

PAULA RENATA LOPES MOREIRA

**Análise de Esterase e Fosfatase em Espécies
de Morcegos com Diferentes Hábitos Alimentares:
Insetívoros, Frugívoros, Nectarívoros e Hematófagos**

Tese apresentada para obtenção do
Título de Doutor em Genética.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULA RENATA LOPES MOREIRA

**Análise de Esterase e Fosfatase em Espécies de
Morcegos com Diferentes Hábitos Alimentares:
Insetívoros, Frugívoros, Nectarívoro e Hematófago**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto, para obtenção do Título de
Doutor em Genética

ORIENTADORA: Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

São José do Rio Preto – SP

2008

Moreira, Paula Renata Lopes.

Análise de esterase e fosfatase em espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares: insetívoros, frugívoros, nectarívoro e hematófago/ Paula Renata Lopes Moreira - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eliana Morielle-Versute

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2. Morcego. 3. Esterases. 4. Fosfatases. I. Morielle-Versute, Eliana. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 577.21

PAULA RENATA LOPES MOREIRA

**Análise de Esterase e Fosfatase em Espécies de Morcegos com
Diferentes Hábitos Alimentares: Insetívoros, Frugívoros,
Nectarívoro e Hematófago**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

São José do Rio Preto, ____/____/____

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Morielle Versute, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Para tudo há um tempo, para cada coisa
há um momento debaixo dos céus.
Todas as coisas serão achadas boas a seu tempo
(Eclesiastes)*

*À vovó Maura e mãe Sônia
Exemplos de vida... modelos de seres humanos.*

Agradecimentos

À orientadora Prof. Dra. Eliana Morielle Versute pelo exemplo profissional, conduta ética e moral em todos os momentos. Por acreditar em meu trabalho e lapidá-lo. Pela perseverança e dedicação. Por todo conhecimento e calma compartilhados. Minha gratidão pelo cuidado e amizade durante todos esses anos.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do Instituto, em especial Rosana, Rosemar, Sílvia e Pinceli, pela boa vontade, disponibilidade e atenção nos assuntos burocráticos.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro concedido;

*À equipe da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral por coletar os espécimes de **Desmodus rotundus**.*

Ao técnico Jorge do laboratório de Chiroptera pela colaboração no preparo dos materiais e pela amizade.

Aos Professores: Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, responsável pelo Laboratório de Evolução Molecular de Insetos; Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, responsável pelo Laboratório de Bioquímica de Proteínas; Dr. Roberto da Silva e Dra. Eleni Gomes, responsáveis pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, que abriram as portas de seus laboratórios para realização dos experimentos, e a todos os usuários dos respectivos laboratórios, que me receberam, auxiliaram e dividiram o uso de equipamentos tão solicitados.

Ao Prof. Doutor Luís Gustavo da Conceição Galego por todas as dicas no início dos estudos das esterases. Principalmente pela amizade e entusiasmo, que me incentivaram a persistir pelos caminhos dos estudos enzimáticos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, por ter me acolhido em seu laboratório e orientado, sempre com seu entusiasmo, alegria, calma e paciência. Minha gratidão por tamanha generosidade, disponibilidade em compartilhar o conhecimento.

Ao Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela disponibilidade, atenção e paciência em me auxiliar. Principalmente pela amizade, dosando meu desespero com sua “calma peculiar”, sempre com uma palavra de incentivo, me fazendo acreditar que os resultados seriam “bacanas”.

Aos amigos de Laboratório Mateus Rodrigues Beguelini, Bruno Simões, Fábio Leme e Lidiani Aguiar pela amizade e companheirismo. Cada um tem uma parcela de contribuição no trabalho realizado. Sem a amizade de vocês o trabalho teria sido muito mais difícil.

À amiga Karina de Cássia Faria, por compartilhar durante todos esses anos dos momentos difíceis, sempre com uma palavra de conforto, incentivando nos momentos de desânimo, mas principalmente por compartilhar os momentos de alegria tornando tudo mais fácil.

À amiga Sandra Regina de Carvalho Marchesin por todos os anos de convivência... sendo colega de trabalho, um pouco “mãe” e irmã, assim os meus, os seus, os nossos problemas foram divididos, tornando-os mais simples e os dias mais leves.

Ao querido amigo Maurício Papa de Arruda, pelo carinho, companheirismo e dedicação. Por participar do meu dia-a-dia, pelo fácil convívio e longas conversas que tornaram os dias mais fáceis e me abriram os olhos para encarar a vida de uma maneira diferente, influenciando meu caminhar.

Às amigas Flávia Cal, Nathália de Setta e Nedenia Bonvino Stafuzza, que enriqueceram minha vida mais do que eu poderia expressar.

Aos colegas que fiz durante a jornada “Pos-Graduação”: Adriana Granzoto, Edson Albaneze, Fabrício Ramon Lopes e Julcimary Ricci, pelas conversas, risos e alegrias, propiciando momentos “lights” no árduo dia-a-dia.

Às amigas Daniela Alonso Bocchini, Flávia Rodrigues Lisoni e Tatiane Iembo, por continuarem fazendo parte da minha vida, mesmo depois de “10 anos de formadas”.

À querida amiga Luciane de Almeida Madureira, obrigada pelo carinho, incentivo, solidariedade em todos os momentos... mesmo longe, tão presente. Minha profunda gratidão por sua gentileza, generosidade e amizade.

À Família Lopes, por continuarem na torcida me apoiando sempre em todas as conquistas. Serão sempre meu porto seguro, certeza de sempre ter para onde voltar.

Ao meu irmão, Manoel torcedor e incentivador.

À minha irmã, Daniela pelo amor, cumplicidade, generosidade e compreensão. Por me agüentar nas longas ligações telefônicas e emails gigantescos...

Aos meus amores Ana Beatriz e João Vitor, que me impulsionaram a continuar, para poder ser exemplo de que vale a pena investir no sonho.

Gratidão eterna: à vovó Maura, pelo amor, conselhos e exemplo de vida, que me levaram a acreditar e confiar que “a luzinha” esta sempre brilhando. E à minha mãe Sônia, por ter me ensinado e incentivado a investir na educação. Por demonstrar tanto orgulho pelo “filha bióloga e pesquisadora de morcegos”. Obrigada por me incentivarem a sempre ir cada vez mais longe.

A Deus, por tantas oportunidades.....

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	12
I.A. ALGUNS ASPECTOS SOBRE OS HÁBITOS ALIMENTARES EM MORCEGOS	14
I.A.1. Frugivoria	14
I.A.2. Sanguivoria	16
I.A.3. Insetivoria	17
I.A.4. Nectarivoria	18
I.B. MUDANÇAS EVOLUTIVAS NA DIETA E NA DIGESTÃO EM MORCEGOS	21
I.C. ISOENZIMAS	24
I.C.1. As Enzimas Esterases e Fosfatases	25
I.C.1.a. Esterase (Hidrolases de ésteres carboxílicos - E.C.3.1.1) ...	25
I.C.1.b. Fosfatase Alcalina	32
II. OBJETIVOS	41
III. ARTIGOS	43
Artigo 1	43
Artigo 2	83
IV. CONCLUSÕES GERAIS	121
V. RESUMO	123
VI. ABSTRACT	126
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera, que representa um quarto de todas as espécies de mamíferos viventes, com cerca de 1100 espécies agrupadas em 200 gêneros e duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera.

Os Megachiroptera com uma única família, Pteropodidae, e 180 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais do Velho Mundo (SIMMONS, 2005), compreendem animais com hábito alimentar predominantemente frugívoro.

Os Microchiroptera apresentam 930 espécies com distribuição mundial (SIMMONS, 2005) e é constituída de 17 famílias agrupadas em oito superfamílias, Emballonuroidea (Emballonuridae), Rhinopomatoidea (Craseonycteridae e Rhinopomatidae), Rhinolophoidea (Nycteridae, Megadermatidae e Rhinolophidae), Noctilionoidea (Noctilionidae, Mormoopidae e Phyllostomidae), Molossoidea (Antrozoidae e Molossidae), Nataloidea (Myzopodidae, Thyropteridae, Furipteridae e Natlidae), Vespertilionoidea (Vespertilionidae) e *Incertae sedis* (Mystacinidae) (SIMMONS e GEISLER, 1998).

No Brasil são reconhecidos 57 gêneros de Microchiroptera, representantes de nove famílias: Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae que ocorrem no Velho e Novo Mundo, e Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Natalidae, Furipteridae e Thyropteridae que ocorrem exclusivamente nas Américas (PERACHI et al., 2006).

Os Chiroptera exibem a maior variação de estratégias alimentares e forrageamento entre os mamíferos, com especializações variando de nectarívoros a sanguívoros, piscívoros, insetívoros e frugívoros. Essas especializações alimentares refletem adaptações morfológicas no aparelho crânio-dental e no esqueleto pós-

cranial, assim como na histoquímica e ultraestrutura do trato digestório e glândulas salivares entre outras características (PHILLIPS et al., 1984; TANDLER et al., 1990; MAKANYA et al., 1995; SCHLOSSER-STURN e SCHLIEMANN, 1995; DUMONT, 1997).

O trato gastrointestinal apresenta grande plasticidade associada a diferenças na capacidade de absorção, que é modificada em resposta a diminuição ou aumento na qualidade ou disponibilidade de alimento (FORMAN et al., 1979; KOVTUN e ZHUKOVA, 1994; DELORME e THOMAS, 1999).

Apesar da grande diversidade de dietas, pouca atenção tem sido dada ao estudo da nutrição, principalmente ao sistema de enzimas digestivas, que é muito influenciado pelo tipo de alimento consumido (OGUNBIYI e OKON, 1976).

Ferrarezi e Gimenez (1996) redefiniram a categorização alimentar de várias espécies de morcegos, atribuindo para a maioria delas categorias politípicas. O uso comum de categorias monotípicas, não implica que os morcegos tenham exclusivamente um único hábito alimentar (exceto os hematófagos); somente sugere que uma dada categoria alimentar é o tipo de alimento predominante de determinada espécie (CRUZ-NETO et al., 2001).

Em função da capacidade de vôo, as especializações alimentares dos morcegos capazes de reunir grandes concentrações de nutrientes a partir de alimentos facilmente digeríveis e absorvíveis, uma vez que eles necessitam de uma digestão rápida, que facilite a locomoção e forneça a energia necessária para o vôo, que é um fenômeno altamente dispendioso. É nesse momento que entram em ação as enzimas digestivas e, não só elas, mas todas as substâncias e reações metabólicas envolvidas

com a digestão e absorção, e estas estão diretamente relacionadas ao tipo de alimento ou hábito alimentar.

I.A. ALGUNS ASPECTOS SOBRE OS HÁBITOS ALIMENTARES EM MORCEGOS

I.A.1. Frugivoria

O hábito frugívoro é característico nas espécies da família Phyllostomidae que utilizam os mais variados tipos de frutos, folhas, néctar, pólen, além de insetos (GARDNER, 1977).

A utilização de frutas como único item alimentar é considerada por muitos pesquisadores uma dieta inadequada, pelo baixo valor nutricional, quando comparada a outras plantas e fontes de alimento animal (DEMPSEY, 2004).

A maioria das frutas oferece energia na forma de carboidratos e geralmente contém pouca proteína ($\leq 0,5\%$) (MORTON, 1973; WHITE, 1974), o que poderia representar um problema para os frugívoros na obtenção do conteúdo protéico necessário. Além disso, apenas um conjunto menor de plantas produzem frutas com altos níveis de lipídios e conteúdos acima de 6%-7% de proteína por peso (WHITE 1974).

Para sobreviver, crescer e reproduzir com dietas únicas, os frugívoros utilizam ajustes fisiológicos e comportamentais, como o uso preferencial de frutas maduras, que contêm mais aminoácidos livres, que acabam por compensar o baixo valor nutricional (THORPE, 1991). Outras estratégias são a redução na perda de nitrogênio urinário e nas fezes, através do aumento da eficiência da digestão de

proteínas e absorção no intestino, e a suplementação da dieta com fontes ricas em proteína, como insetos, pólen e folhas.

Algumas dessas estratégias são observadas no forrageamento, onde certas espécies se alimentam quase que inteiramente com frutas durante o ano todo, e outras se alimentam também de insetos quando as frutas são menos abundantes (HERRERA et al., 2002). A exemplo, pode-se destacar as espécies *Sturnira lilium* e *Carollia brevicauda* que no final da estação chuvosa e início da estação seca, quando há um declínio na dieta e na proporção de proteína das plantas, os insetos tornam-se a fonte principal de proteína (DEMPSEY, 2004).

Segundo Martinez del Rio (1994), as frutas das plantas dispersadas pelos Phyllostomidae mostram significativa variação no conteúdo protéico, sugerindo que a alimentação com ampla variedade de frutas e quantidades variáveis de proteínas pode ser suficiente em uma dieta inteiramente frugívora, que misturaria seletivamente espécies de frutas para obter aminoácidos suficientes, não necessitando de proteínas de insetos (HERBST, 1988). Contudo, alguns estudos envolvendo a análise dos frutos ingeridos por *Carollia perspicillata* revelaram que eles continham proteína suficiente para a manutenção de indivíduos não reprodutivos, mas não para aqueles que eram lactantes, sugerindo que a suplementação de proteína seria requerida apenas em certos períodos do ano, como gravidez, lactação e crescimento de jovens (HERBST, 1988; COURTS, 1998).

Qualquer que seja a situação real das espécies, o sucesso das variações que têm sido relatadas está diretamente relacionado, em especial, às especializações digestórias.

Vários fatores como condições ambientais, variações sazonais e dimorfismo sexual podem influenciar o armazenamento de gordura nas várias espécies da família Phyllostomidae. Em muitas espécies de filostomídeos neotropicais, os músculos peitorais apresentam maior atividade de enzimas metabólicas para lipídios, demonstrando que as reservas de lipídios constituem a principal fonte de nutrientes durante o voo (YACOE et al., 1982). Já, espécies nectarívoras apresentam níveis menores de reserva de gordura durante o ano, enquanto que os insetívoros mostram maior variação anual quando comparados a outros hábitos alimentares como os frugívoros e nectarívoros (McNAB, 1976).

I.A.2. Sanguivoria

Estudos em laboratório mostraram que o morcego vampiro *Desmodus rotundus*, embora seja um filostomídeo, e tenha o hábito alimentar mais especializado, pois é exclusivamente hematófago, exibe uma susceptibilidade incomum à falta de comida, mesmo com uma dieta rica em proteína (sangue bovino) e armazenam menos energia do que a maioria dos mamíferos (FREITAS et al., 2005). A concentração de lipídios e proteínas no fígado e músculo permanece inalterada nos períodos de jejum, apresentando ausência de reserva de gordura abdominal, sugerindo que adquirem a energia necessária de sua dieta.

A dependência mínima de reservas de lipídios (FREITAS et al., 2003) pode ser devido basicamente três fatores, a capacidade limitada para armazenar energia em diferentes tecidos, devido o alimento estar disponível o ano todo, o comportamento comum entre os vampiros, de compartilhar o alimento que é obtido,

e também à capacidade inadequada para mobilizar reservas de lipídios durante períodos de escassez. Essas características parecem refletir adaptações comportamentais para compensar a susceptibilidade metabólica para inanição (WILKINSON, 1990).

I.A.3. Insetivoria

Os morcegos insetívoros são tipicamente pequenos, predam pequenos insetos e têm capacidade intestinal limitada, o que contribui para um consumo diário alto de energia, particularmente para fêmeas durante a gravidez e lactação (KURTA et al., 1989; HOOD et al., 2006).

Os morcegos insetívoros do Novo Mundo também suplementam sua dieta com pólen. Essa interpretação foi subsidiada com análises que demonstraram que seus intestinos fornecem um ambiente propício para a quebra da exina do grão de pólen, liberando para a absorção, um conjunto de aminoácidos, como a prolina, que é importante para a síntese de tecidos conectivos (HERRERA e MARTÍNEZ del RÍO, 1998).

A eficiência digestiva dos morcegos insetívoros é influenciada principalmente pelo tamanho do alimento. Os insetos maiores são mais fáceis de serem manipulados pois os animais têm habilidade de descartar as porções indigeríveis, sendo o restante digerido mais eficientemente do que porções muito pequenas. (BARCLAY e DOLAN, 1991).

Outro fator que parece influenciar a escolha da presa é a concentração de ácidos graxos, uma vez que uma dieta rica em ácidos graxos essenciais permite uma

diminuição na temperatura do corpo, condição importante para mamíferos que hibernam ou entram em torpor, como ocorre com os morcegos insetívoros da zona temperada, durante o inverno (FRANK, 1991; GEISER et al., 1992; GEISER e KENAGY, 1993; SCHALK e BRIGHAM, 1995). Acredita-se que essa mesma seleção seja feita por fêmeas grávidas ou lactantes que têm maior necessidade de energia e porque os ácidos graxos contêm prostaglandina que é importante na gravidez e parto (KURTA et al., 1989; YEN e JAFFE, 1991).

I.A.4. Nectarivoria

O néctar floral consumido pelos vertebrados é principalmente uma solução aquosa de açúcar que varia amplamente em concentração (10% -53% w/w) (BAKER e BAKER, 1982; NICOLSON, 1993, 2002; BERNARDELLO et al., 2004). Vários estudos têm demonstrado que muitos animais nectarívoros ingerem uma quantidade constante de açúcar, regulando o volume de absorção para compensar variações na concentração de açúcar (LÓPEZ-CALLEJA et al., 1997; MARTINEZ del RIO et al., 2001).

Sob condições naturais, os morcegos nectarívoros neotropicais que alimentam-se com concentrações variadas de açúcar podem ajustar o volume de absorção de alimento para manter uma ingestão de açúcar constante (5%-29% w/w; von HELVERSEN, 1993; WINTER e von HELVERSEN, 2001). Em razão às suas altas taxas metabólicas, uma alimentação compensatória parece ser importante quando os morcegos neotropicais alimentam-se de flores com néctar muito diluído (5%-10% w/w; RAMÍREZ et al., 2005).

Em um estudo realizado na Colômbia, Rivas-Pava et al. (1996) observaram que *Glossophaga soricina*, categorizado como nectarívoro, tem preferência por frutas, sendo pólen e insetos consumidos em menor escala. No Brasil, os animais de florestas de galeria têm feito uso de frutas de plantas da espécie *Piper* e em áreas de cerrado eles utilizam preferencialmente frutas (60%), principalmente da espécie *Vismia* e insetos (40%) (FLEMING, 1981, 1986; WILLIG et al., 1993; BIZERRIL e RAW, 1997; GALINDO-GONZÁLEZ, 1998).

Um estudo comparativo entre a dieta de machos e fêmeas de *G. soricina*, mostrou que os sexos podem se alimentar de fontes alimentares semelhantes ou diferentes (ALVAREZ e SÁNCHEZ-CASAS, 1999). Contudo, Zortéa (2003) verificou que as proporções de cada categoria alimentar foram as mesmas para ambos os sexos.

Embora os indivíduos de *Anoura geoffroyi* e *Anoura caudifera* sejam também usuários de néctar, eles têm sido categorizados como generalistas, alimentando-se de insetos em determinados períodos do ano (GARDNER, 1977). A adaptação para diferentes itens alimentares pode ser uma resposta à variação sazonal na fonte de alimento disponível, bem como uma estratégia que minimiza a competição entre espécies morfológica e ecologicamente muito próximas. As diferenças encontradas em suas dietas indicam que elas podem selecionar recursos diferentes para atenuar um possível processo competitivo (ZORTÉA, 2003).

Embora o pólen possa ser importante fonte de proteína, vitaminas e minerais, a camada de exina é altamente resistente a degradação pelas enzimas digestivas (STANLEY e LINSKENS, 1974). Vários estudos em vertebrados têm

estimado a eficiência na extração dos conteúdos do pólen que variaram de 7% a 100% (RICHARDSON et al., 1986; BRICE et al., 1989).

Algumas espécies de morcegos incluem regularmente pólen em suas dietas e são capazes de extrair seu conteúdo (GARDNER, 1977). A extração do conteúdo de pólen é maior em morcegos que são visitantes especializados de flores, do que em visitantes sazonais, sugerindo que filostomídeos nectarívoros tem um sistema digestivo que permite alimentar-se mais eficientemente de grãos de pólen do que os frugívoros (HERRERA e MARTÍNEZ del RIO, 1998).

Embora o trânsito do pólen através do intestino seja variável (de 30 minutos a várias horas), a maior parte da digestão do conteúdo de pólen ocorre no intestino, pela ação enzimática na parede do pólen (PENG et al., 1986). Alguns estudos demonstram que as diferenças na eficiência de extração podem ser justificadas pelas diferenças no nível de atividade das enzimas intestinais responsáveis pela degradação da parede do pólen (HERRERA e MARTÍNEZ del RIO, 1998).

A composição da dieta tem um impacto significativo na função digestiva e renal, uma vez que as quantidades de água, carboidratos, proteínas e eletrólitos assimilados da dieta dependem das características morfológicas e bioquímicas do trato digestório e todos os seus anexos, sendo a fisiologia intestinal reflexo das variações e especializações nas estruturas digestórias, que estão diretamente relacionadas aos hábitos alimentares (KARASOV e DIAMOND, 1988; KARASOV e HUME, 1997).

Os rins também têm importante papel no sucesso de obtenção da energia suficiente para a manutenção e sobrevivência dos animais. Schondube et al. (2001)

observaram que ingestão de proteína parece estar positivamente relacionada com a habilidade para concentrar urina. Esses resultados sugerem que seja correta a hipótese de Studier e Wilson (1983), de que a morfologia renal em morcegos é determinada primeiramente pelo conteúdo de proteínas e eletrólitos da dieta e secundariamente pela água do ambiente.

Um outro fator que influencia diretamente a alimentação das espécies de morcegos, em especial das fêmeas, é a reprodução, uma vez que as condições ambientais e fatores endógenos estão fortemente associados com a reprodução dos morcegos (NEUWEILER, 2000). Os fatores climáticos combinados (temperatura e chuva) influenciam a disponibilidade de alimento, interferindo diretamente com os ciclos reprodutivos desses animais (FLEMING et al., 1972; RACEY, 1982).

I.B. MUDANÇAS EVOLUTIVAS NA DIETA E NA DIGESTÃO EM MORCEGOS

As relações taxonômicas em Chiroptera são ainda debatidas. Classicamente a Ordem pertence a Superordem Archonta, que inclui Primatas, Dermoptera e Scandentia (NOVACEK, 1992), mas a idéia tradicional de filogenia de Mammalia tem mudado freqüentemente à medida que evidências moleculares de dados nuclear e mitocondrial são acrescentados nas especulações (NIKAIDO et al., 2000; MADSEN et al., 2001; MURPHY et al., 2001; ARNASON et al., 2002; DEUSUC et al., 2002; SPRINGER et al., 2004). Os morcegos têm sido agrupados em Laurasiatheria junto de Carnivora, Pholidota, Perissodactyla, Cetartiodactyla (Artiodactyla mais Cetácea) e Soricomorpha. Os Primates, Dermoptera e Scandentia

são agrupados juntos formando um grupo irmão com Rodentia e Lagomorpha em Euarchontoglires (SPRINGER et al., 2004).

Os estudos filogenéticos indicam que insetivoria é a dieta ancestral dos filostomídeos e que a maioria das dietas evoluíram somente uma vez dos insetívoros (WETTERER et al. 2000). A única possível exceção para este padrão parece ser o hábito carnívoro, que pode ter evoluído duas vezes em Phyllostomidae (SCHONDUBE et al., 2001).

O desenvolvimento do hábito frugívoro dos filostomídeos é mais recente do que dos pteropodídeos, fato testado pela análise e verificação de diferentes graus de especializações morfológicas apresentadas pelos dois grupos (CRUZ-NETO et al., 2001).

A evolução comparativamente recente de frugívoros em Phyllostomidae é indicada pela retenção de muitas características anatômicas associadas com insetivoria, incluindo dentes complexos, olhos pequenos e ecolocalização (DELORME e THOMAS, 1999). Até mesmo a maioria dos filostomídeos, como espécies dos gêneros *Carollia* e *Artibeus*, continuam incluindo insetos e frações líquidas de folhas ricas em proteína em sua dieta (FLEMING et al. 1972; KUNZ e DIAZ, 1995).

Estudos demonstraram diferenças na expressão de enzimas entre espécies com diferentes dietas, e essas mudanças alimentares levaram ao aumento ou diminuição da atividade de certas enzimas, de acordo com o substrato presente na dieta (KARASOV et al., 1985, DIAMOND, 1991; DIAMOND e HAMMOND, 1992). A exemplo, a atividade da trealase foi reduzida quando morcegos mudaram de insetívoro para todas as outras dietas, sendo demonstrada que sua atividade foi

maior em morcegos insetívoros do que em fitófagos, carnívoros e hematófagos (SCHONDUBE et al., 2001).

A atividade da maltase e sacarase intestinal está ausente em *D. rotundus* cuja dieta é quase completamente livre de dissacarídeos e carboidratos complexos, sendo o único vertebrado conhecido que falta atividade da maltase (SCHONDUBE et al., 2001).

Karasov e Diamond (1988) propuseram que fisiologia e dieta interagem de maneira complexa, criando restrição e oportunidades. Os resultados de vários estudos demonstram que mudanças evolutivas na dieta são acompanhadas por mudanças fisiológicas que facilitam o uso de dietas derivadas. Uma mudança de insetívoro para frugívoro, por exemplo, conduz a aumento da atividade da sucrase e maltase, cujas atividades também aumentaram nas mudanças de insetívoro para nectarívoro e frugívoro, diferente da atividade da trealase que foi reduzida juntamente com a habilidade para concentrar urina. Na ausência de grandes quantidades de água livre, as mudanças renais podem restringir a habilidade de morcegos nectarívoros e frugívoros para livrar-se da uréia produzida pelo catabolismo de grandes quantidades de proteínas, que caracterizam uma dieta insetívora (STUDIER et al., 1983).

Apesar dos relatos sobre as mudanças nas atividades das enzimas envolvidas com a digestão, os estudos moleculares evolutivos de enzimas digestivas em morcegos são ainda raros, e certamente a diversidade de fontes alimentares usadas por esses animais deve estar relacionada com uma diversificação semelhante de suas enzimas digestivas, tornando um aspecto interessante para ser estudado.

I.C. ISOENZIMAS

Um grupo particular de enzimas que tem sido amplamente investigado em vários outros grupos de mamíferos são as isoenzimas, que são proteínas diferentes que catalizam a mesma reação. São formas múltiplas, que podem ocorrer na mesma espécie, no mesmo tecido ou na mesma célula. Comumente, apresentam seqüências de aminoácidos semelhantes, embora não idênticas e em muitos casos compartilham a mesma origem evolutiva (LEHNINGER et al., 1995) As isoenzimas apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética, sendo, portanto úteis na detecção de polimorfismos e caracterização de populações e espécies que habitam diferentes ambientes (SOMERO, 1978).

As isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas a ser separadas por processos bioquímicos. Isto significa que as isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na seqüência de aminoácidos que possuem, o que poderá influenciar a natureza da estrutura protéica secundária, terciária e quaternária da enzima. Por essa razão, elas têm sido utilizadas para estimar os níveis de variação e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais, estudar o fluxo gênico entre populações e processos de hibridação natural. A análise comparativa de enzimas e outras proteínas em vários grupos taxonômicos de plantas (VASSEUR et al., 1990; KIDAMBI et al., 1990) e animais foram usadas também para estudar problemas evolutivos e taxonômicos (MILLER e NOVAK, 1983; PADHI e KHUDA-BUKHSH, 1990).

O estudo das isoenzimas, sob o ponto de vista evolutivo, bioquímico e fisiológico é importante, devido as suas formas moleculares múltiplas, que são

comuns em vários organismos, apresentam a mesma atividade catalítica, podendo assim, desempenhar uma função específica no metabolismo, em harmonia com outras enzimas celulares. Frequentemente as isoenzimas apresentam especificidade celular ou tecidual, e a heterogeneidade delas confere flexibilidade, versatilidade e precisão para os organismos em termos de função metabólica, assim a multiplicidade é importante para a eficiência morfológica.

Entre as várias isoenzimas que vêm sendo estudadas em vertebrados, podem ser destacadas as esterases e as fosfatases. O estudo das propriedades físico-químicas, estrutura e distribuição de enzimas oferece informação valiosa para o entendimento da função das relações função-estrutura dos diferentes complexos isoenzimáticos (SALAMASTRAKIS, 1988).

I.C.1. As Enzimas Esterases e Fosfatases

I.C.1.a. Esterase (Hidrolases de ésteres carboxílicos - E.C.3.1.1)

Desde a década de 30 há registros na literatura de estudos com esterases em mamíferos, e os vários trabalhos relatam a presença da enzima em diferentes tecidos como plasma sanguíneo, fígado, coração, músculo peitoral e rim de diferentes animais, como cavalo, seres humanos, porcos e morcegos (CONNORS et al., 1950; COURVILLE e LEDINGTON, 1951; MOUNTER et al., 1956; MARKERT e HUNTER, 1959; ADLER e KISTIAKOWSKY, 1961; PETRAS, 1963; MANWELL e KERST, 1966; PELZER, 1965; RANDERSON, 1965; MORALES et al., 1991).

Foi em 1959 que, com o emprego da eletroforese, Augustinsson K.B. revelou pela primeira vez, ao usar substratos enzimáticos específicos e inibidores, a ocorrência de variedade de esterases. Pouco depois, em 1963, Holmes e Masters, estabeleceram o “status” de isoenzima e a base genética das esterases (KOEHN et al., 1983). O emprego da eletroforese em gel de amido e de técnicas histoquímicas permitiu a detecção de grande número de enzimas e formas eletroforéticamente separáveis, de um mesmo organismo, o que possibilitou o estudo da variabilidade no padrão enzimático de várias espécies.

