (Van der Beek et al. 1997; Navás et al. 2002; Calvo et al. 2005), peçonha de serpentes (Mackessy 2002; Fox & Serrano 2008) escorpiões (Nascimento et al. 2006) e aranhas (Yuan et al. 2007). Em algumas ocasiões, as proteínas caracterizadas são usadas para estabelecer relações filogenéticas entre espécies próximas (Aquadro & Avise 1981; Miyazaki et al. 2004) ou variabilidade genética entre populações (Fullaondo et al. 2001; Blank et al. 2005; Biron et al. 2006).

A proteína foi o primeiro nutriente considerado essencial para um organismo, pois sua disponibilidade influencia a ecologia alimentar que, por sua vez, afeta o crescimento e a reprodução dos indivíduos (White 1993). A disponibilidade de proteína é um importante fator que limita a coexistência de espécies que utilizam recursos semelhantes para alimentação. Por exemplo, frutos são consumidos por grande quantidade de espécies de aves e mamíferos tropicais (Fleming 1992), mas são recursos pobres em proteínas (Thomas 1984). Provavelmente por esse motivo, animais exclusivamente frugívoros são raros e muitas espécies complementam a dieta com recursos ricos em proteínas, como insetos, folhas e pólen (Gardner 1976).

De modo simplificado, o processo chave para hidrólise do alimento é realizado por enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas (Karasov & Hume 1997). Primeiramente, o alimento é hidrolisado pelas enzimas pancreáticas que quebram carboidratos em dissacarídeos [via amilase (EC 3.2.1.1)] e proteínas em peptídeos [via tripsina (EC 3.4.21.4) e quimiotripsina (EC 3.4.21.1)]. Após essas passagens, enzimas produzidas na borda do intestino hidrolisam dissacarídeos em monossacarídeos [maltase (EC 3.2.1.20) e sucrase (EC 3.2.1.48)] e peptídeos em aminoácidos [e.g., aminopeptidase-N; APN (EC 3.4.11.2)]. A digestão de proteínas começa no estômago, onde se decompõem em proteases, peptonas e polipeptídeos grandes, e continua no intestino onde sofrem a maior parte da digestão na porção intestinal correspondente ao duodeno. Nesta porção as proteínas sofrem ação das enzimas secretadas pelo pâncreas, principalmente das enzimas proteolíticas tripsina, quimiotripsina e carboxipolipeptidase. Dentre as enzimas proteolíticas, destaca-se a tripsina por ser encontrada em sistemas digestivos de muitos vertebrados que necessitam hidrolisar e absorver proteínas (Rawlings & Barrett 1994).

Duas importantes hipóteses evolutivas foram propostas baseadas na descrição do processo digestivo: (1) a atividade da respectiva enzima é ajustada pelo conteúdo dos respectivos substratos alimentares, portanto organismos não consumiriam energia produzindo enzimas em excesso e, ao mesmo tempo, absorveriam todos os nutrientes disponíveis (“adaptive modulation hypothesis” de Karasov& Diamond 1988); seguindo o mesmo pensamento, (2) a atividade das enzimas pancreáticas é moldada pela quantidade de seus respectivos substratos e vice-versa, uma proposição análoga a hipótese da simorfose (“symmorphosis hypothesis” de Weibel et al. 1991). Essa hipótese postula que sistemas biológicos aderem ao princípio da economia morfológica (“economy of design”), onde a formação de elementos estruturais é regulada para satisfazer, mas não exceder, os requerimentos do sistema funcional.

Na linha da primeira hipótese, muitos estudos tem encontrado correlação significativa entre as atividades das enzimas digestivas e os respectivos substratos presentes na dieta, em ambos os níveis intra e inter-específico (revisado por Karasov& Hume 1997; Karasov et al. 2011). Em aves passeriformes, há correlação inter-específica entre a composição da dieta e atividade de carboidrases intestinais e pancreáticas, mas não de proteases (Kohl et al. 2011; Ramirez-Otarola et al. 2011). Indivíduos adultos de uma mesma espécie de passeriformes ajustam a atividade de proteases de acordo com a composição da dieta, mas não de carboidrases intestinais. Por outro lado, aves Galloanserae (clado que inclui Galiformes e Anseriformes) ajustam a atividade de carboidrases intestinais, mas não proteases (McWhorter et al. 2009). Alguns peixes marinhos ajustam as atividades das enzimas responsáveis pela digestão de proteínas de acordo com a porcentagem desse substrato na dieta (Zambonino-Infante e Cahu 2007), assim como fazem as espécies de roedores (Sabat et al. 1999; Liu et.al. 2012)

A morfologia e a função do trato gastrointestinal de muitos vertebrados podem ser explicadas pelas interações entre os componentes da dieta e a forma mais econômica de digestão, ambos aspectos incorporados às reações químicas e aos modelos funcionais do intestino. Um único estudo encontrado sobre enzimas digestivas de morcegos reporta que a mudança de hábito alimentar insetívoro para nectarívoro ou frugívoro foi acompanhada pelo aumento da atividade de enzimas intestinais que atuam na digestão de carboidratos e açúcares (sucrase e maltase), e pela diminuição da atividade da enzima trealase, que atua na digestão de trealose (responsável pelo armazenamento de açúcar em insetos) (Schondube et al. 2001). Por ser um nutriente essencial, Schondube et al. (2001) predizem que a habilidade em digerir proteínas permanece constante entre morcegos de diferentes hábitos alimentares.

A capacidade dos animais de ajustar a atividade das enzimas digestivas de acordo com as variações na quantidade e qualidade dos itens presentes na dieta é considerada uma das maiores virtudes na fisiologia comparada e ecologia nutricional. As principais características dessa capacidade são o aumento na taxa de absorção e a diminuição do tempo de digestão (Karasov et al. 2011). A composição da dieta age como uma força seletiva sobre as enzimas digestivas dos organismos, que ajustam a atividade das enzimas envolvidas na digestão (Karasov & Diamond 1988). A efetiva função do trato intestinal é importante em vertebrados, principalmente em morcegos e aves, pois demandam grande energia para o voo e rápida taxa de crescimento (Caviedes-Vidal et al. 2007).

OBJETIVOS GERAIS

A presente tese teve cinco objetivos principais divididos em 2 capítulos. O capítulo 1 teve como objetivos (1) analisar o perfil protéico do intestino de 16 espécies de morcegos filostomídeos, (2) comparar a similaridade entre as espécies estudadas com relação aos níveis de proteínas encontrados nos intestinos e (3) verificar se a similaridade dos perfis protéicos dos intestinos está associada à proximidade filogenética entre as 16 espécies de morcegos filostomídeos. No capítulo 2, os objetivos foram (4) avaliar se morcegos filostomídeos possuem capacidade de modular a produção da enzima tripsina em função da porcentagem de proteínas na dieta e (5) avaliar se as espécies com dieta pobre em proteínas possuem menos habilidade de modular a enzima tripsina do que as espécies com dieta mais rica em proteínas.

LITERATURA CITADA

- Aquadro, C.F. & Avise, J.C. (1981) Genetic-divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**, 3784-3788.
- Biron, D.G., Marche L., Ponton F., Loxdale H.D., Galeotti N., Renault L., Joly, C. & Thomas, F. (2005) Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **272**, 2117-2126.
- Blank, M., Bastrop, R. & Jurss, K. (2006) Stress protein response in two sibling species of *Marenzelleria* (Polychaeta, Spionidae) Is there an influence of acclimation salinity? *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **144**, 451-462.
- Calvo, E., Flores-Romero, P., López J.A. & Navás, A. (2005) Identification of proteins expressing differences among isolates of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) by nano-liquid chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, **4**, 1017-1021.
- Caviedes-Vidal, E., McWhorter T. J., Lavin S.R., Chediack J. G., Christopher, R. T. & Karasov, W.H. (2007) The digestive adaptation of flying vertebrates: High intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** (48), 19132 - 19137.
- Fleming, T. H. (1992) How do fruit and nectar feeding birds and mammals track their food resources? *Effects of Resource Distribution on Animal-Plant Interactions* (eds M. D. Hunter, T. Ohgushi & P. W. Price), pp. 355–391. Academic Press, San Diego.

- Fox, J.W. & Serrano, S.M.T. (2008) Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, **8**, 909-920.
- Fullaondo, A., Vicario, A., Aguirre, A., Barrena, I. & Salazar, A. (2001) Quantitative analysis of two-dimensional gel electrophoresis protein patterns: a method for studying genetic relationships among *Globodera pallida* populations. *Heredity*, **87**, 266-272.
- Gardner, A. L. (1976) Feeding habits. *Biology of the New World Family Phyllostomidae, Part II*. (eds R.J. Baker, J.K. Jones Jr. & D.C. Carter), pp 293-350. Special Publications, Museum Texas Tech University, Lubbock, Texas.
- Karasov, W. H. & Hume, I. D. (1997) The vertebrate gastrointestinal system. Handbook of Physiology (ed W. H. Dantzler), pp. 407. Oxford University Press, New York.
- Karasov, W. H., & Diamond, J. M. (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience*, **38**(9), 602-611.
- Karasov, W.H., Martinez del Rio, C. & Caviedes-Vidal, E. (2011) Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual Review of Physiology*, **73**:69-93.
- Kohl, K.D., Brzek P., Caviedes-Vidal, E. & Karasov, W.H. (2011) Pancreatic and intestinal carbohydrases are matched to dietary starch level in wild passerine birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, **84**, 195-203.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680-685.
- Liu, Q.S. & Wang, D.H (2007) Effects of diet quality on phenotypic flexibility of organ size and digestive function in Mongolian gerbils (*Merionesunguiculatus*). *Journal of Comparative Physiology Part B*, **177**, 509–518.

- López, J.L. (2005) Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **815**, 261-274.
- Mackessy, S.P. (2002) Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, **21**, 43-83.
- McWhorter, T.J., Caviedes-Vidal, E. & Karasov, W.H. (2009) The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **84**, 533-565.
- Miyazaki, J.I., Shintaku M., Kyuno A., Fujiwara Y., Hashimoto J. & Iwasaki, H. (2004) Phylogenetic relationships of deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae). *Marine Biology*, **144**, 527-535.
- Murphy, W., Sites J.W., Buth, D.G. & Hauser, C.H. (1996) Proteins: Siozyme electrophoresis. *Molecular systematic* (eds D.M., Hillis, Mortiz, C. & B.K. Mable) pp. 51-120. Sinauer Associates, Sunderland MA, USA.
- Nascimento, D.G., Rates, B., Santos, D.M., Verano-Braga, T., Barbosa-Silva, A., Dutra, A.A.A., Biondi, I., Martin-Eauclaire, M.F., De Lima, M.E. & Pimenta, A.M.C. (2006) Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon*, **47**, 628-639.
- Navás, A., Lopez J.A., Esparrago G., Camafeita, E. & Albar, J.P. (2002). Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, **1**, 421-427.

