

BÁRBARA SILVA LINHARES

**DIFERENÇAS NA MORFOLOGIA E FISIOLOGIA RENAL DE MORCEGOS
FRUGÍVOROS E HEMATÓFAGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

Coorientadoras: Reggiani Vilela Gonçalves
Sirlene Souza Rodrigues

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L755d
2019 Linhares, Bárbara Silva, 1995-
Diferenças na morfologia e fisiologia renal de morcegos
frugívoros e hematófagos / Bárbara Silva Linhares. – Viçosa,
MG, 2019.
37 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 32-37.

1. Morcegos. 2. *Desmodus rotundus*. 3. *Artibeus lituratus*.
4. Rins. 5. Morfologia. 6. Anatomia. 7. Vasopressina.
8. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal. II. Título.

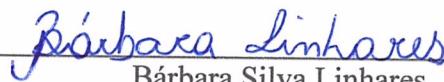
CDD 22. ed. 599.4

BÁRBARA SILVA LINHARES

**DIFERENÇAS NA MORFOLOGIA E FISIOLOGIA RENAL DE MORCEGOS
FRUGÍVOROS E HEMATÓFAGOS**

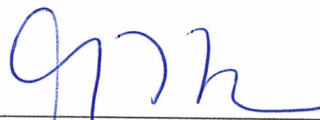
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2019.



Bárbara Silva Linhares

Autora



Mariella Bontempo Duca de Freitas

Orientadora

*Dedico esse trabalho primeiramente a **Deus** por toda instrução, sabedoria e saúde que me conduziram até aqui. Aos meus pais, irmãos, amigos e familiares por formarem a base que me sustenta em todos os passos da minha caminhada, e a toda a **comunidade científica** que luta e acredita em um amanhã melhor.*

AGRADECIMENTOS

Nos últimos dois anos a gratidão passou a ser uma palavra ainda mais vívida em meus dias. Agradeço à **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** e ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal** pela oportunidade de aprendizado e por me formarem como bióloga e profissional. Os aprendizados aqui adquiridos certamente extrapolam a vida acadêmica;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos e empenho em manter as atividades de pesquisa em nosso país;

À minha orientadora **Prof^ª. Dr^ª. Mariella Bontempo Duca de Freitas** pela disponibilidade e paixão em ensinar, por não medir esforços para que o trabalho proposto fosse realizado, e por se mostrar uma grande amiga nos momentos em que mais precisei, tornando essa caminhada um pouco menos difícil;

Às coorientadoras **Prof^ª. Dr^ª. Sirlene Souza Rodrigues Sartori** e **Prof^ª. Dr^ª. Reggiani Vilela Gonçalves** por compartilharem seus conhecimentos e pelas oportunidades oferecidas durante este tempo de convivência;

À **Dr^ª. Susana Puga Ribeiro** por ser uma mãe para mim, no sentido pleno da palavra. Admiro-a como profissional e pessoa desde o primeiro contato;

À **Dr^ª. Mariáurea Matias Sarandy** por toda paciência e tempo cedidos em prol das publicações científicas e à **Dr^ª. Jerusa Maria de Oliveira Amorim** por compartilhar seu vasto conhecimento e pelas boas histórias em suas visitas a Viçosa;

Ao **Dr. Luciano Carlos Heringer Porcaro Puga** pelos conhecimentos compartilhados nas idas a campo, sempre tornando o trabalho divertido e proveitoso;

Aos **amigos do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros** por auxiliar em toda a parte experimental do trabalho, especialmente à **Renata Maria Pereira de Freitas** por extrapolar esse laço de amizade para nosso dia a dia;

Aos amigos que estiveram comigo desde a graduação, especialmente **Maria Luiza Assis Rodrigues, Filipe Iglesias de Almeida, Bianca de Souza Araujo Adão, Karina Ventura Boechat Martins, Thércia Rocha Balbino, Anaíza Almeida Caldeira e Francielle de Fátima Viana Santana** por representarem a minha família longe de casa;

Aos queridos amigos **Diogo Carneiro Spinola, Cassiano Vieira Barbosa, Pollyana Brandão Leite Magalhães, Alan Santos Magalhães, Bárbara Bezerra de Menezes Picanço, Ana Carolina Azevedo Tavares, Pedro Brandão Martino, Juliana Machado e Marina Ribeiro** por serem companheiros de todas as horas;