As esterases são enzimas altamente variáveis, que compreendem um grupo multifuncional e heterogêneo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos e estão amplamente distribuídas entre os seres vivos. Contudo, podem atuar sobre outros substratos, como por exemplo, peptídeos e amidas (WALKER e MACKNESS, 1983; SALAMASTRAKIS, 1988). Embora sua especificidade aos substratos possa ser limitada *in vivo*, algumas são capazes de hidrolisar uma ampla classe de substratos *in vitro*, sendo que para a maioria das esterases, seus substratos naturais não são conhecidos e para a maioria das esterases não específicas também não é conhecida a sua função fisiológica (VEINI et al., 1986; OAKESHOTT et al., 1993; SALAMASTRAKIS, 1988).

Em vertebrados as esterases são caracterizadas por grande variabilidade genética intra-específica, e por isso foram amplamente utilizadas como marcadores genéticos para investigações populacionais em muitas espécies (SELANDER e KAUFMAN, 1973).

O avanço das técnicas de análise eletroforética propiciou o estudo mais detalhado das esterases, possibilitando a classificação dessas em grupos distintos.

Mais de 20 enzimas esterásicas foram classificadas por este método, em diversas espécies de organismos (HOLMES E MASTERS, 1967; COATS et al., 1975; WALKER e MACKNESS, 1983; OAKESHOTT et al., 1993; WALKER, 1993). Como a atividade das esterases é demonstrada por métodos histoquímicos de coloração com substratos sintéticos, que não apresentam relação com os substratos biológicos (SCHAW, 1965; BREWER, 1970; HOPKINSON, 1974), elas são capazes de hidrolisar um vasto grupo de substratos *in vitro*. Pela inespecificidade de ação aos substratos muitas esterases têm sido classificadas como enzimas inespecíficas (SCHAW, 1965). Além disso, outras enzimas que não esterases, apresentam atividade frente aos ésteres sintéticos utilizados para a detecção das esterases e, por isso, outros critérios são requeridos para sua classificação funcional.

A classificação das esterases mais aceita baseia-se na sua sensibilidade a três grupos de inibidores de atividade enzimática, os reagentes sulfidrílicos, como o para-cloromercúriobenzoato (pCMB), os organofosforados (malathion, por exemplo) e carbamatos (como exemplo, o sulfato de eserina) (HOLMES e MASTER., 1967). Por esse método são diferenciadas quatro classes de esterases: carboxilesterases, arilesterases, colinesterases e acetilcolinesterases.

As carboxilesterases (EC 3.1.1.1) são inibidas apenas por organofosfatos. Catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos em ácido e álcool livres. Agem também sobre amidas aromáticas, ésteres aromáticos e tioésteres. Ozols (1987) demonstrou que a carboxilesterase no fígado de mamíferos é um catalisador altamente eficiente na hidrólise de éster, sendo a maioria capaz de clivar monoglicerídios de ácidos graxos de cadeia longa.

Essas enzimas já foram estudadas em anfíbios (PICARIELLO et al., 1982), peixes (HODGES e WHITMORES, 1977; HARITOS e SALAMASTRAKIS, 1982), aves (VEINI et al., 1986), coelhos (BELLEN et al., 1986), preás (MONJELÓ e CORDEIRO, 1979), ratos (ROBBI e BEAUFAY, 1983) e camundongos (von DEIMLING et al., 1984).

As carboxilesterases mais conhecidas encontram-se no fígado de mamíferos (HUANG et al., 1994; MORGAN et al., 1994), ocorrendo na fração microssomal, onde compreendem de 5% a 7% do total de proteínas. Seu papel fisiológico é incerto. Junge (1984) sugere a função de auxiliar no sistema de desintoxicação do organismo, participando do metabolismo de ésteres ou amidas.

As carboxilesterases das espécies de Mammalia compreendem uma família multigene, cujos produtos gênicos estão localizados no retículo endoplasmático e citosol de muitos tecidos (SATOH e HOSOKAWA, 2006). Sua principal característica é apresentar uma conservação na tríade catalítica (MARSHALL et al., 2003), com o sítio ativo composto por uma serina, um glutamato e uma histidina (OLLIS et al., 1992; OAKESHOTT et al., 1999).

Apresentam uma ampla variação de funções incluindo neurotransmissão em animais (VOGT et al., 1995), degradação de xenobióticos em fígado de mamíferos (SATOH e HOSOKAWA, 1998), resistência à inseticidas em insetos (HEMINGWAY, 2000), detoxificação ou ativação metabólica de várias drogas, poluentes ambientais e carcinogênicos (SATOH e HOSOKAWA, 1998).

Os padrões de expressão dos genes codificadores das carboxilesterases são regulados durante desenvolvimento pelo estado nutricional, fatores hormonais e xenobióticos, sendo a sua expressão observada principalmente no fígado, intestino

delgado, rim e pulmão (SATOH e HOSOKAWA, 1998; SATOH et al., 2002). Há vários fatores que influenciam a atividade da carboxilesterase, diretamente ou no nível da regulação da enzima, sendo que a exposição a poluentes ambientais ou a drogas lipofílicas podem resultar na indução da atividade (SATOH e HOSOKAWA, 2006).

Os vários estudos realizados em animais têm sido concordantes quanto à observação de que a maior atividade hidrolase ocorre no fígado (HOSOKAWA et al., 2001), enquanto que uma atividade moderada foi observada nos túbulos proximal de ratos (TSUJITA et al., 1988, 1993). Também nesses foi relatada uma atividade significativa da enzima no intestino delgado (INOUE et al., 1979; MORGAN et al., 1994; CAMPBELL et al., 1987).

Uma variação na atividade da carboxilesterase ao longo do intestino já foi verificada, e esta é maior nas porções iniciais do intestino, em que sua atividade é cerca de 1,5 vezes maior no jejuno do que no íleo (MASAKI et al., 2007, TAKETANI et al., 2007).

Enzimas carboxilesterases foram inicialmente classificadas por sua especificidade ao substrato e *pI*. Entretanto, esta classificação é ambígua na sobreposição da especificidade ao substrato. Uma única reação esterolítica é frequentemente mediada por vários tipos de enzimas (SATOH e HOSOKAWA, 2006). Por esse fato, Satoh e Hosokawa (1998) propuseram uma nova classificação e nomenclatura de isoenzimas carboxilesterases de Mammalia, classificando as isoenzimas em cinco subfamílias, CES 1, CES 2, CES 3, CES 4 e CES 5, de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos, sendo que a identidade de sequência das isoenzimas da carboxilesterase é baseada na carboxilesterase do fígado humano

(SATOH e HOSOKAWA, 1998). Como exemplo, as famílias CES1 e CES2 compartilham 40-50% de identidade da sequência de aminoácidos, mas têm diferentes especificidades ao substrato (SATOH et al., 2002; IMAI et al., 2006).

Algumas carboxilesterases são altamente específicas, atuando somente em substrato particular (SUSSMAN et al., 1989), embora outras são capazes de hidrolisar uma ampla variação de substratos (OAKESHOTT et al., 1991). Assim, a variação da distribuição das isoenzimas em tecidos animais, como por exemplo, CES1 e CES2 resulta da diferença na atividade hidrolase órgão específica. Quando a mesma família de enzima está presente em um órgão, em diferentes espécies animais, sua atividade esterase pode ainda variar, devido à diferente especificidade aos substratos decorrentes da presença de diferentes isoformas.

As arilesterases (EC 3.1.1.2) são inibidas por reagentes sulfidrílicos, como mercúrio e chumbo e por cátions metálicos e atuam preferencialmente, sobre substratos aromáticos. Nos mamíferos estão associadas à partículas de lipoproteínas de alta densidade (VHLP) do plasma, sendo inibidas por reagentes como o PHMB (parahidroximercuribenzoato) e metais pesados tais como Hg^{++} , Cu^{++} e La^{+++} (JUNGE e KLEES, 1984). Seu papel fisiológico é desconhecido, mas por estar associada com partículas lipoprotéicas do soro, acredita-se estarem envolvidas no metabolismo de lipídeos.

Alguns estudos têm revelado que certas aves e insetos apresentam uma baixa atividade das arilesterases, o que poderia explicar a maior sensibilidade desses organismos aos inseticidas organofosforados, em comparação com mamíferos (WALKER et al., 1991).

As colinesterases representam uma das famílias mais polimórficas de enzimas e estão presentes em todos os organismos. São inibidas por organofosfatos e carbamatos, sendo esta última substância responsável pela distinção entre carboxilesterases e colinesterases. Podem ainda ser classificadas em acetilcolinesterases e pseudocolinesterases.

Essa complexidade nas formas e tipos das esterases dificulta também a caracterização funcional de suas atividades.

A atividade dos genes nos tecidos reflete a atuação dos mecanismos de regulação no desenvolvimento e na diferenciação celular. No caso das esterases, além da regulação diferencial, a distribuição nas diferentes partes do corpo e tecidos de um organismo pode indicar ou sugerir o possível papel fisiológico.

Embora as esterases têm sido estudadas em diversos organismos, as melhores informações sobre o seu funcionamento foram, até o momento, obtidas em insetos, onde estão envolvidas em processos digestórios (KAPIN e AHMAD, 1980; SREERAMA e VEERABHADRAPPA, 1991; KERLIN e HUGUES, 1992; ARGENTINE e JAMES, 1995), reprodutivos (COSTA et al., 1983; RICHMOND e SÊNIOR, 1991; KAROTAN et al., 1993), na regulação dos níveis do hormônio juvenil (KORT e GRANGER, 1981; ZERA e HOLTMEIER, 1992; GU E ZERA, 1994) e degradação de inseticidas (MUTERO et al., 1994; WHYARD et al., 1994; FEYEREISEN, 1995).

Em espécies de vertebrados a atividade da carboxilesterase também pode estar relacionada a dieta. Geralmente espécies onívoras, herbívoras, insetívoras e granívoras (isto é, onívoras e não carnívoras) têm maior atividade de carboxilesterase do que os carnívoros. A possibilidade que tem sido considerada é do requerimento

desta enzima no metabolismo dos constituintes da dieta (THOMPSON et al., 1991). Westlake et al. (1983) relataram diferenças entre a atividade geral da esterase no soro de espécies de mamíferos e aves herbívoros/onívoros e carnívoros. O estudo aponta a evidência de que espécies de pássaros onívoras e herbívoras têm uma maior variação de formas de esterases, acompanhada da maior atividade de carboxilesterase do que as espécies carnívoras. Este fato sugere que qualquer diferença pode ser relacionada, primariamente, a fatores alimentares do que fatores metabólicos.

I.C.1.b. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) ou monoester ortofosfórico fosfohidrolase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres fosfato em pH alcalino, resultando na remoção de um grupo fosfato (CALHAU et al., 2000). Sob condições fisiológicas a fosfatase alcalina pode hidrolisar um grande número de substratos naturais incluindo piridoxal-5'-fosfato, β -glicerofosfato, fosfoetanolamina e pirofosfato (WHYTE et al., 1995).

A fosfatase é amplamente distribuída em vários tecidos, onde aparece ligada a membrana basal (FUJIMORI-ARAI et al., 1997; WADA et al., 2001). Alcança grande concentração no fígado, osso, intestino e placenta, porém, praticamente todos os tecidos do corpo contêm, no mínimo, uma pequena quantidade.

Como as esterases, representa um sistema de isoenzimas, todas glicoproteínas, que diferem em suas propriedades físico-químicas e eletroforéticas, e são codificadas por diferentes genes (CALHAU et al., 2000). Modificações pós-

tradução originam as várias isoformas, cuja designação reflete o local de expressão mais elevada (NEGRÃO et al., 2003).

Em primatas superiores são descritas três isoenzimas, a placentária, intestinal e uma não específica, que ocorre em diferentes tecidos (fígado/osso/rim) (SUSSMAN et al., 1989; van HOOFF e de BROE, 1994). A fosfatase alcalina intestinal é normalmente expressa somente no intestino delgado.

O aparecimento da fosfatase alcalina intestinal com propriedades únicas e alta atividade específica é uma característica de mamíferos (KOMODA et al., 1986) porém, em ratos há duas isoformas distintas (rIALP-I e rIALP-II), com 79% de identidade nos aminoácidos, diferindo notavelmente na extremidade carboxi-terminal (ENGLE e ALPERS, 1992; XIE et al., 1997). Em coelho a fosfatase intestinal é expressa em estágios iniciais da gestação no fígado e rim (FUJIMORI-ARAI et al., 1997).

A fosfatase humana consiste de no mínimo quatro isoenzimas geneticamente diferentes, denominadas tecido inespecífica, intestinal, placentária e germinativa (MATSUSHITA et al., 2000). A fosfatase alcalina inespecífica é encontrada em quase todos os tecidos, sendo mais abundante nos rins, osso e fígado (van HOOFF e de BROE, 1994).

A origem da família gênica das fosfatases alcalinas é hipoteticamente atribuída à uma série de duplicações gênicas. A hipótese estabelece que a primeira duplicação de um gene ancestral deve ter produzido o gene da fosfatase alcalina tecido não específica e, uma duplicação subsequente deve ter, então, causado modificações nos genes para as demais fosfatases (placentária, fosfatase alcalina embrionária/placental-like e fosfatase alcalina intestinal) (XIE e ALPERS, 2000).

Os níveis da fosfatase alcalina são regulados geneticamente e a liberação de cada uma das isoenzimas e isoformas para a corrente sanguínea, o lúmen intestinal ou a bile é dependente de situações fisiológicas e patológicas (NEGRÃO et al., 2003).

A fosfatase alcalina tem especificidade para diversos substratos e, desta forma, vários métodos têm sido utilizados para quantificar a sua atividade no soro e outros materiais biológicos, sendo que todos dependem da taxa de hidrólise de vários ésteres fosfatos sob condições específicas de temperatura e pH. Entre os vários substratos utilizados pode ser destacado o p-nitrofenil fosfato, um composto incolor, que após a hidrólise do grupo fosfato pela enzima, resulta na liberação de p-nitrofenol, que tem coloração amarela e pode ser quantificado por espectrofotometria em 400 nm. A quantidade de p-nitrofenol liberado indica a quantidade de quebras que ocorreram no substrato e dessa forma permite o cálculo da atividade e concentração de fosfatase na amostra (BESSEY et al., 1946).

Alguns estudos têm constatado que a concentração total da fosfatase alcalina depende do sexo e da idade. As crianças apresentam altas concentrações de fosfatase alcalina óssea devido ao crescimento, especialmente no período da puberdade. Após esta fase ocorre um rápido declínio (YONG, 1967). Negrão et al. (2003), ao analisarem a variação da atividade da fosfatase alcalina sérica humana em indivíduos com idade e sexos diferentes, verificaram que a fosfatase alcalina tecidual não específica aumenta gradualmente com a idade em ambos os sexos, sendo mais acentuada dos 50 aos 60 anos nos homens, diminuindo em seguida, enquanto nas mulheres a atividade foi mais acentuada na faixa dos 69 anos. Nas mulheres a fosfatase alcalina intestinal se estabiliza (diminuindo ligeiramente) após os 69 anos, e

nos homens a partir dos 59 anos. Em macacos foi obtida uma associação positiva entre a fosfatase alcalina e idade (LEES e RAMSAY, 1999).

Em ratos, mudanças na idade afetam significativamente a estrutura da membrana da borda em escova dos enterócitos e os níveis de atividade das enzimas presentes, sendo observada uma redução na absorção de nutrientes. A diminuição da densidade das microvilosidades foi correlacionada com o declínio da atividade das enzimas da borda em escova no intestino delgado, o que explicaria a diminuição da atividade da fosfatase alcalina intestinal (JANG et al., 2000).

Na gravidez a fosfatase alcalina no soro está aumentada devido a isoenzima placentária (YONG, 1967), cujos níveis se elevam no início do primeiro trimestre e podem chegar ao dobro do normal no final deste período (WHYTE et al., 1995). Os níveis de fosfatase alcalina permanecem elevados até um mês após o término da gravidez.

A presença da fosfatase alcalina em vários tecidos das muitas espécies, desde microrganismos até o homem, indica que ela tem uma função fundamental. Contudo, seu papel fisiológico não está ainda totalmente esclarecido (van HOOFF e de BROE, 1994).

Alguns estudos têm fornecido indícios para uma regulação de funções celulares, como proliferação, diferenciação e transformação (CALHAU et al., 2000), regulação em vários processos extracelulares, incluindo formação do osso e mineralização (MAKINEN e PAUNIO, 1969), participação no transporte de fosfato inorgânico (Pi) no rim, intestino e talvez outros tecidos (KEMPSON et al., 1979), e no transporte intestinal de lipídios (YOUNG et al., 1981). Também têm sido demonstrado uma correlação positiva entre a atividade da fosfatase alcalina por

unidade de peso no fígado, nos rins, no duodeno e no jejuno, e entre a extensão da membrana plasmática apical por unidade de volume dos mesmos tecidos (CALHAU et al., 1999), o que reforça a associação entre a fosfatase alcalina e sistemas de transporte. Um papel na absorção de ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e proteínas do intestino não é descartada (WADA et al., 2001; NARISAWA et al., 2003).

Variação nos níveis alimentares de gordura afetam a atividade da fosfatase alcalina no intestino, linfa e soro, e por isso foi suposto que a enzima tem função no metabolismo de fosfolipídios (KAPLAN, 1972). Pessoas com grupos sanguíneos B ou O, e que são secretores, apresentam elevação da fosfatase alcalina duas horas após alimentação gordurosa (NAOUM, 1999). Um requerimento para a ação específica da enzima poderia explicar a maior atividade da fosfatase alcalina durante a alimentação rica em gordura do que de carboidrato, visto que somente o lipídio pode requerer fosforilação durante o transporte. Alternativamente, essas diferenças podem ocorrer em resposta a diferentes concentrações luminiais de carboidratos, que variam em sua capacidade para estimular a fosfatase alcalina intestinal (McCARTHY et al., 1980).

A mucosa do intestino tem o maior conteúdo de fosfatase alcalina de qualquer tecido do corpo (SCHMIDT e THANNHAUSER, 1943) e, por isso, existem muitos estudos sobre a fosfatase alcalina intestinal. Estudos em várias espécies de animais têm mostrado que esta enzima está ligada à membrana apical através de ligação covalente fosfatidilinositolglicana (ENGLE et al., 1995). Ela também tem sido encontrada associada com uma partícula surfactante e secretada na

lâmina própria, capilares linfáticos, soro e lúmen do intestino delgado em resposta a absorção de gordura (ZHANG et al., 1996).

Várias funções associadas com a fosfatase alcalina intestinal têm sido sugeridas, e entre elas está o de ser responsável por hidrolisar ligações ester fosfóricas de compostos orgânicos (SOGABE et al., 2004), uma função na absorção de gordura (MAHMOOD et al., 1994; ZHANG et al., 1996) e no transporte transcelular intestinal de nutrientes (BAILLIEN e COGNEAU, 1995).

Vários estudos têm demonstrado que múltiplas formas de fosfatase alcalina (isoenzimas) são expressas no intestino delgado de roedores (ENGLE et al., 1995), bovinos (BESMAN e COLEMAN, 1985; BUBLITZ et al., 1993) e humanos, porém, as múltiplas formas de RNAm codificando a fosfatase alcalina intestinal são devidas a diferenças na poliadenilação (HENTHORN et al., 1988), e somente uma proteína é produzida. Porém a maioria das espécies expressam exatamente uma única fosfatase alcalina intestinal, apesar de que em duas espécies de bovinos, no mínimo duas isoenzimas já foram encontradas (BESMAN e COLEMAN, 1985), e em ratos foram isolados dois genes que codificam fosfatase alcalina intestinal que, apesar de apresentarem organização semelhante, apresentam diferentes regiões 5' flanqueando as regiões promotoras.

Os níveis de fosfatase alcalina intestinal variam entre as diferentes espécies. Em ratos com diferentes dietas foi observado um gradiente próximo-distal na atividade da fosfatase no intestino. Dietas ricas em proteína conduziram a uma maior atividade da enzima em todas as regiões do intestino, enquanto que, dietas ricas em gordura e carboidrato levaram a diferenças significativas da atividade em diferentes regiões do intestino. Esses dados suportam a hipótese de que a fosfatase

alcalina pode ter importante função fisiológica na defosforilação de fosfoproteínas e outros componentes alimentares (McCARTHY et al., 1980).

Wada et al. (2001) demonstraram que a atividade específica da fosfatase alcalina nas partes superiores do intestino de rato é alta, evidenciando que os nutrientes são absorvidos principalmente nesta parte do intestino, e a absorção estaria portanto, diretamente correlacionada com a atividade da fosfatase alcalina. As outras isoenzimas do intestino superior desempenhariam uma função na absorção de ácidos graxos e carboidratos. Em ratos a fosfatase alcalina intestinal no duodeno e íleo diferem nos parâmetros cinéticos, provavelmente devido a expressão da isoforma IALP II somente no duodeno (CALHAU et al., 2000).

Em humanos, a maior atividade catalítica da fosfatase alcalina intestinal é observada no duodeno, enquanto a atividade em coelho é maior no íleo do que no duodeno. Essa diferença tem sido atribuída a uma variação funcional da fosfatase alcalina intestinal humana e de coelho no trato digestório desses organismos (MIURA et al., 1989; FUJIMORI-ARAI et al., 1997).

Também têm sido relatadas diferenças estruturais e funcionais entre as metades proximal e distal do intestino durante o desenvolvimento e maturação de ratos que mamam. Durante o período de lactação, a atividade total da fosfatase alcalina é maior no íleo e torna-se muito maior no intestino proximal. Os resultados demonstraram que as formas solúveis e de membrana da fosfatase alcalina em ratos que mamam são isoenzimas distintas (YEDLIN et al., 1981).

Não há nenhum estudo sobre fosfatase em espécies de morcegos, o que seria de grande interesse, uma vez que, como vimos, é o grupo que entre os mamíferos apresenta a maior diversidade de dieta (DEMPSEY, 2004).

Os estudos sobre a nutrição e o sistema de enzimas digestivas em morcegos são raros na literatura, e as indicações de que a atividade da fosfatase alcalina varia entre diferentes dietas (KEMPSON et al., 1979; McCARTHY et al., 1980; NARISAWA et al., 2003) motivam a obtenção de informações sobre aspectos da digestão em espécies de Chiroptera com diferentes hábitos alimentares. O desenvolvimento de estudos que caracterizem a atividade enzimática de diferentes enzimas relacionadas à digestão como a fosfatase alcalina e as esterases é interessante e as informações certamente serão importantes para auxiliar na compreensão da fisiologia do sistema digestório dos animais e para uma melhor compreensão das funções das enzimas.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

A escassez de informações e a possibilidade de se analisar os sistemas enzimáticos em quatro tecidos, fígado, rim, estômago e intestino, em oito espécies de morcegos: *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus*, que apresentam diferentes hábitos alimentares motivou o presente trabalho, que teve como objetivos:

- 1) Identificar a presença de esterases em indivíduos pertencentes a oito espécies de três famílias de Chiroptera que apresentam variação no hábito alimentar;
- 2) Dosar a atividade enzimática das esterases e fosfatases nas espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares.

III. ARTIGOS

Padrão de esterases no fígado, rim, intestino e estômago de espécies de morcegos frugívoras, insetívoras, nectarívora e hematófaga

Paula Renata Lopes Moreira¹, Carlos Roberto Ceron², Eduardo Alves de Almeida² & Eliana Morielle-Versute³

¹ Departamento de Biologia, ² Departamento de Química e Geociências e ³ Departamento de Zoologia e Botânica - UNESP- Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Palavras-Chave: Carboxilesterase, Isoenzimas, Atividade, Hábito Alimentar

Resumo

Os morcegos apresentam especializações alimentares que refletem especialmente nas adaptações morfológicas do aparelho crânio-dental, na histoquímica e ultra estrutura do trato digestório, nas glândulas salivares e no sistema enzimático. Estes aspectos estimulam o estudo da caracterização molecular das diferentes estratégias nutricionais, através de análises bioquímicas de enzimas que atuam nos processos digestórios. Pela sua ampla distribuição nos diferentes tecidos dos organismos, a esterase é uma enzima muito estudada, e que participa de vários eventos, como o transporte de lipídios no intestino, nos processos digestórios e reprodutivos e na degradação de inseticidas. A análise das esterases presentes em quatro diferentes tecidos (fígado, rim, estômago e intestino) de oito espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares (*Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus*), revelou um padrão espécie-específico para a enzima nos diferentes tecidos, com uma maior similaridade entre o fígado e o rim, e o estômago e intestino, evidenciando uma maior expressão da enzima no fígado e no rim. Observou-se a predominância de α -esterases em todos os tecidos para todas as espécies, sendo que β -esterases ocorreram apenas no intestino da espécie *Myotis nigricans*, e α - β esterases foram observadas nas espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus*, e na espécie insetívora *M. nigricans*. A caracterização das esterases com base na inibição permitiu identificá-las como carboxilesterases, embora elas tenham sido inibidas apenas parcialmente pelo malathion e PMSF. A análise da atividade da carboxilesterase, medida pelo substrato feniltioacetato detectou, na maioria das espécies, maior atividade desta

enzima no intestino, seguido do rim e fígado, e estômago. Os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que diferentes dietas geralmente conduzem à mudanças específicas na atividade de várias enzimas, e a presença e a atividade variável das esterases nos tecidos das espécies analisadas evidenciam uma função para a enzima na digestão ou degradação de diferentes compostos presentes na dieta.

Abstract

The food specialities of bats reflect especially on morphological adaptations of the skull and dental apparatus, in histochemistry and ultrastructure of the digestive system, in the salivary glands and the enzymatic system. These features stimulate the study of molecular characterization of different nutritional strategies, through biochemical analysis of enzymes that act in digestive process. For its wide distribution in different tissues of organisms, the esterase enzymes is very studied, and it participates in several events, such as transport of lipids in the intestine, in digestive and reproductive processes and the degradation of insecticides. The analysis of esterases present in four different tissues (liver, kidney, stomach and intestine) from eight species of bats with different dietary habits (*Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina* and *Desmodus rotundus*), revealed a species-specific enzyme pattern for different tissues, with a greater similarity between the liver and kidney, and stomach and intestine, showing greater expression of the enzyme in the liver and kidney. There was a predominance of α - esterases in tissues for all species, β - esterases occurred only in the intestine of the insectivorous species *M. nigricans*, and β - α esterases occurred in frugivorous species *A. planirostris*, *A. lituratus* and *P. lineatus*. The characterization of esterases based on the inhibition allowed identify them as carboxylesterases, although they have been only partially inhibited by malathion and PMSF. The analysis of the carboxylesterase activity, measured by the substrate feniltoacetato found in most species, higher activity of this enzyme in the intestine, followed by kidney and liver and stomach. The results of this study reinforce the idea that different diets usually lead to changes

in specific activity of several enzymes, and the variable presence and activity of esterases in the tissues of species analyzed show a function for the enzyme in the digestion or degradation of different compounds present in diet.

Introdução

Cerca de um quarto de todas as espécies atuais de mamíferos são morcegos (Wilson e Reeder 2005), o que representa 1100 espécies reconhecidas mundialmente. Eles constituem a Ordem Chiroptera, que é subdividida em duas Subordens, a Megachiroptera com 180 espécies de morcegos frugívoros que ocorrem no Velho Mundo, e os Microchiroptera, com cerca de 930 espécies amplamente distribuídas pelo Mundo (Simmons, 2005). Cerca de 75% dos microquiróteros alimentam-se de insetos, contudo outras fontes alimentares são observadas, como outros invertebrados, peixes, anfíbios, pequenos mamíferos (incluindo outros morcegos), sangue, frutas, flores, néctar e pólen.

O grupo melhor estudado de morcegos é a família Phyllostomidae, que ocorre exclusivamente no Novo Mundo, onde constituem o exemplo mais espetacular de radiação adaptativa caracterizada pela grande divergência de dietas refletidas especialmente na morfologia e comportamento dos diferentes táxons. Os filostomídeos podem alimentar-se de sangue, insetos, pequenos vertebrados, néctar, frutas e um complexo de misturas onívoras (Gardner, 1977). Este amplo espectro de dieta fornece uma oportunidade única para investigar a influência desta sobre características bioquímicas. Animais que ingerem diferentes itens alimentares devem processar os nutrientes e toxinas de maneira contrastante ou variada. Assim, a dieta tem grande potencial para atuar como uma força seletiva importante e modeladora das reações digestivas e metabólicas (Studier et al., 1983; Karasov e Diamond, 1988; Diamond, 1991).

Os estudos envolvendo a caracterização molecular e evolutiva de enzimas digestivas em morcegos são raros na literatura e a diversidade da alimentação e dos

recursos utilizados pelos morcegos podem estar diretamente correlacionados com uma diversificação das suas enzimas digestivas, bem como com as enzimas envolvidas no processo oxidativo muscular, para o desenvolvimento do vôo (Buchholz et al., 1958, Yacoe et al., 1982, Hermanson et al., 1993; Redondo e Santos, 2006).

A técnica de eletroforese de proteínas séricas e extratos de tecidos em gel de poliacrilamida, seguida da aplicação de métodos derivados de histoquímica para a visualização de proteínas, tem sido utilizada em diferentes estudos para a caracterização de proteínas específicas como imunoglobulina, albumina, esterase entre outras (Augustinsson, 1961, Paul e Fottrell, 1961, Braend e Andersen 1987, Fisher e Scott, 1978, Bell et al., 1984, Alavi-Shoustari et al., 2006). As esterases têm sido amplamente estudadas em insetos, onde estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como a regulação dos níveis de hormônios juvenis (Kort e Granger, 1981; Gu e Zera, 1994), reprodução (Richmond et al., 1980; Mane et al. 1983; Karotan e Oakeshott, 1993), gravidez (Breed e Jolly, 1987), digestão (Argentine e James, 1995), funcionamento do sistema nervoso (Mesulam e Geula, 1991), desenvolvimento de resistência aos inseticidas (Fournier et al., 1992; Lee et al., 2000), entre outros. Poucos são os trabalhos com esterases de mamíferos, e os estudos têm sido aplicados para a caracterização genética de populações e espécies e têm revelado diferenças entre as espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Markert e Hunter, 1959, Coutinho et al. 1964, Womack, 1973, Dew e Kennedy, 1980, von Deimling et al., 1985, Yamada et al., 1993; Bell et al., 1998, Verimli et al., 2000; Erdogan e Ozbeyaz, 2004).