- Ramirez-Otarola, N., Narvaez, C. & Sabat, P. (2011) Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology Part B*, **181**, 817-827.
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, **244**, 19-61.
- Sabata, P., Lagos, J.A. & Francisco Bozinovic, F. (1999) Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **123**, 83-87.
- Schondube, J.E, Herrera-M L.G. & Martinez del Rio, C. (2001) Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zoology*, **104**, 59-73.
- Thomas, D. W. (1984) Fruit intake and energy budgets of frugivorous bats. *Physiological and Biochemical Zoology*, **57**, 457–467.
- Van der Beek, J.G., Folkertsma R., Poleij L.M., vanKoert P.H.G.& Bakker, J. (1997) Molecular evidence that *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax* are distinct biological entities. *Fundamental and Applied Nematology*, **20**, 513-520.
- Weibel, E.R., Taylor, C.R., & Hoppeler, H. (1991) The concept of symmorphosis: A testable hypothesis of structure-function relationship *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10357-10361.
- White, T.C.R. (1993) *The Inadequate Environment: Nitrogen and the Abundance of Animals*. Springer-Verlag, Berlin. 425 pp.
- Yuan, C.H., Jin, Q.H., Tang, X., Hu, W.J., Cao, R., Yang, S.Q., Xiong, J.X., Xie, C.L., Xie, J.Y. & Liang, S.P. (2007) Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. *Journal of Proteome Research*, **6**, 2792-2801.

Zambonino-Infante, J. L. & C. L. Cahu. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, **268**, 98-105.

Partição de proteínas entre morcegos filostomídeos em regiões de Savana no Mato Grosso do Sul

RESUMO

Os morcegos filostomídeos são especializados em algum tipo de alimento, porém podem explorar eficientemente outros tipos de recursos e assim reduzir a sobreposição alimentar entre espécies e suprir necessidades fisiológicas, principalmente de proteínas. Os objetivos deste trabalho são descrever o perfil protéico do intestino de 15 espécies de morcegos filostomídeos, avaliar a similaridade entre as espécies com respeito aos níveis de proteínas e avaliar se a similaridade dos perfis protéicos dos intestinos está associada à proximidade filogenética. Os espécimes foram coletados em seis regiões de Savana e seus intestinos dissecados para extração de proteínas e posteriormente analisados através do método de eletroforese SDS-PAGE. As maiores concentrações de proteína total foram registradas em intestinos de *Platyrrhinus lineatus*, *Lophostoma brasiliense* e *Glossophaga soricina*. A ordenação (NMDS) em uma dimensão das espécies de filostomídeos baseada no perfil protéico encontrado no intestino dos morcegos aproximou as espécies em dois grupos compostos por membros de diferentes subfamílias. Adicionalmente, dentro de cada um desses grupos ocorreram subgrupos compostos por espécies de diferentes subfamílias e subgrupos compostos por espécies de mesma subfamília (Stenodermatinae). Morcegos filostomídeos são altamente especializados quanto ao tipo de alimento, e aqueles especializados em recursos cuja oferta é muito abundante, podem co-ocorrer e sobrepor suas dietas. Por outro lado, espécies especializadas em recursos escassos podem co-ocorrer com mais frequência com espécies que diferem quanto à dieta principal, evitando a sobreposição. A exploração de diferentes fontes de proteínas, conforme encontrado nesse estudo, pode ser resultado de estratégia de partição de recursos pouco abundantes para diminuir ou evitar a competição interespecífica, e de sobreposição de consumo de itens muito abundantes, que não parecem ser limitantes para espécies de stenodermatíneos, embora filogeneticamente próximas.

PALAVRAS CHAVES: 1) Recursos 2) Eletroforese 3) Perfil Protéico

Protein partition between phyllostomidae bats in savanna regions of Mato Grosso do Sul

ABSTRACT

Bats of the family Phyllostomidae are specialized in a certain type of food, however they might efficiently explore other resources, and therefore reduce dietary overlap between species while matching physiological needs, protein-like mainly. Here we aim to describe intestine protein profiles of 16 species of Phyllostomidae bats, assess the similarity between species regarding protein levels and evaluate if intestine protein profiles similarity is linked to phylogenetic proximity. Bats were collected in six savanna regions and their intestines were dissected for protein extraction, and after analyzed through the electrophoresis SDS-PAGE method. The greatest total protein concentrations were registered in *Platyrrhinus lineatus*, *Lophostoma brasiliense* and *Glossophaga soricina* intestines. The NMDS analysis showed two groups composed by different subfamilies members. Group 1 was formed by *L. brasiliense*, *C. perspicillata*, *G. soricina*, *A. planirostris* e *P. bilabiatum*. Group 2 had *M. minuta*, *T. bidens*, *D. rotundus*, *S. lilium*, *C. doriae*, *A. lituratus*, *V. pusilla*, *P. lineatus*, *P. helleri*, *P. discolor* e *A. caudifer*. Phyllostomidae bats are highly specialized when it comes to food type, and those specialized in abundant resources may co-occur and overlap their diets. On the other hand, species specialized in scarce resources might co-occur more frequently with species that differ when it comes to the main dietary constituents, avoiding overlap. The exploitation of different protein sources, as was found here, can be a result of a resource partition strategy when resources are not abundant, to diminish or avoid interspecific competition, and consumption overlap of rather abundant items, which do not seem to be limiting for Stenodermatinae species, although phylogenetically close.

Key words: 1) Resources 2) Electrophoresis 3) Protein Profile

INTRODUÇÃO

Phyllostomidae é a família com maior riqueza de espécies entre os mamíferos neotropicais, e mais de 70 espécies podem co-ocorrerem uma mesma região (Rex et al. 2008). Os mecanismos que promovem e mantêm essa grande diversidade local e regional de filostomídeos têm sido abordados, porém ainda não são bem compreendidos (Rex et al. 2008). Os morcegos filostomídeos são especializados em algum tipo de alimento, porém podem explorar eficientemente outros tipos de recursos e assim reduzir a sobreposição alimentar entre espécies (Dumont 2003; Munin et al. 2012). Com base no hábito alimentar predominante, as espécies de filostomídeos têm sido classificadas em guildas alimentares que consideram a dieta e o comportamento de forrageio (Giannini & Kalko 2004). Essa classificação tem como pressupostos (1) que a exploração de diferentes fontes alimentares é um resultado da partilha de recursos entre populações de espécies coexistentes de filostomídeos, e (2) que espécies filogeneticamente mais próximas exploram recursos semelhantes de maneira semelhante (Magurran 2004). Uma expectativa ecológica-evolutiva é que espécies filogeneticamente mais próximas possuem maior potencial para competição do que espécies filogeneticamente mais distantes (Arlettaz et al. 1997, Giannini & Kalko 2004, Moreno et al. 2006).

Diferentes estudos mostram que morcegos filostomídeos exploram uma ampla gama de recursos, incluindo néctar, pólen, folhas, frutos, sementes, artrópodes, pequenos vertebrados e sangue de grandes vertebrados (Gardner 1977; Kunz & Diaz 1994; Munin et al. 2012). Essa diversidade de recursos explorados é uma estratégia para suprir necessidades fisiológicas e, principalmente, de proteínas. A disponibilidade de proteína tende a ser um importante fator limitante para a coexistência de espécies de uma mesma guilda que utilizam esse nutriente como principal componente de sua dieta

(Herrera et al. 2002). Além disso, o crescimento e a reprodução dos indivíduos são amplamente dependentes de proteína, cuja disponibilidade influencia a ecologia alimentar das espécies (White 1993) e pode explicar padrões de co-ocorrência em uma determinada região (Wetterer et al. 2000; Giannini & Kalko 2004; Rex et al. 2008).

Resumidamente, uma ampla gama de recursos é consumida pelos morcegos filostomídeos e as macromoléculas de proteínas são hidrolisadas no intestino grosso pelas proteases e então absorvidas pelos vasos sanguíneos localizados na parede do intestino reto (Karasov & Martinez del Rio 2007). Com isso, análise das proteínas presentes no intestino é uma excelente ferramenta para estudos sobre partição de proteínas entre espécies de determinada região. A utilização e a sobreposição de diferentes tipos de recursos por morcegos filostomídeos têm sido bastante estudada por meio de métodos como análise de conteúdo fecal (Fleming 1986; 1991; Giannini & Kalko 2004; Munin et al. 2012), conteúdo estomacal (Fleming et al. 1972), genética molecular (Clare et al. 2009) e marcadores moleculares (Fleming 1995; Herrera et al. 2002). Porém, não há estudos de fisiologia que abordem a ingestão e a possível partição de proteínas digeridas e assimiladas no intestino por espécies de filostomídeos.

Os objetivos deste trabalho são (1) descrever o perfil protéico do intestino de 16 espécies de morcegos filostomídeos, (2) avaliar a similaridade entre as espécies com respeito aos níveis de proteínas encontrados nos intestinos e (3) avaliar se a similaridade dos perfis protéicos dos intestinos está associada à proximidade filogenética entre as 16 espécies de morcegos filostomídeos. É esperado que espécies filogeneticamente mais próximas tenham baixa similaridade de proteínas intestinais, evitando assim a competição interespecífica. Por outro lado, caso a similaridade de proteínas intestinais entre espécies filogeneticamente próximas seja alta, é esperado que essas proteínas sejam abundantes no local.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de estudo

Os indivíduos foram coletados em quatro regiões de Cerrado próximos as cidades de Nioaque (21° 04' S, 55° 40' W), Campo Grande (20° 26' S, 54° 38' W), Jardim (22° 18' S, 56° 09' W) e Rio Verde de Mato Grosso (18° 30' S, 54° 30' W). Esses fragmentos apresentam clima Tropical sazonal de inverno seco com precipitações anuais na média de 1000 a 1600 mm. As temperaturas variam de 25 a 32 °C no verão e de 8 a 17 °C no inverno (PCBAP 1997). Apresentam vegetação arbórea com dossel contínuo com altura média em torno de 10m e constituído por vegetação características de regiões seca, com fisionomia diversificada e composição florística bastante heterogêneas. Adicionalmente as regiões de Cerrado, foram coletados espécimes em duas regiões do Pantanal, próximos as regiões do Passo do Lontra (19° 34' S, 57° 20' W) no Pantanal do Miranda e Barranco Alto (19° 34' S, 56° 09' W) no Pantanal da Nhecolândia. O clima da região Pantaneira é do tipo Aw de Köppen (PCBAP 1997), com nítida diferença entre as estações seca e úmida e caracterizada pela presença de baías e salinas circundadas por extensos cordões de florestas decíduas ou semidecíduas. Outros tipos de vegetações presentes são as matas ciliares ao longo do Rio Negro (Pantanal da Nhecolândia) e Miranda (Pantanal do Miranda).

