

Insectivoría en *Marmosa elegans* (Marsupicarnívora): ¿una restricción fisiológica-evolutiva?

Insectivory in *Marmosa elegans* (Marsupicarnívora): an
evolutionary-physiological constraint?

PABLO SABAT¹, FRANCISCO BOZINOVIC^{1*} y FERNANDO ZAMBRANO²

¹ Departamento de Ciencias Ecológicas.

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile,
Casilla 653, Santiago, Chile

RESUMEN

La capacidad de regular los mecanismos digestivos en vertebrados, de acuerdo a los sustratos dietarios, estaría presente en especies omnívoras y herbívoras, pero no en carnívoras/insectívoras. De ser así, es esperable que *Marmosa* (un pequeño marsupial insectívoro) tenga una restricción fisiológica evolutiva tal, que sea incapaz de hidrolizar azúcares presentes en frutos. Estudiamos sus características digestivas enzimáticas, sometiendo a prueba la hipótesis de adaptación fisiológica evolutiva a la dieta. Los insectos poseen altas concentraciones de lípidos y proteínas, y bajas concentraciones de carbohidratos.

Si esta especie posee una restricción fisiológica evolutiva a una dieta de composición química particular, es posible esperar actividades enzimáticas ausentes o muy bajas de maltasa y sacarasa en el intestino delgado, y altas actividades enzimáticas de trehalasa (enzima que hidroliza trehalosa, azúcar de almacenamiento en insectos). No se detectaron diferencias significativas entre las actividades de las disacaridasas estudiadas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Este hecho permite rechazar las predicciones anteriores. Se discuten las implicancias de los mecanismos digestivos sobre los procesos conductuales de explotación de alimento.

Palabras claves: *Marmosa elegans*, dieta, restricción fisiológica, disacaridasas.

ABSTRACT

The digestive regulatory capability of vertebrates to dietary substrates has been postulated in omnivores and herbivores but not in carnivores/insectivores. If this is so we would expect an evolutionary physiological constraint in *Marmosa* (a small insectivorous marsupial), being unable to hidrolize sugars from fruits. We studied three digestive enzymes, to test the hypothesis of an evolutionary physiological adaptation to dietary sugars. Insects have higher concentrations of lipids and proteins and lower concentrations of carbohydrates. If such species has a physiological constraint to dietary chemical composition, we should expect the absence or low activities of maltase and sucrose and higher activities of trehalase (trehalose is a sugar of storage in insects). We detected non significant differences between the activities of such disaccharidases (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). This fact allowed us to reject the above predictions. The implications of the difestive mechanisms on the behavioral processes of food exploitation are discussed.

Key words: *Marmosa elegans*, diet, physiological constraints, dissaccharidases.

INTRODUCCION

Las consecuencias ecológicas y evolutivas de la función digestiva dentro del ámbito de la ecología fisiológica han cobrado gran interés, al documentar e integrar problemáticas comunes en ecología y fisiología comparada desde distintos niveles disciplinarios y de organización biológica (Bozinovic en prensa, 1992, Bozinovic *et al.* 1990. Bozinovic & Iturri 1991).

Martínez del Rfo & Stevens (1989), y Martínez del Rfo (1990), por ejemplo, han demos-

trado que la ausencia de sacarasa en el tracto digestivo de aves frugívoras determina que éstas rechacen alimentos ricos en sacarosa, independientemente de su abundancia en el ambiente. Es decir, la preferencia de las aves por diferentes azúcares y nutrientes se relaciona tanto con la capacidad de digerirlos y asimilarlos, como con la diversidad dietaria, la amplitud de nicho trófico y las relaciones coevolutivas entre frugívoros y frutos.

Las enzimas hidrolíticas de los disacáridos, localizadas en la membrana plasmática de las

* A quien enviar toda correspondencia.