Apesar das extensas investigações que vêm sendo realizadas nos diferentes organismos, pouco se pode dizer quanto ao papel das esterases no metabolismo de mamíferos, com exceção, naturalmente, para acetilcolinesterase, que está envolvida na transmissão de impulsos nervosos (Aldridge, 1954, Andreasen et al., 2001, Rotundo, 2003).

A caracterização funcional da atividade das esterases é complexa e a classificação mais utilizada baseia-se principalmente na sensibilidade diagnóstica de concentrações variadas de três grupos de reagentes inibidores: o ácido p-cloromercúrio benzóico (pCMB), organofosforados (PO), e o sulfato de eserina (Holmes e Masters, 1967). A utilização destes inibidores distingue quatro classes de esterases: acetilesterases, arilesterases, carboxilesterases e colinesterases. Todas as classes são heterogêneas, apresentando múltiplas formas reconhecidas pelos seus parâmetros físico-químicos e de desenvolvimento.

Entre as esterases, as carboxilesterases têm sido uma das mais estudadas em mamíferos. Como as demais esterases, compreendem uma família multigene, cujos produtos gênicos estão localizados no retículo endoplasmático e citosol de muitos tecidos (Sato e Hosokawa, 2006). Sua principal característica é apresentar uma conservação na tríade catalítica (Marshall et al., 2003), com o sítio ativo composto por uma serina, um glutamato e uma histidina (Ollis et al., 1992; Oakeshott et al., 1999).

Entre suas várias funções pode ser destacada um papel na neurotransmissão em animais, a degradação de xenobióticos em fígado de mamíferos, a resistência a inseticidas em insetos e a detoxificação ou ativação metabólica de várias drogas, poluentes ambientais e carcinogênicos (Vogt et al., 1995, Sato e Hosokawa, 1998;

Heminguway, 2000). A modulação na expressão dos genes é diretamente influenciada pelo estado nutricional do organismo, hormônios e substâncias xenobióticas, e sua expressão observada principalmente no fígado, intestino delgado, rim e pulmão, sendo a maior atividade hidrolase observada no fígado (Satoh e Hosokawa, 1998; Hosokawa et al., 2001, Satoh et al., 2002).

Assim como para a maior parte das esterases, existe variação na atividade da carboxilestrase ao longo do intestino, onde é maior nas porções iniciais (Masaki et al., 2007; Taketani et al., 2007).

Em razão da sobreposição de especificidade da enzima a diferentes substratos, Satoh e Hosokawa (1998) propuseram, baseados na homologia de seqüências de aminoácidos, uma nova classificação e nomenclatura de isoenzimas carboxilesterases de Mammalia, classificando as isoenzimas em cinco subfamílias, CES 1, CES 2, CES 3, CES 4 e CES 5. As enzimas das famílias CES1 e CES2 compartilham 40-50% de identidade da seqüência de aminoácidos, mas têm diferentes especificidades a substratos tornando a atividade hidrolase da enzima, órgão-específica (Satoh et al., 2002; Imai et al., 2006).

Mesmo quando a mesma família de enzima está presente em um determinado órgão de diferentes espécies animais, sua atividade esterásica pode ainda variar, devido a diferente especificidade ao substrato pois a enzima pode apresentar diferentes isoformas (Imai et al., 2006).

Neste trabalho, a eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para comparar as esterases de quatro órgãos (fígado, rim, intestino e estômago) em oito espécies de morcegos com diferentes dietas, a fim de investigar a ocorrência de

expressão e os tipos de esterases presentes nestes tecidos. Foi analisada o grau de atividade da carboxilesterase nos quatro tecidos.

Material e Métodos

Material Biológico

Foram avaliados tecidos de 10 indivíduos adultos de cada uma das oito espécies de morcegos: *Artibeus lituratus* (6M, 4F), *Artibeus planirostris* (4M, 6F) e *Platyrrhinus lineatus* (6M, 4F), frugívoros, *Glossophaga soricina* (2M, 8F), nectarívoro, e *Desmodus rotundus* (10F), hematófago, todas da família Phyllostomidae; *Molossus rufus* (1M, 9F) e *Molossus molossus* (4M, 6F), insetívoros da família Molossidae, e *Myotis nigricans* (2M, 8F) insetívoro da família Vespertilionidae. Os espécimes foram obtidos em área urbana e rural de São José do Rio Preto, SP. Foram utilizadas redes *mist – nets* dispostas em rotas de voo e saídas de abrigos. Os exemplares capturados foram transportados ao Laboratório de Chiroptera do IBILCE-UNESP, onde receberam apenas água e permaneceram até o momento da obtenção das amostras de tecidos. Os animais foram depositados na coleção de quirópteros do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE/UNESP – SJRP, mantidos em álcool.

A discriminação dos espécimes por família, espécie, número de registro, sexo e procedência dos animais está apresentada na Tabela 1.

Obtenção dos tecidos e extratos

Os fragmentos com 20 mg obtidos do estômago, fígado, rim e segmento proximal do intestino delgado (duodeno) foram obtidos imediatamente após a morte dos animais e cuidadosamente lavados com solução salina de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Em seguida eles foram picotados e macerados em tubos *ependorf* contendo de 120 a 500 μ l de solução tampão pH 8,8 (Tris-HCl 0,1 M), a temperatura de 4 °C. Os homogeneizados foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes armazenados a -20 ° C até o momento da eletroforese. A diluição aplicada a cada amostra está especificada na Tabela 2.

Identificação das esterases

Amostras de 10 μ l do sobrenadante foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (PAGE), e submetidas a eletroforese em tampão de corrida Tris-Glicina (0,1M) pH 8,3 a 180 V durante 6 h (de acordo com Ceron, 1988). A fim de identificar as esterases de acordo com a sua afinidade para α e β -naftil acetatos, os géis foram pré-incubados por 30 minutos em 100 ml de tampão fosfato de sódio (0,1M) pH 6,2 à temperatura ambiente (\pm 25 ° C). Após a remoção do tampão a atividade das esterases no gel foi detectada pela solução de 100 ml de fosfato de sódio 0,1M, 60 mg de α -naftil acetato, 50 mg de β -naftil acetato, 120 mg de Fast Blue RR e 10 ml de N-propanol, por 40 minutos na ausência de luz (Steiner e Johnson, 1973). O excesso de coloração foi removido pela lavagem do gel com metanol-ácido acético-água (50:10:50 vol.). Após este tratamento, foram consideradas α - esterases as bandas coradas em preto, β -esterases as bandas coradas em vermelho, e α - β beta esterases as bandas coradas em magenta. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Como controle e acompanhamento das esterases no gel foram utilizados extratos das espécies *Drosophila melanogaster* e *Zaprionus indianus*, cujos padrões de esterases são bem estabelecidos (Galego et al., 2006).

Testes com inibidores

Para a caracterização bioquímica das esterases no fígado, rim, intestino e estômago, foram utilizados três inibidores: malation, sulfato de eserina e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Cada inibidor foi utilizado apenas na etapa de coloração. Os compostos foram utilizados nas concentrações mais frequentemente encontradas na literatura: 1 mM, para o sulfato de eserina e PMSF e 0,7 mM para o malation. Os seus efeitos sobre a atividade das esterases foram comparados com os controles não tratados, feitos simultaneamente, e submetidos à mesma corrida eletroforética. Para comparação e controle dos inibidores foram aplicados nos géis amostras de *D. melanogaster* e *Z. indianus*. A inibição da esterases foi classificada como total (+++), parcial (++) ou fraca (+), de acordo com a intensidade de coloração da banda.

Com base nos resultados de inibição as esterases foram identificadas como carboxilesterases (aquelas inibidas por malathion e PMSF, neste caso com núcleo de eserina), colinesterases (inibidas por malathion e sulfato de eserina) e acetilesterases (não é afetada por nenhum dos Inibidores) (Holmes & Masters, 1967; Oakeshott et al., 1993).

Dosagem da atividade da carboxilesterase

Para a medida da atividade da carboxilesterase nos tecidos de fígado, rim, estômago e intestino (porção proximal) foi utilizado o substrato feniltioacetato. O volume final de reação de 500 μ L continha: 15 μ L de feniltioacetato 150 mM, 10 μ L de ditionitrobenzeno 10 mM (DTNB), 10 μ L da amostra e 465 μ L de Tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A enzima cliva o feniltioacetato em fenil + tioacetato, que reage com o DTNB formando um produto com forte absorção em 412 nm. A cinética de formação do derivado tioacetato + DTNB é proporcional à atividade da enzima, e é medida em 412 nm por um minuto a 25^oC. Uma unidade (U) de atividade da carboxilesterase representa a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de feniltioacetato/min.

Para os valores de atividade registrados foram calculados a média, o desvio padrão e a mediana representativa da espécie.

Resultados

O padrão eletroforético foi arbitrariamente dividido em três regiões: I, II e III. A divisão foi baseada nos agrupamentos das bandas (enzimas) que refletem as propriedades bioquímicas das esterases (conformação e carga)

A análise dos géis representativos do padrão de enzimas expressas nos quatro tecidos (fígado, rim, estômago e intestino) das oito espécies de morcegos analisadas revelou oito diferentes padrões enzimáticos (Figura 1). Também foi observada variação no número de enzimas expressas pelos diferentes indivíduos (dos dois sexos) nos quatro tecidos, assim como na intensidade das bandas. O número de bandas/enzimas variou de 3 a 7, sendo esses valores observados em diferentes

tecidos, ou seja, os números mínimo e máximo não foram particulares a um único tecido (Tabela 3).

Para a maioria dos tecidos e espécies as esterases ocuparam as regiões I e II, sendo algumas poucas enzimas observadas na região III.

Com alguma variação, as enzimas identificadas pela sua atividade com o uso dos substratos α - e β -beta naftil são α -esterases. Enzimas β ou α - β esterases foram observadas na espécie insetívora *M. nigricans* (β) e nos indivíduos e tecidos das espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* (α - β) (Figura 2 D e E).

O tratamento dos géis com os três inibidores, Malathion, PMSF e sulfato de eserina nas concentrações utilizadas não foram suficientes para uma classificação precisa das esterases identificadas, contudo foi verificado um predomínio da carboxilesterase.

Padrão das espécies insetívoras: M. molossus, M. rufus e M. nigricans

O número de esterases expressas em cada indivíduo foi variável nos dois sexos.

Nas três espécies insetívoras, o tecido com o maior número de esterases foi o fígado e também o intestino em *M. rufus* (Tabela 3 e Figura 3A e B).

Em *M. molossus* e *M. rufus*, à exceção de 2 e 3 esterases respectivamente, que ocuparam a região II, as outras 4 enzimas observadas nos diferentes tecidos ocuparam a região III, enquanto que a maioria das esterases identificadas nos tecidos de *M. nigricans* ocuparam a região II e duas (β -esterases) ocuparam a região I. Além da variação no número e posição das enzimas, os tecidos apresentaram diferenças na intensidade das bandas, que nas três espécies foi maior nas enzimas presentes no fígado, e também no intestino e estômago de *M. nigricans*.

O padrão de expressão das enzimas foi muito similar nos diferentes tecidos, contudo a similaridade foi maior entre o fígado e rim e entre o estômago e intestino. Apenas em *M. rufus* foi observada uma variação maior na presença das bandas no tecido do intestino (Figura 2B) em relação aos outros três. Apesar das similaridades nos padrões das enzimas nos quatro tecidos da mesma espécie, e entre os tecidos do fígado e rim das espécies *M. molossus* e *M. rufus*, no conjunto eles foram diferentes entre as espécies, indicando uma característica espécie- específica para a presença dessas enzimas nesses tecidos.

A maioria das esterases foi reconhecida como alfa-esterase. Apenas duas diferentes β - esterases na região I foram identificadas no intestino de dois indivíduos da espécie *M. nigricans*, e uma α -beta esterase no estômago e intestino de um indivíduo dessa mesma espécie (Figura 2C).

Padrão das espécies frugívoras A. planirostris, A. lituratus e P. lineatus

Semelhante ao observado nas espécies insetívoras, houve variação no número de enzimas expressas nos diferentes indivíduos e tecidos. Contudo, os indivíduos da espécie *P. lineatus* apresentaram uma menor variação, o que resultou em um padrão homogêneo de enzimas nos diferentes tecidos (Tabela 3 e Figuras 2E, 3C e D). Em *A. planirostris* e *A. lituratus* o maior número de bandas foi observado no fígado e rim. Contudo, as esterases identificadas nos quatro tecidos apresentaram o mesmo padrão de expressão. Diferença na expressão das enzimas nos diferentes tecidos só foi observada nos indivíduos de *P. lineatus* em que uma menor expressão foi notada no estômago e intestino.

Nas três espécies as esterases distribuíram-se nas regiões I e II. Nas espécies *A. planirostris* (Figura 2D) e *A. lituratus* três enzimas foram reconhecidas como α - β esterases, com hidrólise preferencial para β -naftil acetato, e quatro como α -esterases. Em *P. lineatus* as esterases identificadas foram reconhecidas como α - β esterases, com preferência de hidrólise para α -naftil acetato (Figura 2E).

Diferente do observado para as espécies congênicas *M. molossus* e *M. rufus*, em *A. planirostris* e *A. lituratus* o padrão de esterases foi variável nos indivíduos das duas espécies, que não apresentaram um padrão similar de expressão nos quatro tecidos analisados. Além disso, o padrão de enzimas apresentado pelas espécies foi diferente ao de *P. lineatus*.

Padrão das espécies nectarívora G. soricina e hematófaga D. rotundus

Conforme se observa na Tabela 3, o número de esterases nos quatro tecidos das duas espécies variou, sendo o maior número de enzimas observado no estômago de *G. soricina* e fígado e estômago de *D. rotundus*. À semelhança das espécies frugívoras, as enzimas foram observadas nas regiões I e II.

A variação na intensidade das bandas nos tecidos de *G. soricina* e *D. rotundus* não foi tão evidente como nas espécies insetívoras e *P. lineatus* (Figura 4 A e B- colunas 7-9 para *G. soricina* e Figura 4C e D colunas 4-6 para *G. soricina* e colunas 7-9 para *D. rotundus*). O padrão homogêneo de esterases nos diferentes tecidos reflete uma baixa variação nos indivíduos analisados. Todas as enzimas foram reconhecidas como α -esterases.

O padrão de enzimas nos quatro tecidos das duas espécies foi diferente entre elas e quando comparados aos de *A. planirostris* e *A. lituratus* (Figura 4).

Inibidores

A análise dos inibidores nas espécies insetívoras, cuja atividade foi confirmada pela observação das enzimas de *D. melanogaster* e *Z. indianus*, evidenciou que o malathion e o PMSF inibem parcialmente (++) a maioria das enzimas nos quatro tecidos, sendo a inibição pelo malathion facilmente identificada na imagem do gel da Figura 5 B. Muito embora tenha sido observada uma inibição pelo sulfato de eserina, esta sempre foi menor que os demais inibidores (+). O padrão de inibição permitiu reconhecer as enzimas como carboxilesterases. Não foram identificadas colinesterases ou acetilesterases.

Nas espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* os resultados foram semelhantes aos observados nas espécies insetívoras, ou seja, as enzimas são parcialmente inibidas pelo malathion e pelo PMSF, e fracamente pelo sulfato de eserina.

O padrão de inibição das enzimas pelos três diferentes inibidores para a espécie nectarívora *G. soricina* e a hematófaga *D. rotundus* variou muito pouco em relação ao observado nas outras espécies já apresentadas. Apenas em *G. soricina* foi notado que o PMSF e a eserina inibem fracamente (+) as enzimas, que foram inibidas parcialmente (++) pelo malathion. A inibição em *D. rotundus* foi semelhante ao das espécies frugívoras e insetívoras, com inibição parcial pelo malathion e PMSF e fraca inibição pela eserina.

Atividade da carboxilesterase

A média, desvio e mediana dos valores medidos da atividade da carboxilesterase nas 320 amostras avaliadas para os quatro tecidos e indivíduos de cada espécie, estão apresentadas na Tabela 4.

Observa-se na tabela quando consideradas as médias e os desvios, que esses foram muito altos em alguns tecidos e espécies. Por essa razão, as medianas foram os valores considerados na avaliação dos resultados.

Para a espécie insetívora *M. rufus*, a maior atividade da carboxilesterase foi observada no intestino (0,43), seguido pelo fígado e estômago (0,34 e 0,32, respectivamente). No rim a atividade foi cerca de 50% menor que nos demais tecidos (0,12).

Em *M. molossus* as maiores atividades da carboxilesterase também foram observadas no intestino e no estômago, porém esses foram muito maiores, quando comparadas à *M. rufus*. No estômago a atividade foi 2,95 e no intestino 2,14. As atividades dosadas no fígado (0,34) e no rim (0,11) foram baixas e semelhantes ao observado em *M. rufus*.

Para *M. nigricans*, também insetívora, a maior atividade foi observada no fígado, e o valor foi muito elevado (23, 94), se considerados os valores observados nas outras espécies e o desvio padrão em *M. nigricans*. Em ordem decrescente de atividade seguiu o intestino (3,74), rim (0,33) e estômago (0,14).

As espécies frugívoras *A. planirostris* e *A. lituratus* apresentaram padrão de atividade semelhante, em que maior atividade da carboxilesterase foi observada no rim (0,83 e 1,46, respectivamente). Contudo, em *A. planirostris* o fígado foi o órgão que apresentou a segunda maior atividade (0,72), enquanto que em *A. lituratus* foi o intestino (0,80). Em *A. planirostris* a atividade no intestino e estômago foi semelhante (0,64 e 0,65, respectivamente), e em *A. lituratus* o fígado apresentou atividade de 0,55 e o estômago 0,36. Diferente das espécies de *Artibeus*, em *P. lineatus* foi o intestino que apresentou a maior atividade (1,03), seguido do estômago

(0,71), rim (0,18) e fígado (0,06). Apesar das diferenças na atividade nos tecidos das espécies, os valores não variaram na mesma proporção que o observado para alguns tecidos das espécies insetívoras.

A espécie nectarívora *G. soricina* apresentou valores semelhantes e maior atividade no fígado (2,51) e rim (2,4), seguido do estômago (1,32) e intestino (1,21). Em *D. rotundus*, a espécie hematófaga, foi expressiva a atividade no intestino (6,32).

Discussão

Apesar da ampla distribuição e de particularidades de, entre os mamíferos, os morcegos exibirem a maior variação de estratégias alimentares, são poucos os estudos sobre sua nutrição, e informações sobre o sistema de enzimas digestivas são raras na literatura (Ogunbiyi e Okon, 1976; Redondo e Santos, 2006). E, devido à complexidade das reações metabólicas, o estudo de determinação e caracterização das funções dos complexos enzimáticos, em especial nos processos de digestão também são raros.

Um método muito utilizado na caracterização das enzimas presentes nos diferentes tecidos é a eletroforese em gel, seguida de coloração (Steiner e Johnson, 1973; Ceron, 1988) com corantes específicos, que permitem a visualização dos produtos da reação enzimática na forma de uma “banda” no gel. Este método acompanhado da determinação da atividade específica de uma dada enzima, pela quantificação por espectrofotometria através da absorbância, na presença de substratos específicos (Calhau et al., 2000; Wada et al., 2001) é que tem embasado as diferentes interpretações nos estudos da caracterização do papel funcional de várias enzimas, em diferentes tecidos e organismos.

No presente trabalho, a aplicação dessa metodologia na análise de esterases revelou que há um padrão de expressão dessas enzimas nos diferentes tecidos, com uma similaridade maior entre o fígado e o rim e entre estômago e intestino. Além disso, a marcação mais intensa das enzimas no fígado e no rim evidenciam uma maior expressão dessas nesses órgãos quando comparadas com o estômago e intestino. As variações na posição das bandas no gel e de expressão refletem a ocorrência de um padrão espécie-específico das esterases nesses tecidos, que revelaram oito diferentes padrões enzimáticos. Apesar disso, os dados são semelhantes aos observados em outros vertebrados, em que as esterases apresentam variabilidade genética intra-específica, que no caso das espécies analisadas, não está diretamente relacionada ao sexo dos indivíduos (Coutinho et al., 1964; Dew e Kennedy, 1980; Erdogan e Ozbeyaz, 2004).

A ocorrência de α e β esterases nos tecidos também é condição observada em outras espécies animais em especial de insetos, para as quais foi feita a caracterização das enzimas e, semelhante ao observado no presente trabalho, a maioria delas foram classificadas como α -esterases (Siquierolli et al., 2004; Sousa-Polezzi e Campos Bicudo, 2005; Galego et al., 2006).

No presente trabalho foi interessante o fato de que o maior número de α - β esterases foi observado nas espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* e na espécie insetívora *M. nigricans*. Contudo, a especificidade para os dois tipos de substrato (α e β -nafilacetatos) foi variável nas espécies e em *M. nigricans*, que também apresentou duas β -esterases, e essas enzimas foram variáveis nos diferentes tecidos, ou seja, as β -esterases ocorreram no intestino e as α - β esterases no

intestino e também no estômago. Nas espécies frugívoras as α - β esterases estão presentes nos quatro tecidos.

A afinidade pelos substratos α e β naftilacetatos está relacionada à hidrólise destes substratos e, conseqüentemente, a semelhanças na estrutura terciária e na seqüência de aminoácidos das enzimas (Oakeshott et al., 1993). Com base nisso, pode-se sugerir que nas espécies congênicas *M. molossus* e *M. rufus*, onde só foram identificadas α -esterases, há uma semelhança nas esterases presentes, reforçada pelo padrão semelhante das enzimas nos diferentes tecidos. O fato de *M. nigricans* apresentar também afinidade pelo β -naftilacetato demonstra que, mesmo sendo uma espécie insetívora, contudo pertencente à outra família (Vespertilionidae), ela apresentou diferenças nas esterases presentes nos tecidos. Essas diferenças na presença de esterases podem estar relacionadas a uma especialização para uma alimentação diferenciada, o que exigiria um maquinário enzimático diferente. Isto pode também estar relacionado ao número de enzimas presentes nos vários tecidos dessas espécies.

Nas duas espécies frugívoras congênicas *A. planirostris* e *A. lituratus*, apesar das diferenças no padrão de expressão e distribuição das enzimas nos diferentes tecidos elas apresentaram afinidade pelo mesmo substrato (pelo α e pelo β naftilacetato). Em *P. lineatus*, onde as enzimas apresentaram um padrão mais homogêneo (em relação ao número) nos diferentes tecidos, diferente do observado nas espécies de *Artibeus*, as enzimas α - β esterases apresentam preferência para o α -naftilacetato, sugerindo diferenças entre essas espécies nos substratos naturais para essa enzima.

Os resultados de *G. soricina* e *D. rotundus*, espécies nectarívora e hematófaga, respectivamente, devem, de alguma forma, também estar refletindo as especializações no hábito alimentar dessas espécies. *G. soricina*, diferente de todas as demais espécies, apresentou o maior número de enzimas no estômago (7) e o menor número no fígado e intestino (4) e todas foram α -esterases. Embora *D. rotundus* apresente o hábito alimentar mais especializado, se alimentando exclusivamente de sangue, o número de enzimas apresentado nos tecidos não evidenciou nenhuma diferença, quando comparado às demais espécies, que pudesse ser indicativa ou conseqüente do hábito diferenciado. As diferenças observadas foram apenas no padrão de expressão e distribuição das enzimas nos géis. A afinidade pelo substrato foi semelhante a *G. soricina*, *M. molossus* e *M. rufus*, e as enzimas todas caracterizadas como α -esterases. Este fato sugere um papel diferenciado para as α - β esterases nas espécies frugívoras.

A caracterização das esterases com base na inibição permitiu identificá-las como carboxilesterases, embora nenhum dos três inibidores testados produziu inibição completa das bandas. Elas foram inibidas parcialmente pelo malathion e PMSF, sendo por isso, identificadas como carboxilesterases com serina no sítio ativo (serino-esterases).

O padrão de inibição das esterases em alguns organismos, como em *Drosophila* já está bem estabelecido, porém não é, necessariamente, o mesmo apresentado por outros organismos. No caranguejo *Procambarus clarkii*, por exemplo, Vioque-Fernández et al. (2007) observaram que a acetilcolinesterase é inibida pelo PMSF e pela eserina, enquanto que apenas a carboxilesterase do fígado é inibida pelo PMSF, sendo que nos demais tecidos ela não é inibida nem pela eserina ou pelo malathion.

Contudo, a inibição da carboxilesterase foi verificada por outros dois inibidores, o carbaril e o clorpirifos, que são compostos da mesma classe que a eserina e o malathion, respectivamente. O estudo revelou que o padrão de inibição é tecido específico e também influenciado pelo tipo de inibidor. Portanto, a falta de inibição completa das esterases em morcegos pode também ser atribuída possivelmente a uma menor ação dos inibidores utilizados sobre as enzimas. O teste com outros compostos organofosforados, a exemplo do estudo citado, talvez pudesse conduzir a um padrão mais preciso de inibição das esterases das espécies de morcegos.

As carboxilesterases com serina no sítio ativo, geralmente estão relacionadas à atividade proteolítica (Mateus et al., 1996), sugestiva de uma possível função digestiva ou de degradação de proteínas que contenham ésteres de ácidos carboxílicos em suas moléculas. O aparente predomínio de carboxilesterases nas espécies analisadas aponta para um alto consumo de proteína na dieta dessas espécies, independente do hábito alimentar.

A presença de carboxilesterases em diferentes órgãos de muitas espécies de mamíferos já foi relatada por vários autores e em muitos desses estudos foi notado que a maior atividade ocorre no fígado e intestino (Hasokawa et al., 2001), e a menor atividade no rim (Tsujita et al., 1988, 1993). No presente trabalho como vimos, a análise dos géis dos tecidos dos quatro diferentes órgãos das oito espécies de morcegos, revelou que o tecido com maior expressão de esterase para a maioria das espécies foi o fígado, seguido do rim e estômago e intestino.

Contudo, na análise de atividade da carboxilesterase, a maior atividade da enzima foi, para a maioria das espécies, observada no intestino, seguido pelo rim e fígado, e estômago.

Essa alta atividade da carboxilesterase no rim das espécies de morcegos, também foi observada para outras hidrolases em porcos adultos e tem sido interpretada como conseqüente da assimilação de nutrientes, que pode ocorrer também fora do sistema digestório, como por exemplo, durante a filtração e reabsorção que ocorre no rim (Smirnova et al., 2005).

Muito embora os padrões de expressão dos genes que codificam as carboxilesterases sejam regulados, entre outros fatores, pelo “status” nutricional do indivíduo (Satoh e Hosokawa, 1998), não foi possível observar um padrão da atividade da carboxilesterase com relação aos diferentes hábitos alimentares e condição alimentar das oito espécies. Contudo, foi possível observar que, das três espécies insetívoras, *M. molossus* e *M. rufus* apresentaram atividade semelhante no fígado e rim e maior atividade no intestino. Em *M. nigricans*, que apresentou valores de atividade muito maiores, quando comparado às outras duas espécies insetívoras, foi o fígado que apresentou maior atividade, ficando o intestino com o segundo maior valor.

G. soricina, semelhante à *M. nigricans*, apresentou atividade maior no fígado, contudo, diferente de *M. nigricans*, também foi maior a atividade no rim. Em *D. rotundus*, semelhante às espécies insetívoras e *P. lineatus*, foi no intestino a maior atividade, porém para os demais órgãos a atividade da carboxilesterase foi muito baixa.

Quando comparadas as atividades de *M. molossus* e *M. rufus*, com as de *A. planirostris* e *A. lituratus* que são espécies congênicas, observa-se que o padrão de atividade em *M. molossus* e *M. rufus* são iguais para o fígado e rim e, para os demais órgãos, as atividades são diferentes, sendo que *M. molossus* apresentou atividade

muito maior para o intestino e estômago que *M. rufus*. Em *A. planirostris* e *A. lituratus* o padrão de atividade nos quatro órgãos analisados foi muito semelhante. Essas variações observadas nas quatro espécies podem ser indicativas da exploração de nichos diferentes pelas espécies *M. molossus* e *M. rufus*.

As diferenças no padrão de atividade das esterases também podem ser devidas ao efeito da sazonalidade, uma vez que os espécimes foram coletados em diferentes épocas do ano, onde os fatores climáticos podem ter influenciado na disponibilidade de alimento, como por exemplo no aumento ou diminuição no número e no tipo de presas ou ter coincidido com a floração de determinadas espécies de plantas cujos frutos foram utilizados pelas espécies de morcegos, o que pode ter refletido na expressão diferenciada das enzimas.

A falta de um padrão da atividade da carboxilesterase e os tecidos nas várias espécies reforça a idéia de que o estado nutricional do organismo, conforme apontado por Satoh e Hosokawa (1998) atua na modulação dos genes para a expressão da enzima, refletida na atividade.

Muito embora os resultados não permitam fazer qualquer inferência sobre a função dessas enzimas nos diferentes tecidos, a sua presença e atividade variável nos tecidos das espécies evidenciam uma função para a enzima na digestão ou degradação de compostos provenientes da dieta e presentes nos diferentes tecidos, reforçando a idéia de que, geralmente, diferentes dietas produzem mudanças específicas na atividade de várias enzimas (McCarthy et al., 1980).