Coleta de dados

Para cada espécie estudada, foram coletados três exemplares em regiões de savana (tabela 1). As amostragens foram realizadas em março de 2010 na região de Nioaque, abril de 2010 na região de Jardim, novembro de 2010 na região de Rio Verde de Mato Grosso, dezembro de 2010 na região do Passo do Lontra, janeiro de 2011 na região da Fazenda Barranco Alto e fevereiro de 2011 na região de Campo Grande. Em cada visita

a um determinado sítio, foram feitas capturas de morcegos em três noites consecutivas. A cada noite de amostragem num mesmo sítio as redes foram armadas em locais diferentes, distantes 1 a 25 km entre si e sem o conhecimento prévio da presença de espécies de morcegos ou de recursos utilizados por morcegos. Os morcegos foram capturados com auxílio de quatro redes de neblina (duas de 2,6 x 12 m e duas 2,6 x 18 m) a cada noite de amostragem, abertas ao pôr do sol e fechadas após 6 h, totalizando esforço de 1.080 amostral em cada sítio e 6.480 m².h em todo o estudo.

Em cada sítio foram selecionados locais representativos que constituem tipo de ambiente florestal comum aos seis sítios de coleta. A identificação das espécies de morcegos foi feita no campo, com auxílio de chaves de identificação. Esses indivíduos utilizados foram aproveitados de outros projetos de levantamento cuja coleta de espécimes estava prevista como material testemunho de referência, e incorporados à Coleção Zoológica da UFMS (ZUFMS).

Extração das proteínas intestinais

Para extração de proteínas, os intestinos dos espécimes coletados foram dissecados com auxílio de estiletes sobre lâmina de vidro escavada e refrigerada em banho de gelo. Os intestinos dos morcegos sofreram incisão longitudinal e foram lavados exaustivamente com água destilada para eliminação dos resíduos. Após serem dissecados, os intestinos foram homogeneizados com Potter® e pistilo em solução de 150 mM NaCl e posteriormente centrifugado a 4° C e 10.000 rpm por 5 min. O sedimento (restos celulares do intestino) foi descartado e o material líquido contendo proteínas solúveis foi coletado e armazenado em gelo para os ensaios posteriores. A concentração total de proteínas nos intestinos foi determinada pelo método de Bradford (1976) com albumina bovina como padrão.

Eletroforese SDS-PAGE

As análises em gel SDS-PAGE (12,5%) (Eletroforese SDS-PAGE) foram realizadas conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas usadas como padrões de peso molecular foram fosforilase (94 kDa), albumina de soro de bovino (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa). As proteínas foram detectadas por coloração com 0,1% de azul brilhante de Coomassie R-250. Para padronizar os testes, foram usados 10 mg de proteína por espécie.

Análises de dados

A partir do perfil protéico de cada uma das espécies de filostomídeos, revelado pela eletroforese SDS-PAGE, foi construída uma matriz de espécies de morcegos e principais proteínas (presença ou ausência) identificadas com base em pesos moleculares. Para ordenar as espécies de acordo com a similaridade (ou dissimilaridade) de proteínas intestinais foi usado o método de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) ordenados a partir do índice de similaridade de Jaccard. Para avaliar se as espécies filogeneticamente mais próximas são mais similares quanto ao perfil protéico do intestino foi calculada a distância filogenética par-a-par entre as espécies estudadas de acordo com os valores descritos por Baker et al. (2003) (Figura 1). Posteriormente, foi testada a correlação entre a matriz de distância filogenética e a matriz de similaridade protéica através do teste de Mantel (1967).

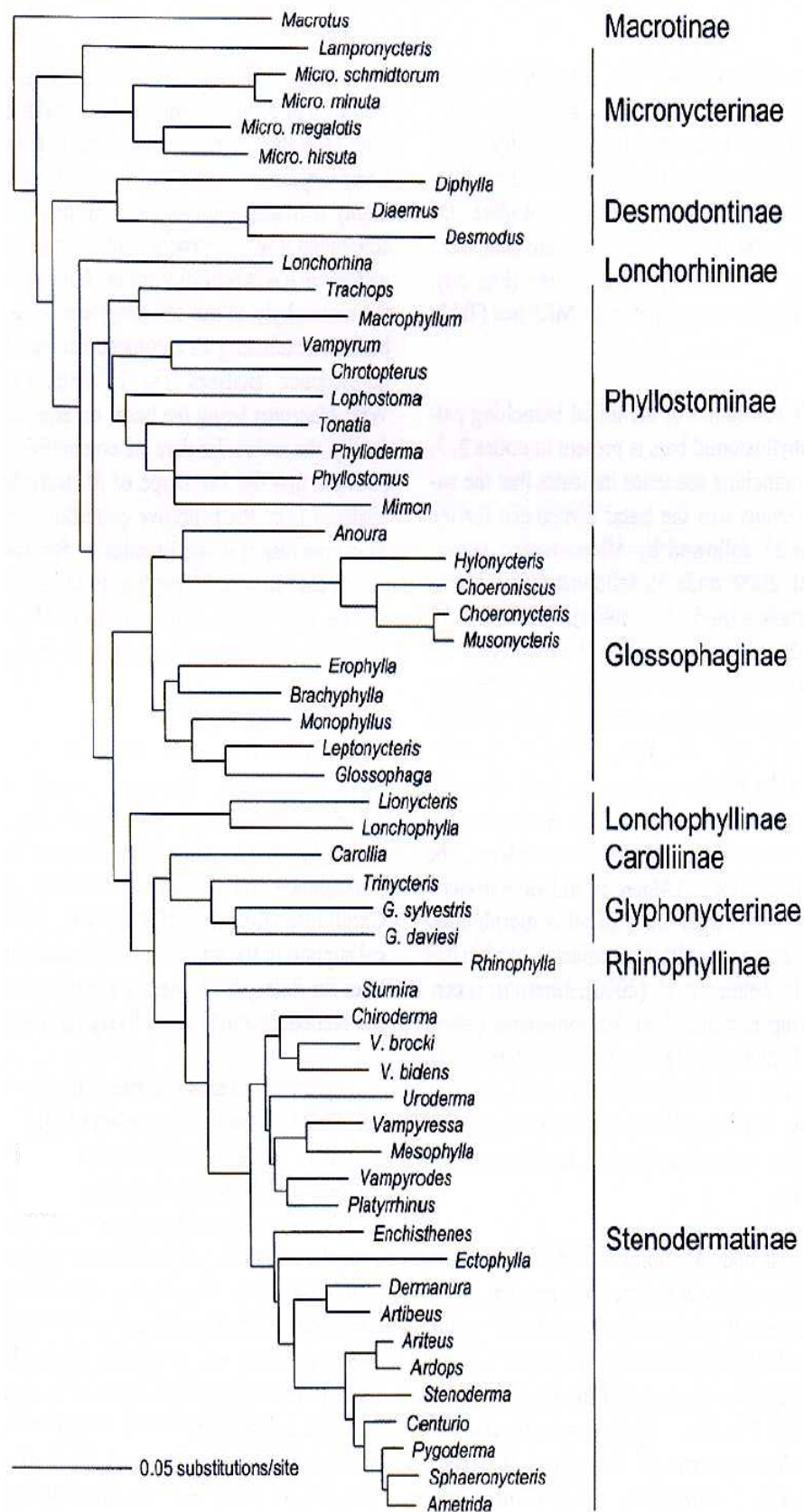


Figura 1: Distâncias filogenéticas entre as espécies da família Phyllostomidae (cf. Baker et al. 2003)

RESULTADOS

As maiores concentrações de proteína total foram registradas em intestinos de *Platyrrhinus lineatus* ($26,77 \pm 4,22$ ug/ul; n = 3), *Lophostoma brasiliense* ($19,43 \pm 1,52$ ug/ul; n = 3) e *Glossophaga soricina* ($18,45 \pm 2,26$ ug/ul; n = 3). Por outro lado, *Phyllostomus discolor* ($1,76 \pm 0,93$ ug/ul; n = 3), *Vampyressa pusilla* ($2,04 \pm 1,43$ ug/ul; n = 3) e *Micronycteris minuta* ($2,76 \pm 0,25$ ug/ul; n = 3) foram as espécies com menores concentrações de proteínas no intestino (Tabela 1).

Tabela 1: Proteína total, mensurada através do método de Bradford (1976), de 16 espécies de morcegos filostomídeos arranjados em ordem decrescente, bem como o local de coleta.

Espécies de morcegos	Concentração de proteínas (ug/ul)		Locais de coleta	
	Média (n =3)	DP (n =3)	Domínio	Local
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	26,77	4,22	Pantanal	Passo do Lontra
<i>Lophostoma brasiliense</i>	19,43	1,5	Cerrado	Nioaque
<i>Glossophagasoricina</i>	18,45	2,26	Cerrado	Campo Grande
<i>Platyrrhinus helleri</i>	13,12	2,07	Cerrado	Nioaque
<i>Sturniralilium</i>	11,28	1,2	Pantanal	Passo do Lontra
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	11,13	1,87	Cerrado	Jardim
<i>Artibeus lituratus</i>	11,09	1,4	Pantanal	Passo do Lontra
<i>Tonatia bidens</i>	10,34	1,03	Cerrado	Rio Verde
<i>Artibeus planirostris</i>	9,84	1,52	Pantanal	Passo do Lontra
<i>Chiroderma doriae</i>	9,17	1,4	Pantanal	Passo do Lontra
<i>Carollia perspicillata</i>	6,83	0,73	Cerrado	Rio Negro
<i>Anoura caudifer</i>	4,14	0,95	Cerrado	Rio Verde
<i>Micronycteris minuta</i>	2,76	0,25	Cerrado	Rio Verde
<i>Vampyressa cf. pusilla</i>	2,04	1,43	Pantanal	Barranco Alto
<i>Phyllostomus discolor</i>	1,76	0,93	Pantanal	Passo do Lontra

As análises de eletroforese SDS-PAGE do conteúdo protéico do intestino dos morcegos apresentaram bandas de 16 a 102 kDa. *Chiroderma doriae* e *G. soricina* apresentaram maior riqueza de proteínas (n = 5) e *Carollia perspicillata* e *M. minuta* foram as espécies com menor riqueza (n = 1) (Tabela 2). As espécies *L. brasiliense*

(Phyllostominae), *C. perspicillata* (Carolliinae) e *G. soricina* (Glossophaginae) apresentaram somente proteínas acima de 56 kDa, enquanto que *Pygoderma bilabiatum* (Stenodermatinae), *M. minuta* (Phyllostominae), *Anoura caudifer* (Glossophaginae), *Platyrrhinus helleri* (Stenodermatinae) e *Tonatia bidens* (Phyllostominae) somente proteínas abaixo de 52 kDa. As demais espécies – *V. pusilla* (Stenodermatinae), *P. lineatus* (Stenodermatinae) e *P. discolor* (Phyllostominae) – apresentaram tanto proteínas acima quanto abaixo de 50 kDa (Tabela 2).