Aos amigos de longa data em especial **Anna Karolina Vilela Freitas, Carolina Cássia Fraga Faraco, Caio Victor da Paz Figueiredo, Pedro Henrique Caldeira Brant e Ramon G. Portes** por me mostrarem como a força da amizade é essencial para nos guiar em todos os momentos;

Aos funcionários e demais professores do **Departamento de Biologia Animal (DBA)**, do **Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV)** e do **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural** da UFV pelas parcerias fundamentais à execução deste projeto;

Agradeço imensamente aos meus pais, **Álvaro José Linhares e Sildete Aparecida Silva Linhares**, aos meus irmãos **Arthur da Silva Linhares e Débora Silva Linhares**, às minhas avós **Maria do Santos Ávila da Silva e Maria Carvalho Linhares de Souza**, à minha doce **Lia** e aos demais familiares, em especial à **Marlene de Souza Bretas**, por serem companhia, inspiração e porto seguro. Essa conquista é de todos nós.

Muito Obrigada!

RESUMO

LINHARES, Bárbara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Diferenças na morfologia e fisiologia renal de morcegos frugívoros e hematófagos.** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadoras: Reggiani Vilela Gonçalves e Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

Os morcegos (Ordem Chiroptera) desenvolveram diferentes estratégias para a alimentação, que variam de acordo com o hábito alimentar. Além de adaptações morfológicas há alterações que parecem ocorrer primariamente em função da dieta. A dieta de sangue de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) na fase adulta parece impor um desafio aos rins, em função da excreção aumentada da proteína ingerida. *D. rotundus* ingere preferencialmente sangue de bovinos, que possui um conteúdo de 90% de proteína, portanto sua dieta é considerada uma dieta hiperproteica (HP), contrastando com a dieta ingerida por *Artibeus lituratus*, uma espécie predominantemente frugívora. Os morcegos vampiros parecem sobreviver graças a adaptações metabólicas, que devem incluir o tecido renal, já que a excreção aumentada de proteínas deve ser facilitada nesta espécie. O objetivo desse estudo foi analisar as adaptações morfológicas renais, testar a capacidade antioxidante dos rins e avaliar a concentração do hormônio antidiurético (ADH) no plasma de indivíduos adultos de *A. lituratus* e *D. rotundus*. Foram utilizados 8 adultos machos de cada espécie, coletados em regiões onde as espécies são comumente encontradas. Os animais foram encaminhados ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa para eutanásia e retirada de tecidos. O plasma sanguíneo foi utilizado para dosar o ADH, e os rins foram parte processados e destinados a morfometria e estereologia, avaliando a área glomerular (AG), o índice renal somático (IRS) e o índice medula-córtex (IMC), e as densidades volumétricas de glomérulos (VvG) e túbulos (VvT). A outra parte dos órgãos foi mantida a -80°C e destinada para análises de capacidade antioxidante, avaliando a presença de espécies reativas como o óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), e a presença de marcadores do estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA) e a proteína carbonilada (PC), além da dosagem de proteína total (PT). Os dados histológicos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e para as análises de capacidade antioxidante e da dosagem hormonal utilizamos o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados foram submetidos ao teste t para comparação de médias utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e o nível de

significância foi estabelecido em 5%. A AG, a VvG, o IRS e os valores obtidos para a atividade da GST, produção de MDA e NO, e FRAP foram maiores para a espécie hematófaga em comparação à espécie frugívora. Apenas as atividades de CAT e SOD foram maiores para *A. lituratus*. O IMC, a VvT, os valores de PC e H₂O₂, e a dosagem da concentração plasmática de ADH não foram diferentes entre as espécies. As adaptações desenvolvidas pela espécie hematófaga se destacaram em relação às adaptações desenvolvidas pela espécie frugívora. Interessante citar que nenhum outro mamífero de tamanho semelhante aos morcegos hematófagos é capaz de lidar com a alta carga proteica ingerida por esses animais sem consequentes injúrias renais.

Palavras-chave: *Desmodus rotundus*. *Artibeus lituratus*. Morfologia renal. Morfofisiologia.

ADH. Perfil oxidativo.