A atividade dos genes nos tecidos também é reflexo da atuação dos mecanismos de regulação no desenvolvimento e diferenciação celular. No caso das esterases, além da regulação diferencial, sua distribuição nas diferentes partes do

corpo e tecidos de um organismo pode indicar seu papel fisiológico (Jones e Bancroft, 1986). As diferenças na atividade e expressão destas enzimas nos diferentes tecidos das espécies analisadas refletem, possivelmente, não apenas diferenças nos processos digestórios, mas também diferenças na regulação de outros processos metabólicos e celulares, uma vez que as esterases estão envolvidas em vários outros processos, como reprodutivos, na regulação de hormônios e na degradação de inseticidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Referências

- Alavi-Shoushtari SM, Asri-Rezai S, Abshenas J (2006) A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow : a comparison with the serum proteins. *Anim Reprod Sci* 96:10-20
- Aldridge WN (1954) Some esterases of the rat. *Biochem J* 57:692-702
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT (2001) Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem* 49:5679-5684
- Argentine JA, James AA (1995) Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Molec Biol* 25:621-630
- Augustinsson KB (1961) Multiple forms of esterase invertebrate blood plasma. *Ann NY Acad Sci* 94:884-860
- Bell K, Arthur H, Anderson IL (1984) Esterase and albumin polymorphism in the domestic cat (*Felis catus*). *Anim Genet* 25:1-11

- Bell K, Cooper D, Arthur H, Poole WE (1998) Plasma esterase (ES) polymorphism in the *Tammar Walaby*, *Macropus eugenii*. *Biochem Genet* 36:137-146
- Braend M, Andersen AE (1987) Variation of transerrin and esterase in sera of dogs. *Acta Vet Scand* 28:435-444
- Breed RT, Jolly CJ (1987) Identification and phyletic distribution of the plasma esterases of some anthropoid primates. *Intern J Primatol* 8:331-350
- Buchholz RH, Wells PH, Conaway CH (1958) Digestive enzymes of mole, bat and rat. *J Mamm* 39:452-454
- Calhau C, MARTEL F, Cândido HR, Azevedo I (2000) Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin Biochem* 33:571-577
- Ceron CR (1988) Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila Mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 142 pp
- Coutinho HB, Padilha MCS, Gomes JM, Alves JJA (1964) Comparative study of mammalian esterases by the zymogram method. *J Histochem Cytochem* 13:339-343
- Dew RD, Kennedy ML (1980) Genic variation in raccoons, *Procyon lotor*. *J Mamm* 61:697-702
- Diamond JM (1991) Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. *News Phys Sci* 6:92-96
- Erdogan M, Özbeyaz C (2004) Investigation of blood polymorphism and estimation of genetic distance in some dog breeds in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 28:583-590
- Fisher RA, Scott AM (1978) Isoelectric focusing of horse serum esterase isoenzymes and detection of new phenotypes. *Biochem Genet* 9:207-213
- Fournier D, Bride JM, Bergé JB, Plapp FW Jr (1992) Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J Biol Chem* 267:1840-1845
- Galego LGC, Ceron CR, Carareto CMA (2006) Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 126:89-99
- Gardner AL (1977) Feeding habits p 205-227 In: RJ Baker, DC Carter, JK Jones eds. *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae. Part II. Special Publications of the Museum of Texas Tech University, Lubbock, Texas, USA*

- Gu X, Zera AJ (1994) Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. *Comp Biochem Physiol B* 107:553-560
- Hemingway J (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30:1009-1015
- Hermanson JW, Cobb MA, Schutt WA, Muradali F, Ryan JM (1993) Histochemical and myosin composition of vampire bat (*Desmodus rotundus*) pectoralis muscle targets a unique locomotory niche. *J Morphol* 217:347-356
- Holmes RS, Masters CJ (1967) The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochem Biophys Acta* 132:379-399
- Hosokawa M, Suzuki K, Takahashi D, Mori M, Satoh T, Chiba K (2001) Purification, molecular cloning, and functional expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: a member of the carboxylesterase multigene family. *Arch Biochem Biophys* 389:245-253
- Imai T, Taketani M, Shii M, Hosokawa M, Chiba K (2006) Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab Dispos* 34:1734-1741
- Jones BR, Brancoft HR (1986) Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive and fat-body tissue of adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Biochem Genet* 24: 499-508
- Karasov WH, Diamond JM (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience*. 38:602-611
- Karotan J, Oakeshott JG (1993) Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity* 71:41-50
- Kort CAD, Granger NA (1981) Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu Rev Entomol* 26:1-28
- Lee SE, Lees EM, Campbell BC (2000) Purification and characterization of an esterase conferring resistance to fenitrothion in *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Insecta, Coleoptera, Silvanidae). *J Agric Food Chem* 48:4991-4996
- Mane SD, Tompkins L, Richmond RC (1983) Male esterase 6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science* 28:419-421
- Markert C, Hunter RL (1959) The distribution of esterases in mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 7:42-49
- Marshall SDG, Putterill JJ, Plummer KM, Newcomb RD (2003) The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Evol* 57:487-500

- Masaki K, Hashimoto M, Imai T (2007) Intestinal first-pass metabolism via carboxylesterase in rat jejunum and ileum. *Drug Metab Dispos* 35:1089-1095
- Mateus RP (1996) Caracterização da esterase larval em diversas espécies *Drosophila* do complexo mulleri (grupo repleta). *Rev Bras Gen* 19:263
- McCarthy DM, Nicholson JA, Kim YS (1980) Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *American Journal of Physiology* 239:445-451
- Mesulam MM, Geula C (1991) Acetylcholinesterase – rich neurons of the human cerebral cortex cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *J Comp Neurol* 306:193-220
- Oakeshott JG, Pappenrecht TM, Boyce MJ (1993) Evolutionary genetics for *Drosophila* esterases. *Genetica* 90:239-268
- Oakeshott JG, Claudianos C, Russell RJ, Robin GC (1999) Carboxyl/Cholinesterases : A case of the evolution of a successful multigene family. *Biossays* 21:1031-1042
- Ogunbiyi OA, Okon EE (1976) Studies on the digestive enzymes of the African fruit bat *Eidolon helvum* (Kerr). *Comp Biochem Physiol* 55: 359-361
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Frankensm SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5:197-211
- Paul J, Fottrell P (1961) Tissue-specific and species-specific esterases. *Biochem J* 78:418-424
- Redondo AF, Santos FR (2006) Evolutionary studies on an α -amylase gene segment in bats and other mammals. *Genetica* 126:199-213
- Richmond RC, Gilbert DG, Sheehan KB, Gromko MH, Butterworth FM (1980) Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science* 28:1483-1485
- Rotundo RL (2003) Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:743-766
- Satoh T, Hosokawa M (1998) The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:257-288
- Satoh T, Taylor P, Bosron WF, Sanghani SP, Hosokawa M, La Du BN (2002) Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab Dispos* 30:488-493

- Satoh T, Hosokawa M (2006) Structure, function and regulation of carboxylesterases *Chemico Biological Interactions* 162:195-211
- Simmons N (2005) Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM (Eds). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3ed., v1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p.312-529
- Smirnova EV, Gordova LA, Timofeeva NM, Shcherbakov GG (2005) Topography of Digestive Enzymes in Small Intestine and Activity of Corresponding Hydrolases in Liver and Kidney of Adult Pigs. *J Evol Biochem Physiol* 41:47-53
- Siquieroli ACS, Baffi MA, Vieira CU, Côbo JA, Borges AL, Lucas MB, Benetti AM (2004) Atividade esterásica em populações de *Leucoptera cpffeella*. *Arq Inst Biol São Paulo* 71:1-749
- Sousa-Polezzi RC, Campos Bicudo HEM (2005) Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. *Genetica* 125:43-53
- Steiner WWM, Jhonson WE (1973) Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US – IBP. *Island Ecosyst Tech Rep* 30:1–21
- Studier EH, Boyd BC, Feldman AT, Dapson RW, Wilson DE (1983) Kidney structure in neotropical bats. *J Mamm* 64:445-452
- Taketani M, Shii M, Ohura K, Ninomiya S, Imai T (2007) Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sciences* 81:924-932
- Tsujita T, Miyata T, Okuda H. (1988) Purification of rat kidney carboxylesterase and its comparison with other tissue esterases. *J Biochem* 103:327–331
- Tsujita T, Okuda H (1993) Palmitoylcoenzyme A hydrolyzing activity in rat kidney and its relationship to carboxylesterase. *J Lipid Res* 34:1773–1781
- Verimli R, Yigit N, Colak E, Sözen M (2000) Nonspecific esterase patterns of *Rattus norvegicus*. *Turk J Biol* 24:825-831
- Vioque-Fernández A, Almeida EA, López-Barea J (2007) Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem Physiol C* 145:404-412
- Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD (1995) Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: The sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8827-8831

- von Deimling O, Ronai A, Looze SL (1985) Nonspecific esterases of mammalian testis. *Histochem Cell Biol* 82:547-355
- Yacoe ME, Cummings JW, Myers P, Creighton GK (1982) Muscle enzyme profile, diet, and flight in South American bats. *Am J Physiol* 11:189-194
- Yamada T, Morralejo D, Tsuchiya K, Agui T, Matsumoto K (1993) Biochemical polymorphisms in wild rats (*Rattus norvegicus*) captured in Oita city. *Japan J Vet Med Sci* 55:673-675
- Wada H, Yagami I, Niwa N, Takashi H, Tsuge H (2001) Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. *Exp Anim* 50:153-158
- Wilson DE, Reeder DAM (2005) Mammal species of the world. Third Edition. Johns Hopkins University Press 2:2-142pp
- Womack JE (1973) Biochemical genetics of rat esterases. Polymorphism, tissue expression, and linkage of four loci. *Biochem Genet* 9:13-24

Tabela 1. Discriminação dos exemplares analisados pela família, espécie, número de registro, sexo, procedência.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	CFC	SEXO	PROCEDÊNCIA
Phyllostomidae	<i>Artibeus planirostris</i> (6♀ e 4♂)	873	♂	Guapiaçu - SP
		882	+0	Nova Aliança - SP
		885	+0	São José do Rio Preto - SP
		888	+0	São José do Rio Preto - SP
		889	♂	São José do Rio Preto - SP
		890	+0	São José do Rio Preto - SP
		891*	♂	São José do Rio Preto - SP
		892	+0	São José do Rio Preto - SP
		893	♂	São José do Rio Preto - SP
	895	+0	São José do Rio Preto - SP	
	<i>Artibeus lituratus</i> (4♀ e 6♂)	847	+0	São José do Rio Preto - SP
		848	+0	São José do Rio Preto - SP
		851*	+0	São José do Rio Preto - SP
		852	+0	São José do Rio Preto - SP
		854	♂	São José do Rio Preto - SP
		964	♂	Campo Grande - MS
		966	♂	São José do Rio Preto - SP
		971	♂	São José do Rio Preto - SP
		973	♂	Guapiaçu - SP
974	♂	Guapiaçu - SP		
<i>Platynhinus lineatus</i> (4♀ e 6♂)	967	♂	São José do Rio Preto - SP	
	968	♂	São José do Rio Preto - SP	
	969	♂	São José do Rio Preto - SP	
	970	+0	São José do Rio Preto - SP	
	977*	+0	São José do Rio Preto - SP	
	979	♂	São José do Rio Preto - SP	
	980	+0	São José do Rio Preto - SP	
	985	♂	São José do Rio Preto - SP	
	989*	+0	São José do Rio Preto - SP	
	990	♂	São José do Rio Preto - SP	
<i>Glossophaga soricina</i> (8♀ e 2♂)	963*	+0	São José do Rio Preto - SP	
	965	♂	São José do Rio Preto - SP	
	975	+0	São José do Rio Preto - SP	
	976	+0	São José do Rio Preto - SP	
	981	+0	São José do Rio Preto - SP	
	986	+0	São José do Rio Preto - SP	
	987*	+0	São José do Rio Preto - SP	
	988	♂	São José do Rio Preto - SP	
	992	+0	São José do Rio Preto - SP	
994	+0	São José do Rio Preto - SP		

* Fêmeas grávidas

Cont. Tabela 1. Discriminação dos exemplares analisados pela família, espécie, número de registro, sexo, procedência.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	CFC	SEXO	PROCEDÊNCIA
	Desmodus rotundus (10♀)	934	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		935	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		936*	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		937*	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		938	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		939	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		940	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		941	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		942	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		943	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
Molossidade	Molossus molossus (6♀ e 4♂)	876	♀	Guapiaçu - SP
		879	♀	Guapiaçu - SP
		928	♂	São José do Rio Preto - SP
		950	♂	São José do Rio Preto - SP
		951	♂	São José do Rio Preto - SP
		959	♂	São José do Rio Preto - SP
		960	♀	São José do Rio Preto - SP
		961	♀	São José do Rio Preto - SP
		962	♀	São José do Rio Preto - SP
		991	♀	São José do Rio Preto - SP
	Molossus rufus (9♀ e 1♂)	875	♀	Guapiaçu - SP
		900	♀	São José do Rio Preto - SP
		901	♀	São José do Rio Preto - SP
		903	♀	São José do Rio Preto - SP
		923	♀	São José do Rio Preto - SP
		924	♀	São José do Rio Preto - SP
		925	♀	São José do Rio Preto - SP
		998	♂	São José do Rio Preto - SP
		1001	♀	Engenheiro Schmidt - SP
		1002	♀	Engenheiro Schmidt - SP
Vespertilionidae	Myotis nigricans (8♀ e 2♂)	907	♀	São José do Rio Preto - SP
		908	♀	São José do Rio Preto - SP
		910	♀	São José do Rio Preto - SP
		911	♀	São José do Rio Preto - SP
		912	♀	São José do Rio Preto - SP
		913	♀	São José do Rio Preto - SP
		914	♀	São José do Rio Preto - SP
		932	♀	São José do Rio Preto - SP
		952	♂	São José do Rio Preto - SP
		954	♂	São José do Rio Preto - SP

* Fêmeas grávidas

Tabela 2. Número de bandas no gel e tipo das enzimas quanto à hidrólise do substrato observadas nos quatro tecidos das oito espécies de morcegos analisadas.

Tecido	Fígado			Rim			Estômago			Intestino			Total		
	α	α - β	β	α	α - β	β	α	α - β	β	α	α - β	β	α	α - β	β
<i>M. molossus</i>	6			3			4			4			6		
<i>M. rufus</i>	7			3			4			7			7		
<i>M. nigricans</i>	5			5			3	1		3	1	2	4	1	2
<i>A. lituratus</i>	6	3		6	1		6	1		6	1		6	3	
<i>A. planirostris</i>	6	3		6	1		5	1		6	1		6	3	
<i>P. lineatus</i>		5			4			4			4			5	
<i>G. soricina</i>	4			6			7			4			7		
<i>D. rotundus</i>	6			4			6			5			6		

Tabela 3. Média, desvio padrão e mediana dos valores de atividade da carboxilesterase (U/ mg proteína) no fígado, intestino, rim e estômago das oito espécies de morcegos analisadas (n = 10).

Espécie	<i>Molossus molossus</i>			<i>Molossus rufus</i>			<i>Myotis nigricans</i>			<i>Desmodus rotundus</i>		
	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana
Tecido												
Fígado	0,37	0,12	0,34	0,31	0,06	0,34	21,48	11,40	23,94	0,27	0,08	0,31
Intestino	2,90	2,61	2,14	1,12	2,22	0,43	6,00	5,37	3,74	12,85	13,17	6,32
Rim	0,12	0,06	0,11	0,13	0,04	0,12	0,39	0,26	0,33	0,06	0,02	0,05
Estômago	3,16	1,28	2,95	0,36	0,14	0,32	0,20	0,17	0,14	0,09	0,03	0,09

Espécie	<i>Artibeus planirostris</i>			<i>Artibeus lituratus</i>			<i>Platyrrhinus lineatus</i>			<i>Glossophaga soricina</i>		
	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana	Média	Desvio	Mediana
Tecido												
Fígado	0,82	0,44	0,72	0,55	0,25	0,55	0,09	0,07	0,06	2,50	0,56	2,51
Intestino	1,23	1,12	0,64	1,10	0,96	0,80	1,11	0,62	1,03	1,27	1,10	1,21
Rim	0,94	0,62	0,83	2,81	3,70	1,46	0,22	0,08	0,18	12,85	18,12	2,40
Estômago	0,72	0,25	0,65	0,42	0,17	0,36	0,82	0,40	0,71	1,46	0,7	1,32

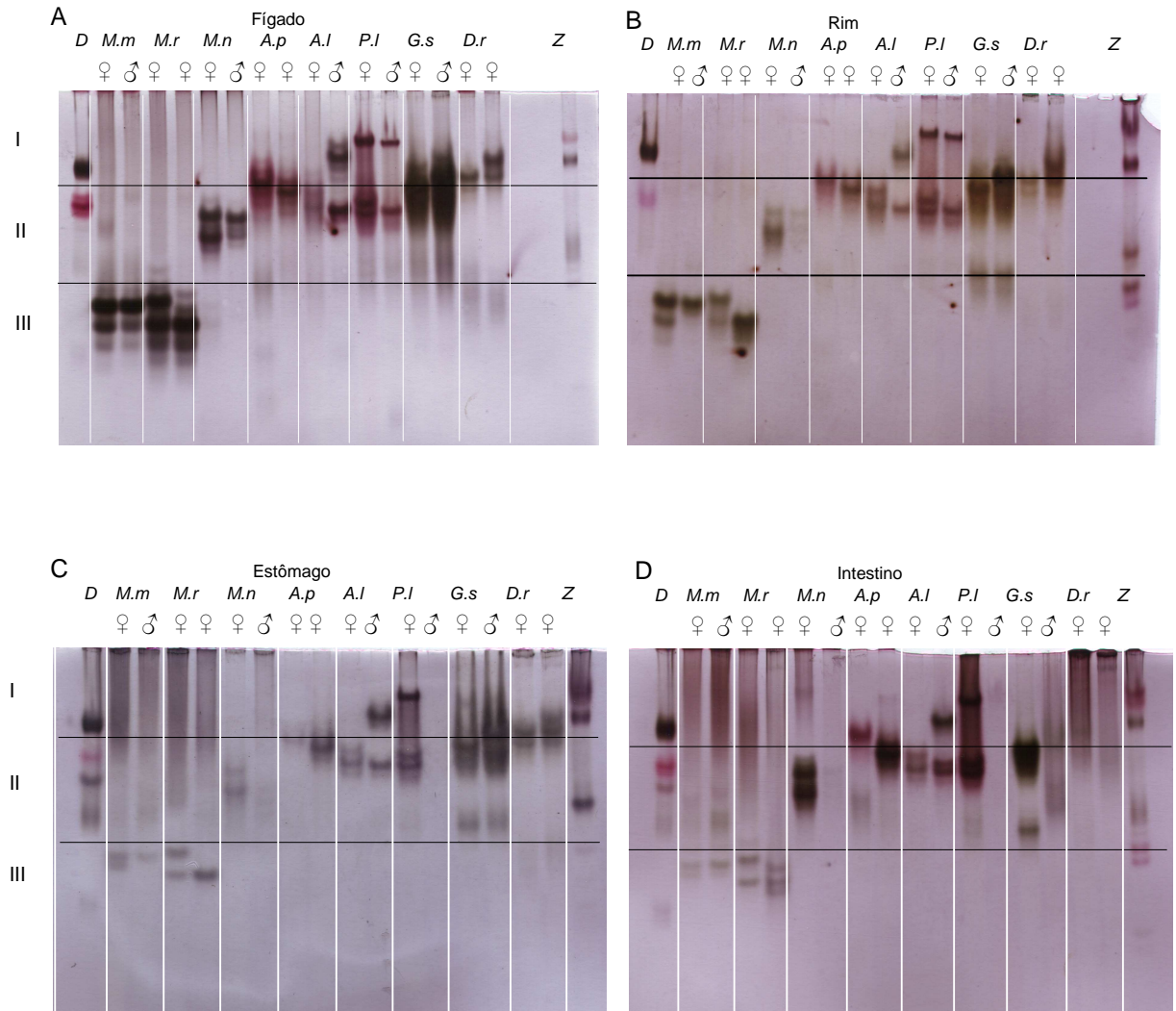
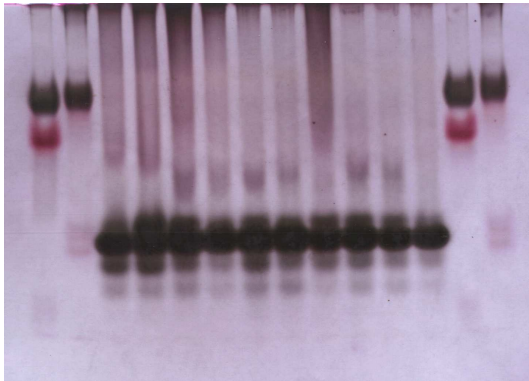


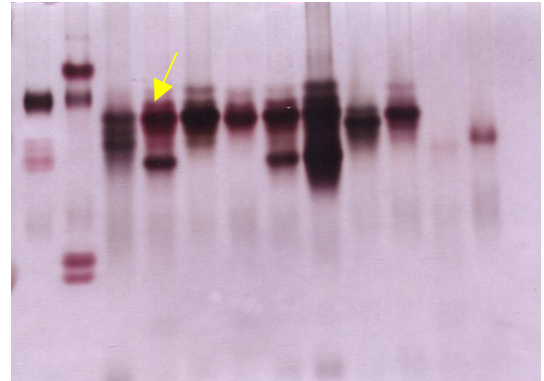
Figura 1. Padrão de esterases em gel de poliacrilamida a 10% (C= 5%) de dois indivíduos das espécies *M. molossus* (*M.m*), *M. rufus* (*M.r*), *M. nigricans* (*M.n*), *A. planirostris* (*A.p*), *A. lituratus* (*A.l*), *P. lineatus* (*P.l*), *G. soricina* (*G.s*) e *D. rotundus* (*D.r*) nos quatro tecidos analisados: Fígado (A), Rim (B), Estômago (C) e Intestino (D). *D*: *Drosophila* e *Z*: *Zaprionus*. ♀: fêmea, ♂: macho.

Figura 2. Padrão de esterases em gel de poliacrilamida a 10% (C=5%) de 10 indivíduos das espécies. Em A: fígado de *M. molossus*, B: fígado de *A. planirostris*, C: fígado de *P. lineatus*, D: rim de *D. rotundus*, E: intestino de *M. rufus* e F: intestino de *M. nigricans*. D: *D. melanogaster*, Z: *Z. indianus*. ♀: fêmea, ♂: macho. Em B a seta amarela indica α - β esterase. Em F as setas vermelhas indicam α -esterases e a seta amarela indica α - β -esterase.

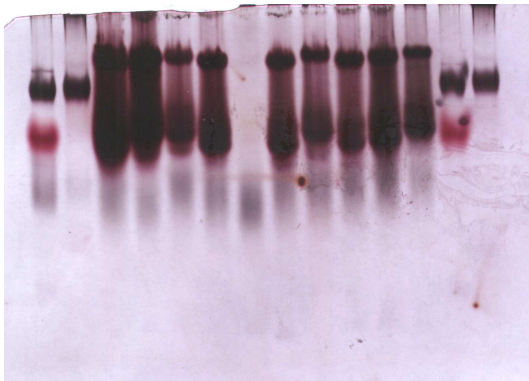
A Fígado de *M. molossus*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 D Z
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂ ♂ ♂



B Fígado de *A. planirostris*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂ ♂ ♂



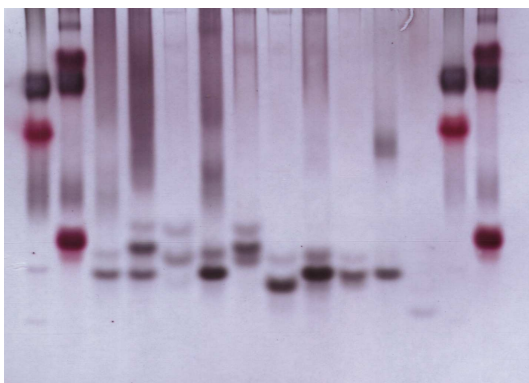
C Fígado de *P. lineatus*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 D Z
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂



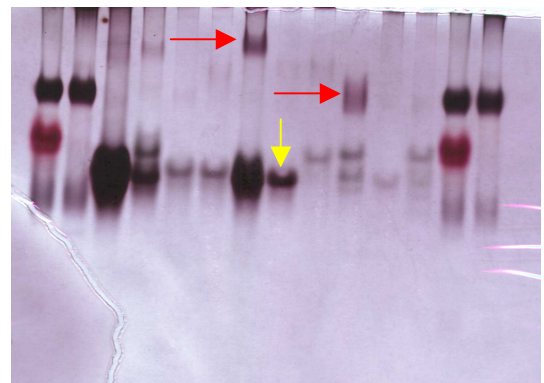
D Rim de *D. rotundus*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 D Z
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀



E Intestino de *M. rufus*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 D Z
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♂



F Intestino de *M. nigricans*
 D Z 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 D Z
 ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂



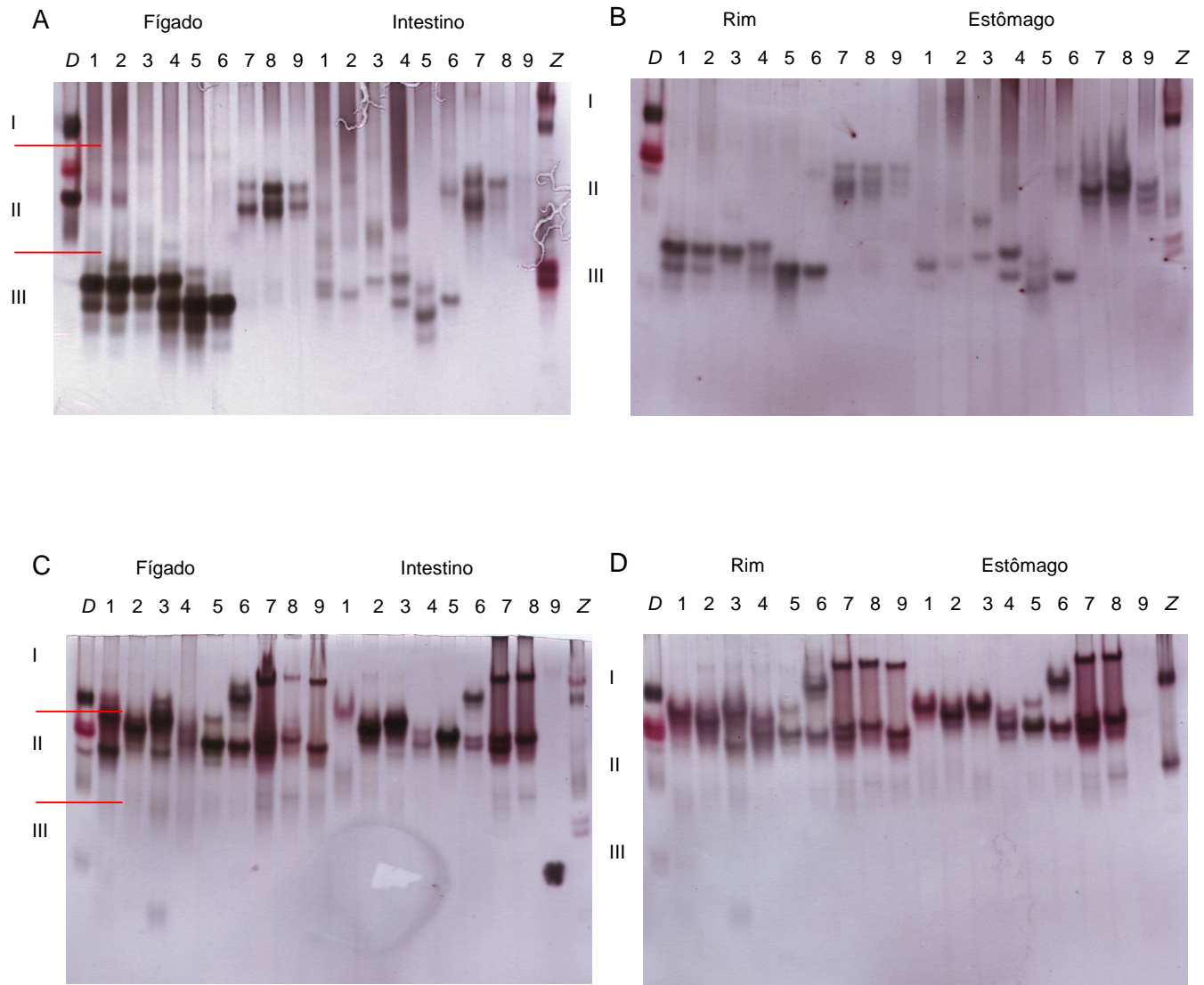


Figura 3. Padrão de esterases em gel de poliacrilamida a 10% (C=5%) nos tecidos fígado e intestino, rim e estômago das espécies insetívoras (A e B) *M. molossus* (colunas 1-3), *M. rufus* (colunas 4-6) e *M. nigricans* (colunas 7-9) e das espécies frugívoras (C e D) *A. planirostris* (colunas 1-3), *A. lituratus* (colunas 4-6) e *P. lineatus* (colunas 7-9). D: *Drosophila melanogaster* e Z: *Zaprionus indianus*.