A ordenação (NMDS) em uma dimensão das espécies de filostomídeos baseada no perfil protéico encontrado no intestino dos morcegos aproximou as espécies em dois grupos compostos por membros de diferentes subfamílias. Um grupo (grupo 1) foi formado pelas espécies *L. brasiliense* (Phyllostominae), *C. perspicillata* (Carolliinae), *G. soricina* (Glossophaginae), *A. planirostris* e *P. bilabiatum* (Stenodermatinae). Outro grupo (grupo 2) reuniu as espécies *M. minuta*, *T. bidens* (Phyllostominae), *S. lilium*, *C. doriae*, *A. lituratus*, *V. pusilla*, *P. lineatus*, *P. helleri* (Stenodermatinae), *P. discolor* (Phyllostominae) e *A. caudifer* (Glossophaginae) (Figura 2). Adicionalmente, dentro de cada um desses grupos ocorreram subgrupos compostos por espécies de diferentes subfamílias, como (1) *L. brasiliense* (Phyllostominae), *C. perspicillata* (Carolliinae) e *G. soricina* (Glossophaginae) e (2) *Anoura caudifer* (Glossophaginae), *P. helleri* (Stenodermatinae) e *T. bidens* (Phyllostominae); ou (3) subgrupo composto por espécies de mesma subfamília (Stenodermatinae), como *S. lilium*, *C. doriae* e *A. lituratus* (Stenodermatinae), e *V. pusilla* e *P. lineatus* (Stenodermatinae) (Figura 2).

Tabela 2: Proteínas em ordem decrescente de pesos moleculares identificadas por eletroforese SDS-PAGE em intestinos de 16 espécies de morcegos filostomídeos em regiões de Savana, Mato Grosso do Sul.

Espécies	Proteínas																k D a						
	102	96	86	82	72	70	62	59	58	56	52	50	43	41	39	32	26	25	24	23	22	21	16
<i>Artibeus lituratus</i>	■				■																		
<i>Chiroderma doriae</i>	■				■			■	■	■											■		
<i>Sturniralilium</i>	■																		■		■		
<i>Artibeus planirostris</i>		■																		■			
<i>Caroliaperspicillata</i>		■																					
<i>Lophostoma brasiliense</i>		■	■	■		■																	
<i>Glossophagasoricina</i>		■	■	■		■				■													
<i>Platyrrhinus lineatus</i>		■	■	■		■	■																
<i>Vampyressa pusilla</i>							■									■							■
<i>Phyllostomus discolor</i>							■														■		
<i>Pygoderma bilabiatum</i>											■						■			■			
<i>Anoura caudifer</i>												■	■		■		■						
<i>Platyrrhinus helleri</i>													■	■	■								
<i>Tonatia bidens</i>													■	■								■	
<i>Micronycteris minuta</i>															■								

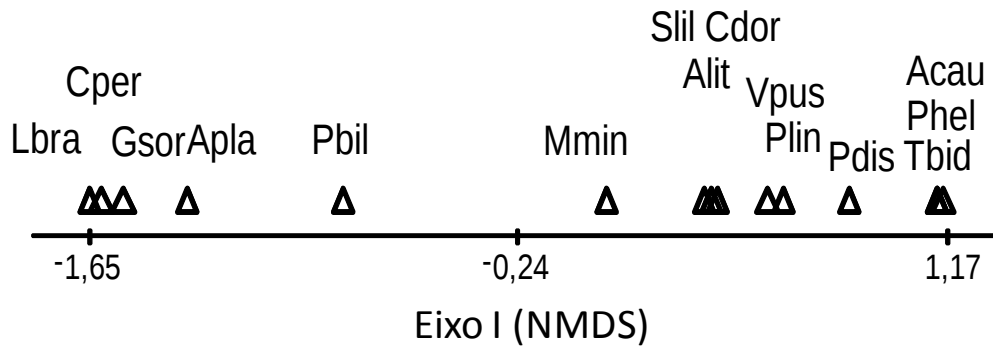


Figura 2. Ordenação em uma dimensão (NMDS: stress = 0,02, $r^2 = 0,99$) de 16 espécies de morcegos de acordo com as proteínas encontradas nos intestinos, em Savana, Brasil. Lbra = *Lophostoma brasiliense*, Cper = *Carollia perspicillata*, Gsor = *Glossophaga soricina*, Apla = *Artibeus planirostris*, Pbil = *Pygoderma bilabiatum*, Mmin = *Micronycteris minuta*, Slil = *Sturnira lilium*, Alit = *Artibeus lituratus*, Cdor = *Chiroderma doriae*, Vpus = *Vampyressa pusilla*, Plin = *Platyrrhinus lineatus*, Pdis = *Phyllostomus discolor*, Acau = *Anoura caudifer*, Phel = *Platyrrhinus helleri*, Tbid = *Tonatia bidens*.

Não houve correlação significativa ($p = 0,61$ $r = -0,047$; teste de Mantel) entre os valores da distância filogenética estimados (Tabela 3) com a distância da ordenação (Figura 2) baseada no perfil protéico das espécies estudadas. Entretanto a ordenação (NMDS) em uma dimensão mostrou que existe similaridade com relação à ingestão de proteínas de determinados pesos moleculares entre alguns membros da subfamília Stenodermatinae, como *S. lilium*, *A. lituratus*, *C. doriae*, e entre *V. pusilla* e *P. lineatus* (Figura 2).

Tabela 3: Distâncias filogenéticas, com base em Baker et al. 2003, de 16 espécies de morcegos filostomídeos. Lbra = *Lophostoma brasiliense*, Cper = *Carollia perspicillata*, Gsor = *Glossophaga soricina*, Apla = *Artibeus planirostris*, Pbil = *Pygoderma bilabiatum*, Mmin = *Micronycteris minuta*, Drot = *Desmodus rotundus*, Slil = *Sturnira lilium*, Alit = *Artibeus lituratus*, Cdor = *Chiroderma doriae*, Vpus = *Vampyressa pusilla*, Plin = *Platyrrhinus lineatus*, Pdis = *Phyllostomus discolor*, Acau = *Anoura caudifer*, Phel = *Platyrrhinus helleri*, Tbid = *Tonatia bidens*.

Espécies	Substituição/site														
	P. lin	G. sor	L. bra	P. bil	P. hel	T. bid	A. cau	M. min	A. pla	C. per	S. lil	A. lit	C. dor	V. pus	D. rot
<i>Glossophagasoricina</i>	0,178														
<i>Lophostoma brasiliense</i>	0,193	0,193													
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	0,097	0,203	0,218												
<i>Platyrrhinus helleri</i>	0,039	0,178	0,193	0,097											
<i>Tonatia bidens</i>	0,185	0,185	0,158	0,210	0,185										
<i>Anoura caudifer</i>	0,181	0,147	0,204	0,206	0,181	0,188									
<i>Micronycteris minuta</i>	0,214	0,214	0,213	0,239	0,214	0,204	0,217								
<i>Artibeus planirostris</i>	0,082	0,188	0,203	0,076	0,082	0,194	0,190	0,224							
<i>Caroliaperspicillata</i>	0,142	0,169	0,185	0,167	0,142	0,176	0,172	0,206	0,151						
<i>Sturniralilium</i>	0,114	0,186	0,201	0,139	0,114	0,193	0,189	0,222	0,124	0,150					
<i>Artibeus lituratus</i>	0,082	0,188	0,203	0,076	0,082	0,194	0,190	0,224	0,033	0,151	0,124				
<i>Chiroderma doriae</i>	0,064	0,181	0,196	0,100	0,064	0,188	0,183	0,217	0,085	0,144	0,117	0,085			
<i>Vampyressa cf Pusilla</i>	0,061	0,189	0,204	0,108	0,061	0,196	0,192	0,231	0,093	0,153	0,125	0,093	0,075		
<i>Desmodusrotundus</i>	0,300	0,275	0,274	0,300	0,300	0,265	0,278	0,261	0,285	0,267	0,283	0,285	0,275	0,286	
<i>Phyllostomus discolor</i>	0,188	0,188	0,161	0,213	0,188	0,136	0,190	0,207	0,189	0,179	0,196	0,189	0,190	0,199	0,268

DISCUSSÃO

A concentração de proteína total registrada em intestinos de morcegos filostomídeos indica que *P. lineatus*, *L. brasiliense* e *G. soricina* possuem dieta com maior proporção de proteínas quando comparado com as outras espécies em estudo. Esse resultado é coerente com a grande proporção de pólen e artrópodes que estas espécies consomem no local de estudo (Munin2012), ou seja, com a diversidade de itens alimentares que inclui componentes animais e vegetais. Comparativamente a outras espécies de filostomídeos da região de estudo, essas três espécies incluem aproximadamente sete vezes mais pólen e cinco vezes mais artrópodes em suas dietas (Munin 2012). Além disso, os frutos de *Ficus* spp. consumidos em grandes quantidades por *P. lineatus* apresentam maior porcentagem de proteínas e aminoácidos que outros frutos consumidos por outras espécies (Wendeln et al. 2000). Também no local de estudo, *G. soricina* consome pólen de 10 espécies vegetais e insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Thysanoptera; e *L. brasiliense* apresenta dieta fortemente insetívora, consumindo principalmente Coleoptera e Orthoptera, (Munin 2012).