ABSTRACT

LINHARES, Bárbara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Differences in renal morphology and physiology of frugivorous and hematophagous bats.** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-advisers: Reggiani Vilela Gonçalves and Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

Bats (Order Chiroptera) have developed different strategies for feeding, which vary according to dietary habits. In addition to morphological adaptations, there are changes that seem to occur primarily as a function of diet. The blood diet of hematophagous bats (*Desmodus rotundus*) seems to impose a challenge to the kidneys, due to the increased excretion of the protein ingested. *D. rotundus* fed mainly on bovine blood, which is 90% protein content, therefore its diet is considered a hyperproteic diet (HP), in contrast to the diet ingested by *Aribeus lituratus*, a predominantly frugivorous species. Vampire bats can keep energy to fly for large periods of time, and seem to survive through these metabolic adaptations, which must include renal tissue, since increased protein excretion must also be facilitated in this specie to ensure it without damaging renal tissue. The aim of this study was to analyze the renal morphological adaptations, to test the antioxidant capacity of kidneys and to evaluate the plasma concentration of antidiuretic hormone (ADH) in adult individuals of *A. lituratus* and *D. rotundus*. We used sixteen animals, being 8 male adults of each specie, captured in regions where species are commonly found. The animals were taken to Chiroptera Ecophysiology Laboratory at Animal Biology Department of the Federal University of Viçosa for euthanasia and organ and tissue removal. Blood plasma was used to dose ADH, and the kidneys were part processed and used for morphometry and stereology, assessing the glomerular area (AG), renal somatic index (IRS) and medulla-cortex index (IMC), and the volumetric densities of glomeruli (VvG) and tubules (VvT). The other part of the organs was maintained at -80°C and was used for antioxidant capacity analysis, evaluating the presence of reactive species such as nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂) and plasma iron reduction ability (FRAP), activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), and the presence of oxidative stress markers such as malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein (PC), in addition to the total protein (PT) dosage. Histological data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test, and for analyzes of antioxidant capacity and hormonal dosage we used the Shapiro-Wilk normality test. All data were submitted to the t-test for comparison of means using the GraphPad Prism 6.0 software. Results were expressed as mean ± standard deviation (SD) and significance level was set at 5%. AG, VvG, IRS and values obtained for GST activity, MDA and NO production, and FRAP were higher for the blood-eating specie compared to frugivorous specie. Only CAT and SOD activities were higher for *A. lituratus*. IMC, VvT, PC,

H₂O₂ values, and plasma ADH concentration were not different among species. We conclude that both species present different morphophysiological characteristics to deal with challenges imposed by diets. The adaptations developed by hematophagous specie were highlighted in relation to the adaptations developed by frugivorous specie. Is interesting to note that no other mammal similar in size to hematophagous bats is able to cope with the high protein load ingested by these animals without consequent renal injury.

Keywords: *Desmodus rotundus*. *Artibeus lituratus*. Renal morphology. Morphophysiology. ADH.

Oxidative profile.

SUMÁRIO

Artigo: Diferenças na morfologia e fisiologia renal de morcegos frugívoros e hematófagos.	11
Introdução	12
Material e Métodos	14
Animais.....	14
Procedimento.....	15
Análises Histológicas.....	15
Análises de Capacidade Antioxidante.....	17
Concentrações plasmáticas do hormônio antidiurético (ADH).....	19
Análises Estatísticas.....	20
Resultados	20
Análises Histológicas.....	20
Análises de Capacidade Antioxidante.....	24
Concentrações plasmáticas do hormônio antidiurético (ADH).....	25
Discussão	26
Conclusão	30
Referências	31

Diferenças na morfologia e fisiologia renal de morcegos frugívoros e hematófagos

Bárbara Silva Linhares¹, Susana Puga Ribeiro², Renata Maria Pereira de Freitas¹, Luciano Carlos Heringer Porcaro Puga³, Sirlene Souza Rodrigues Sartori¹, Mariella Bontempo Freitas¹

¹ *Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Viçosa, Brasil, 36571-000*

² *Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Viçosa, Brasil, 36571-000*

³ *Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA, Juiz de Fora, MG, Brasil, 36016-290*

*Autor correspondente (M. Freitas)

E-mail: mfreitas@ufv.br

Phone #: +55 (31) 3612-5271

Palavras-chave: *Desmodus rotundus*, *Artibeus lituratus*, morfologia renal, morfofisiologia, ADH, perfil oxidativo.