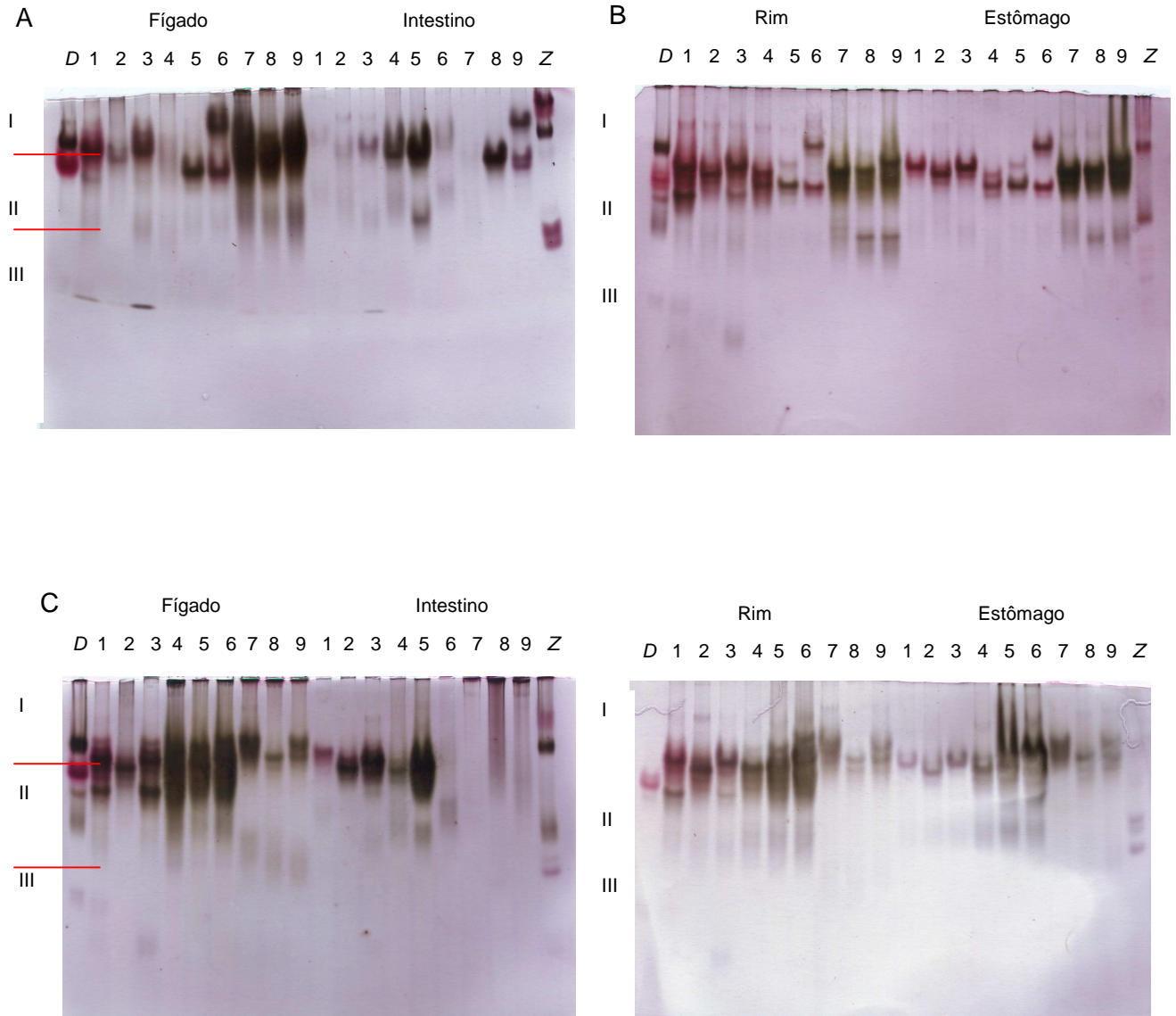


Figura 4. Padrão de esterases em gel de poliacrilamida a 10% (C=5%) nos tecidos fígado e intestino, rim e estômago das espécies frugívoras e nectarívora (A e B) *A. planirostris* (colunas 1-3), *A. lituratus* (colunas 4-6) e *G. soricina* (colunas 7-9), e das espécies frugívora, nectarívora e hematófaga (C e D) *A. planirostris* (colunas 1-3), *G. soricina* (colunas 4-6) e *D. rotundus* (colunas 7-9) (C e D). D: *Drosophila melanogaster* e Z: *Zaprionus indianus*.

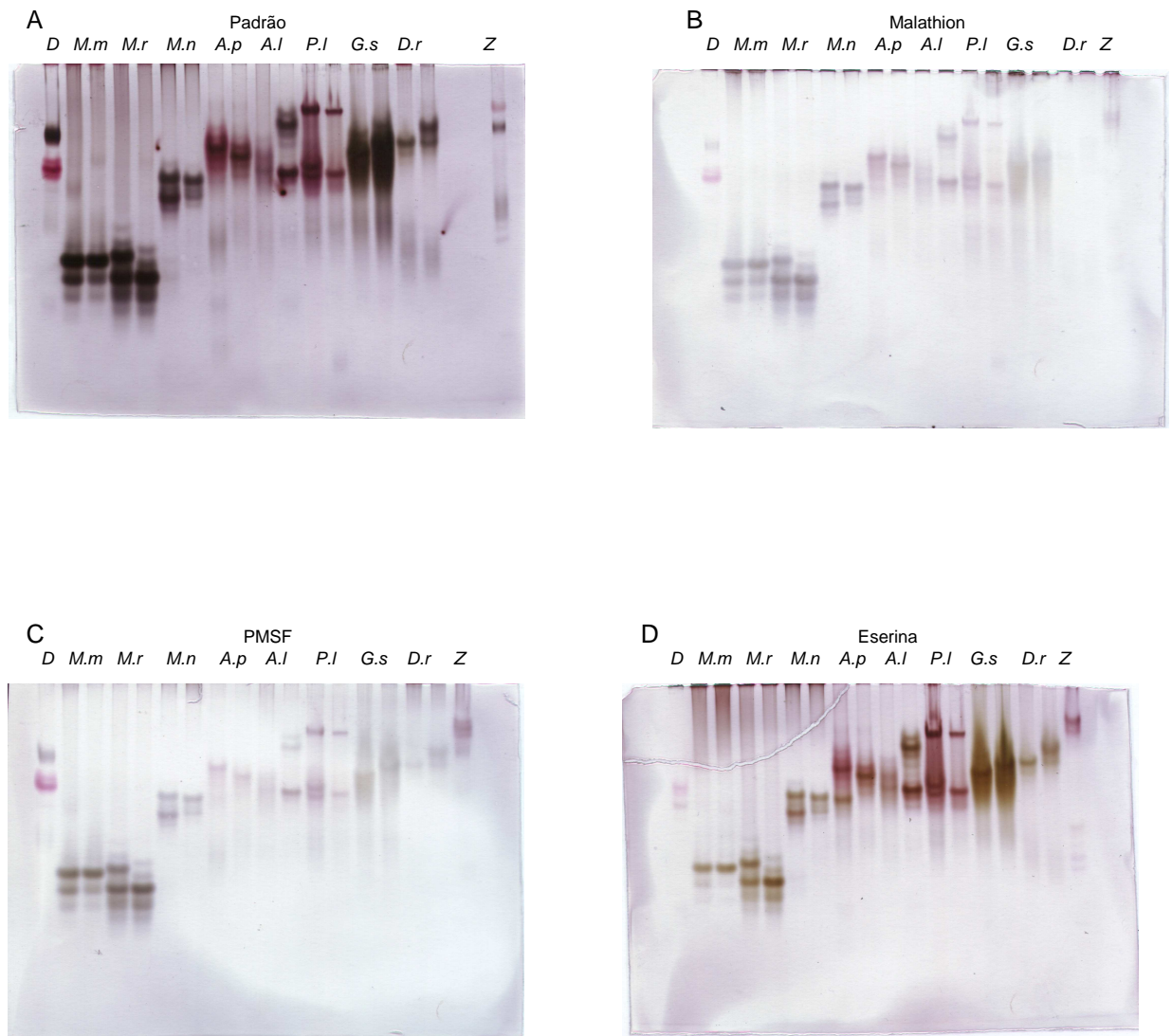


Figura 5. Géis da atividade esterásica na presença dos inibidores malathion (B), PMSF (C) e sulfato de eserina (D). (A) padrão de esterase em gel de poliacrilamida 10% de dois indivíduos das espécies *M. molossus* (M.m), *M. rufus* (M.r), *M. nigricans* (M.n), *A. planirostris* (A.p), *A. lituratus* (A.l), *P. lineatus* (P.l), *G. soricina* (G.s) e *D. rotundus* (D.r). D: *Drosophila melanogaster*, Z: *Zaprionus indianus*

**Análise da atividade enzimática da fosfatase no fígado, rim, intestino e estômago
de sete espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares**

*Paula Renata Lopes Moreira¹, Mateus Rodrigues Beguelini¹, Rodrigo Simões Ribeiro Leite e
Eliana Morielle-Versute³*

*¹ Departamento de Biologia, ² e ³ Departamento de Zoologia e Botânica - UNESP-
Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio
Preto, SP, Brasil*

Palavras-Chave: Chiroptera, enzima, dieta, fosfatase intestinal

Resumo

A diversidade de hábitos alimentares apresentados em Chiroptera pode estar relacionada com a diversidade de enzimas digestivas, sendo o estudo da caracterização dessas enzimas importantes para o grupo. Entre as enzimas estudadas em vários organismos, podemos destacar as fosfatases alcalinas e ácidas que são amplamente distribuídas em vários tecidos de muitas espécies. Entre as funções das fosfatases alcalinas está a regulação de processos celulares como proliferação, diferenciação e transformação, a participação no transporte de fosfato inorgânico no rim, intestino e no transporte intestinal de lipídios, e absorção de ácidos graxos, carboidratos, gorduras, aminoácidos e proteínas no intestino. A fosfatase ácida está envolvida no metabolismo e transporte transplacentário de esteróides e outros metabólitos na placenta, nos processos degradativos associados ao desenvolvimento de doenças específicas e processos patológicos. A análise da fosfatase em diferentes tecidos e diferentes pHs de sete espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares: *Molossus molossus*, *Molossus rufus* (insetívoras), *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Phatyrrhinus lineatus* (frugívoras), *Glossophaga soricina* (nectarívora) e *Desmodus rotundus* (hematófaga) revelou a presença da fosfatase ácida no fígado, rim e estômago da maioria das espécies (*M. molossus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *G. soricina*) e apenas no fígado e estômago de *M. rufus*, enquanto que no rim foi detectada a atividade da fosfatase alcalina. Em *D. rotundus* foi observada a atividade da fosfatase alcalina no fígado e rim, e no estômago, a presença da fosfatase ácida. Para todas as espécies, a fosfatase detectada no intestino foi alcalina e este foi também o tecido que apresentou a maior atividade da enzima, seguido pelo fígado, rim e estômago. Em *G. soricina*, o rim apresentou

maior atividade, seguido do fígado, intestino e estômago. As análises evidenciaram que o estado reprodutivo da fêmea não influencia na atividade da fosfatase e que diferenças na atividade da enzima entre machos e fêmeas só foram significativas para as espécies congênicas *A. planirostris* e *A. lituratus*. Os diferentes pHs bem como os diferentes tecidos influenciaram significativamente na atividade da fosfatase em todas as espécies analisadas. Embora outros estudos demonstraram que a atividade da fosfatase pode mudar dependendo das condições alimentares, neste estudo não foi possível fazer uma correlação entre os diferentes hábitos alimentares e a atividade da enzima, porém é possível sugerir que as diferenças nas atividades das fosfatases observadas entre as diferentes espécies seja influenciada pela composição da dieta.

Abstract

The diversity of food habits presented in Chiroptera may be related to the diversity of yours digestive enzymes, thereby, the studies involving the characterization of these enzymes is important for the group. Among the enzymes studied in several organisms, we can highlight acidic and alkaline phosphatases that are widely distributed in various tissues of many species. Among the functions of alkaline phosphatase level is the regulation of cellular processes such as proliferation, differentiation and transformation, participation in the transport of inorganic phosphate in kidney, intestines and intestinal transport of lipids, and absorption of fatty acids, carbohydrates, fats, amino acids and proteins in the intestine. The acid phosphatase is involved in metabolism and transport of steroids and other metabolites in the placenta, in degradative processes associated with the development of specific diseases and pathological processes. The analysis of phosphatase in different tissues and different pHs of seven species of bats with different dietary habits: *Molossus molossus*, *Molossus rufus* (insectivorous), *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Phatyrrhinus lineatus* (frugivorous), *Glossophaga soricina* (nectarivorous) and *Desmodus rotundus* (sanguivorous) revealed the presence of acid phosphatase in the liver, kidney and stomach of most species (*M. molossus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus* and *G. soricina*) and only in the liver and stomach of *M. rufus*, while in the kidney was detected activity of alkaline phosphatase. In *D. rotundus* the activity of alkaline phosphatase was observed in the liver and kidney and in stomach was detected the presence of acid phosphatase. For all species, the alkaline phosphatase was detected in the intestine and this was also the tissue that had the highest activity of the enzyme, followed by the liver, kidney

and stomach. In *G. soricina*, the kidney showed greater activity, followed by the liver, intestines and stomach. The analyses showed that the female reproductive state does not affect the phosphatase activity and that differences in the activity of the enzyme between males and females were not significant exceptly to the congeneric species *A. planirostris* and *A. lituratus*. The different pHs as well as the various tissues affected significantly in the phosphatase activity in all species analyzed. Although other studies have shown that the activity of phosphatase may change depending on conditions food, in the present study was not possible to make a correlation between the different dietary habits and activity of the enzyme, but it is possible to suggest that differences in the phosphatase activities observed between different species is influenced by the composition of the diet.

Introdução

Poucos têm sido os estudos em Chiroptera voltados à caracterização do papel funcional ou da atividade de algumas enzimas que apresentam características importantes, especialmente no processo de digestão dos vários grupos de organismos (Ogunbiyi e Okon, 1976; Redondo e Santos, 2006).

Chiroptera é um grupo de especial interesse para o estudo da variação enzimática, uma vez que ele apresenta grande diversidade de dietas, com hábitos muito especializados como o observado nos morcegos hematófagos e nectarívoros, passando por animais carnívoros, insetívoros, frugívoros e onívoros (Gardner, 1977; Dumont, 1997; Dempsey, 2004) e, essa diversidade pode, como o observado em outros grupos de vertebrados, estar correlacionada com a diversidade de suas enzimas digestivas. Entre as enzimas estudadas nos vários grupos de vertebrados e na espécie humana estão as fosfatases.

As fosfatases são hidrolases que atuam sobre monoésteres de fosfato e estão presentes em vários grupos de animais e vegetais. São divididas em 3 grupos principais: as fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases (Aoyama et al., 2003). A distinção entre as fosfatases alcalinas e as ácidas é baseada em diferenças na variação de pH em que essas enzimas são ativas (Neuman, 1968).

As fosfatases alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 10,0 e atuam em substratos de baixa massa molecular (Calhau et al., 2000). São enzimas que aparecem ligadas à borda em escova dos eritrócitos e que hidrolisam monoésteres de fosfato resultantes da digestão, principalmente de proteínas e lipídios (Fan et al., 1999). Apesar de serem encontradas em vários tecidos, apresentam maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A mucosa

intestinal, o soro e a placenta também contêm fosfatases alcalinas (Fujimori-Arai et al., 1997; Wada et al., 2001). Pela suas características bioquímicas constituem um grupo de isoenzimas, do tipo glicoproteínas, codificadas por diferentes genes, provavelmente originados por duplicações gênicas, e que apresentam várias isoformas (Fujimori-Arai et al., 1997; Xie e Alpers, 2000; Calhau et al., 2000; Negrão et al., 2003).

Boa parte das informações relativas à presença das fosfatases alcalinas nos tecidos têm sido baseada na determinação da atividade específica da enzima, quantificada por espectrofotometria através da absorbância com a utilização de substratos sintéticos específicos, entre os quais podem ser destacados o p -nitrofenil fosfato, p -nitrofenil fosfato de sódio, β -glicerofosfato e β -glicerolfosfato de sódio (Schmidt e Thannhauser, 1943; Kempson et al., 1979; McCarthy et al., 1980; Yedlin et al., 1981; Calhau et al., 2000; Wada et al., 2001; Peulen et al., 2004).

Na espécie humana são encontradas quatro isoenzimas, cujas designações refletem o local de expressão mais elevada: a fosfatase alcalina intestinal, a placentária, a germinativa e a tecido-inespecífica, esta encontrada em quase todos os tecidos (Millán e Fishman, 1995; Matsushita et al., 2002). Em outras espécies de vertebrados o número de isoenzimas é variável, sendo em primatas superiores descritas três isoenzimas, a placentária, a intestinal e a não específica (Sussman et al., 1989; van Hoof e de Broe, 1994) e, em ratos, há duas isoformas distintas (Engle e Alpers, 1992; Xie et al., 1997).

Os resultados dos vários estudos desenvolvidos sugerem que as fosfatases alcalinas estão envolvidas em funções como transporte de fosfato inorgânico (Pi) no rim, intestino e talvez outros tecidos (Kempson et al., 1979), no transporte de lipídios

(Young et al., 1981), na absorção de ácidos graxos, fósforo, carboidratos, gorduras, aminoácidos e proteínas do intestino (Young et al., 1981; Wada et al., 2001, Narisawa et al., 2003).

Alguns estudos têm demonstrado também, através de análises de vários segmentos do trato intestinal de vertebrados, que a atividade da fosfatase alcalina varia quando são consideradas diferentes dietas (Kempson et al., 1979; McCarthy et al., 1980; Narisawa et al., 2003, Sogabe et al., 2004; Gawlicka e Horn, 2005). Também tem sido verificada uma relação entre a concentração da enzima e o sexo e idade do indivíduo, gravidez e lactação em fêmeas (Jang et al., 2000; Negrão et al., 2003; Sogabe et al., 2004). Embora o papel fisiológico não seja completamente conhecido, a sua ampla distribuição nos tecidos e fases de desenvolvimento dos organismos sugere que ela tem um papel fisiológico importante.

As fosfatases ácidas têm sido isoladas em vários tecidos de mamíferos, principalmente próstata, baço, fígado (Heinrikson, 1969), eritrócito humano (Scott, 1966) e placenta (DiPietro e Zengerli, 1967). Altos níveis de atividade são encontrados também em osteoclastos e em osteoblastos (Lau et al., 1987).

Na espécie humana as fosfatases ácidas são encontradas em baixas concentrações, e mudanças acentuadas na sua síntese estão associadas ao desenvolvimento e de doenças específicas, onde as alterações nas concentrações ocorrem como parte dos processos patológicos (Bull et al., 2002). Contudo, outras funções têm sido relatadas também justificando a presença das fosfatases ácidas nos tecidos, como uma função no metabolismo e transporte transplacentário de esteróides e outros metabólitos na placenta, bem como nos processos degradativos associados, como injúria e morte celular (DiPietro e Zengerle, 1967).

Uma vez que estudos sobre a nutrição e o sistema de enzimas digestivas em morcegos são raros na literatura, a obtenção de informações sobre aspectos da digestão em espécies de Chiroptera com diferentes hábitos alimentares através de estudos que caracterizem a atividade de enzimas relacionadas à digestão são importantes para auxiliar na compreensão do funcionamento do sistema digestório, podendo fornecer informações que podem auxiliar também no esclarecimento das relações taxonômicas e evolutivas do grupo.

No presente trabalho a atividade da fosfatase foi medida e comparada entre quatro tecidos que participam ativamente da digestão (fígado, rim, estômago e intestino) de sete espécies de morcegos que representam quatro categorias diferentes de hábitos alimentares: *Molossus molossus* e *Molossus rufus*, insetívoros, *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus*, frugívoros, *Glossophaga soricina*, nectarívoro e *Desmodus rotundus*, hematófago.

Material e Métodos

Material Biológico

A análise de atividade da fosfatase foi realizada em quatro tecidos (fígado, rim, estômago e intestino) de cinco indivíduos adultos machos e fêmeas, algumas dessas grávidas, pertencentes a sete espécies de morcegos com hábitos alimentares variados, e representantes de duas famílias de Chiroptera: *Molossus molossus* (3 fêmeas e 2 machos) e *Molossus rufus* (4 fêmeas e 1 macho), insetívoros da família Molossidae, *Artibeus lituratus* (2fêmeas e 3machos), *Artibeus planirostris* (3fêmeas e 2machos) e *Platyrrhinus lineatus* (2fêmeas e 3machos), frugívoros, *Glossophaga soricina* (5fêmeas), nectarívoro e *Desmodus rotundus* (5 fêmeas), hematófago, todos da

família Phyllostomidae. O número de registro, sexo e procedência dos animais utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tecidos e extratos

Amostras de tecidos de fígado, rim, estômago e intestino foram obtidas após a morte dos animais e imediatamente lavadas em solução de cloreto de potássio (KCl) 1, 15% e armazenadas em tubos estéreis em freezer -20°C até o uso. O intestino foi retirado em sua totalidade e dividido em três segmentos de igual tamanho classificados, com relação à proximidade do estômago, como intestino proximal, intestino intermediário e intestino distal. De cada tecido e porções do intestino foram retirados fragmentos de 20 mg e estes foram picotados e macerados individualmente em tubos *ependorf* contendo 200 μL de tampão de extração com pHs variados. Os tampões utilizados foram Tampão Tris-HCl 0,1 M, nos pHs 7,2 e 9,4; e Tampão Acetato de Sódio 0,1 M, nos pHs 3,5 e 5,5. Após a homogeneização dos tecidos as suspensões foram centrifugadas a 5000 rpm, a temperatura ambiente, por cinco minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da atividade.

Dosagem da atividade da fosfatase

A medida da atividade da fosfatase foi realizada em quatro valores de pHs (3,5, 5,5, 7,2 e 9,4) para os tecidos fígado, rim, estômago e intestino proximal, e no pH 9,4 para os tecidos de intestino intermediário e distal. 50 μL dos sobrenadantes das amostras foram adicionados a 250 μL dos tampões Acetato de Sódio 0,2 M nos pHs 3,5 e 5,5, e Tris-HCl 0,2M nos pHs 7,2 e 9,4, ambos contendo 2 mM MgCl_2 . À cada solução foi acrescentado 250 μL do substrato p-nitrofenil fosfato a 4 mM. Após 10 minutos a reação foi paralisada com a adição de 2 ml de solução de carbonato de sódio 2 M. O produto liberado da reação (p-nitrofenol) foi quantificado por

espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade (U) de atividade de fosfatase representa a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol/min.

Análise estatística

Para todas as medidas efetuadas nos vários indivíduos, tecidos e espécies foram calculadas as médias e o desvio padrão. A análise de variância em dois fatores em medidas repetidas (pH) (ANOVA Two Way) foi usada para estimar a significância estatística das diferenças entre a atividade da fosfatase em fêmeas grávidas e não grávidas, em machos e fêmeas e entre as espécies. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Nesta análise e para a redução da heterogeneidade da variância foram utilizados dados transformados (*log transformation*).

Resultados

A atividade da fosfatase foi determinada para todas as 630 amostras analisadas (140 fígado, 210 intestino, 140 rim e 140 estômago) nos pHs 3,5, 5,5, 7,2 e 9,4. Os valores médios da atividade da fosfatase em cada tecido e espécie, nos diferentes valores de pH, estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 1 a 3. É possível verificar que eles variaram nos quatro tecidos e condições de pH em todas as espécies.

Na espécie insetívora *M. molossus*, os maiores valores de atividade para a fosfatase foram observados na porção intermediária e distal do intestino, no pH 9,4 (62,58 e 18,11, respectivamente). Não foi possível efetuar medidas de atividade neste pH para a porção proximal do intestino. Nos tecidos fígado, rim e estômago os maiores valores de atividade para a fosfatase foram registrados no pH 5,5 (4,74, 2,67

e 1,39 respectivamente) e, para o intestino proximal, no pH 7,2 (3,15) (Figura 1A). O tecido a apresentar maior atividade de fosfatase nos pHs ácidos foi o fígado e no pH básico foi o intestino.

Em *M. rufus*, os maiores valores de atividade da fosfatase foram registrados no pH 9,4 para o intestino proximal (66,78), intermediário (30,59) e distal (19,19), e para o rim (6,42). No estômago e fígado, os maiores valores de atividade foram registrados no pH 5,5 (2,37 e 4,45 respectivamente), embora o rim e intestino também apresentaram atividade de fosfatase neste pH (Figura 1B).

Nas espécies frugívoras, ou seja, *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* a atividade da fosfatase apresentou um padrão semelhante quando consideradas as variações nos tecidos, em especial nos pHs ácidos.

Em *A. planirostris* as medidas de atividade da fosfatase foram maiores no pH 9,4, no intestino proximal (14,7) e no intestino intermediário (17,28). No fígado, estômago e rim os maiores valores de atividade da enzima foram registrados no pH 5,5 (8,5, 3,58 e 3,74, respectivamente), sendo que o rim também apresentou atividade significativa no pH 9,4 (3,52). Novamente, o fígado foi o tecido com maior atividade nos pHs ácidos (Figura 2A). Em *A. lituratus* cujas atividades da enzima seguiram o padrão de *A. planirostris*, a atividade da fosfatase foi maior no intestino proximal e intermediário no pH 9,4 (13,01 e 9,37, respectivamente) (Figura 2B).

Os valores de atividade em *P. lineatus* acompanharam a condição observada em *A. lituratus*, ou seja, os maiores valores de atividade da fosfatase foram registrados no pH 9,4 para o intestino proximal (78,39), intermediário (38,52) e distal (20,11), e no pH 5,5 para o fígado (4,37), rim (4,27) e estômago (2,26) (Figura 2C).

Na espécie hematófaga *D. rotundus* os maiores valores de atividade da fosfatase em ordem decrescente, foram registrados para o pH 9,4 no intestino porção proximal (26,06), porção intermediária (11,22) e distal (7,49), no fígado (4,86) e no rim (3,41), sendo que no fígado a atividade também foi alta no pH 5,5 (4,72). No estômago foi no pH 3,5 que a fosfatase mostrou maior atividade (2,37). Semelhante às espécies insetívoras, o fígado foi o tecido que apresentou maior atividade em pH ácido (Figura 3A).

Na espécie nectarívora *G. soricina*, as maiores atividades foram registradas nos pHs 5,5 e 9,4, e, para alguns tecidos, os valores de atividade foram muito próximos nos dois pHs no mesmo tecido. No fígado e no estômago a maior atividade de fosfatase foi registrada no pH 5,5 (6,72 e 4,32 respectivamente), enquanto que no intestino foi no pH 9,4. No intestino proximal e no rim os valores de atividade da enzima nos pHs 5,5 (3,6 e 7,58 respectivamente) e 9,4 (3,91 e 7,57 respectivamente) foram muito semelhantes e os maiores observados nesses tecidos (Figura B).

A observação dos resultados aponta para uma variação na atividade da fosfatase nos diferentes tecidos e pHs nas sete espécies, com alguma similaridade entre elas, quanto a forma da variação. Contudo quando são considerados os valores médios de atividade da enzima nas espécies, eles são em algumas, muito diferentes, especialmente no pH 9,4 para o intestino em todas as espécies e para o rim de algumas espécies (*G. soricina*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *M. rufus* e *D. rotundus*).

Para as porções do intestino foi evidente a maior atividade da fosfatase no pH 9,4 em seis das sete espécies analisadas. Além disso, as maiores atividades ficaram igualmente distribuídas entre os dois intestinos, ou seja, ora ela apareceu no intestino proximal, ora no intestino intermediário (Figura 3C). Apenas em *G. soricina* alguns

tecidos como o fígado e o rim alcançaram valores de atividades semelhantes aos observados no intestino.

As médias de atividade da fosfatase apresentadas pelas fêmeas grávidas e não grávidas das espécies *D. rotundus* e *G. soricina* estão representadas nos gráficos da Figura 4, assim como as médias de atividade de machos e fêmeas das espécies *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *M. molossus* estão representados na Figura 5.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) aplicada aos dados das espécies que apresentaram algumas condições para serem testadas, ou seja, fêmeas grávidas e não grávidas, e machos e fêmeas nas amostras estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

O estado de gravidez na atividade da fosfatase nos diferentes tecidos e pHs nas fêmeas avaliadas para as espécies *G. soricina* e *D. rotundus* não interferiram nos valores de atividade, pois os valores de F não apresentaram significância estatística ($P= 0,338$ e $P= 0,602$, respectivamente – Tabela 3).

A ausência de diferença entre as fêmeas possibilitou a comparação entre fêmeas e machos. A análise foi efetuada para as espécies *M. molossus*, *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus*. Diferenças significativas entre machos e fêmeas foram detectadas nas duas espécies de *Artibeus*, cujos valores de P foram: $P= 0,036$ para *A. planirostris*, e $0,041$ para *A. lituratus*. Nota-se pelos dados das Tabelas 3 e 4 que as diferenças entre tecidos e pH são sempre significativas.

A análise de diferenças interespecífica foi aplicada às espécies *M. molossus*, *M. rufus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus*, *G. soricina* e *D. rotundus*, e envolveram os dados observados nas amostras de fêmeas, nos pHs 3,5, 5,5 e 7,2. Os

valores de F foram todos significativos, indicando diferenças nas atividades de fosfatase nos três pHs, entre as fêmeas dessas espécies (Tabela 5).

A análise par a par dessas espécies não detectou diferenças entre as espécies *A. planirostris* e *P. lineatus*, *A. planirostris* e *G. soricina*, *A. lituratus* e *M. molossus*, *A. lituratus* e *P. lineatus* e entre *D. rotundus* e *M. molossus*, entre *M. rufus* e *M. molossus* e entre *M. rufus* e *A. lituratus* (Tabela 6).

Os resultados evidenciam o papel do pH e dos tecidos nas diferenças.

Discussão

A distribuição de enzimas digestivas no sistema gastro-intestinal de mamíferos e outros órgãos a ele associados tem sido estudada por muitos autores. De forma geral, as hidrolases típicas e representadas em muitas espécies de vertebrados estão presentes no intestino delgado, onde promovem a digestão de membrana e intracelular e, em outros órgãos, como no rim e no fígado, onde participam das etapas finais de digestão, condução e assimilação dos nutrientes, como por exemplo, durante a passagem dos mesmos pelo sistema porta do fígado e durante a filtração e reabsorção no rim (Ugolev et al., 1992; Smirnova et al., 2005).

A presença da fosfatase alcalina nos tecidos tem sido correlacionada com a intensidade de absorção de nutrientes e diferenciação funcional dos enterócitos (Jang et al., 2000). É uma enzima que hidrolisa monésteres de fosfato resultantes, principalmente, de proteínas e lipídeos e, no intestino de vertebrados, tem mostrado variação no gradiente de atividade ao longo do comprimento do intestino, que é atribuída, entre outros fatores, à variação na composição da dieta (Kempson et al., 1979; McCarthy et al., 1980; Gawlicka e Horn, 2005).