A riqueza de proteínas, revelada pela eletroforese SDS-PAGE, do conteúdo protéico do intestino das espécies de morcegos estudadas, mostrou que existem espécies de morcegos mais generalistas quanto ao consumo de itens protéicos, pois apresentam proteínas de pesos moleculares diferentes, como é o caso de *C. doriae* e *G. soricina* que obtiveram proteínas de cinco pesos moleculares diferentes. *Chiroderma doriae* é considerado frugívoro, especialista em frutos de *Ficus* spp. e possui comportamento de ingestão atípico (Nogueira & Peracchi 2002) podendo consumir várias espécies de *Ficus* em determinada região (Nogueira & Peracchi 2002, 2003). *Glossophaga soricina* é considerado generalista por apresentar uma ampla gama de itens em sua dieta. De acordo com Munin (2012), na região de estudo *G. soricina* pode se alimentar de

recursos florais de 10 espécies vegetais além de quatro espécies de frutos, e predar artrópodes de quatro ordens. Por outro lado, *C. perspicillata* e *M. minuta* podem ser consideradas especialistas, pois os ensaios mostraram somente proteínas de um peso molecular. *C. perspicillata* é destacadamente uma espécie consumidora de frutos de *Piper* spp. (Marinho-Filho 1991), sendo que no local de estudo 73 % da sua dieta é baseada na ingestão de frutos desse gênero (Munin 2012). Apesar da baixa captura no local de estudo, *M. minuta*, apresentou somente artrópodes da ordem Lepidoptera em sua dieta, resultado que apoia a possibilidade de dieta especializada.

A similaridade quanto às proteínas intestinais entre as espécies de filostomídeos reunidas no grupo 1 (*L. brasiliensis*, *C. perspicillata*, *G. soricina*, *A. planirostris* e *P. bilabiatum*) pode ser explicada pela sobreposição entre elas quanto ao consumo de Coleóptera, a ordem de artrópode mais abundante na região (Munin 2012). Por outro lado, a similaridade entre os filostomídeos que compuseram o grupo 2 (*M. minuta*, *S. liliun*, *A. lituratus*, *C. doriae*, *V. pusilla*, *P. lineatus*, *P. discolor*, *A. caudifer*, *P. helleri*, *T. bidens*), pode ser devido à sobreposição entre elas quanto ao consumo de Lepidóptera, a segunda ordem de artrópodes mais abundante na região (Munin 2012).

A similaridade quanto às proteínas intestinais entre as espécies de diferentes subfamílias – *L. brasiliensis* (Phyllostominae), *G. soricina* (Glossophaginae) e *C. perspicillata* (Carollinae) subgrupo 1 e *A. caudifer* (Glossophaginae), *P. helleri* (Stenodermatinae) e *T. bidens* (Phyllostominae) subgrupo 2 – indica que alguns recursos protéicos podem ser usados por espécies de morcegos filogeneticamente distantes. Na região de estudo, espécies do subgrupo 1 sobrepõem suas dietas com relação ao consumo de Hymenoptera e Hemiptera (Munin 2012). *Carollia perspicillata* e *G. soricina* sobrepõe suas dietas por consumirem frutos de *Ficus crocata* (Moraceae), e recursos florais de *Bauhinia unguolata*, *Hymenaea courbaril* (Fabaceae),

Pseudobombax longiflorum (Malvaceae), *Psittacanthus corynocephalus* (Loranthaceae) e artrópodes como Hymenoptera e Hemiptera (Munin 2012). A similaridade entre as espécies do subgrupo 2 pode ser explicada pela sobreposição no consumo de Lepidoptera (Nogueira et al. 2003, Oprea et al. 2009).

A presença de subgrupos compostos apenas por espécies da subfamília Stenodermatinae indica forte sobreposição de fontes de proteínas entre elas e, portanto, entre espécies que são filogeneticamente próximas. As espécies de stenodermatíneos do subgrupo 3 (*S. liliun*, *C. doriae* e *A. lituratus*) possuem morfologia dental e cranial muito semelhantes, são freqüentemente capturadas juntas e próximas às mesmas fontes de frutos (Oprea & Wilson 2008), principalmente *Ficus* spp. na região de estudo, ou mesmo em outros locais (Giannini & Kalko 2004, Oprea & Wilson 2008, Munin et al. 2012, Munin 2012). Na região de estudo, *S. liliun* e *A. lituratus* também sobrepõem suas dietas com respeito ao consumo de pólen de *Bauhinia unguolata* (Fabaceae) e à predação de Lepidoptera (Munin 2012). As espécies do subgrupo 4 (*V. pusilla* e *P. lineatus*), além da morfologia semelhante, são consideradas consumidoras assíduas de *Ficus* spp. (Giannini & Kalko 2004).

A sobreposição quanto aos itens alimentares consumidos pelos morcegos Stenodermatinae pode ocorrer sem levar à competição interespecífica (ver Fleming 1986), pois os recursos utilizados não parecem limitados. As figueiras possuem estratégia de frutificação explosiva e por pouco tempo, produzindo mais frutos do que a fauna é capaz de consumir (Kalko et al. 1996). Essa estratégia é confirmada pela grande quantidade de infrutescências maduras (sicônios) que caem da planta pela gravidade por não terem sido consumidos pelos dispersores (Figueiredo & Perin 1995, Wendeln et al. 2000, Shanahan et al. 2001). Flores de *Bauhinia unguolata* também representam recurso muito abundante na região de estudo. Essa espécie pioneira ocupa amplamente áreas

abertas e produz grande densidade de flores por longo tempo (Fischer 1992). Adicionalmente, outro item alimentar compartilhado pelas espécies de stenodermátíneos são espécies de Lepidoptera, segunda ordem de artrópode mais abundante na região de estudo; correspondem a 24 % da biomassa de insetos disponíveis (Munin 2012). Portanto, a abundância desses recursos na região de estudo pode permitir a forte sobreposição de itens alimentares entre espécies da subfamília Stenodermatinae, que provavelmente não competem por esses recursos e devem ter suas populações limitadas por outros fatores (Magurran 2004).

Morcegos filostomídeos são altamente especializados quanto ao tipo de alimento, e aqueles especializados em recursos cuja oferta é muito abundante, como frutos de *Ficus*, podem co-ocorrer e sobrepor suas dietas. Por outro lado, espécies especializadas em recursos escassos podem co-ocorrer com mais frequência com espécies que diferem quanto à dieta principal, evitando sobreposição (Dumont 2003). A exploração de diferentes fontes de proteínas, conforme encontrado nesse estudo, pode ser resultado de estratégia de partição de recursos pouco abundantes para diminuir ou evitar a competição interespecífica, e de sobreposição de consumo de itens muito abundantes, que não parecem ser limitantes para espécies de stenodermátíneos, embora filogeneticamente próximas.

O perfil protéico dos intestinos das espécies de morcegos estudados não apresentou associação com a distância filogenética. Portanto, a composição das proteínas do intestino não parece ser uma característica conservada através das linhagens de filostomídeos. Porém, algumas espécies filogeneticamente próximas e pertencentes à subfamília Stenodermatinae apresentaram sobreposição quanto ao perfil protéico do intestino, isso indica que o perfil protéico é uma característica não que tende a ser conservada nas linhagens de morcego. Embora tenham capacidade de explorar

diferentes recursos protéicos, os stenodermatíneos apresentam semelhança de dieta devido à oferta abundante dos itens alimentares principais. Com isso, a competição interespecífica por recursos alimentares pode ser reduzida entre espécies de filostomídeos filogeneticamente próximas, permitindo a coexistência de espécies do mesmo gênero.

LITERATURA CITADA

- Arlettaz, R, Perrin, N. & Hausser, J. (1997) Trophic resource partitioning and competition between the two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii*. *Journal of Animal Ecology*, **66**, 897-911.
- Baker, R.J., Hoofer S.R., Porter, C.A., & Van den bussche, R.A. (2003) diversification among New World Leaf-Nosed Bats: An Evolutionary hypotheses and classification inferred from digenomic congruence of DNA Sequence. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, **230**, 1-2.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Clare, E. L., Fraser E. E., Braid H. E., Fenton, M. B. & Hebert, P. D. N. (2009) Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): Using a molecular approach to detect arthropod prey. *Molecular Ecology*, **18**, 2532–2542.
- Dumont, E. (2003) Bats and fruit: An ecomorphological approach. *Bat Ecology* (eds T. H. Kunz & M. B. Fenton), pp 398–429. University of Chicago Press, Chicago.
- Figueiredo, R.A., Perin, E. (1995) Germination ecology of *Ficus luschnathiana* drupelets after bird and bat ingestion. *Acta Oecologia*, **16**, 71–75.

- Fischer, E. (1992). Foraging of nectarivorous bats on *Bauhinia unguolata*. *Biotropica*, **24**, 579-582.
- Fleming, T. H., Hooper, E. T. & Wilson, D. E. (1972). Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology*, **53**, 555-569.
- Fleming, T.H. (1986) Opportunism versus specialization: the evolution of feeding strategy in frugivorous bats. *Frugivores and seed dispersal* (eds A. Estrada, & T.H. Fleming), Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Fleming, T.H. (1991) The relationship between body size, diet, and habitat use in frugivorous bats, genus *Carollia* (Phyllostomatidae). *Journal of Mammalogy*, **72**(3), 493-501.
- Gardner, A.L. (1977) Feeding habits. *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae. Part II.* (eds R.J. Baker, J. Jones, J. Knox & D. C. Carter), 293-350. Special Publications The Museum Texas Tech University.
- Herrera, L. G., Gutierrez E., Hobson K. A., Altube B., Díaz, W. G. & Sánchez-Cordero, V. (2002) Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats. *Oecologia*, **133**, 280–287.
- Kalko, E.K.V., Herrera, E.A. & Handley Jr, C.O. (1996). Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the New and Old World tropics. *Journal of Biogeography*, **23**, 565-576.
- Karasov, W.H. & Martinez del Rio, C. (2007) *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Kunz, T. H. & Diaz, C. A. (1994) Folivory in fruit-eating bats, with new evidence from *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biotropica*, **72**, 106–120.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680-685.
- Magurran, A. E. (2004) *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 493-501.
- Marinho-Filho, J.S. (1991) The coexistence of two frugivorous bat species and the phenology of their food plants in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **7**, 59-67.
- Moreno, C. M., Arita, H. T. & Solis, L. (2006). Morphological assembly mechanisms in Neotropical bat assemblages and ensembles within a landscape. *Oecologia*, **149**, 133–140.
- Munin, R.L. (2012) *Efeito da disponibilidade de recursos alimentares sobre a diversidade e a composição de espécies de morcegos filostomídeos em regiões do Pantanal e do Cerrado*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso d Sul.
- Munin, R.L., Fischer, E., & Gonçalves, F. (2012) . Food habits and dietary overlap in a phyllostomid bat assemblage in the Pantanal of Brazil. *Acta Chiropterologica*, **14**, 195-204.
- Nogueira, M.R. & Peracchi, A. L. (2002) The feeding specialization in *Chiroderma doriae* (Phyllostomidae, Stenodermatinae) with coments on its conservation implications. *Chiroptera Neotropical*, **8**, 143-148.
- Nogueira, M.R. & Peracchi, A. L. (2003) Fig-seed predation by two species of *Chiroderma*: discovery of a new feeding strategy in bats. *Journal of Mammalogy*, **84**, 225-233.
- Giannini, N.P. & Kalko E.K.V. (2004) Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos*, **105**, 209-220.