(Recibido el 6 de agosto de 1992; aceptado el 2 de noviembre de 1992.)

células intestinales (enterocitos del intestino delgado), parecen poseer la capacidad de cambiar reversiblemente su cantidad y actividad específica frente a cambios en los niveles de sustrato del alimento (Deren *et al.* 1967); un fenómeno similar ha sido postulado para el transporte intestinal de nutrientes. Sin embargo, se ha demostrado que el transporte intestinal de prolina y glucosa en peces aparece como un fenómeno evolutivamente rígido (Buddington *et al.* 1987). Estos autores encontraron que la proporción prolina/glucosa transportada decrece desde: carnívoros > omnívoros > herbívoros, a pesar de que todas las especies estudiadas estaban sometidas al mismo régimen alimentario. Además, el transporte de glucosa fue mayor en herbívoros que en carnívoros, y correlacionado con las diferencias en los contenidos de carbohidratos en la dieta natural de las especies. Sin embargo, el transporte de aminoácidos (prolina) varió menos entre las especies. Esto sugiere que los mecanismos digestivos y los procesos de selección de alimento de las especies especialistas no son fenotípicamente plásticos, sino más bien adaptaciones fisiológicas seleccionadas en tiempo evolutivo a las dietas naturales.

Según Karasov & Diamond (1988), la síntesis y mantención de la estructura molecular para hidrolizar, absorber y metabolizar nutrientes ausentes de la dieta natural constituye un alto costo biosintético, y sería reprimida y posteriormente eliminada por selección natural. Así, específicamente para carnívoros/insectívoros, poseer una estructura molecular para metabolizar carbohidratos sería inútil en función de la composición química de sus dietas (bajos contenidos de carbohidratos) y estaría ausente o sería eliminada. Sin embargo, dado que nutrientes como los aminoácidos son esenciales para todos los organismos, independientemente de sus hábitos alimentarios, la estructura encargada de hidrolizar proteínas y absorber aminoácidos se mantendría.

Marmosa elegans como modelo experimental: ¿restricción fisiológica-evolutiva sobre la conducta de alimentación?

El pequeño marsupial *Marmosa elegans* (Marsupicarnivora: Didelphidae), constituye un modelo adecuado para someter a prueba la

hipótesis de adaptación fisiológica, en sentido evolutivo, a la dieta. *Marmosa elegans* es una de las especies del ensamble de pequeños mamíferos en el centro y norte de Chile. Los estudios de nichos ecológicos en diferentes hábitats han mostrado cambios espaciales y temporales en los hábitos alimentarios en el conjunto de micromamíferos. Estos cambios dietarios se correlacionan con la abundancia y disponibilidad de recursos tróficos en el ambiente. Es decir, los micromamíferos, y especialmente los roedores cricétidos de este ensamble, responden como especies oportunistas. La excepción es *M. elegans* que siempre se ha clasificado como una especie insectívora. De los análisis estomacales realizados, sobre el 90% de la dieta anual de esta especie corresponde a insectos, la diferencia corresponde, en su mayoría, a frutos y semillas (Glanz 1977, Meserve & Glanz 1978, Meserve 1981, Meserve *et al.* 1988, Muñoz-Pedrerros *et al.* 1990).

Según Karasov & Diamond (1988), dado que un cambio evolutivo desde carnivoría/insectivoría a herbivoría/frugivoría requiere un cambio genético —i.e. es necesario generar nuevo complejo molecular digestivo—, la capacidad de regular mecanismos digestivos de acuerdo a sustratos dietarios estaría presente en especies omnívoras y herbívoras, pero no en carnívoras/insectívoras.

En el presente trabajo estudiaremos las características digestivas a nivel celular —i.e. la actividad de enzimas disacaridasas—, sometiéndolo a prueba la hipótesis de adaptación fisiológica evolutiva a la dieta propuesta por Karasov & Diamond 1988. Nos centraremos en el último paso de la digestión de carbohidratos, la hidrólisis de disacáridos, específicamente sacarosa, maltosa y trehalosa por las enzimas de la mucosa intestinal de *Marmosa* sometida a régimen estricto de proteínas.