No presente trabalho, o intestino foi a estrutura que apresentou maior atividade de fosfatase no pH alcalino 9,4, em seis espécies analisadas. Contudo, os valores de atividade variaram entre as porções do intestino, com algumas espécies apresentando maior atividade na porção proximal (*M. rufus*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *D. rotundus*) e outras na porção intermediária (*M. molossus*, *A. planirostris* e *G. soricina*).

A enzima predominante no intestino foi a fosfatase alcalina, que pelos altos valores de atividade observados, pode ser caracterizada como sendo fosfatase alcalina intestinal. Nos demais tecidos sua atividade foi, comparativamente às atividades observadas nos diferentes pHs, significativa no fígado de *D. rotundus* e no rim das espécies *M. rufus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *G. soricina* e *D. rotundus*.

Nos demais tecidos e pHs, valores significativos de atividade da fosfatase foram observados no fígado de seis das sete espécies analisadas, onde a maior atividade da fosfatase foi no pH 5,5. Apenas em *D. rotundus* a maior atividade no fígado foi registrada como vimos, no pH 9,4. O rim e o estômago no pH 5,5 também apresentaram maior atividade da fosfatase na maioria das espécies, exceto em *M. rufus* e *D. rotundus*, que apresentaram maior atividade também em pH 9,4 no rim, e para *D. rotundus*, que apresentou maior atividade também no estômago em pH 3,5. Na espécie *G. soricina* a atividade da fosfatase no rim foi alta nos pHs 5,5 e 9,4, enquanto no estômago a atividade foi observada nos pHs 3,5 e 5,5.

Alguns estudos envolvendo a análise de atividade da fosfatase alcalina no intestino verificaram que há uma variação nos níveis da atividade da enzima ao longo do eixo longitudinal do intestino. Em ratos e camundongos, os maiores níveis de atividade foram encontrados no duodeno (Bessey et al., 1946; Calhau et al., 2000) e em seres humanos, a maior atividade da fosfatase alcalina também foi maior no

duodeno em relação ao íleo (Miura et al., 1989). Os resultados obtidos para as espécies de morcegos estão de acordo com os citados na literatura, visto que das sete espécies estudadas, em quatro delas as maiores atividades foram observadas na porção proximal do intestino. Nas espécies *M. molossus*, *A. planirostris* e *G. soricina* a maior atividade da fosfatase alcalina foi observada na porção intermediária do intestino, e essa diferença pode ser atribuída a uma variação funcional da fosfatase alcalina no trato digestório das diferentes espécies, possivelmente decorrente de variação na dieta. Para Miura et al. (1989) a atividade elevada da fosfatase alcalina nas porções iniciais do intestino, onde em geral ocorre a absorção de nutrientes, está relacionada à função da fosfatase, para a qual é sugerida um papel na absorção de ácidos graxos, carboidratos e proteínas (Moog e Glazier, 1972; Dupuis et al., 1977; Wada et al., 2001), substâncias presentes na dieta das espécies analisadas.

Glossophaga soricina, diferente das outras espécies, apresentou as maiores atividades no rim e no fígado. Essa diferença deve estar relacionada ao tipo de alimento ingerido pela espécie, ou seja, néctar e pólen.

Fan et al. (1999) observaram que o pH ótimo da atividade da fosfatase para vários segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) de porcos foi 10,5, quando utilizou o p-nitrofenil-fosfato como substrato. Outros estudos mostraram diferenças no pH ótimo para a enzima em diferentes espécies, sendo o pH ótimo igual a 9,0 para ratos e aves e pH 9,5 para bovinos e humanos (Bitar e Reinhold, 1972).

Nas espécies de morcegos analisadas, os valores altos de atividade da fosfatase no pH 9.4 apontam esse como o pH ótimo para a atividade da enzima no intestino de animais com dietas mais generalistas, como os frugívoros e insetívoros. Este pH foi

suficiente para detectar a variação funcional na atividade da fosfatase nos vários segmentos do intestino.

A baixa atividade da fosfatase em pH neutro, ou seja, pH 7,2, evidencia que as fosfatases presentes nos diferentes tecidos podem ser caracterizadas como fosfatase alcalina e fosfatase ácida, em função das suas maiores atividades nos pHs ácidos e básicos nos diferentes tecidos.

Na maioria das espécies analisadas, a maior atividade da fosfatase em pH ácido ocorreu no pH 5,5 no fígado. Para este tecido, a espécie *A. planirostris* foi a que apresentou a maior atividade (8,5) e *M. rufus* a menor (4,45). No rim a fosfatase apresentou maior atividade em pH 5,5 para a maioria das espécies (*A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *M. molossus*), sendo que *G. soricina* foi a que apresentou a maior atividade (7,58) e *M. molossus* a menor atividade (2,67). As espécies *M. rufus* e *D. rotundus* apresentaram as maiores atividades em pH 9,4.

No estômago, também foi o pH 5,5 que detectou a maior atividade da enzima para a maioria das espécies, sendo *G. soricina* a espécie que apresentou a maior atividade (4,32) e *M. molossus* a menor (1,39). *D. rotundus* apresentou a maior atividade em pH 3,5 (2,37).

Neste estudo foi possível observar que em seis espécies, *M. molossus*, *M. rufus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *D. rotundus* as maiores atividades da fosfatase sempre foram detectadas no intestino, seguido do fígado, rim e estômago. *Glossophya soricina* apresentou maior atividade no rim, seguido do fígado, intestino e estômago. As mais altas atividades foram observadas no intestino, cujo papel nas etapas finais de digestão e absorção são evidentes. Contudo, nos pHs ácidos para a maioria das espécies e também no pH 9,4 para *G. soricina*, o fígado e o rim, também

apresentaram valores altos de atividade, enquanto o estômago, que participa diretamente do processo de digestão, sempre apresentou as menores atividades da enzima. Essa diferença pode ser atribuída provavelmente, ao fato de que o rim, como órgão central de excreção, e o fígado, que participa do metabolismo intermediário, têm atividade de fosfatase diferente da apresentada pelo estômago.

Egorova et al. (1990) observaram que em ratos, a atividade de várias hidrolases foi maior no rim do que no intestino, enquanto que no fígado a atividade foi comparável com a atividade no intestino delgado. A alta atividade da fosfatase no rim pode ser devida ao fato que etapas específicas da digestão e assimilação de diferentes nutrientes também podem ocorrer fora do sistema digestório, como por exemplo, durante a passagem pelo sistema porta no fígado ou durante a filtração ou reabsorção no rim. A baixa atividade da fosfatase observada no estômago das espécies analisadas pode ser atribuída ao fato de que o trânsito de nutrientes é muito rápido em morcegos, uma vez que eles necessitam de uma digestão rápida e que forneça altas taxas de energia, facilitando o voo, que é um evento altamente dispendioso.

Diferentes dietas produzem mudanças na atividade da fosfatase alcalina em resposta a mudanças alimentares. Alterações nos níveis de gordura afetam sua atividade no intestino, sendo que uma dieta rica em proteína conduz a um aumento na fosfatase alcalina na mucosa intestinal, enquanto que o jejum reduz a atividade da enzima (Flock e Bollman, 1948; Jackson, 1952; McCarthy et al., 1980; Wada et al., 2001). Embora não tenha sido possível discriminar os alimentos ingeridos pelas espécies analisadas, ao considerarmos o hábito geral dessas espécies, ou seja, frugívoros e insetívoros, no caso das espécies de *Artibeus* e *Platyrrhinus* e *Molossus*,

respectivamente, acreditamos, embasados nos dados da literatura para essas espécies que há em suas dietas, um predomínio de proteínas, o que justificaria os níveis altos de atividade da fosfatase alcalina no intestino. As diferenças entre as espécies, que foram significativas, podem se dever, em parte, devidas a diferenças no tipo e quantidade de alimento ingerido.

Os morcegos nectarívoros possuem rins especializados para processar grandes volumes de água, apresentando características morfológicas que permitem produzir grande quantidade de urina diluída (Herrera et al., 2001; Schondube et al., 2001). Essa especialização e o tipo de alimento consumido por esses animais pode ter implicado na necessidade de atividade diferenciada de determinadas enzimas, como por exemplo a fosfatase, nas etapas da digestão o que explicaria sua atividade diferente nos tecidos de *G. soricina*.

Os resultados do presente estudo verificaram que além do pH e do tecido, como condições principais de variação na atividade da fosfatase, esta o sexo dos indivíduos, muito embora diferenças na atividade da fosfatase entre machos e fêmeas só foram detectadas nas espécies *A. planirostris* e *A. lituratus*. Essas diferenças devem, provavelmente, ser devidas a condições ou necessidades fisiológicas que são compartilhadas apenas pelos machos e fêmeas dessas espécies congênicas. Variações na expressão e atividade da fosfatase alcalina entre machos e fêmeas também já foram observadas em seres humanos (Negrão et al., 2003) e as diferenças entre machos e fêmeas foram atribuídas a idade em consequência do processo normal de envelhecimento em ambos os sexos.

Nas espécies para as quais foi possível analisar o papel do estado reprodutivo de fêmeas na atividade da fosfatase, não foi observado que este fator seja

significativo na atividade da fosfatase, ao contrário do observado em seres humanos, em que foi observado um aumento na atividade da fosfatase alcalina placentária presente no soro (Yong, 1967).

Embora já tenha sido demonstrado que a atividade da fosfatase alcalina pode mudar dependendo das condições alimentares (Wada et al., 2001), no presente estudo não foi observada esta relação para as sete espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares. As análises detectaram diferenças significativas na atividade da enzima entre as espécies, contudo elas ocorreram mesmo entre espécies de mesmo hábito alimentar. Essas diferenças devem estar relacionadas mais diretamente ao alimento consumido pelos indivíduos do que apenas à forma de dieta. Por se tratar de animais silvestres, o controle do estado fisiológico dos animais no momento da coleta, não é avaliado, pois não dá para concluir se os animais se alimentaram antes de serem coletados, ou mesmo o tempo que estavam em jejum. Também deve ser ressaltado que, embora os morcegos sejam colocados em categorias alimentares monotípicas, isso não implica que tenham exclusivamente um único hábito alimentar; somente sugere que uma dada categoria alimentar é o tipo de alimento predominante de determinada espécie (Cruz-Neto et al., 2001). Das espécies avaliadas, apenas os hematófagos se alimentam exclusivamente de sangue, sendo este talvez o motivo pelo qual a espécie apresentou um padrão diferente da atividade da fosfatase em diferentes pHs e tecidos, comparado com as demais espécies estudadas.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que as diferenças observadas refletem uma atividade diferenciada da fosfatase nas diferentes espécies,

condicionada mais provavelmente, a composição da dieta, do que ao hábito alimentar genérico da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Prof. Dr. Gustavo Romero pelo auxílio com os dados estatísticos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Qusn Nova* 26:896-900
- Bessey O, Lowry OH, Brock MJ (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164:321-329
- Bitar K, Reinhold JG (1972) Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf, and man. *Biochim Biophys Acta* 268:442-452
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson, PN (2002) Acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 55:65-72
- Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I (2000) Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin Biochem* 33:571-577
- Cruz-Neto AP, Garland TJ, Abe AS (2001) Diet, phylogeny, and basal metabolic rate in phyllostomid bats. *Zoology* 104:49-58
- Dempsey JL (2004) Fruit bats: nutrition and dietary husbandry. *Fact Sheet* 014:01-17

-
- DiPietro DL, Zengerle FS (1967) Separation and Properties of Three Acid Phosphatases from Human Placenta. *J Biol* 242:3391-3396
- Dumont ER (1997) Salivary pH buffering capacity in frugivorous and insectivorous bats. *J Mamm* 78:1210-1219
- Dupuis Y, Digaudo A, Fontaine F (1977) Further observation in favour of the role of alkaline phosphatase in calcium absorption. *Calcif Tissue Res* 22:556-560
- Engle MJ, Alpers DH (1992) The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. *Clin Chem* 38:2506-2509
- Egorova VV, Iezuitova NN, Timofeeva NM, Nikitina AA, Ugolev AM (1990) Distribution of digestive enzymes in some non-digestive organs (kidney, liver) and gastrointestinal tract in adult rats in various functional states. *Dokl AN SSSR* 310:239-243
- Fan MZ, Adeola O, Asem EK (1999) Characterization of brush border membrane-bound alkaline phosphatase activity in different segments of the porcine small intestine. *J Nutr Biochem* 10:299-305
- Flock EV, Bollman JL (1948) Alkaline phosphatase in the intestinal lymph of the rat. *J Biol Chem* 175:439-449
- Fujimori-Arai Y, Koyama I, Hirano K, Komoda T (1997) Intestinal alkaline phosphatase isoforms in rabbit tissues differ in glycosylation patterns. *Clin Biochem* 30:545-551
- Gawlicka AK, Horn MH (2005) Storage and absorption in the digestive system of carnivorous and herbivorous pricklyback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiol Biochem Zool* 78:879-892
- Gardner AL (1977) Feeding habits. Pages 293-350 in R.J. Baker, J.K. Jones, Jr., and D.C. Carter, eds. *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae*. Miscellaneous Publication n.13 of the Museum, Texas Tech University, Lubbock. Vol.2
- Heinrikson RL (1969) Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. *J Biol Chem* 244:299-307
- Herrera MLG, Martínez del Río C, Braun E, Hobson K (2001) Renal structure in Neotropical bats: using stable isotopes to explore relationships between diet and morphology. *Isot Environ Health Stud* 37:1-11
- Jackson SH (1952) The effect of food ingestion on intestinal and serum alkaline phosphatase in rats. *J Biol Chem* 198:553-559

- Jang I, Jung K, Cho J (2000) Influence of age on duodenal brush border membrane and specific activities of brush border membrane enzymes in wistar rats. *Exp Anim* 49:281-287
- Kempson SA, Kim JK, Northrup Te, Knox Fg, Dousa Tp (1979) Alkaline phosphatase in adaptation to low dietary phosphate intake. *Am J Physiol* 237:465-473
- Lau WKH, Freeman TK, Baylink DJ (1987) Purification and characterization of an acid phosphatase that displays phosphotyrosyl-protein phosphatase activity from bovine cortical bone matrix. *Biol Chem* 262:1389-1397
- Matsushita M, Irino T, Oh-Le K, Komoda T (2000) Specific gel electrophoresis method detects two isoforms of human intestinal alkaline phosphatase. *Electrophoresis* 21:281-284
- McCarthy DM, Nicholson JA, Kim YS (1980) Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *Am J Physiol* 239:0.445-451
- Millán JL, Fishman WH (1995) Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32:1-39
- Miura M, Matsuzaki H, Sakagishi Y, Komoda T (1989) Partial characterization of human ileal alkaline phosphatase: differences of human ileal and duodenal enzymes. *Clin Chem Acta* 163:279-287
- Moog F, Glazier HS (1972) Phosphatase absorption and alkaline phosphatase activity in the small intestine of the adult mouse and of the chick embryo and hatched chick. *Comp Biochem Physiol* 42:321-336
- Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL (2003) Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Biol* 23:7525-7530
- Negrão MR, Martins MJ, Ramos E, Barros H, Hipólito-Reis C, Azevedo I (2003) Fosfatase alcalina sérica humana e envelhecimento. *Acta Médica Portuguesa* 16:395-400
- Neuman H (1968) Substrate Selectivity in the Action of Alkaline and Acid Phosphatases. *J Biol Chem* 243:4671-4676
- Ogunbiyi OA, Okon EE (1976) Studies on the digestive enzymes of the African fruit bat *Eidolon helvum* (Kerr). *Comp Biochem Physiol* 55:359-361
- Peulen O, Gharbi M, Brigitte P, Dandrifosse G (2004) Differential effect of dietary spermine on alkaline phosphatase activity in jejunum and ileum of unweaned rats. *Biochemie* 86:487-493

- Redondo AF, Santos FR (2006) Evolutionary studies on an α -amylase gene segment in bats and other mammals. *Genetica* 126:199-213
- Schmidt G, Thannhauser SJ (1943) Intestinal phosphatase. *J Biol Chem* 149:369-385
- Schondube JE, Herrera MLG, Martínez del Rio C (2001) Diet and the evolution of digestion and renal function in Phyllostomid bats. *Zoology* 104:59-73
- Scott EM (1966) Kinetic Comparison of Genetically Different Acid Phosphatases of Human Erythrocytes. *J Biol Chem.* 241:3049-3052
- Smirnova EV, Gordova LA, Timofeeva NM, Shcherbakov GG (2005) Topography of Digestive Enzymes in Small Intestine and Activity of Corresponding Hydrolases in Liver and Kidney of Adult Pigs. *J Evol Biochem Physiol* 41: 47-53
- Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M. (2004) Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* 35:249-255
- Sussman NL, Eliakim R, Bubin D, Perlmutter DH, DeSchryver K, Alpers DH (1989) Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes. *Am J Physiol* 257:14-23
- Ugolev AM, Iezuitova N, Timofeeva NM, Egorova VV, Nikitina AA, Gordova LA (1992) Digestive enzymes in gastrointestinal tract, kidney, liver, and spleen in various functional states. *Sechenov Fiziol Zh* 78:76-83
- van Hoof VO, de Broe ME (1994) Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab* 31:197-293
- Xie Q, Alpers DH (2000) The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes. *Physiol Genomics* 3:1-8
- Xie Q-M, Zhang Y, Mahmood S, Alpers D (1997) Rat intestinal alkaline phosphatase II messenger RNA is present in duodenal crypt and villus cells. *Gastroenterology* 112:376-386
- Wada H, Yagami I, Niwa N (2001) Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. *Exp Anim* 50:153-158
- Yedlin ST, Young G.P, Seetharam B, Seetharam S, Alpers DH (1981) Characterization and comparison of soluble and membranous forms of intestinal alkaline phosphatase from the suckling rat. *J Biol Chem* 256:5620-5626
- Yong JM (1967) Origins of serum alkaline phosphatase. *J Clin Path* 20:647-653

Young GP, Friedman S, Yedlin ST, Alpers DH (1981) Effect of fat feeding on intestinal alkalinephosphatase activity in tissue and serum. *Am J Physiol* 241: 461-468

Tabela 1. Discriminação dos exemplares analisados pela família, espécie, número de registro, sexo, procedência.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	CFC	SEXO	PROCEDÊNCIA
Phyllostomidae	<i>Artibeus planirostris</i> (3♀ e 2♂)	882	♀	Nova Aliança - SP
		885	♀	São José do Rio Preto - SP
		890	♂	São José do Rio Preto - SP
		891*	♀	São José do Rio Preto - SP
		893	♂	São José do Rio Preto - SP
	<i>Artibeus lituratus</i> (2♀ e 3♂)	847	♀	São José do Rio Preto - SP
		851*	♀	São José do Rio Preto - SP
		854	♂	São José do Rio Preto - SP
		966	♂	São José do Rio Preto - SP
		974	♂	Guapiaçu - SP
	<i>Platyrrhinus lineatus</i> (2♀ e 3♂)	968	♂	São José do Rio Preto - SP
		977*	♀	São José do Rio Preto - SP
		979	♂	São José do Rio Preto - SP
		989*	♀	São José do Rio Preto - SP
		990	♂	São José do Rio Preto - SP
	<i>Glossophaga soricina</i> (5♀)	975	♀	São José do Rio Preto - SP
		976	♀	São José do Rio Preto - SP
		987*	♀	São José do Rio Preto - SP
		992	♀	São José do Rio Preto - SP
		963*	♀	São José do Rio Preto - SP
	<i>Desmodus rotundus</i> (5♀)	934	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		936*	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		937*	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		940	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
		943	♀	Sebastianópolis do Sul - SP
Molossidae	<i>Molossus molossus</i> (3♀ e 2♂)	928	♂	São José do Rio Preto - SP
		950	♂	São José do Rio Preto - SP
		960	♀	São José do Rio Preto - SP
		962	♀	São José do Rio Preto - SP
		991	♀	São José do Rio Preto - SP
	<i>Molossus rufus</i> (3♀ e 1♂)	903	♀	São José do Rio Preto - SP
		923	♀	São José do Rio Preto - SP
		998	♂	São José do Rio Preto - SP
		1001	♀	Engenheiro Schmidt - SP
		1002	♀	Engenheiro Schmidt - SP

*Fêmeas grávidas

Tabela 2. Médias das atividades da fosfatase (U/ g tecido) no fígado, intestino, rim e estômago das sete espécies de morcegos analisadas (n=5). (P) = Proximal; (I) = Intermediário; (D) = Distal.

Espécie	<i>Molossus molossus</i>				<i>Molossus rufus</i>				<i>Desmodus rotundus</i>			
	pH				pH				pH			
Tecido	3,5	5,5	7,2	9,4	3,5	5,5	7,2	9,4	3,5	5,5	7,2	9,4
Fígado	2,94	4,74	1,19	0,83	3,45	4,45	1,14	1,18	3,06	4,72	1,53	4,86
Intestino (P)	1,06	1,89	3,15		1,60	2,90	1,73	66,78	0,76	1,37	1,60	22,57
Intestino (I)				62,58				30,59				11,22
Intestino (D)				18,11				19,19				7,49
Rim	1,54	2,67	0,66	1,51	2,61	2,64	0,49	6,42	2,36	2,47	0,47	3,41
Estômago	0,91	1,39	0,63	0,95	1,05	2,37	0,96	1,82	2,37	2,18	0,56	1,48

Cont. Tabela 2. Médias das atividades da fosfatase (U/ g tecido) no fígado, intestino, rim e estômago das sete espécies de morcegos analisadas (n=5). (P) = Proximal; (I) = Intermediário; (D) = Distal.

Espécie	<i>Artibeus planirostris</i>				<i>Artibeus lituratus</i>				<i>Platyrrhinus lineatus</i>				<i>Glossophaga soricina</i>			
	pH				pH				pH				pH			
Tecido	3,5	5,5	7,2	9,4	3,5	5,5	7,2	9,4	3,5	5,5	7,2	9,4	3,5	5,5	7,2	9,4
Fígado	3,52	8,5	2,09	1,08	3,69	5,35	2,53	0,98	1,85	4,37	1,72	1,95	0,81	6,72	2,30	0,82
Intestino (P)	3,21	5,17	2,45	14,69	1,84	3,83	2,41	13,01	1,55	4,73	4,41	78,39	3,19	3,6	1,06	3,91
Intestino (I)				17,28				9,37				38,52				6,13
Intestino (D)				2,9				5,57				20,11				1,77
Rim	1,93	3,74	0,83	3,52	3,58	4,39	1,12	3,54	2,5	4,24	1,13	1,34	5,79	7,58	1,54	7,57
Estômago	2,07	3,58	1,09	1,57	2,42	2,87	0,91	0,33	1,37	2,26	0,79	0,49	4,25	4,32	1,55	0,73

Tabela 3. Análise de variância em medidas repetidas examinando a atividade da fosfatase em diferentes tecidos, pH, estado reprodutivo de indivíduos das *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus*.

Espécie	Fonte de variação	d.f	MS	F	P
<i>Glossophaga soricina</i>	Tecido	3	0,31629	25,527	p<0.001
	Gravidez	1	0,01232	0,994	0,338419
	Tecido x Gravidez	3	0,02416	1,949	0,175532
	Erro	12	0,01239		
	pH	3	0,52593	46,000	p<0.001
	pH x Tecido	9	0,20896	18,277	p<0.001
	pH x Gravidez	3	0,03532	3,090	0,039155
	pH x Tecido x Gravidez	9	0,00549	0,480	0,878056
	Erro	36	0,01143		
	<i>Desmodus rotundus</i>	Tecido	3	0,15472	6,5890
Gravidez		1	0,00671	0,2858	0,602672
Tecido x Gravidez		3	0,01163	0,4955	0,692176
Erro		12	0,02348		
pH		3	0,78618	40,7147	p<0.001
pH x Tecido		9	0,29105	15,0730	p<0.001
pH x Gravidez		3	0,00796	0,4121	0,745323
pH x Tecido x Gravidez		9	0,01134	0,5870	0,798842
Erro		36	0,01931		

Tabela 4. Análise de variância em medidas repetidas examinando a atividade da fosfatase em diferentes tecidos, pH para as quatro espécies de morcegos com machos e fêmeas (*Molossus molossus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus* e *Platyrrhinus linetatus*), testando a influência do sexo na atividade da fosfatase.

Espécie	Fonte de variação	d.f	MS	F	P
<i>Molossus molossus</i>	Tecido	3	0,15954	5,8746	0,010461
	Sexo	1	0,00536	0,1973	0,664797
	Tecido x Sexo	3	0,00423	0,1556	0,924032
	Erro	12	0,02716		
	pH	2	0,25385	26,7566	p<0.001
	pH x Tecido	6	0,07816	8,2378	0,000066
	pH x Sexo	2	0,00437	0,4608	0,636218
	pH x Tecido x Sexo	6	0,00420	0,4430	0,842618
	Erro	24	0,00949		
	<i>Artibeus planirostris</i>	Tecido	3	0,33849	29,296
Sexo		1	0,06405	5,543	0,036422
Tecido x Sexo		3	0,00738	0,639	0,604579
Erro		12	0,01155		
pH		3	0,48965	39,239	p<0.001
pH x Tecido		9	0,17430	13,968	p<0.001
pH x Sexo		3	0,01890	1,514	0,227325
pH x Tecido x Sexo		9	0,01868	1,497	0,186524
Erro		36	0,01248		
<i>Artibeus lituratus</i>		Tecido	3	0,19310	4,7335
	Sexo	1	0,21227	5,2033	0,041598
	Tecido x Sexo	3	0,18724	4,5897	0,023156
	Erro	12	0,04080		
	pH	3	0,29485	16,3011	p<0.001
	pH x Tecido	9	0,17413	9,6269	p<0.001
	pH x Sexo	3	0,00241	0,1331	0,939734
	pH x Tecido x Sexo	9	0,01914	1,0581	0,415828
	Erro	36	0,01809		
	<i>Platyrrhinus linetatus</i>	Tecido	3	1,26950	31,0179
Sexo		1	0,03486	0,8517	0,374264
Tecido x Sexo		3	0,00875	0,2137	0,884985
Erro		12	0,04093		
pH		3	0,45117	37,9119	p<0.001
pH x Tecido		9	0,61168	51,3997	p<0.001
pH x Sexo		3	0,00163	0,1373	0,937069
pH x Tecido x Sexo		9	0,00659	0,5535	0,825154
Erro		36	0,01190		

Tabela 5. Análise de variância em medidas repetidas examinando a atividade da fosfatase em diferentes tecidos, pH de fêmeas das sete espécies de morcegos analisadas: *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus linetatus*, *Glossopha soricina* e *Desmodus rotundus*.

Espécie	Fonte de variação	d.f	MS	F	P
	Tecido	3	0,27052	20,737	p<0.001
	Espécie	6	0,23066	17,681	p<0.001
	Tecido x Espécie	18	0,08403	6,442	p<0.001
	Erro	68	0,01305		
	pH	2	1,85868	199,014	p<0.001
	pH x Tecido	6	0,16763	17,949	p<0.001
	pH x Espécie	12	0,02192	2,347	0,009075
	pH x Tecido x Espécie	36	0,03557	3,808	p<0.001
	Erro	136	0,00934		

Tabela 6. Teste a posteriori LSD de Fisher. Valores de P para as comparações entre as sete espécies de morcegos analisadas para a atividade da fosfatase.

	<i>M. molossus</i>	<i>P. linetatus</i>	<i>G. soricina</i>	<i>A. planirostris</i>	<i>A. lituratus</i>	<i>D. rotundus</i>
<i>M. molossus</i>						
<i>P. linetatus</i>	0,001488					
<i>G. soricina</i>	p<0.001	0,039434				
<i>A. planirostris</i>	0,000002	0,167790	0,509468			
<i>A. lituratus</i>	0,108507	0,128604	0,000196	0,002991		
<i>D. rotundus</i>	0,480512	0,000071	p<0.001	p<0.001	0,019446	
<i>M. rufus</i>	0,275912	0,014018	p<0.001	0,000025	0,458470	0,047024

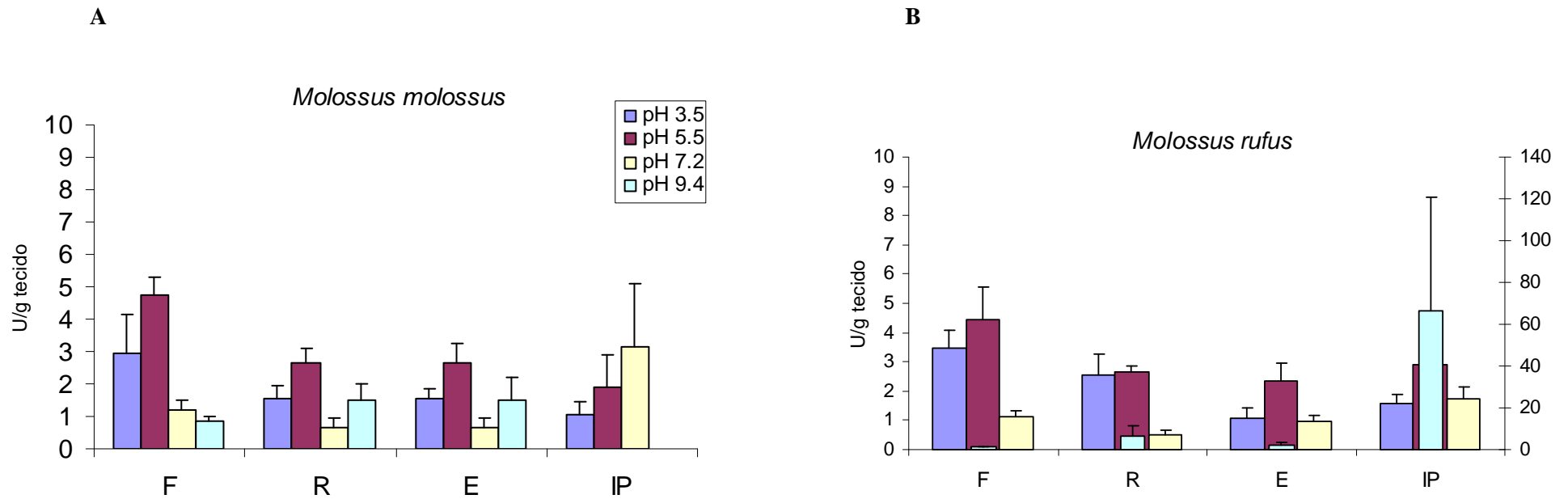


Figura 1 . Gráfico de barras mostrando a atividade da fosfatase nos tecidos F: fígado, R: rim, E: estômago, em quatro diferentes pHs. IP: intestino proximal. Em A: *Molossus molossus*, B: *Molossus rufus*. A atividade da fosfatase para o intestino proximal no pH 9.4 é apresentada no eixo à direita.