- Oprea, M. & Wilson, D.E. (2008) *Chiroderma Doriae* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mammalian Species*, **816**, 1.
- Oprea, M., Esberard C.E.L., Vieira T.B., Mendes P., Pimenta V.T. ; Brito, D.& Ditchfield, A.D. (2009) Bat community species richness and composition in a restinga protected area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **69**, 1073-1079.
- PCBAP (1997) Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal). *Análise integrada e prognóstico da Bacia do Alto Paraguai*, Volume III. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal.
- Rex, K., Kelm D., Wiesner K., Kunz, T.H. & Voigt C.C., (2008) Species richness and structure of three Neotropical bat assemblages. *Biological Journal of the Linnean Society*, **94**, 617–629.
- Shanahan, M., So S., Compton S.G., & Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological Reviews*, **76**, 529-572.
- Wendeln, M.C., Runkle, J.R. & Kalko, E.K.V. (2000) Nutritional values of 14 fig species and bat feeding preferences in Panama. *Biotropica*, **32**, 489–501.
- Wetterer, A.L., Rockman, M.V. & Simmons, N.B. (2000) Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *The Bulletin of the American Museum of Natural History*, **248**, 1-200.
- White, R.C.T. (1993) The inadequate environment. Nitrogen and the abundance of animals. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Dieta proteica e atividade triptica em morcegos filostomídeos de Savana, Mato Grosso do Sul

Resumo

A tripsina é uma enzima que atua na digestão de proteínas e sua atividade pode, ou não, ser ajustada de acordo com o tipo de substrato alimentar ingerido, de modo que os organismos não produzam enzimas em excesso ou em quantidades abaixo do necessário. Os objetivos deste trabalho são descrever a presença e a atividade da enzima tripsina em 15 espécies de morcegos filostomídeos e testar a hipótese de que morcegos filostomídeos possuem capacidade de modular a produção da enzima tripsina em função da proporção de proteínas na dieta. Os espécimes foram coletados em seis regiões de Savana e seus intestinos dissecados para extração de proteínas e posteriormente analisados através do ensaio triptico. Adicionalmente, as amostras fecais foram verificadas e classificadas em “não proteica” e “proteica” e realizada regressão linear simples entre a atividade da enzima tripsina e a proporção de “dieta proteica”. Houve relação significativa entre a atividade da enzima tripsina no intestino dos morcegos filostomídeos e a porcentagem de itens protéicos na dieta. A atividade da enzima tripsina foi maior em intestinos de *Tonatia bidens*, *Lophostoma brasiliense* e *Glossophaga soricina*. *Tonatia bidens* e *L. silviculum* foram as espécies que apresentaram dieta 100% proteica. Morcegos filostomídeos possuem capacidade de modular a produção da enzima tripsina de acordo com a porcentagem de proteína ingerida. O custo metabólico para manter elevadas concentrações de tripsina pode gerar forte pressão seletiva para modulação da sua produção, pois o gasto energético para a síntese e manutenção de grandes quantidades de enzima seria perdido por aqueles animais que possuem níveis baixos de determinado substrato na dieta.

Palavras chaves: 1) Hidrolise 2) Modulação 3) Dieta Protéica

Protein diet and tryptic activity in phyllostomidae bats of savanna region, Mato Grosso do Sul

Abstract

Trypsin is an enzyme that works on protein digestion and this activity may, or may not, be adjusted according to the type of feeding substrate ingested, so the organisms do not overproduce or under produce enzymes. This essay goals are to describe the trypsin enzyme presence and production in 15 phyllostomidae bats species, and test the following hypothese: phyllostomidae bats are able to modulate trypsin enzyme production according to the diet protein proportion. Samples were collected in six savanna regions and had their intestines dissected for protein extraction, and then analyzed through tryptic testing. Moreover, faecal sample were verified and classified in “non-proteinic” and “proteinic”. Simple linear regression was carried out between trypsin enzyme and “proteinic diet” proportion. There was meaningful relation between trypsin enzyme activity in phyllostomidae bats intestines and proteinic items percentage on the diet. Trypsin enzyme activity was greater in intestines of *Tonatia bidens*, *Lophostoma brasiliense* and *Glossophaga soricina*. *Tonatia bidens* and *L. silviculum* were the species that showed a 100% protein diet. Phyllostomidae bats are able to modulate trypsin enzyme production according to protein percentage ingested. The metabolic cost to keep high trypsin concentrations might generate strong selective pressure for its production modulation, for the energy expenditure for synthesis and maintenance of large enzyme quantities would be wasted by those animals which have low substrate levels on their diet.

Key words: 1) Hydrolysis 2) Modulation 3) Protein Diet

INTRODUÇÃO

A grande diversidade de peptídeos e aminoácidos torna complexo o processo de digestão de proteínas por animais vertebrados. O processo chave para a digestão de proteínas é mediado por enzimas proteolíticas secretadas pelo pâncreas, que auxiliam diretamente a digestão e ativam outras enzimas intestinais (Karasov & Hume 1997). Dentre essas enzimas, destaca-se a tripsina que é encontrada nos sistemas digestivos de muitos vertebrados que necessitam hidrolisar e absorver proteínas (Rawlings & Barrett 1994). A tripsina é produzida no pâncreas como tripsinogênio inativo e se torna ativa quando chega ao duodeno, onde atua na hidrólise de peptídeos, quebrando em moléculas menores. Após esse processo, o peptídeo será hidrolisado em aminoácidos por outras enzimas proteolíticas e por último absorvido pelo sistema sanguíneo. Portanto, a atividade da tripsina tem papel fundamental no processo de hidrólise e consequentemente na absorção de proteínas, pois essas moléculas são grandes para serem absorvidas pelo intestino (Polgár 2005). A variação da presença e atividade de tripsina no intestino dos vertebrados podem revelar adaptações dos organismos para diferentes fontes de alimentos, hábitos alimentares e estratégias de vida (Starck & Wang, 2005; Karasov & Martinez del Rio, 2007; Karasov et al., 2011).

Muitos animais vertebrados apresentam habilidade em modular a produção e a quantidade da tripsina (Kohl et al. 2011; Ramirez-Otarola et al. 2011), uma característica importante para otimizar o gasto energético. A atividade das enzimas digestivas pode ser ajustada de acordo com o tipo de substrato alimentar ingerido, de modo que os organismos não produzam enzimas em excesso ou em quantidades abaixo do necessário (hipótese da modulação adaptativa, de Karasov & Diamond 1988). Seguindo esse princípio, a atividade da enzima tripsina pode ser modulada pela quantidade de proteínas que o indivíduo ingere (Weibel 2000). Esse mecanismo permite

aumento ou redução da concentração de tripsina conforme o consumo de proteínas, além de controlar a taxa de absorção e a velocidade de digestão (Karasov & Hume 1997). Portanto, animais que conseguem modular as enzimas digestivas de acordo com a dieta podem balancear o custo de produção de enzimas e o benefício de alcançar absorção máxima dos itens consumidos (Caviedes-Vidal et al. 2000), otimizando assim o gasto metabólico para síntese e manutenção de enzimas digestivas. A digestão rápida com baixo custo energético pode ser especialmente importante para os morcegos devido à grande demanda energética para o voo (Caviedes-Vidal et al. 2007).

Entretanto, não são todos os vertebrados que apresentam capacidade de modular a produção de enzimas digestivas (Karasov & Hume 1997). Uma hipótese é que essa habilidade tenha sido desenvolvida por espécies generalistas, que podem mudar frequentemente os itens alimentares de acordo com a disponibilidade no ambiente (Buddington et al. 1992; Afik et al. 1995). Com base nessa hipótese é possível esperar que morcegos da família Phyllostomidae sejam capazes de modular a produção de enzimas digestivas, uma vez que muitas delas consomem diferentes tipos de recursos conforme a disponibilidade no ambiente (Fleming 1986). Algumas espécies consomem principalmente itens com alta porcentagem de proteínas, como insetos, pólen, folhas e pequenos vertebrados (Redford & Dorea 1984; Munin et al. 2012, Gonçalves et al. 2007). Outras apresentam dieta pouco proteica, baseada principalmente em néctar e/ou frutos (Nogueira et al. 2007, Gonçalves et al. 2007, Munin et al. 2012).

Uma vez que a tripsina é mediadora da digestão de itens alimentares protéicos, caso ocorra modulação de produção de tripsina é esperada relação positiva entre a proporção de proteínas na dieta de filostomídeos e a atividade da enzima tripsina. Caso contrário, não haveria relação positiva entre a porcentagem de proteínas na dieta dos morcegos filostomídeos com a atividade da enzima tripsina, como demonstrado para outros mamíferos (Kohl et al. 2011, Ramirez-Otarola et al. 2011). Os objetivos deste trabalho são descrever a presença e a atividade da enzima tripsina em 15 espécies de morcegos

filostomídeos e testar a seguinte hipótese: (1) morcegos filostomídeos possuem capacidade de modular a produção da enzima tripsina em função da proporção de proteínas na dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de estudo

Os espécimes foram coletados em regiões de Cerrado e Pantanal no estado do Mato Grosso do Sul (tabela 1). O Pantanal brasileiro compreende aproximadamente 140.000 km², constituindo a maior planície inundável da Terra e, com exceção das regiões de dunas costeiras, é a formação geológica mais recente da América do Sul (Godoi Filho 1986). O clima é do tipo Aw de Köppen (PCBAP 1997), com estações seca e úmida bem definidas. As chuvas são concentradas de novembro a março, com picos em dezembro e janeiro (Allem & Valls 1987). A pluviosidade média varia de 1000 a 1400 mm por ano (Alfonsi & Camargo 1986). O regime hidrológico é caracterizado por um ciclo anual de cheia e vazante. No Pantanal, os estudos foram desenvolvidos em duas regiões: (1) Passo do Lontra (19° 34' S, 57° 20' W) no Pantanal do Miranda e (2) Barranco Alto (19° 34' S, 56° 09' W) no Pantanal da Nhecolândia. A região do Pantanal da Nhecolândia é caracterizada pela presença de lagos circundados por extensos cordões de florestas decíduas ou semidecíduas, denominados cordilheiras (Adamoli 1987). A região do Pantanal do Miranda é caracterizada pela presença de “capões”, que compreendem manchas (0,2 a 4 ha) de floresta semidecídua com formato esférico-elíptico, circundadas por campos sazonalmente inundáveis (Araujo & Sazima 2003). Outros ambientes florestais presentes em ambas as regiões são as matas ciliares ao longo do rio Negro (Pantanal da Nhecolândia) e Miranda (Pantanal do Miranda).