Los insectos poseen altas concentraciones de lípidos y proteínas, y bajas concentraciones de carbohidratos (Bell 1990). Consecuentemente, si esta especie posee una restricción fisiológica evolutiva (i.e. adaptación a una dieta de composición química particular) se predicen (*sensu* Karasov & Diamond 1988) actividades enzimáticas de maltasa y sacarasa ausentes o comparativamente muy bajas en el intestino delgado, y altas actividades enzimáticas de trehalasa, la que hidroliza trehalosa, azúcar de almacenamiento en insectos.

MATERIALES Y METODOS

Animales y captura

Los animales ($n = 6$) fueron capturados en Chile central a 80 km NE de Santiago utilizando trampas Sherman durante el otoño de 1992. Se trasladaron a Santiago, donde fueron mantenidos en jaulas individuales durante 90 días, con dieta exclusiva de insectos (larvas de *Tenebrio molitor*), huevos y agua *ad lib*.

Al término de la aclimatación, los animales fueron sacrificados. En el intestino delgado extraído y lavado con solución fisiológica fría se determinó su área y peso ($\pm 0,0001$ g). Los tejidos fueron mantenidos durante todo el tiempo a 4°C.

Obtención de la fracción celular

El intestino previamente trozado, fue homogenizado con cinco volúmenes de una solución NaCl al 1%, en tres pasadas por un homogenizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem con vástago de teflón y una tolerancia de 0,012 pulgadas. El homogenizado, filtrado mediante una malla de nylon de 110 mesh, fue centrifugado a 400 x g durante 10 min (véase Eichholz & Crane 1974). El sobrenadante, que presentó escasas actividades enzimáticas, fue descartado, y la porción de sedimento (pellet) resuspendido en solución salina al volumen original. La concentración de proteínas en ambas fracciones, usando como estándar albúmina de suero bovino, fue determinada según el método de Lowry modificado por Peterson (1977).

Preparaciones y ensayo de actividades enzimáticas

Las actividades de disacaridasas se determinaron por medición de la concentración de glucosa liberada según el método de Dahlqvist (1964) modificado por Martínez del Río & Stevens (1989).

La actividad enzimática se determinó en un volumen final de 200 μ l, en un medio que contenía maleato de Na^+ 10 mM, pH 6,5; 28 mM del sustrato (maltosa, sacarosa o trehalosa), y fracción celular. El protocolo consistió de una preincubación del sustrato por 5 min a 35°C, la reacción se inició con la adición

de la fracción celular que contenía entre 5-25 μ g de proteína. Se incubó por 10 min y la reacción se detuvo con 3 ml de glucosa Trinder disuelta en 500 ml de solución que contenía fosfato de Na^+ 250 mM, pH 7,0 y Tris-Hcl 500 mM, pH 7,0. Se continuó la incubación por 18 min, y se leyó la densidad óptica a 505 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21. Los blancos se realizaron de igual modo pero en ausencia de la fracción membranosa, y la curva estándar de glucosa fue similarmente tratada con reactivo de detención y revelado (glucosa Trinder).

Sobre la base de las mediciones de absorbancia, las actividades disacaridásicas se calcularon como UI/mg de proteínas del ribete en cepillo de los enterocitos (membranas de las células epiteliales del intestino delgado), siendo UI = micromoles de sustrato hidrolizado por minuto. Las actividades disacaridásicas se compararon utilizando ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis), y se expresaron como media aritmética \pm DE. El nivel de rechazo para la hipótesis de nulidad se definió en 5%.

RESULTADOS

La masa corporal promedio de los seis individuos fue de $31,5 \pm 10,5$ g, sin evidenciar cambios significativos durante el período de aclimatación. El peso húmedo promedio del intestino delgado al final del tratamiento fue de $1,08 \pm 0,47$ g, mientras que el área promedio fue de $11,25 \pm 2,44$ cm². El área nominal (excluyendo vellosidades y microvellosidades) intestinal de *Marmosa* es 54,7% inferior a la esperada según la relación alométrica: Área Intestinal Nominal (cm²) = $0,47 m_b^{1,15}$, donde m_b = masa corporal en gramos, documentada por Hernández & Martínez del Río (en prensa), para microquirópteros.