Figura 2. Gráfico de barras mostrando a atividade da fosfatase nos tecidos F: fígado, R: rim, E: estômago e IP: intestino proximal, em quatro diferentes pHs. Em A: *Artibeus planirostris*, B: *Artibeus liturarius*, C: *Platyrrhinus lineatus*. A atividade da fosfatase para o intestino proximal no pH 9.4 é apresentada no eixo à direita.

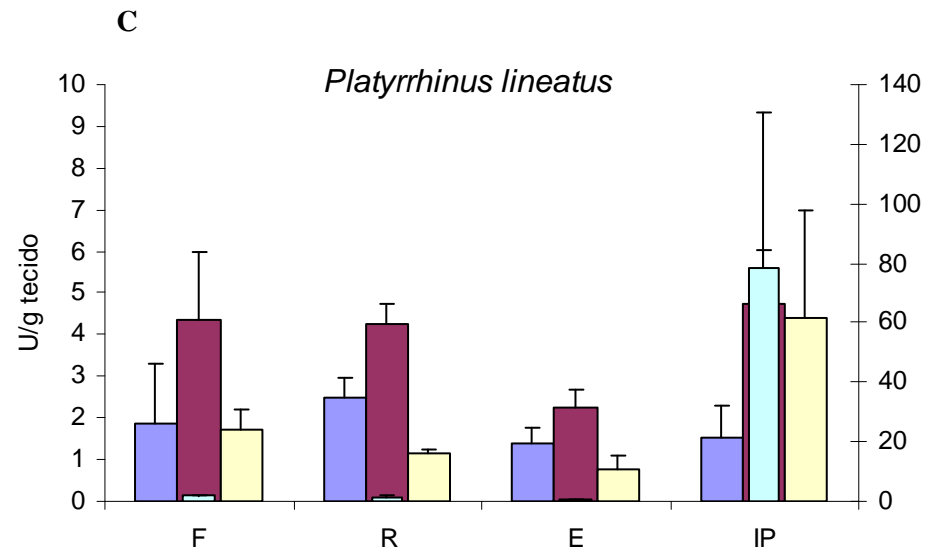
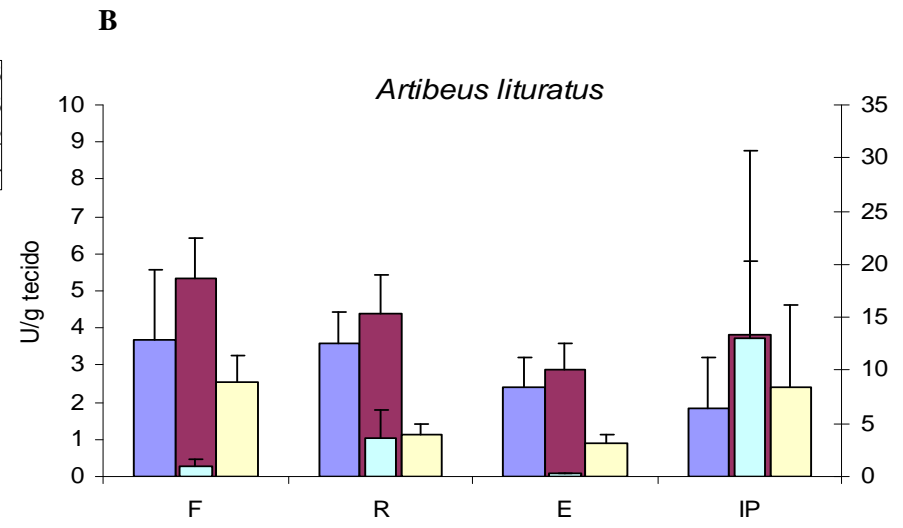
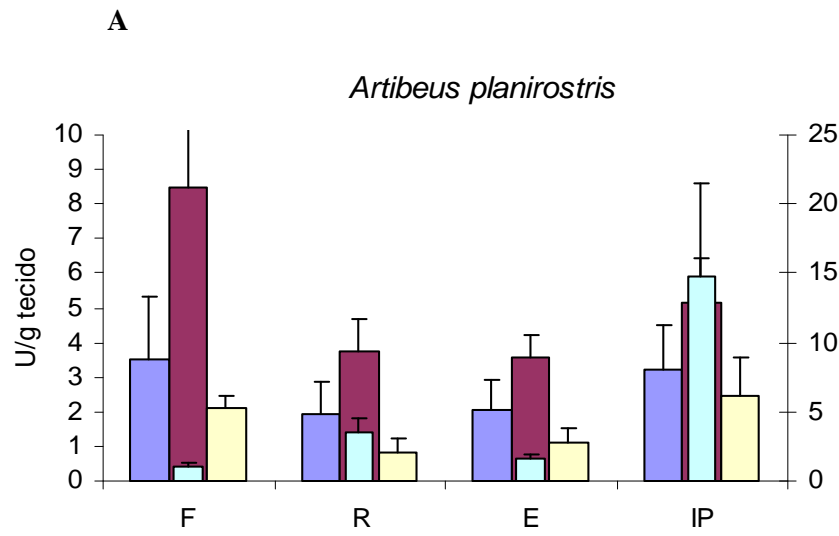
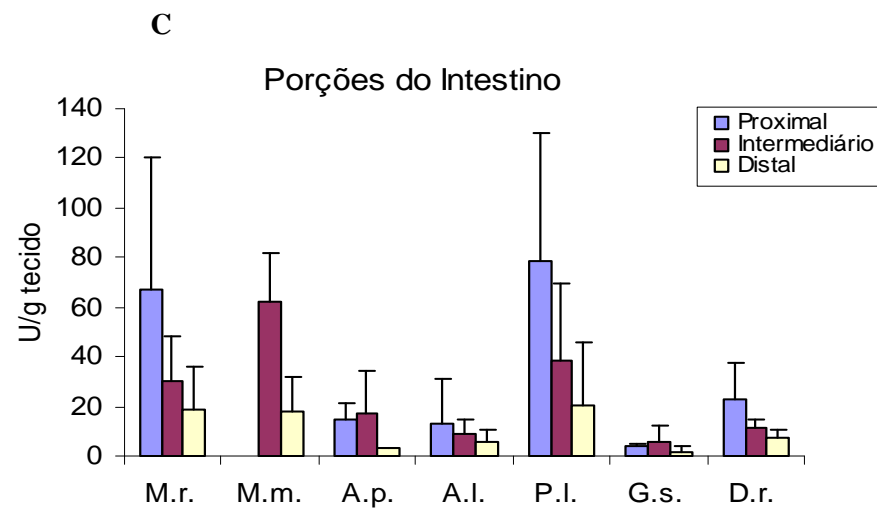
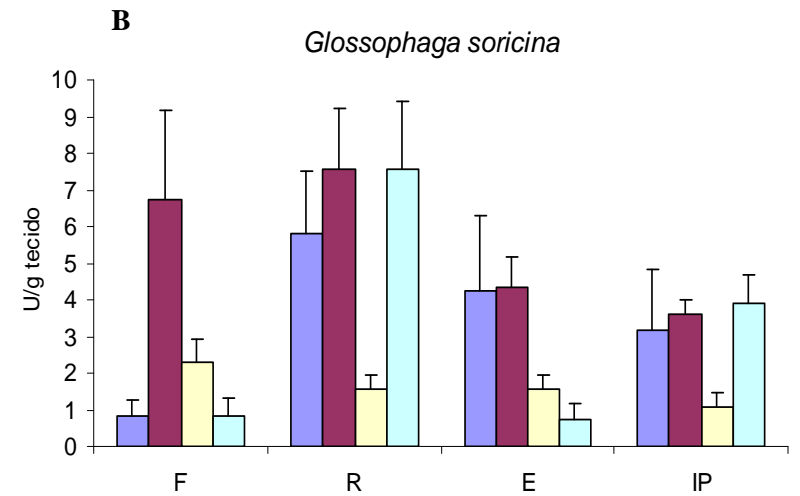
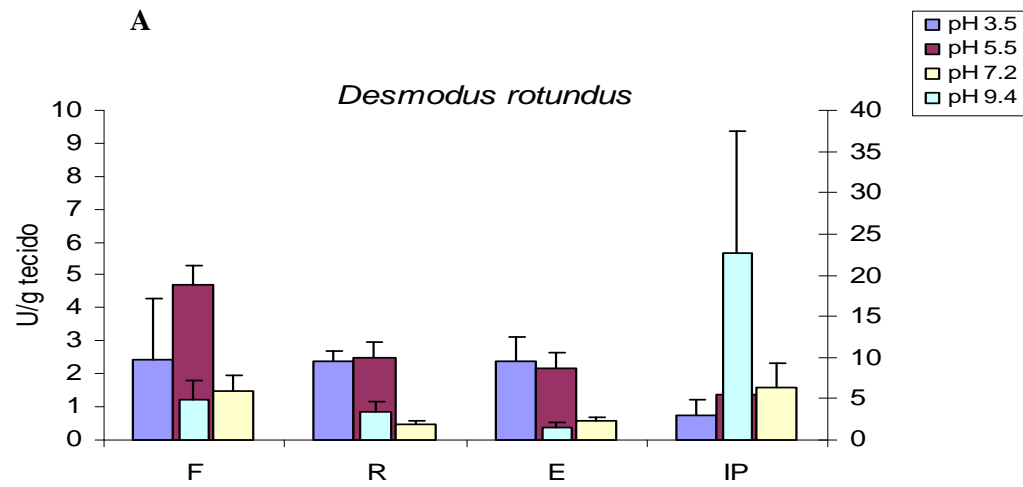


Figura 3. Gráfico de barras mostrando a atividade da fosfatase nos tecidos F: fígado, R: rim, E: estômago e IP: intestino proximal, em quatro diferentes pHs. Em A: *Desmodus rotundus*, B: *Glossophaga soricina*, C: Porções proximal, intermediária e distal do intestino de todas as espécies *Molossus rufus* (M.r.), *Molossus molossus* (M.m.), *Artibeus planirostris* (A.p.), *Artibeus lituratus* (A.l.), *Platyrrhinus lineatus* (P.l.), *Glossophaga soricina* (G.s.) e *Desmodus rotundus* (D.r.). A atividade da fosfatase para o intestino proximal no pH 9.4 é apresentada no eixo à direita.



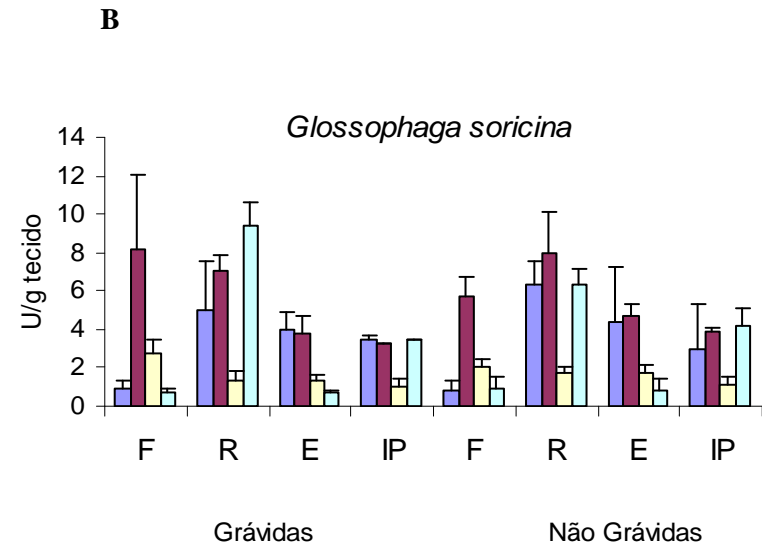
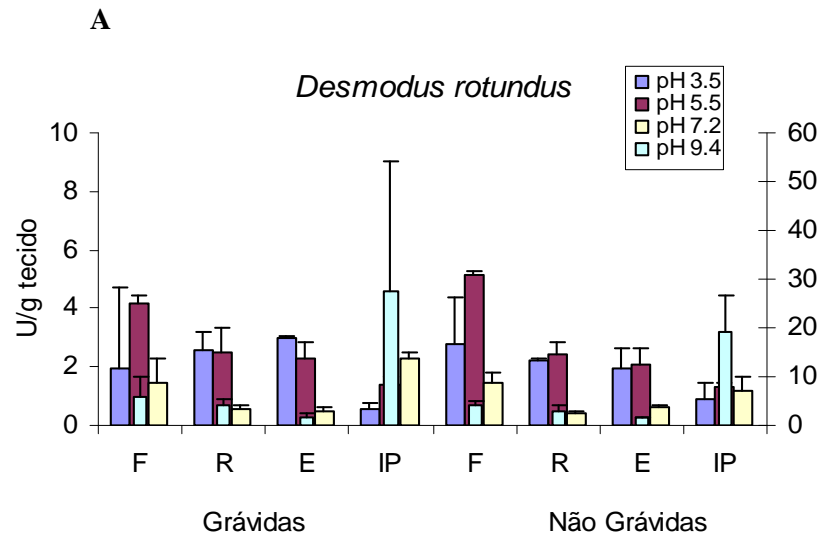
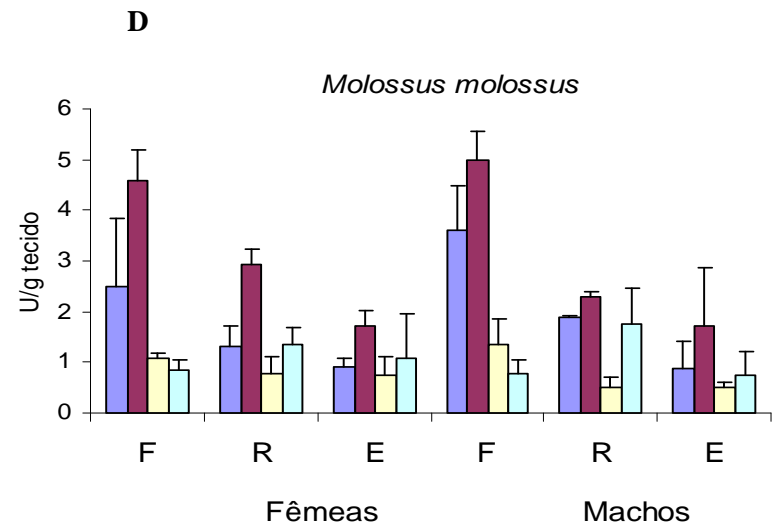
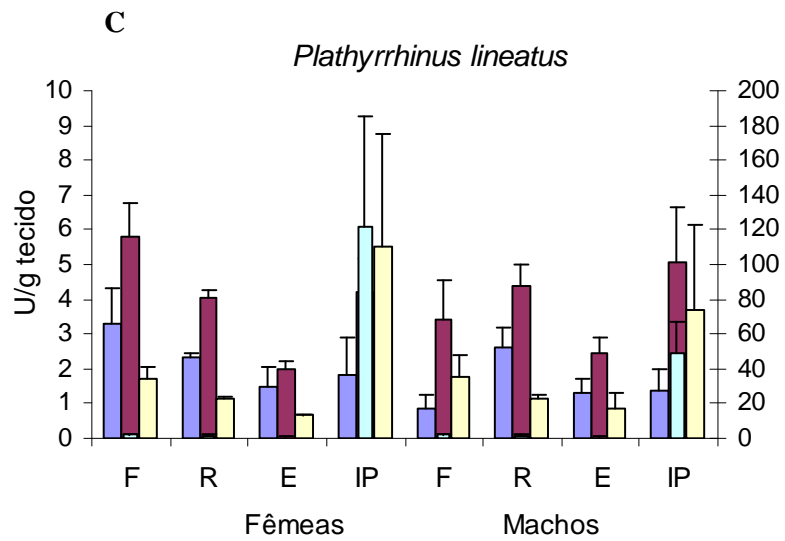
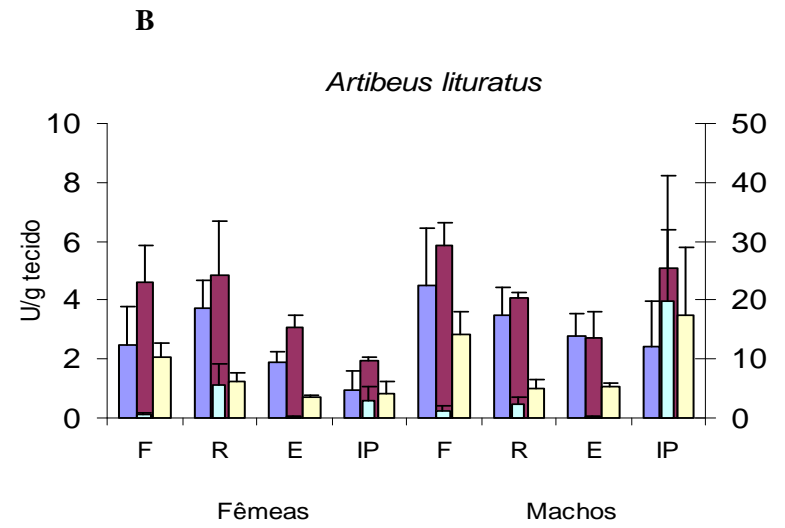
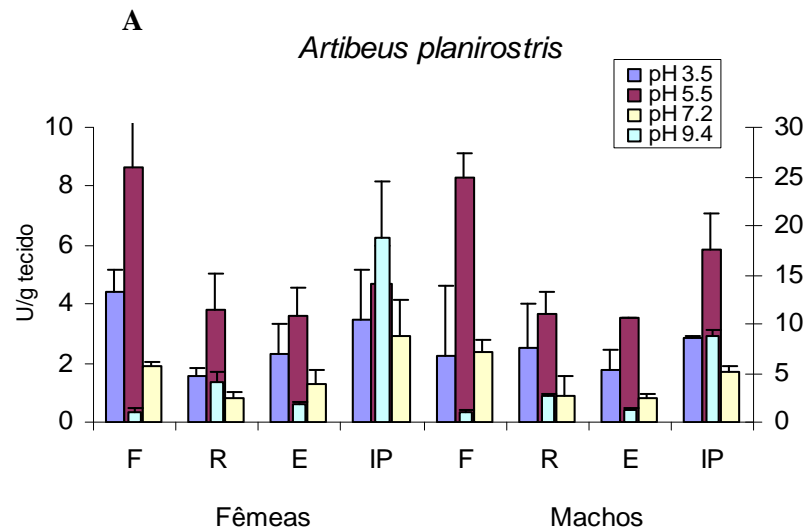


Figura 4 . Gráfico de barras mostrando a atividade da fosfatase em fêmeas grávidas e não grávidas, nos tecidos F: fígado, R: rim, E: estômago, em quatro diferentes pHs. IP: intestino proximal. Em A: *Desmodus rotundus*, B: *Glossophaga soricina*. A atividade da fosfatase para o intestino proximal no pH 9.4 é apresentada no eixo à direita.

Figura 5. Gráfico de barras mostrando a atividade da fosfatase entre fêmeas e machos nos tecidos F: fígado, R: rim, E: estômago e IP: intestino proximal, em quatro diferentes pHs. Em A: *Artibeus planirostris*, B: *Artibeus liturarius*, C: *Platyrrhinus lineatus* e D: *Molossus molossus*. A atividade da fosfatase para o intestino proximal no pH 9.4 é apresentada no eixo à direita.



IV. CONCLUSÕES GERAIS

IV. CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho, através da análise bioquímica das esterases e das atividades enzimáticas das esterases e fosfatases no fígado, rim, intestino e estômago em diferentes pHs em espécies de morcegos das famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae, com diferentes hábitos alimentares, foi possível concluir que:

- A análise bioquímica das esterases presentes nos diferentes tecidos de oito espécies de morcegos (*Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus* e *Myotis nigricans*) revelou um padrão espécie-específico da enzima, com a presença de α -esterases em todos os tecidos para sete das oito espécies de morcegos analisadas, sendo que β -esterase foi detectada apenas no intestino da espécie insetívora *M. nigricans*, e α - β esterases foram observadas nas espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* e no intestino e estômago de *M. nigricans*.

- Com base na inibição foi possível identificar as esterases como carboxilesterases, sendo inibidas apenas parcialmente pelo malathion e PMSF.

- Embora não tenha sido possível fazer uma correlação entre os diferentes hábitos alimentares e a atividade das enzimas analisadas, foi possível observar que as atividades variáveis da esterase e da fosfatase nos diferentes tecidos nas diferentes espécies seja influenciada pela composição da dieta, sendo possível sugerir uma participação dessas enzimas na digestão ou degradação dos diferentes compostos da dieta

V. RESUMO

V. RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar a enzima esterases em quatro tecidos (fígado, rim, intestino e estômago) em gel de poliacrilamida em oito espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares pertencendo as famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae e dosar a atividade da enzima fosfatase nos mesmos tecidos em quatro pHs.

A análise bioquímica das esterases no fígado, rim, estômago e intestino das espécies *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus* e *Myotis nigricans* revelou um padrão espécie-específico nas diferentes espécies. As esterases nos quatro tecidos para as sete das oitos espécies analisadas foram identificadas como α -esterases. Somente o intestino da espécie insetívora *M. nigricans* apresentou uma β - esterase. Nas espécies frugívoras *A. planirostris*, *A. lituratus* e *P. lineatus* α - β esterases foram observadas em todos os tecidos, enquanto em *M. nigricans* foi observada no intestino e estômago. Baseado na inibição, as esterases foram identificadas como carboxilesterases. A inibição ocorreu somente pelo malathion e PMSF.

Através da análise da fosfatase nos diferentes tecidos em diferentes pHs das espécies, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus*, foi possível identificar a fosfatase ácida no fígado, rim e estômago da maioria das espécies analisadas (*M. molossus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus*, *Glossophaga soricina*), e apenas no fígado e estômago de *M. rufus*, enquanto que no rim foi detectada a atividade da fosfatase alcalina. Em *D. rotundus* foi observada a

atividade da fosfatase alcalina no fígado e rim, e no estômago ocorre a fosfatase ácida. A maior atividade da enzima fosfatase alcalina foi detectada no intestino de todas as espécies, sendo seguido pelo fígado, rim e estômago. Em *G. soricina* o rim apresentou maior atividade, seguido do fígado, intestino e estômago.

A maior atividade da carboxilesterase foi detectada, na maioria das espécies, no intestino, seguido do rim e fígado, e estômago.

As análises evidenciaram que os diferentes pHs e os diferentes tecidos influenciam na atividade da fosfatase nas espécies analisadas, diferente do estado reprodutivo das fêmeas que não influenciou na atividade das enzimas. Diferenças na atividade da fosfatase entre machos e fêmeas foram significativas somente para as espécies *A. planirostris* e *A. lituratus*.

Palavras-Chaves: Chiroptera, esterase, fosfatase, atividade, hábito alimentar.

VI. ABSTRACT

VI. ABSTRACT

This study aimed to examine the esterases enzymes in polyacrylamide gel of four tissues (liver, kidney, intestine and stomach) belonging to eight species of bats with different dietary habits belonging to the Molossidae, Phyllostomidae and Vespertilionidae families and estimate the activity of phosphatase enzyme in the same tissues in four different pHs.

The biochemical analysis of esterases in the liver, kidney, stomach and intestine of species *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus* and *Myotis nigricans* revealed a tissue species-specific pattern in different species. The esterases in the four tissues of the seven of the eight species examined were identified as α - esterases. Only in the intestine of the insectivorous species *M. nigricans*, presented a β - esterases. In the frugivorous species *A. planirostris*, *A. lituratus* and *P. lineatus* α - β esterases were observed in all tissues while in *M. nigricans* it were observed in intestine and stomach. Based on inhibition, the esterases were identified as carboxylesterases. The inhibition occurred only by malathion and PMSF.

Through analysis of phosphatase in different different pHs and tissues of the species, *M. molossus*, *M. rufus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus*, *G. soricina* and *D. rotundus*, it was possible to identify acid phosphatase in the liver, kidney and stomach of most species examined (*M. molossus*, *A. planirostris*, *A. lituratus*, *P. lineatus*, *G. soricina*), and only in the liver and stomach of *M. rufus*, while in the kidney was detected activity of alkaline phosphatase. In *D. rotundus*

was observed the activity of alkaline phosphatase in the liver and kidney, and in the stomach occurred acid phosphatase. The highest activity of the enzyme alkaline phosphatase was detected in the intestine for all species and this was followed by the liver, kidney and stomach. In *G. soricina* the kidney showed greater activity, followed by the liver, intestines and stomach.

The activity of carboxylesterase it was detected greater in most of species, in intestine, followed by kidney and liver and stomach.

The analyses showed that the different tissues and different pH influence in the phosphatase activity in the species examined, other than reproductive status of females that did not influence the activity of enzymes. Differences in the phosphatase activity between males and females were significant only for the species *A. planirostris* and *A. lituratus*.

Key-Words: Chiroptera, esterase, phosphatase, activity, dietary habits.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS

ADLER, A.J.; KISTIAKOWSKY, G.B. Isolation and properties of pig liver esterase. *J. Biol. Chem.* 236, n.12, p.3240-3245, 1961.

ALVAREZ,T.; SÁNCHEZ-CASAS,N. Diferenciación alimentaria entre los sexos de *Glossophaga soricina* (Chiroptera: Phyllostomidae) en México. *Rev. Biol. Trop.* 47(4), 1999.

ARGENTINE,J.A.; JAMES,A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25(5), p.621-630, 1995.

ARNASON,U., ADEGOKE,A.J.; BODIN,K.; BORN,E.W.; ESA,Y.B.; GULLBERG,A.; NILSSON,M.; SHORT,R.V.; XU,X.; JANKE,A. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(12), p.8151-8156, 2002.

BAILLEN,M.; COGNEAU,M. Characterization of two mechanisms of ^{28}Mg uptake in rat jejunal brush border membrane vesicles. *Magn. Res.* 8, p.331-339, 1995.

BAKER,H.G.; BAKER, I. 1982. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. Pp. 131-171 in M.H. Nitecki, ed. *Biochemical Aspects of Evolutionary Biology*. University of Chicago Press, Chicago.

BARCLAY,R.M.R., DOLAN,M. The digestive efficiency of insectivorous bats. *Can. J. Zool.* 69(07), p.1853-1856, 1991.

BELLEN,H.; van de WEGHE,A.; BOUQUET,Y.; van ZUTPHEN,L.F.M. Heterogeneity of Es-1 esterases in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Biochem. Genet.* 22, p.853-870, 1986.

BERNARDELLO,G., AGUILAR,R.; ANDERSON,G.J. The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *Am. J. Bot.* 91, p.198-206, 2004.

BESMAN,M.; COLEMAN,J.E. Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 260(20), p.11190-11193, 1985.

BESSEY,O.; LOWRY,O.H.; BROCK,M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, p.321-329, 1946.

BIZERRIL,M..X. A.; RAW,A. Feeding specialization of two species of bats and the fruit quality of *Piper arboreum* in a Central Brazilian gallery forest. *Rev. Biol. Trop.* 45(2), p. 913-918, 1997.

BRICE,A.T.; DAHL,K.H.; GRAU,C.R. Pollen digestibility by hummingbirds and psittacines. *Condor.* 91, p.681-688, 1989.

BREWER,G.J. Introduction to isozyme technique. Academic Press, N.Y. pp. 87, 1970.

BUBLITZ,R.; ARMESTO, J.; HOFFMANN-BLUME,E.; SCHULZE',M.; RHODE,H.; HORN,A.; AULWURM,S.; HANNAPPEL,E.; FISCHER,W. Heterogeneity of glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase of calf intestine. *Eur. J. Biochem.* 217, p.199-207, 1993.

CALHAU,C.; MARTEL,F.; HIPÓLITO-REIS,C.; AZEVEDO,I. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin. Biochem.* 33(7), p.571-577, 2000.

CAMPBELL,C.J.; CHANTRELL,L.J.; EASTMOND,R. Purification and partial characterization of rat intestinal cefuroxime axetil esterase. *Biochem. Pharmacol.* 36, p.2317-2324, 1987.

COATS,P.M.; MESTRINER,M.A.; HOPSKINSON,D.A. A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. *Ann. Hum. Genet.* 39, p.1-20, 1975.

CONNORS,W.M.; PIHL,A.; DOUNCE,A.L.; STOTZ,E. Purification of liver esterase. *J. Biol. Chem.* 184, p.29-36, 1950.

COSTA,R.; NIGRO,L.; DANIELI,G.A. Esterase-6 allozymes: biochemical studies of two common and one rare variant in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 21(½), p. 191-197, 1983.

COURTS,S.E. Dietary strategies of Old World Fruit Bats (Megachiroptera, Pteropodidae): how do they obtain sufficient protein? *Mammal Rev.* 28(4), p.185-194, 1998.

COURVILLE,D.A.; LEDINGTON,W. A new method of assay for serum esterase. *J. Biol. Chem.* 190, p.575-584, 1951.

CRUZ-NETO,A.P.; GARLAND,T.Jr.; ABE,A.S. Diet, phylogeny, and basal metabolic rate in phyllostomid bats. *Zoology.* 104, p.49-58, 2001.

DELORME,M.; THOMAS,D.W. Comparative analysis of the digestive efficiency and nitrogen and energy requirements of the phyllostomid fruit-bat (*Artibeus jamaicensis*) and the pteropodid fruit-bat (*Rousettus aegyptiacus*). *J. Comp. Physiol. B.* 169, p.123-132, 1999.