1. Introdução

Dietas são conhecidas por induzir diferentes adaptações em diversas ordens de mamíferos. Os morcegos (Ordem Chiroptera) desenvolveram algumas estratégias para a alimentação, que variam de acordo com o hábito alimentar (Casotti et al., 2006). Os hematófagos, por exemplo, apresentam fatores anticoagulantes na saliva para manter o sangue fluido no seu trato digestivo (Ciprandi et al., 2003), e os frugívoros apresentam adaptações morfológicas a esta dieta no tubo gastrointestinal, como fendas paracelulares para aumentar a absorção de carboidratos (Caviedes-Vidal et al., 2008). Além de adaptações morfológicas, existem adaptações fisiológicas que parecem ocorrer primariamente em função da dieta.

Desmodus rotundus (Phyllostomidae: Desmodontinae), popularmente conhecido como morcego vampiro comum, alimenta-se preferencialmente de sangue de bovinos, e desperta grande interesse econômico por estar diretamente relacionado à transmissão do vírus da raiva (Bernard, 2005). O sangue dos bovinos possui um conteúdo de aproximadamente 94% de proteína (Breidenstein, 1982), portanto a dieta dos morcegos vampiros é considerada uma dieta hiperproteica (HP). Sabe-se que animais que consomem dietas hiperproteicas são mais resistentes ao jejum devido, principalmente, à maior atividade neoglicogênica hepática, já ativa no período pós prandial, importante para a conversão das proteínas ingeridas em glicose. Essa via metabólica continua ativa também durante o período de jejum, uma característica dos morcegos dessa espécie que os torna mais sensíveis a longos períodos na ausência de alimento (Freitas et al., 2013).

Em outros mamíferos já estudados, dietas HP podem causar efeitos adversos em processos envolvidos com a excreção de subprodutos nitrogenados do metabolismo das proteínas, como hiperfiltração glomerular, e são responsáveis por adaptações morfológicas nos rins essenciais à exploração desta dieta (Patil, 2013). Em alguns casos os animais precisam lidar ainda com alterações no balanço hormonal, já que o balanço osmótico, também afetado por dietas HP, é regulado por hormônios. Estudos com mamíferos mostram evidências de que o hormônio antidiurético (ADH) e o glucagon são importantes reguladores da cascata de eventos que leva à hiperfiltração glomerular após uma refeição rica em proteínas, sugerindo que o aumento na secreção de glucagon está associado ao uso de aminoácidos para a gliconeogênese (Bankir et al., 2015), e o ADH atua no sentido de aumentar a habilidade dos animais em concentrar urina, e conseqüentemente reabsorver água para o organismo (Bouby et al., 1988; Epstein et al., 1957).

Além de induzir adaptações morfológicas nos rins e apresentar peculiaridades em relação à secreção de hormônios, dietas HP têm potencial para alterar o equilíbrio entre as

espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes (Halliwell & Whiteman, 2004). A dieta de sangue é rica em ferro e, quando concentrado em grande quantidade, esse íon pode se acumular nos órgãos levando à destruição e perda de sua função normal (Fibach, 2017), podendo ainda causar danos às membranas celulares, DNA e proteínas (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010). O excesso de proteínas e ferro ingeridos pode sobrecarregar a função renal, caso alternativas morfofisiológicas para lidar com essa sobrecarga não sejam desenvolvidas.

Em contraste com a dieta HP ingerida pelo morcego vampiro comum, a espécie *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Phyllostominae) apresenta hábitos alimentares variados, podendo consumir frutas, néctar, folhas e pequenos insetos (Zortéa & Mendes, 1993; Silva & Peracchi, 1999; Passos & Passamani, 2003). Embora *A. lituratus* possua um hábito alimentar quase generalista, essa espécie é considerada uma espécie frugívora, por consumir frutos e infrutescências de uma grande variedade de espécies vegetais (Gardner, 1977; Fábian et al., 2008). Em termos metabólicos, esses morcegos possuem uma dieta rica em carboidratos (HC).

Em geral, uma dieta de frutas provê para o organismo vitaminas, carotenoides e flavonoides, compostos que possuem uma grande capacidade antioxidante (Tapiero et al., 2004; Kuskoski et al., 2006), e auxiliam na defesa do organismo. Essas defesas ocorrem, por exemplo, por meio da ação de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e mecanismos não enzimáticos como a glutathione (Singh et al., 2008), com a finalidade de reduzir possíveis danos celulares causados pelo aumento na produção de EROs nas células. Enzimas que atuam nos tratos digestivos aumentam ou diminuem suas atividades de acordo com os substratos fornecidos pelas dietas. A atividade da maltase intestinal e da sacarase, por exemplo, é praticamente ausente em morcegos vampiros (Schondube et al., 2001).