La Fig. 1 muestra las actividades enzimáticas comparadas de las disacaridasas de *Marmosa*. Los valores de actividad enzimática expresados como UI/mg proteína fueron de: $0,78 \pm 0,48$ para maltasa, $0,25 \pm 0,15$ para sacarasa, y $0,31 \pm 0,49$ para trehalasa.

No se detectaron diferencias significativas entre las actividades de las disacaridasas estudiadas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; véase Fig. 1).

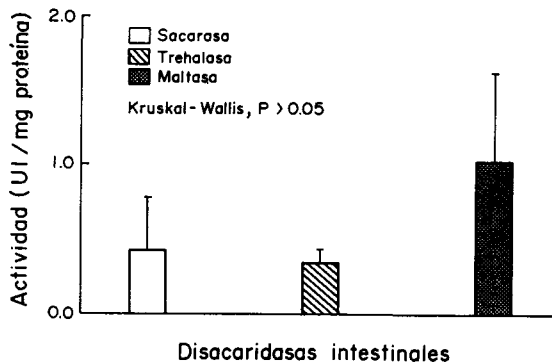


Fig. 1: Actividades enzimáticas (UI/mg proteína) de disacaridasas de *Marmosa elegans* medidas en fracción membranosa del ribete en cepillo del intestino delgado. UI = micromoles de sustrato hidrolizado por minuto. No se detectó diferencias significativas en la actividad de las enzimas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Cada barra representa la media aritmética \pm DE.

Enzymatic activities (UI/mg protein) of disaccharidases measured in the brush border membranous fraction from the small intestine of *Marmosa elegans*. UI = micromoles of hydrolyzed substrate per minute. Non significant differences were found in the activity of the enzymes (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Bars represent arithmetic mean \pm SD.

DISCUSION

El hecho que la actividad enzimática de trehalasa no sea significativamente mayor que la de maltasa y sacarasa, permite rechazar las predicciones elaboradas a partir de las hipótesis de Karasov & Diamond (1988), en el sentido que el mantener o poseer una estructura molecular para hidrolizar nutrientes ausentes en la dieta constituiría un costo biosintético inútil, debiéndose reprimir y eliminar por selección natural.

En efecto, las actividades de las disacaridasas de los individuos de *M. elegans* mantenidos con régimen proteico forzado, son comparables entre sí, y también con aquellas señaladas en la literatura, incluso en grupos filogenéticamente distintos. Por ejemplo, la actividad de maltasa, expresada como UI/mg de proteína, es muy similar a la encontrada en el homogenizado de mucosa intestinal de *Sturnus vulgaris*, ave europea que incluye frutas como importante componente estacional de su dieta (Martínez del Rfo & Stevens, 1989). La actividad de sacarasa detectada es también comparable a la de la mucosa intestinal del hamster (*Cricetus cricetus*), roedor cricético

que ingiere semillas y frutos (Galluser *et al.* 1988) y que además está sujeto a fuertes variaciones estacionales en la actividad de estas enzimas producto de sus estados de hibernación.

Se ha sugerido que si los disacáridos están presentes en la dieta se esperaría detectar algún nivel de actividad de las correspondientes enzimas específicas, lo que se encuentra, por ejemplo, en marsupiales (Kerry 1969). La mayoría de las especies de marsupiales estudiadas hasta el momento presentan actividad en todas las disacaridasas, con la excepción del canguro (*Macropus giganteus*) y del marsupial *Isoodon obesulus*, no presentan actividad de sacarasa; el koala (*Phascolarctos cinereus*) también no presenta actividad de trehalasa. Estas ausencias enzimáticas parecen ser el resultado de una alta especialización a la dieta. Sin embargo, especies de la familia Dasyuridae, caracterizadas como carnívoras, presentan actividad de las tres enzimas, al igual que *Marmosa elegans*.