Os remanescentes de vegetação natural de Cerrado no Mato Grosso do Sul encontram-se fragmentados, isolados e constituído por vegetação xeromórfica de

fisionomia diversificada e composição florística bastante heterogênea. Os fragmentos existentes encontram-se invariavelmente degradados, porém ainda podemos encontrar espécies características das Florestas Aluviais com influência do Cerradão. O clima dos remanescentes de entorno é mais úmido quando comparado ao do Pantanal. A pluviosidade média varia de 1000 a 1600 mm. As temperaturas variam de 25 a 32 °C no verão e de 8 a 17 °C no inverno (PCBAP 1997). Os estudos foram realizados nos remanescentes de Cerrado próximos as cidades de Nioaque (21° 04' S, 55° 40' W), Campo Grande (20° 26' S, 54° 38' W), Jardim (22° 18' S, 56° 09' W) e Rio Verde de Mato Grosso (18° 30' S, 54° 30' W).

Coleta de dados

As amostragens foram realizadas em março de 2010 na região de Nioaque, abril de 2010 na região de Jardim, novembro de 2010 na região de Rio Verde de Mato Grosso, dezembro de 2010 na região do Passo do Lontra, janeiro de 2011 na região da Fazenda Barranco Alto e fevereiro de 2011 na região de Campo Grande. Em cada visita a um determinado sítio, foram feitas capturas de morcegos em três noites consecutivas. A cada noite de amostragem num mesmo sítio as redes foram armadas em locais diferentes, distantes 1 a 25 km entre si e sem o conhecimento prévio da presença de espécies de morcegos ou de recursos utilizados por morcegos. Os morcegos foram capturados com auxílio de quatro redes de neblina (duas de 2,6 x 12 m e duas 2,6 x 18 m) a cada noite de amostragem, abertas ao pôr do sol e fechadas após 6 h, totalizando esforço de 1.080 amostral em cada sítio e 6.480 m².h em todo o estudo.

Em cada sítio foram selecionados locais representativos que constituem tipo de ambiente florestal comum aos seis sítios de coleta. Os morcegos capturados foram acondicionados e mantidos em sacos de pano por pelo menos 45 min, período

considerado suficiente para defecarem caso tenham se alimentado antes da captura (Studier et al. 1983). As amostras fecais foram coletadas e acondicionadas individualmente em microtubos herméticos contendo glicerina, para posterior identificação do conteúdo fecal. Os sacos de pano foram utilizados apenas uma vez por expedição, e foram lavados e escovados entre expedições. A identificação das espécies de morcegos foi feita no campo, com auxílio de chaves de identificação. As amostras fecais foram inspecionadas em laboratório com auxílio de estereomicroscópio para registrar a presença de sementes, polpa de fruto, artrópodes e folhas e com auxílio de microscópio para registrar a presença de pólen.

Extração do conteúdo intestinal

Foram sacrificados três indivíduos de cada espécie de morcegos filostomídeos estudadas e posteriormente incluídos na coleção ZUFMS-M como testemunhos. Os intestinos desses indivíduos foram retirados e dissecados sobre lâmina de vidro escavada e refrigerada em banho de gelo, com auxílio de estilete. Após incisão longitudinal os intestinos foram lavados exaustivamente com água destilada para eliminação de resíduos. Os intestinos foram então macerados e homogeneizados com Potter® e pistilo em solução de 150 mM NaCl e posteriormente centrifugados a 4° C e 10.000 rpm durante 5 min. O sedimento (restos celulares do intestino) foi desprezado e o material líquido (proteína solúvel) coletado e mantido em gelo para os ensaios.

Ensaio para determinar atividade da enzima tripsina

A determinação da presença e atividade da enzima tripsina foi realizada segundo o método de Erlanger *et al.* (1961) e o material líquido (proteína solúvel) dos três intestinos foi misturado para obter maior precisão nos ensaios. Uma mistura pré-

incubada por 10 min a 37°C contendo 0,0133 M de tampão Tris-HCl pH 8. Em seguida, foi adicionado 500 µl de solução 0,01M de N- α -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8; durante mais 20 min a 37°C. Ao término desse período, a reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). A hidrólise do substrato pela tripsina foi então mensurada em espectrofotômetro com a leitura 81 a 410 nm.

Análise dos dados

As amostras foram classificadas, com base no conteúdo fecal, em (1) “não proteica” quanto continham frutos (presença de sementes) ou polpa e (2) “protéica” quanto tinha restos de artrópodes, pólen e folhas e posteriormente calculada a porcentagem de cada amostra. Para diminuir a variação na dieta entre os sítios amostrais, usamos apenas as amostras fecais do local e período onde os espécimes foram coletados para análise do conteúdo intestinal. Para testar se morcegos filostomídeos modulam a produção de enzimas positivamente em função da proporção de proteína na dieta, foi realizada regressão linear simples entre a atividade da enzima tripsina e a proporção de “dieta proteica”. Para essa análise os valores foram transformados em log₁₀.

RESULTADOS

A atividade da enzima tripsina foi maior em intestinos de *Tonatia bidens* (0,224 nM BAPNA/min/ugP), *Lophostoma brasiliense* (0,208 nM BAPNA/min/ugP) e *Glossophaga soricina* (0,104 nM BAPNA/ min/ ugP). Ao passo que, *Micronycteris minuta* (0,009 nM BAPNA/ min/ ugP), *Artibeus planirostris* (0,009 nM BAPNA/ min/ ugP) e *Anoura caudifer* (0,003 nM BAPNA/ min/ ugP) foram as espécies que apresentaram menor atividade dessa enzima (Tabela 1).

De acordo com as amostras fecais, *Tonatia bidens* e *L. silviculum* foram as espécies que apresentaram dieta 100% proteica; consumiram artrópodes e pólen no período estudado e *P. lineatus* e *A. planirostris* foram as espécies que consumiram menor porcentagem de itens considerados “não protéicos”, 20% e 17% respectivamente, consumindo grande quantidade de frutos no período (Tabela 1).

Houve relação significativa ($P \leq 0,05$ e $R^2 = 0,85$) entre a atividade da enzima tripsina no intestino dos morcegos filostomídeos e a porcentagem de itens protéicos na dieta (Figura 1).

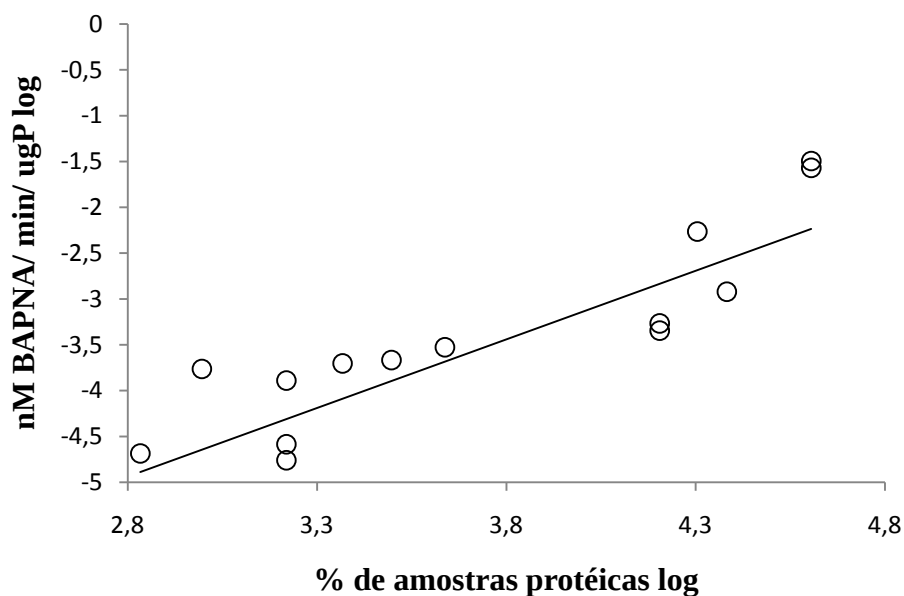


Figura 1: Relação entre a atividade da enzima tripsina com a porcentagem de amostras fecais protéicas em 15 espécies de morcegos filostomídeos em regiões de savana, Mato Grosso do Sul ($P \leq 0,05$ e $R^2 = 0,85$)

Tabela 1. Porcentagem de amostras fecais proteicas (pólen, artrópodes e folhas), não proteicas (frutos e polpa) e atividade da enzima tripsina, arranjadas em ordem decrescente, no intestino de 15 espécies de morcegos filostomídeos em regiões de Savana, Mato Grosso do Sul.

Morcegos	Amostras não proteicas		Amostras proteicas			Atividade da Tripsina (nM BAPNA/ min/ ugP)	Locais de coleta		Total de amostras fecais
	frutos	polpa	insetos	pólen	folhas		Domínio	Local	
<i>Tonatia bidens</i>			80%	20%		0,224	Cerrado	Rio Verde	3
<i>Lophostoma brasiliense</i>			100%			0,208	Cerrado	Nioaque	3
<i>Glossophaga soricina</i>	26%		14%	60%		0,104	Cerrado	Campo Grande	23
<i>Carolia perspicillata</i>	20%		50%	30%		0,053	Pantanal	Rio Negro	33
<i>Artibeus lituratus</i>	33%	33%		33%		0,038	Pantanal	Passo do lontra	3
<i>Chiroderma doriae</i>	33%		33%	33%		0,035	Pantanal	Passo do lontra	3
<i>Sturnira lilium</i>	62%		29%	9%		0,029	Pantanal	Passo do lontra	21
<i>Vampyressa Pusilla</i>	67%		30%		3%	0,025	Pantanal	Barranco Alto	3
<i>Phyllostomus discolor</i>	35%	35%		30%		0,024	Pantanal	Passo do lontra	7
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	80%		10%	10%		0,023	Pantanal	Passo do lontra	20
<i>Platyrrhinus helleri</i>	75%		25%			0,020	Cerrado	Nioaque	4
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	75%		25%			0,010	Cerrado	Jardim	4
<i>Artibeus planirostris</i>	83%		10%	5%	2%	0,009	Pantanal	Passo do lontra	30
<i>Micronycteris minuta</i>	75%		25%			0,008	Cerrado	Rio Verde	4
<i>Anoura caudifer</i>	40%	20%	30%	10%		0,003	Cerrado	Rio Verde	5

DISCUSSÃO

A presença da enzima tripsina no trato digestivo mostra a capacidade das espécies estudadas em hidrolisar ligações peptídicas, assim como reportados para algumas espécies de morcegos do velho mundo (Ogunbiyi & Okon 1976), porém até este trabalho não reportado para morcegos neotropicais. Os resultados indicam que diferentes níveis de atividade da tripsina estão positivamente relacionados à variação da quantidade de proteínas ingeridas pelas espécies, uma vez que a atividade dessa enzima foi maior em espécies que incluíram maior proporção de itens protéicos na dieta. Essa diferença na atividade implica em diferentes taxas de absorção de nutrientes e tempo de digestão (Karasov & Hume 1997; Karasov et al. 2011).