A análise das adaptações morfológicas a diferentes dietas tendo morcegos como mamíferos naturalmente habituados a elas é interessante para aumentar o conhecimento acerca da biologia das espécies, e para investigarmos possíveis modelos para estudos metabólicos relacionados a diferentes doenças. O objetivo desse estudo foi analisar as adaptações morfológicas renais, a concentração plasmática de ADH, e as capacidades antioxidantes dos tecidos renais de *D. rotundus* e *A. lituratus*. As diferentes dietas foram então comparadas para investigar a extensão e a importância de adaptações morfofisiológicas na manutenção das condições fisiológicas ideais para a homeostasia energética destas espécies, com ênfase na investigação dos mecanismos desenvolvidos pela espécie hematófaga para lidar com a grande carga de proteínas ingerida sem que haja danos aos tecidos e células renais, especificamente.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 16 morcegos, sendo 8 machos adultos da espécie *Desmodus rotundus* e 8 machos adultos da espécie *Artibeus lituratus*, capturados em fragmentos de Mata Atlântica pertencentes à microrregião de Juiz de Fora (21° 45' 51" Sul, 43° 20' 59" Oeste) e Viçosa (20° 45' 17" Sul, 42° 52' 57" Oeste), na Zonta da Mata de Minas Gerais (Fig. 1). Os indivíduos da espécie hematófaga foram capturados em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) de Juiz de Fora. As capturas e coletas foram realizadas de Outubro do ano de 2017 a Março do ano de 2018, com o auxílio de redes de neblina armadas na entrada de cavernas e matas onde as espécies são comumente encontradas. Os animais foram identificados de acordo com Díaz et al., (2016). Após serem capturados, os morcegos foram alocados em gaiolas e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