Un ejemplo de alto correlato entre las actividades de disacaridasas y dieta ha sido documentado por Hernández & Martínez del Rfo (en prensa). Estos autores han demostrado que las actividades enzimáticas de maltasa y sacarasa en el murciélago insectívoro (*Pteronotus personatus*) es casi cinco veces menor que en los murciélagos frugívoros y nectarívoros (*Glossophaga soricina*, *Leptoncyteris sanborni*, *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis*). Sin embargo, la actividad de trehalasa (azúcar de almacenamiento en insectos) sólo es detectada en la especie insectívora.

Hay varios factores que podrían explicar la presencia de disacaridasas en especies insectívoras. La ausencia de disacaridasas en el tracto digestivo puede resultar letal para el organismo cuando ingiere azúcares (Rey & Fresal 1967). Esto sugiere que la presencia de disacaridasas en animales estrictamente carnívoros/insectívoros puede constituir más bien un mecanismo de defensa frente a la ingesta casual u ocasional de presas no animales ricas en disacáridos. Por otra parte, para el caso de *M. elegans*, es también posible que los métodos de análisis estomacales realizados impidan determinar restos de frutos, subestimándose este ítem en los estudios de nicho trófico documentados hasta el presente.

Nuestros resultados sugieren que *M. elegans* no posee una restricción fisiológica/evolutiva para hidrolizar disacáridos presentes en los frutos, y que esta actividad enzimática podría ser fenotípicamente modulable. Esta hipótesis debería someterse a prueba con estudios en que se determinen la relación entre los mecanismos de digestión, las preferencias tróficas y la abundancia y disponibilidad de alimento en el ambiente.

Sin embargo, la ausencia o baja actividad específica de una enzima digestiva es condición necesaria pero no suficiente para explicar las preferencias tróficas de los organismos. Así, la presencia de enzimas con actividades bajas también constituiría una restricción fisiológica sobre la conducta de alimentación. Por ejemplo, los tiempos de tránsito extremadamente rápidos en algunas aves frugívoras evitan la hidrólisis eficiente de azúcares y su transporte intestinal, incluso en presencia de las enzimas (Karasov & Levey 1990). En efecto, el tránsito rápido de alimento a través del tracto digestivo no proveería el tiempo necesario para procesar sustratos que deben ser primero hidrolizados por enzimas digestivas, y después transportados. Luego, desde la perspectiva de la fisiología ecológica de forrajeo y digestión, las preferencias tróficas podrían también ser consecuencias de tiempos de tránsito rápidos del alimento, lo cual sería producto de tractos digestivos cortos, con áreas pequeñas y/o concentraciones de material retractorio en la dieta que impidan la hidrólisis eficiente.

Nuestras observaciones indican que *Marmosa* es incapaz de sobrevivir sólo con fruta por un largo tiempo, lo cual sugiere la necesidad de otros nutrientes esenciales en su dieta, como los aminoácidos. Sin embargo, esta especie ingiere y no rechaza frutos en el laboratorio, lo que probablemente se relaciona con la explotación de frutos como recurso alimentario durante períodos temporales que significan un cuello de botella nutricional en la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los valiosos consejos y estímulo de C. Martínez del Río, así como su asesoríaórica y experimental. De igual modo, agra-

decemos a M. Rosenmann por la lectura y comentarios a un primer manuscrito y la ayuda experimental de V. Gaete y C. Veloso. Este trabajo fue parcialmente financiado por la Universidad de Chile, proyecto especial DTI a F. Bozinovic, y DTI B 2811-8911 a F. Zambrano. Este estudio fue realizado durante el programa de post-grado de P. Sabat.