A relação positiva entre a atividade da enzima tripsina e a proporção de itens protéicos na dieta sustenta que espécies de morcegos filostomídeos possuem capacidade de modular a produção dessa enzima de acordo com a porcentagem de proteína ingerida. Muitos estudos têm encontrado relação entre a atividade de enzimas digestivas e os substratos presentes na dieta, em ambos os níveis intra e inter-específico (Karasov & Hume 1997, Infante e Cahu 2007, Karasov et al. 2011, Liu et.al. 2012).

O custo metabólico para manter elevadas concentrações de tripsina pode gerar forte pressão seletiva para modulação da sua produção, pois o gasto energético para a síntese e manutenção de grandes quantidades de enzima seria perdido por aqueles animais que possuem níveis baixos de determinado substrato na dieta (Karasov & Diamond 1988; Diamond 1991; Diamond & Hammond 1992; Hammond et al. 1996). No geral, morcegos filostomídeos mostraram plasticidade na atividade da enzima tripsina, sendo regulada pela porcentagem de proteína na dieta. Se a variação da concentração de proteína na dieta mudar mais rapidamente do que a resposta da enzima tripsina, ou se a concentração de proteína na dieta nunca decair abaixo de um limite que

regularia a atividade da enzima, a seleção natural pode favorecer níveis constitutivos de enzimas. Este fenômeno evolutivo pode ser aplicável não só para a plasticidade fisiológica, mas também para qualquer tipo de plasticidade fenotípica (Padilla & Adolph 1996).

CONCLUSÕES

Morcegos filostomídeos sobrepõem os recursos alimentares e consequentemente os recursos protéicos disponíveis desde que o recurso seja abundante, como frutos de *Ficus*, néctar e pólen de *Bauhinia* e artrópodes da ordem Coleóptera, assim como demonstrado em outros estudos (Sperr2011, Tschapka2004, Munin 2012, Munin et al. 2012).Caso o recurso seja escasso, morcegos podem explorar diferentes fontes de proteínas como estratégia para diminuir ou evitar a competição interespecífica de indivíduos morfológicamente semelhantes e que exploram recursos de uma maneira semelhante. Espécies que exploram principalmente recursos pouco abundantes tendem a não sobrepôr itens alimentares (Fleming 1986, Zortéa, 2003, Mello et al. 2004, Tschapka 2004, Munin 2008, Mello et al. 2011, Rojas et al. 2011, Sperr et al. 2011), o que foi suportado também pelo presente estudo.

De acordo com a porcentagem de proteína ingerida, morcegos filostomídeos modulam a produção da enzima tripsina, assim como algumas espécies de aves modulam a produção de outras proteinases (Afik et al. 1995; Martinez del Rio et al. 1995; Sabat et al. 1998; Caviedes-Vidal et al. 2000) e com isso evitam a produção de elevados níveis desta enzima específica para a digestão de pouca proteína, reduzindo o gasto metabólico para síntese e manutenção de enzimas digestivas. A digestão rápida com baixo custo energético pode ser especialmente importante para os morcegos devido à grande demanda energética para o voo.

LITERATURA CITADA

- Adamoli, J. (1987) Fisiografia do Pantanal. *Recursos Forrageiros Nativos do Pantanal Matogrossense* (eds A.C. Allem & J.F.M. Valls), pp. 23–25. DDT-EMBRAPA, Brasília.
- Afik, D. & Karasov, W.H. (1995) The trade-offs between digestion rate and efficiency in warblers and their ecological implications. *Ecology*, **76**, 2247–2257.
- Araujo, A.C. & Sazima, M. (2003) The assemblage of flowers visited by hummingbirds in the “capões” of southern Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Flora*, **1232**, 1-9.
- Buddington, R.K. (1992) Intestinal nutrient transport during ontogeny of vertebrates. *American journal of physiology*, **263**, 503–509.
- Caviedes-Vidal, E., McWhorter T. J., Lavin S.R., Chediack J. G., Christopher, R. T. & Karasov, W.H. (2007) The digestive adaptation of flying vertebrates: High intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** (48), 19132 - 19137.
- Caviedes-Vidal, E., Afik D., Martinez del Rio, C. & Karasov, W.H. (2000) Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **125**, 11–24.
- Diamond J.M. & Hammond K. (1992) The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia*, **48**, 551-557.
- Diamond, J. (1991) Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. *News in Physiological Sciences*, **6**, 92–96.

- Erlanger, B.F., Kokowski, N. & Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **95**, 271 – 278.
- Fleming, T.H. (1986) Opportunism versus specialization: the evolution of feeding strategy in frugivorous bats. *Frugivores and seed dispersal* (eds A. Estrada, & T.H. Fleming), Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Godoi Filho, J.D. (1986) Aspectos geológicos do Pantanal Mato-grossense e de sua área de influência. *Anais do I Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal*. EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Brasília.
- Gonçalves, F., Munin R., Costa, P. & Fischer, E. (2007) Feeding habits of *Noctilio albiventris* (Noctilionidae) bats in the Pantanal, Brazil. *Acta Chiropterologica*, **9**, 535–538.
- Hammond, K. A., Lam M., Lloyd, K. C. K. & Diamond, J. (1996) Simultaneous manipulation of intestinal capacities and nutrient loads in mice. *American Journal of Physiology*, **271**, G969–G979.
- Karasov, W. H. & Hume, I. D. (1997) The vertebrate gastrointestinal system. Handbook of Physiology (ed W. H. Dantzler), pp. 407. Oxford University Press, New York.
- Karasov, W. H., & Diamond, J. M. (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* **38**(9):602-611.
- Karasov, W.H. & Martinez del Rio, C. (2007). *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Princeton University Press, Princeton.
- Karasov, W.H., Martinez del Rio, C. & Caviedes-Vidal, E. (2011) Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual Review of Physiology* **73**:69-93.

- Kohl, K.D., Brzeźek, P., Caviedes-Vidal, E. & Karasov W.H. (2011) Pancreatic and intestinal carbohydrases are matched to dietary starch level in wild passerine birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, **84**, 195–203.
- Liu, Q.S. & Wang, D.H (2007) Effects of diet quality on phenotypic flexibility of organ size and digestive function in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Comparative Physiology Part B*, **177**, 509–518.
- Martinez del Rio, C., Brugger K.E., Rios J.L., Vergara, M.E. & Witmer M (1995). An experimental and comparative study of dietary modulation of intestinal enzymes in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Physiological Zoology*, **68**, 490–511.
- Mello, M.A.R., Marquitti F.M.D., Guimarães Jr P.R., Kalko E.K.V., Jordano, P. & Aguiar, M.A.M. (2011) The missing part of seed dispersal networks: structure and robustness of bat-fruit interactions. *Plos One*, **6** (2), e17395.
- Munin, R.L. 2008. Nicho trófico de morcegos filostomídeos no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- Munin, R.L., Fischer, E., & Gonçalves, F. (2012) Food habits and dietary overlap in a phyllostomid bat assemblage in the Pantanal of Brazil. *Acta Chiropterologica*, **14**, 195–204.
- Nogueira, M. R.; Dias, D. & Peracchi, A. L. (2007) Subfamília Glossophaginae. *Morcegos do Brasil* (eds N.R. Reis; A.L. Peracchi, W.A. Pedro; I.P. Lima), pp 45–59. Londrina.
- Ogunbiyi, O.A. & Okon, E.E. (1976) Studies on the digestive enzymes of the African fruit bat *Eidolon helium*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **55**, 59–61.

- Padilla, D.K. & Adolph, S.C. (1996) Plastic inducible morphologies are not always adaptive – the importance of time delays in a stochastic environment. *Evolutionary Ecology*, **10**, 105–117.
- PCBAP (1997) Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal). *Análise integrada e prognóstico da Bacia do Alto Paraguai*, Volume III. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal.
- Polgár, L. (2005) The catalytic triad of serine peptidases". *Cellular and molecular life sciences*, **62**: 2161–72.
- Ramirez-Otarola, N., Narvaez, C. & Sabat, P. (2011) Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology B*, **181**, 817–827.
- Rawlings, N.D. & Barret, A.J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, **244**, 19-61.
- Redford, K.H. & Dorea, J.G. (1984) The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *Journal of Zoology*, **203**, 385-395.
- Rojas, D., Vale A. Ferrero, V. & Navarro, L. (2011) When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Molecular Ecology*, **20**, 2217- 2228.
- Sabat, P., Novoa E., Bozinovic F. & Martinez del Rio C. (1998) Dietary flexibility and intestinal plasticity in birds: a field and laboratory study. *Physiological Zoology*, **71**, 226-236.
- Sperr, E.B., Caballero-Martinez L.A., Medellin, R.A. & Tschapka, M. (2011) Seasonal changes in species composition, resource use and reproductive patterns within a

- guild of nectar-feeding bats in a west Mexican dry forest. *Journal of Tropical Ecology*, **27**, 133-145.
- Starck, J. M. & Wang T. (2005) *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding In Vertebrates*, Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Tschapka, M. (2004) Energy density patterns of nectar resources mediate coexistence within a guild of neotropical flower-visiting bats. *Journal of Zoology*, **263**, 7–21.
- Weibel, E.R. (2000) *Symmorphosis: on form and function in shaping life*. Harvard University Press, Cambridge.
- Zambonino-Infante, J. L. & Cahu, C. L. (2007). Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, **268**, 98-105.
- Zortéa, M. (2003) Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Biology*, **63**, 159–168.