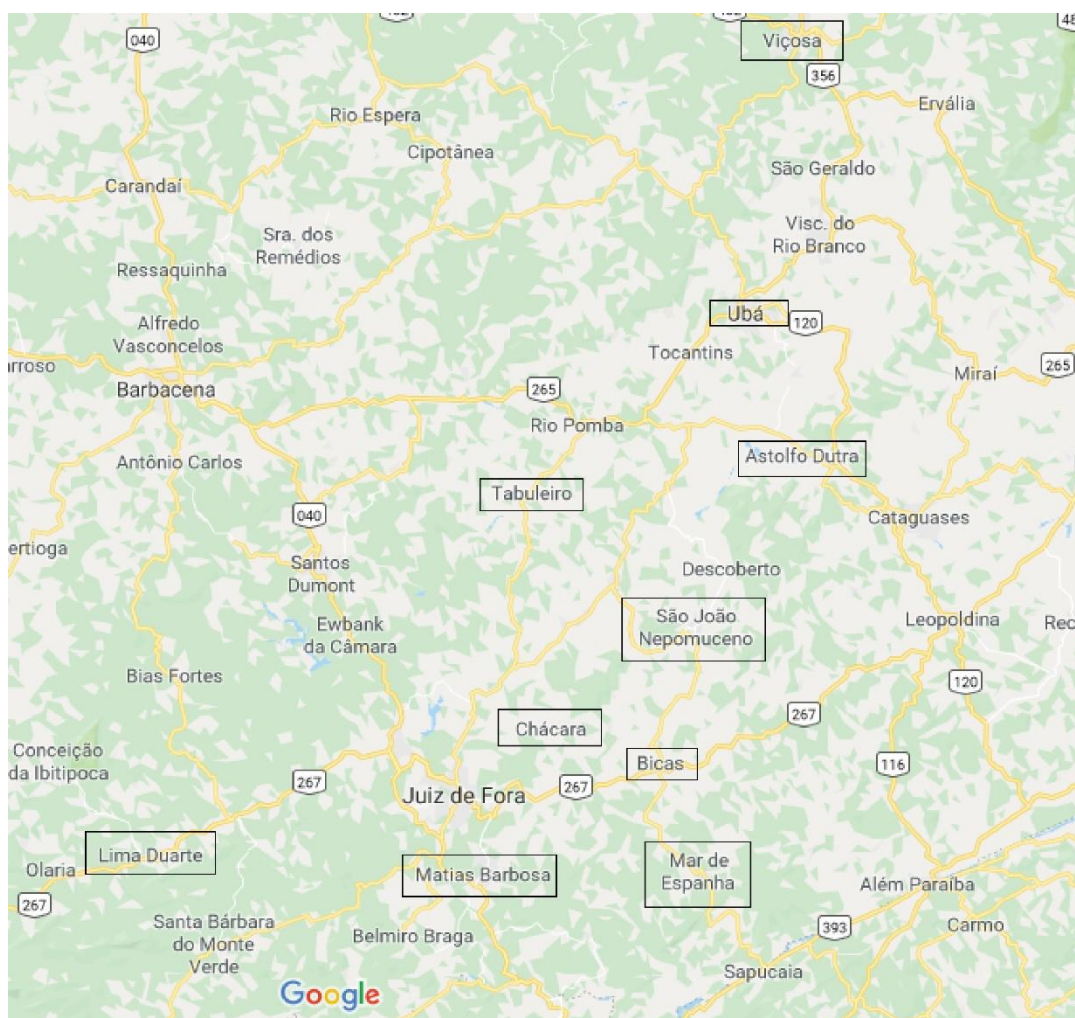


Fig. 1: Mapa mostrando parte da Zona da Mata Mineira. Em destaque estão as cidades visitadas para captura dos animais utilizados no estudo.

2.2 Procedimentos

Os animais foram eutanasiados por decapitação, e em seguida pesados em balança de precisão. A escolha do método de eutanásia está baseada no fato de que anestésicos podem induzir alterações nas análises hormonais a serem realizadas. Os rins esquerdos foram retirados dos animais e fixados em paraformaldeído tamponado 4%, conservados em álcool 70% e destinados ao processamento de rotina para análises histológicas. Os rins direitos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e posteriormente conservados a -80°C, para serem destinados às análises de capacidade antioxidante. O sangue dos animais foi coletado em um tubo de ensaio contendo anticoagulante (HEPAMAX-S, heparina sódica), centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C, e o plasma foi conservado a -80°C até ser realizada a dosagem do ADH. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 2018/4) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBio (Licença nº61246),

2.3 Análises Histológicas

Os rins destinados à histologia foram desidratados em série etanólica crescente, seccionados e divididos em dois grupos: metade do órgão foi incluída em parafina e outra metade em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Foram obtidas secções de 5µm de espessura, em intervalos de 50µm entre eles, para a montagem das lâminas dos órgãos incluídos em parafina. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Para as lâminas dos órgãos incluídos em resina, foram obtidas secções de 3µm de espessura, em intervalos de 30µm entre eles, e foram corados pelo método de PAS (Ácido Periódico-Shiff). Os cortes corados foram analisados através de exame de imagens em microscópio de luz (Olympus BX-60®, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio (Olympus BX-40; 4x e 10x) e associadas ao software de análise de imagens Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics).

2.3.1 Morfometria

A partir das imagens digitalizadas dos cortes corados por HE, utilizamos 10 fotos por animal, tiradas com a lente objetiva 10x, para obter as áreas dos glomérulos, e 18 fotos por animal, tiradas com a lente objetiva de 4x, para obter as espessuras do córtex e da medula dos

rins. Usando essas medidas, calculamos a proporção área glomerular (AG) e o índice medula-córtex (IMC). Sendo:

$$AG = \frac{\sum \text{área glomérulos}}{\text{Área teste}} \times 100$$

$$IMC = \frac{\text{Espessura da medula}}{\text{Espessura do córtex}} \times 100$$

Considerando o peso corporal de cada animal e o peso individual dos rins utilizados, foi calculado o Índice Renal Somático (IRS):

$$IRS = \frac{\text{Peso do rim}}{\text{Peso do corpo}} \times 100$$

2.3.2 Estereologia

Nos cortes corados por PAS, foram usadas 10 fotos (aumento de 10x) por animal para contar os pontos sobre túbulos e glomérulos, projetando uma grade com 260 intersecções associada ao software Image Proplus 4.5 (Media Cybernetcs®, Silver Spring, USA). As densidades volumétricas dos glomérulos (V_{vG}) e dos túbulos renais (V_{vT}) foram mensuradas através das seguintes fórmulas, respectivamente:

$$V_{vG} = \frac{(\sum n^{\circ} \text{ de pontos sobre glomérulos})}{(n^{\circ} \text{ de pontos totais da área teste})} \times 100 \times \text{volume do rim}$$

$$V_{vT} = \frac{(\sum n^{\circ} \text{ de pontos sobre túbulos})}{(n^{\circ} \text{ de pontos totais da área teste})} \times 100 \times \text{volume do rim}$$