LITERATURA CITADA

- BELL GP (1990) Birds and mammals on an insect diet: a primer on diet composition analysis in relations to ecological energetics. En: Morrison ML, CJ Ralph, J Verner & JR Jehl (eds.) Avian foraging: theory, methodology, and application: 416-422. Studies in Avian Biology 13, Cooper Ornithological Society, Kansas.
- BOZINOVIC F (1993) Nutritional ecophysiology of the Andean mouse *Abrothrix andinus*: energy requirements, food quality and turnover time. Comparative Biochemistry and Physiology A. Comparative Physiology. (En prensa).
- BOZINOVIC F (1992) Scaling of maximum and basal metabolic rate to body mass in rodents and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. Physiological Zoology 65: 921-932.
- BOZINOVIC F, FF NOVOA & C VELOSO (1990) Seasonal changes in energy expenditure and digestive tract of *Abrothrix andinus* in the Andes range. Physiological Zoology 63: 1216-1231.
- BOZINOVIC F & SJ ITURRI (1991) Seasonal changes in glucose and tyrosine uptake of *Abrothrix andinus* (Cricetidae) inhabiting the Andes range. Comparative Biochemistry and Physiology A. Comparative Physiology 99: 437-440.
- BUDDINGTON RK, JW CHEN & JM DIAMOND (1987) Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. Journal of Physiology 393: 261-281.
- DALQVIST A (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. Anals of Biochemistry 7: 18-25.
- DEREN JJ, SA BROITMAN & N ZAMCHEK (1967) Effect of diet upon intestinal disaccharidases and disaccharide absorption. Journal of Clinical Investigation 46: 186-195.
- EICHHOLZ A & RK CRANE (1974) Isolation of plasma membranes from intestinal Brush borders. En: Fleischer S & L Parker (eds.) Methods in Enzymology, Vol. XXXI. Biomenbranes A: 123-134. Academic Press, New York.
- GALLUSER M, F RAUL & B CANGUILHEM (1988) Adaptation of intestinal enzymes to seasonal and dietary changes in a hibernator: the European hamster (*Cricetus cricetus*). Journal of Comparative Physiology B 158: 143-149.
- GLANZ W (1977) Comparative ecology of small mammals communities in California and Chile. Ph.d. diss. University of California, Berkeley.
- HERNANDEZ A & C MARTINEZ DEL RIO (en prensa) Intestinal disaccharidases in five species of Phyllostomid bats with contrasting feeding habits. Comparative Biochemistry and Physiology A. Comparative Physiology.
- KARASOV WH & JM DIAMOND (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. BioScience 38: 602-611.

- KARASOV WH & DJ LEVEY (1990) Digestive trade-offs and adaptations of frugivorous birds. *Physiological Zoology* 63: 1248-1270.
- KERRY KR (1969) Intestinal disaccharidases activity in a monotreme and eight species of marsupials (with an added note on the disaccharidases of five species of sea birds). *Comparative Biochemistry and Physiology* 29: 1015-1022.
- MARTINEZ DEL RIO C (1990) Dietary and phylogenetic correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology* 63: 987-1011.
- MARTINEZ DEL RIO C & BR STEVENS (1989) Physiological constraint on feeding behavior: intestinal membrane disaccharidases of the starling. *Science* 243: 794-796.
- MESERVE PL (1981) Trophic relationship among small mammals in a Chilean semiarid thorn scrub community. *Journal of Mammalogy* 62: 304-314.
- MESERVE PL & W GLANZ (1978) Geographical ecology of small mammals in the northern Chilean arid zone. *Journal of Biogeography* 5: 135-148.
- MESERVE PL, BK LANG & B PATTERSON (1988) Trophic relationships of small mammals in a Chilean temperate rainforest. *Journal of Mammalogy* 69: 721-730.
- MUÑOZ-PEDREROS A, R MURUA & L GONZALEZ (1990) Nicho ecológico de micromamíferos en un agroecosistema forestal de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 63: 267-277.
- PETERSON GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Chemistry* 83: 346-356.
- REY J & J FREZAL (1967) Les anomalies des disaccharidases. *Archives Francaises de Pediatrie* 24: 65-101.