DEMPSEY,J.L. Fruit bats: nutrition and dietary husbandry. *Fact Sheet* 014, p.01-17, 2004

DEUSUC,F.; SCALLY,M.; MADSEN,O.; STANHOPE,M.J.; DE JONG,W.W.; CATZEIS,F.M.; SPRINGER,M.S.; DOUZERY,E.J.P. Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. *Mol. Biol. Evol.* 19(10), p. 1656–1671, 2002.

DIAMOND,J.M. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. *News Phys Sci.* 6, p.92–6, 1991.

DIAMOND, J.M.; HAMMOD, K.A. The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia.* 48, p.551-557, 1992.

DUMONT,E.R. Salivary pH buffering capacity in frugivorous and insectivorous bats. *J. Mamm.* 78(4), p.1210-1219, 1997.

ENGLE,M.J.; ALPERS,D.H. The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. *Clin. Chem.* 38(12), p.2506-2509 1992.

ENGLE,M.J.; MAHMOOD,A.; ALPERS,D.H. Two rat intestinal alkaline phosphatase isoforms with different carboxyl-terminal peptides are both membrane-bound by a glycan phosphatidylinositol linkage. *J. Biol. Chem.* 270(20), p.11935-11940, 1995.

FERRAREZI,H.; GIMENEZ,E.A. Systematic patterns and the evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia). *J. Comp. Biol.* 1, p. 75–94, 1996.

FEYEREISEN,R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.* 82, p.83-90, 1995.

FLEMING,T.H. Fecundity, fruiting pattern, and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat dispersed Tropical shrub. *Oecologia.* 51, p. 42-46, 1981.

FLEMING, T.H., 1986, Opportunism versus specialization: the evolution of feeding strategies in frugivorous bats, pp.105- 118. In: A. Estrada & T. H. Fleming (eds.), *Frugivores and seed dispersal*. W. Junk Publishers, Dordrecht, 398p.

FLEMING, T.H.; HOOPER, E.T.; WILSON, D.E. Three central American bat communities: structure, reproductive cycle, and movement patterns. *Ecology*, 53(4), p.553-569, 1972.

FORMAN, G.L.; PHILLIPS, C.J.; ROUCK, C.S. Alimentary Tract. In: *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomidae* (R.J. Baker, J. Knox Jones Jr. and D.C. Carter. eds). Spec. Publ. Mus. Texas Univers. 16. Part III, pp.205-227, 1979.

FRANK, C.L. Adaptations for hibernation in the depot fats of a ground squirrel (*Spermophilus beldingi*). *Can. J. Zool.* 69, p.2707-2711, 1991.

FREITAS, M.B., WELKER, A.F., MILLAN, S.F., PINHEIRO, E.C. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J. Comp. Physiol. B.* 173(8), p.703-707, 2003.

FREITAS, M.B., PASSOS, C.B.C., VASCONCELOS, R.B., PINHEIRO, E.C. Effects of fasting on energy reserves of vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 140, p.59-62, 2005.

FUJIMORI-ARAI, Y.; KOYAMA, I.; HIRANO, K.; KOMODA, T. Intestinal alkaline phosphatase isoforms in rabbit tissues differ in glycosylation patterns. *Clin. Biochem.* 30(7), p.545-551, 1997.

GALINDO-GONZÁLEZ, J. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia en la conservación y regeneración del bosque tropical. *Acta Zool. Mex.* 78, p. 57-74, 1998.

GARDNER, A.L. Feeding habits. Pages 293-350 in R.J. Baker, J.K. Jones, Jr., and D.C. Carter, eds. *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae*. Miscellaneous Publication n.13 of the Museum, Texas Tech University, Lubbock. 2, 1977.

GEISER, F.; KENAGY, G.J. Dietary fats and torpor patterns in hibernating ground squirrels. *Can. J. Zool.* 71, p.1182-1186, 1993.

GEISER, F.; STAHL, B.; LEARMONTH, R.P. The effect of dietary fatty acids on the pattern of torpor in a marsupial. *Physiol. Zool.* 65, p.1236-1245, 1992.

GU,X.; ZERA,A.J. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 107(4), p.553-560, 1994.

HARITOS,A.A.; SALAMASTRAKIS,S.S. A comparison of muscle esterases in the fish genus *Trachurus* by vertical gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, p.477-480, 1982.

HEMINGWAY,J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30, p.1009-1015, 2000.

HENTHORN,P.S.; RADUCHAQ,M.; KADESCH,T.; WEISS,M.J.; HARRIS,H. Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J. Biol. Chem.* 24, p.12011-12019,1988.

HERBST,L.H. Methods of nutritional ecology of plant-visiting bats. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Kuns, Thomas H. p.233-246, 1988.

HERRERA,L.G.; MARTÍNEZ del RÍO,C. Pollen digestion by New World bats: effects of processing time and feeding habits. *Ecology.* 79(8), p.828-2838, 1998.

HERRERA,L.G.; ALTUBE,B.; DÍAZ,W.; GUTIERREZ,E.; HOBSON,K.A.; SÁNCHEZ-CORDERO,V. Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats. *Oecologia.* 133, p.280-287, 2002.

HODGES,J.R.; WHITMORE JR, D.H. Muscle esterase of the mosquito-fish *Gambusia affinis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B, p. 401-4077, 1977.

HOLMES,R.S.; MASTERS,C.J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochem. Biophys. Acta.* 132, p.379-399, 1967.

HOOD,W.R.; OFTEDAL,O.T.; KUNZ,T.H. Variation in body composition of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*) during lactation. *J. Comp. Physiol. B.* 176, p.807-819, 2006.

HOPKINSON,D.A. Isozymes. *J. Clin. Phathol.* 24 (suppl.) (8), p.122-127, 1974.

HOSOKAWA,M.; SUZUKI,K.; TAKAHASHI,D.; MORI,M.; SATOH,T.; CHIBA,K. Purification, molecular cloning, and functional expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: a member of the carboxylesterase multigene family. *Arch Biochem Biophys.* 389, p.245-253, 2001.

- HUNG, Y.S.; WOODS, L.; SULTATOS, L.G. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 28, p.1273-1280, 1994.
- IMAI, T.; TAKETANI, M.; SHII, M.; HOSOKAWA, M.; CHIBA, K. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab. Dispos.* 34, p.1734-1741, 2006.
- INOUE, M.; MORIKAWA, M.; TSUBOI, M.; SUGIURA, M. Species difference and characterization of intestinal esterase on the hydrolyzing activity of ester-type drugs. *Jpn. J. Pharmacol.* 29, p.9-16, 1979.
- JANG, I.; JUNG, K.; CHO, J. Influence of age on duodenal brush border membrane and specific activities of brush border membrane enzymes in wistar rats. *Exp. Anim.* 49(4), p.281-287, 2000.
- JUNGE, W. Carboxylesterases. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Weinheim: Chemie. 4, p.2-7, 1984.
- JUNGE, W.; KLEES, H. Arylesterases. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Weinheim: Chemie. 4, p.9-14, 1984.
- KAPIN, M.A.; AHMAD, S. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimun assay conditions, quantification and characterization. *Insect. Biochem.* 10, p.331-337, 1980.
- KAPLAN, M. Alkaline phosphatase. *Gastroenterology.* 62, p.452-468, 1972.
- KARASOV, W.H., DIAMOND, J.M. Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience.* 38, p.602-11, 1988.
- KARASOV, W.H.; HUME, I.D. Vertebrate gastrointestinal system. In: *Handbook of comparative physiology* (W. Dantzler, ed.). American Physiological Society, Bethesda. p.409-480, 1997.
- KARASOV, W.H.; BUDDINGTON, R.K.; DIAMOND, J.M. Adaptation of intestinal sugar and amino acid transport in vertebrate evolution. In: *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation* (R. Gilles and M. Gilles-Baillien, eds.). Springer-Verlag, Berlin. p.227-239, 1985.
- KAROTAN, J., BOYCE, T.M.; OAKESHOTT, J.G. Regulatory of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila simulans*. *Heredity.* 71, p.41-50, 1993.

KEMPSON,S.A.; KIM,J.K.; NORTHRUP,T.E.; KNOX,F.G.; DOUSA,T.P. Alkaline phosphatase in adaptation to low dietary phosphate intake. *Am. J. Physiol.* 237(5), p.E465-E473, 1979.

KERLIN,R.L.; HUGHES,S. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Med. Vet. Entom.* 6, p.121-126, 1992.

KIDAMBI,S.P.; MAHAN,J.R.; MATCHES,A.G.; BURKE,J.J.; NUNNA,R.R. Genetic variability for esterase enzyme in *Onobrychis* species. *Theor. Appl. Genet.* 9, p.433-436, 1990.

KOEHN,R.K.; ZERA,A.J.; HALL,J.G. Enzyme polymorphism and natural selection. In: Sarich V. (eds): Evolution of genes and proteins. Sunderland: Sinauer Assoc. p.115-136, 1983.

KOMODA,T.; KOYAMA,I.; NAGATA,A. Ontogenetic and phylogenic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. *Gastroenterology.* 91, p.277-286, 1986.

KORT,C.A.D.; GRANGER,N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu. Ver. Entomol.* 26, p.1-28, 1981.

KOVTUN,M.F.; ZHUKOVA,N.F. Feeding and digestion intensity in chiropterans of different trophic groups. *Folia Zool.* 34, p. 377-386, 1994.

KUNZ,T.H.; DIAZ,C.A. Folivory in fruit-eating bats, with new evidence from *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biotropica* 27, p.106-120, 1995.

KURTA,A.; BELL,G.P.; NAGY,K.A.; KUNZ,T.H. Energetics of pregnancy and lactation in free-ranging little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Physiol. Zool.* 62, p.804-818, 1989.

LEES, C.J.; RAMSAY, H. Histomorphometry and bone biomarkers in *Cynomolgus* females: a study in yong, mature, and old monkeys. *Bone.* 24(1), p.25-28, 1999.

LEHNINGER,A.L. (1917) In: Princípios de bioquímica. Lehninger A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.

LÓPEZ-CALLEJA,M.; BOZINOVIC,V.F.; MARTÍNEZ del RIO,C. Effects of sugar concentration on hummingbird feeding and energy use. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, p.1291-1299, 1997.

MADSEN,O.; SCALLY,M.; DOUARDY,C.J.; KAO,D.J.; DEBRY,R.W.; ADKINS, R.M.; AMRINE,H.M.; STANHOPE,M.J.; DE JONG,W.W.; SPRINGER,S. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature*. 409, p.610–614, 2001.

MAHMOOD,A.F.; YAMAGISHI,F.; ELIALIM,R.; De SCHRYVER-KECSKEMETI,K.; GRAMLICH,T.L.; ALPERS,D.H. A possible role for rat intestinal surfactant-like particles in transepithelial triacylglycerol transport. *J. Clin. Invest.* 93, p.70-80, 1994.

MAKANYA,A.N., MAYHEW,T.M., MAINA,J.N. Sterological methods for estimating the functional surfaces of chiroptera small intestine. *J. Anat.* 187, p.361-368, 1995.

MAKINEN, K.; PAUNIO, K.I. Evidence on certain common properties of alkaline phosphatase-like enzymes derived from human foetal mineralizing tissues. North-Holland Publishing Company-Amsterdam. 3(2), p.153-155, 1969.

MANWELL,C.; KERST,K.V. Possibilities of biochemical taxonomy of bats using hemoglobin, lactate dehydrogenase, esterases and other proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, p.741-754, 1966.

MARKERT,C.; HUNTER,R.L. The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 7, p.42-49, 1959.

MARTÍNEZ del RIO,C. Nutritional ecology in nectar- and fruit-eating volant vertebrates. In: Chivers, D., Langer, P. (Eds.), Food and Form and Function of the Mammalian Digestive Tract. Cambridge University Press, Cambridge, p.103–127, 1994.

MARTÍNEZ del RIO, C.; SCHONDUBE, J.E.; MCWHORTER, T.J.; HERRERA, M .L.G. Intake responses in nectar feeding birds: digestive and metabolic causes, osmoregulatory consequences, and coevolutionary effects. *Am. Zool.* 41, p.902–915, 2001.

MARSHALL,S.D.G.; PUTTERILL,J.J.; PLUMMER,K.M.; NEWCOMB,R.D. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Evol.* 57, p.487-500, 2003.

MASAKI,K.; HASHIMOTO,M.; IMAI,T. Intestinal first-pass metabolism via carboxylesterase in rat jejunum and ileum. *Drug Metab. Dispos.* 35(7), p.1089-1095, 2007.

MATSUSHITA,M.; IRINO,T.; OH-le,K.; KOMODA,T. Specific gel electrophoresis method detects two isoforms of human intestinal alkaline phosphatase. *Electrophoresis*. 21, p.281-284, 2000.

McCARTHY,D.M.; NICHOLSON,J.A.; KIM,Y.S. Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *Am. J. Physiol.* 239(06), p.445-451, 1980.

McNAB,B.K. Seasonal fat reserves in two tropical environments. *Ecology*. 57, p. 332-338, 1976.

MILLER,S.; NOVAK,R. A comparative study of esterases in two strains of anpheline mosquitoes by isoelectric focusing. *Int. J. Biochem.* 15(12), p.1409-1415, 1983.

MIURA,M.; MATSUZAKI,H.; SAKAGISHI,Y.; KOMODA,T. Partial characterization of human ileal alkaline phosphatase: diferences of human ileal and duodenal enzymes. *Clin. Chem. Acta.* 163, p.279-287, 1989.

MONJELÓ,L.A.S.; CORDEIRO,A.R. Tissue distribution and population variability of esterases in *Cavia aperea*. *Rev. Bras. Genet.* II (3), p.211-22, 1979.

MORALES,J.C.; BALLINGER,S.W.; BICKHAM,J.W. Genetic relationships among eight species of *Eptesicus* and *Pipstrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Mamm.* 72(2), p.286-291, 1991.

MORGAN,E.W.; YAN,B.; GREENWAY,D.; PARKINSON,A. Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes: species diferences, tissues distribution, and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315(2), p.513-526, 1994.

MORTON,E.S. On the evolutionary advantages and disadvantages of fruit eating in tropical birds. *Amer. Natur.* 107, p.8-22, 1973.

MOUNTER,L.A.; TUCK,K.D.; ALEXANDER,H.C.; DIEN,L.T.H. The reactivity of esterases and proteases in the presence of organophosphorus compounds. *J. Biol. Chem.* p.873-878, 1956.

MURPHY,W.J.; EIZIRIK,E.; JONHSON,W.E.; ZHANG,Y.P.; RYDER,O.A.; O' BRIEN,S.J. Molecular phylogenetics and the origin of placental mammals. *Nature*. 409, p. 614-618, 2001.

MUTERO,A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M.; FOURNIER, D. Resistance associated with point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Ci. USA.* 91, p.5922-5926, 1994.

NAOUM,P.C. Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos. 2^a ed. Santos – Livraria Editora, 154 pag., 1999.

NARISAWA,S.; HUANG,L.; IWASAKI,A.; HASEGAWA,H.; ALPERS,D.H.; MILLÁN, J.L. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* p.7525-7530, 2003.

NEGRÃO,M.R.; MARTINS,M.J.; RAMOS,E.; BARROS,H.; HIPÓLITO-REIS,C.; AZEVEDO,I. Fosfatase alcalina sérica humana e envelhecimento. *Acta Médica Portuguesa.* 16, p.395-400, 2003.

NEUWEILER,G. *The biology of bats.* Oxford University Press, 310p, 2000.

NICOLSON,S.W. Low nectar concentrations in a dry atmosphere: a study of *Grevillea robusta* (Protaceae) and *Callistemon viminalis* (Myrtaceae). *S. Afr. J. Sci.* 89, p.473–477, 1993.

NICOLSON,S.W. Pollination by passerine birds: why are nectars so dilute? *Comp. Biochem. Physiol. B.* 131, p.645–652, 2002.

NIKAIDO,M.; HARADA,M.; CAO,Y.; HASEGAWA,M.; OKADA,N. Monophyletic origin of the Order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *J. Mol. Evol.* 51, p.318–328, 2000.

NOVACEK,M.J. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature.* 256, p.121–125, 1992.

OAKESHOTT,J.G.; PAPPENRECHT,T.M.; BOYCE,M.J. Evolutionary genetics for *Drosophila* species. *Genetica.* 90, p.239-268. 1993.

OAKESHOTT,J.G.; CLAUDIANOS,C.; RUSSELL,R.J.; ROBIN,G.C. Carboxyl/Cholinesterases: A case of the evolution of a successful multigene family. *Biosays.* 21, p.1031-1042, 1999.

OGUNBIYI,O.A.; OKON,E.E. Studies on the digestive enzymes of the African fruit bat *Eidolon helvum* (Kerr). *Comp. Biochem. Physiol.* 55A, p.359-361, 1976.

OLLIS,D.L.; CHEAH,E.; CYGLER,M.; DIJKSTRA,B.; FROLOW,F.; FRANKENSM,S.M.; HAREL,M.; REMINGTON,S.J.; SILMAN,I.; SCHRAG,J.; SUSSMAN,J.L.; VERSCHUEREN,K.H.G.; GOLDMAN,A. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, p.197-211, 1992.

OZOLS,J. Isolation and characterization of a 60-Kilodalton glycoprotein esterase from liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 262(31), p.15316-15321, 1987.

PADHI,K.B.; KHUDA-BUKHSI,A.R. Xanthine dehydrogenase isozymes in twenty species of teleostean fishes: tissue distribution and possible taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 10(5), p.381-386, 1990.

PELZER,C.F. Genetic control of erythrocytic esterase forms in *Mus musculus*. *Genetics.* 52, p.819-828, 1965.

PENG,Y.S.; NASR,M.E.; MARSTON,J.M. Release of alfalfa, *Medicago sativa*, pollen cytoplasm in the gut of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, p.804-807, 1986.

PERACHI,A.L.; LIMA,I.P.; REIS,N.R.; NOGUEIRA,M.R.; ORTÊNCIO-FILHO,H. (2006) Ordem Chiroptera. In Mamíferos do Brasil, (Eds: Reis, N.R. et al.) Londrina, Brasil, pp.153-230.

PETRAS,M. Genetic control of a serum esterase component in *Mus musculus*. *Genetics.* 50, p.112-116, 1963.

PHILLIPS,C.J., STUDHOLME,K.M.; FORMAN,G.L. Results of the Alcoa Foundation Suriname expeditions. Comparative ultrastructure of gastric mucosae in four genera of bats (Mammalia: Chiroptera), with comments on gastric evolution. *Ann. Cam. Mus.* 53, p.71-117, 1984.

PICARIELLO,O.; BOTTE,V.; PAOLUCCI,M. Sex differences in liver non-specific esterases of the green frog *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B(2), p.269-74, 1982.

RACEY,P.A., 1982, Ecology of bat reproduction, pp. 57- 104. In: T. H. Kunz (ed.), *Ecology of bats*. Plenum Press, New York and London, 425p.

RAMÍREZ,N.P.; HERRERA,L.G.M.; MIRÓN,L.M. Physiological constraint to food ingestion in a new world nectarivorous bat. *Physiol. Biochem. Zool.* 78(6), p.1032-1038, 2005.

RANDERSON,S. Erythrocyte esterase forms controlled by multiple alleles in the deer mouse. *Genetics*. 52, p.999-1005, 1965.

RICHARDSON,K.C.; WOOLLER,R.D.; COLLINS,B.C. Adaptations to a diet of néctar and pollen in the marsupial *Tarsipes rostratus* (Marsupialia: Tarsipedidae). *J. Zool. Lond. A*. 208, p.285-297, 1986.

RICHMOND,R.C.; SENIOR,A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and male recovery. *J. Insect Physiol.* 27, p.849-853, 1991.

RIVAS-PAVA,P., SÁNCHEZ-PALOMINO,P.; CADENA,A. Estructura trófica de la comunidad de quirópteros en bosques de galería de la serranía de la Macarena (Meta – Colombia). p. 237-248. In: Contributions in mammalogy: a memorial volume honoring Dr. J. Knox Jones, Jr. *Mus.Texas Tech. Univ.*, 315p, 1996.

ROBBI,M.; BEAUFAY,H. Purification and characterization of various esterases from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 137, p.293-301, 1983.

SALAMASTRAKIS,S.S.; HARITOS,A.A. Physicochemical characterization and tissue distribution of multiple molecular forms of fish (*Trachurus trachurus*) esterases. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B(4), p.741-750, 1988.

SATOH,T.; HOSOKAWA,M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, p.257-288, 1998.

SATOH,T.; HOSOKAWA,M. Structure, function and regulation of carboxylesterases *Chemico Biological Interactions*. 162:195-211, 2006.

SATOH,T.; TAYLOR,P.; BOSRON,W.F.; SANGHAN,S.P.; HOSOKAWA,M.; LA DU, B.N. Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab. Dispos.* 30, p.488-493, 2002.

SCHALK,G.; BRIGHAM,R.M. Prey selection by insectivorous bats: are essential fatty acids important? *Can. J. Zool.* 73, p.1855-1859, 1995.

SCHAW,C.R. Electrophoretic variation in enzymes. *Science*. 149, p.936-42, 1965.

SCHLOSSER-STURM,E.; SCHLIEMANN,H. Morphology and function of the shoulder joint of bats (Mammalia, Chiroptera). *J. Zool. Syst.* 33, p.88-98, 1995.

SCHMIDT,G.; THANNHAUSER,S.J. Intestinal phosphatase. *J. Biol. Chem.* 149, p.369-385, 1943.

SCHONDUBE,J.E., HERRERA,M.L.G.; MARTÍNEZ del RIO,C. Diet and the evolution of digestion and renal function in Phyllostomid bats. *Zoology.* 104, p.59–73, 2001.

SELANDER,R.K.; KAUFMAN,D. Genic variability and strategies of adaptation in animals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70(6) p.1875-1877, 1973.

SIMMONS,N. (2005) Order Chiroptera In: Wilson D.E., Reeder, D.M. (Eds). *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn., v.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, pp.312-529.

SIMMONS,N.B.; GEISLEIR,J.H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchirptera. *Buul. Am. Mus. Nat. Hist.* 235, p.1-82, 1998.

SOGABE,N.; MIZOI, L.; ASAH,K.; EZAWA,I.; GOSEKI-SONE,M. Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone.* 35, p.249-255, 2004.

SOMERO,G.N. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Annu. Ver. Ecol. Syst.* 9, p.1-17, 1978.

SPRINGER,M.S.; STANHOP,M.J.; MADSEN,O.; DE JONG,W.W. Molecules consolidates the placental mammal tree. *Trends Ecol. Evol.* 19(8), p. 430–438, 2004.

SREERAMA,L.; VEERABHADRAPPA,P.S. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odentotermis worni*. *Insect Biochem.* 21(8), p.833-844, 1991.

STANLEY,R.G.; LINSKENS,H.F. Pollen: biology, biochemistry, management. Springer-Verlag, New York, 307p, 1974.

STUDIER,E.H.; WILSON,D.E. Natural urine concentrations and composition in Neotropical bats. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, p.509–515, 1983.

SUSSMAN,N.L.; ELIAKIM,R.; BUBIN,D.; PERLMUTTER,D.H.; DeSCHRYVER,K.; ALPERS,D.H. Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes. *Am. J. Physiol.* 257, p.G14-23, 1989.

TAKETANI,M.; SHII,M.; OHURA,K.; NINOMIYA,S.; IMAI,T. Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sciences*. 81, p.924-932, 2007.

TANDLER,B., PHILLIPS,C.J., NAGATO,T., TOYOSHIMA,K. Ultrastructural diversity in chiropteran salivary glands. Pp. 31-52 in: *Ultrastructure of Extraparietal Glands of the Digestive Tract*. Eds. A. Riva and P.M. Motta. Kluwer Academic Publ., New York, 1990.

THOMPSON,H.M.; MACKNESS,M.I.; WALKER,C.H.; HARDY,A.R. Species differences in avian serum B esterases revealed by chromatofocusing and possible relationships of esterase activity to pesticide toxicity. *Biochemical Pharmacology*. 41(8), p.1235-1240, 1991.

THORPE,I.C. A report on some observations of Rodrigues Fruit Bats in captivity: feeding hierarchies and the changing fitness of captive Rodrigues Fruit Bats. Unpublished report, Jersey Wildlife Preservation Trust, 1991.

TSUJITA,T.; OKUDA,H. Palmitoylcoenzyme A hydrolyzing activity in rat kidney and its relationship to carboxylesterase. *J. Lipid. Res*. 34, p.1773-1781, 1993.

TSUJITA,T.; MIYATA,T.; OKUDA,H. Purification of rat kidney carboxylesterase and its comparison with other tissue esterases. *J. Biochem*. 103, p.327-331, 1988.
van HOOFF,V.O.; de BROE,M.E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit. Rev. Clin. Lab*. 31, p.197-293, 1994.

VASSEUR,L.; GAGNON,D.; SIMON,J-P. Isoenzymatic variability among population and varieties of wild leek (*Allium tricoccum*). *Biochem. Syst. Ecol*. 10(5), p.321-324, 1990.

VEINI,M.; TSITSILONI,O.E.; MARTINI,S. M.; HARITOS,A.A. Multiple molecular forms of soluble esterases in the digestive system of the developin chicken. *Comp. Biochem. Physiol*. 83B (4), p.775-81, 1986.

VOGT,R.G.; RIDDIFORD,L.M.; PRESTWICH,G.D. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: The sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82, p.8827-8831, 1995.

von DEIMLIG,O.H.; WASSMER,B.; MÜLLER,M. Esterase-26 (ES-26): characterization and genetic location on chromosome 3 of an eserine-sensitive esterase of the house mouse (*Mus musculus*). *Biochem. Genet*. 22, p.1119-1126, 1984.

von HELVERSEN, O. Adaptations of flowers to pollination by glossophagine bats. Pp. 41–59 in W. Barthlott, ed. *Animal- Plant Interactions in Tropical Environments*. Museum Koenig, Bonn. 1993.

XIE, Q.; ALPERS, D.H. The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes. *Physiol. Genomics*. 3, p.1-8, 2000.

XIE, Q.-M.; ZHANG, Y.; MAHMOOD, S.; ALPERS, D. Rat intestinal alkaline phosphatase II messenger RNA is present in duodenal crypt and villus cells. *Gastroenterology*. 112, p.376–386, 1997.

WADA, H.; YAGAMI, I.; NIWA, N. Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. *Exp. Anim.* 50(2), p.153-158, 2001.

WALKER, C.H. The classification of esterases which hydrolyse organophosphates: recent developments. *Chem. Biol. Interactions*. 87, p.17-24, 1993.

WALKER, C.H.; BREALEY, C.J.; MACKNESS, M.I.; JOHNSTON, G. Toxicity of pesticides to birds; the enzymic factor. *Biochemical Society Transaction*. 19, p.741-745, 1991.

WALKER, C.H.; MACKNESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.* 32, p.3265-3269, 1983.

WESTLAKE, G.E.; MARIN, A.D.; STANLEY, P.I.; WALKER, C.H. Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain. *Comp. Biochem. Physiol.* 76C, p.15-24, 1983.

WETTERER, A.L.; ROCKMAN, M.V.; SIMMONS, N.B. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia, Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 248, p.1–200, 2000.

WHITE, S.C. Ecological aspects of growth and nutrition in tropical fruit-eating birds. Ph.D. thesis University of Pennsylvania, Philadelphia, 1974.

WHYARD, S.; DOWNE, A.E.R.; WALKER, V.K. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24(8), p.819-827, 1994.

WHYTE, P.M.; LANDT, M.; RYAN, L.M.; MULIVOR, R.A.; HENTHORN, P.S.; FEDDE, K.N.; MAHUREN, J.D.; CUBUM, S.P. Alkaline phosphatase: placental and

tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. *J. Clin. Invest.* 95, p.1440-1445, 1995.

WILKINSON,G.S. Food sharing in vampire bats. *Sci.Amer.* 262(2), p. 76, 1990

WILLIG,M.R.; CAMILO,G.R.; NOBLE,S.J. Dietary overlap in frugivorous and insectivorous bats from edaphic cerrado habitats of Brazil. *J. Mamm.* 74(1), p.117-128, 1993.

WINTER,Y.; von HELVERSEN,O. Bats as pollinators: foraging energetics and floral adaptations. Pp. 148–176 in L. Chittka and J.D. Thompson, eds. *Cognitive Ecology and Pollination: Animal Behavior and Floral Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. 2001.

YACOE,M.E., CUMMINGS,J.W., MYERS,P.; CREIGHTON,K. Muscle enzyme profile, diet, and flight in South American bats. *Am. J. Physiol.* 11, p. r189- r194, 1982.

YEDLIN,S.T.; YOUNG,G.P.; SEETHARAM,B.; SEETHARAM,S.; ALPERS,D.H. Characterization and comparison of soluble and membranous forms of intestinal alkaline phosphatase from the suckling rat. *J. Biol. Chem.* 256(11), p.5620-5626, 1981.

YEN,S.S.C.; JAFFE,R.B. (Editors). 1991. *Reproductive endocrinology, physiology, pathophysiology and clinical management*. 3rd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

YONG,J.M. Origins of serum alkaline phosphatase. *J. Clin. Path.* 20, p.647-653, 1967.

YOUNG,G.P.; FRIEDMAN,S.; YEDLIN,S.T.; ALPERS,D.H. Effect of fat feeding on intestinal alkalinephosphatase activity in tissue and serum. *Am. J. Physiol.* 241, p.G461-468, 1981.

ZERA,A.J.; HOLTMEIER,C.L. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. *J. Insect Physiol.* 38(1), p.61-74, 1992.

ZHANG,Y.; SHAO,J-S.; XIE,Q-M.; ALPERS,D.H. Immunolocalization of alkaline phosphatase and surfactantlike particle proteins in rat duodenum during fat absorption. *Gastroenterology.* 110, p.478–488, 1996.

ZÓRTEA, M. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian cerrado. *Braz. J. Biol.* 63(1), p.159-168, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)