2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Scanner

As amostras atribuídas à MEV foram secas em ponto crítico (Balzers CPD 030), metalizadas sendo revestidas em ouro usando o equipamento Quorum (Q150R S), e visualizadas sob um Microscópio Eletrônico de Varredura com câmera acoplada modelo Leo 1430V para fotos de *D. rotundus* e JEOL JSM-6010LA para *A. lituratus*. Duas das lâminas coradas por HE e também por PAS, uma para cada espécie, foram escaneadas em microscópio

digital (Scanner de Lâminas 3D Histech) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). As imagens obtidas foram usadas a fim de evidenciar as estruturas presentes nos rins de ambas as espécies.

2.4 Análises de capacidade antioxidante

2.4.1 Preparação de amostras para avaliar atividade das enzimas

Após retirar 100mg de tecido dos rins congelados, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,4; 0,2M) contendo EDTA 1M, e centrifugadas a 12000 rpm a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em eppendorfs devidamente identificados, sendo utilizado para a determinação de espécies reativas como óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e análise do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), de produtos do estresse oxidativo tecidual como malondialdeído (MDA) e utilizamos o pellet na dosagem de proteínas carboniladas (PC). Foram avaliadas ainda as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase. Os reagentes químicos utilizados nas análises pertencem às marcas Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) ou Merck (Darmstadt, Alemanha).

1. Produção de óxido nítrico

A produção de NO foi quantificada pela reação padrão de Griess (1879), detalhadamente descrita em uma revisão atual (Wang et al., 2017). Em resumo, 50 µl de sobrenadante foram incubados com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de H₃PO₄) à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi deduzida de uma curva padrão usando concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram expressos como µmole/L.

2. Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de H₂O₂ foi medida usando o sobrenadante dos homogenatos dos tecidos. Seguindo o protocolo padronizado por Oliveira et al. (2018), 50 µL de sobrenadantes foram incubados com 50 µL de dicloridrato de α -fenilenodiamina (OPD) e um volume igual de peroxidase tipo II 15 mmol / L. A microplaca foi incubada por 24 h a 37 ° C. Após a incubação, a reação foi interrompida usando 50 mL de ácido sulfúrico (10%). A absorbância

foi medida a 490 nm em um espectrofotômetro de varredura de microplacas (Multiskan GO). A conversão de absorbância em concentrações micromolares de H₂O₂ foi calculada a partir de uma curva padrão usando concentrações conhecidas de H₂O₂. A produção do H₂O₂ foi determinada em duplicatas usando um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em µmole/L.

3. Mensuração do poder antioxidante de redução do ferro

A análise de FRAP mede o poder antioxidante de redução do ferro no plasma ou em tecidos (Benzie & Strain, 1996). A solução FRAP foi preparada contendo 24mL de tampão acetato, 2,5mL de 3,4,6-Tris-S-streazine (TPTZ) e 2,5mL de cloreto férrico hexahidratado (BDH). Inicialmente foram pipetados 10µL de amostras em placa de ELISA, e adicionados 220µL de solução FRAP em todos os poços. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a absorbância foi medida a 593 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os valores foram obtidos comparando a alteração da absorbância nas amostras testadas com as que contêm íons ferro em concentração conhecida. Os resultados foram expressos em µmole/L.

4. Determinação do malondialdeído

A peroxidação lipídica (LPO) foi medida de acordo com Buege & Aust (1978), envolvendo a medição do malondialdeído total, que é um produto da peroxidação lipídica. Resumidamente, 0,2 mL do sobrenadante de tecidos foram homogeneizados em 0,4 mL da solução TBARS (ácido tricloroacético (15%)/ácido tiobarbitúrico (0,375%)/ácido clorídrico (0,6%)). A mistura reacional total foi mantida em banho maria durante 40 min. Depois de esfriar sobre o gelo, foi adicionado álcool butílico (0,6 mL), depois a solução foi agitada em vórtex durante 1 min e centrifugada durante 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi usado para medir a absorbância a 540 nm no leitor de microplacas. A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em µmole/L por mg de proteína. A determinação do MDA foi feita em duplicatas usando um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

5. Oxidação de proteínas

Grupos carbonil nas proteínas foram mensurados segundo Levine et al. (1994). Foram utilizados os pellets resultantes dos homogenatos dos tecidos preparados para as enzimas. A

oxidação das proteínas foi determinada baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH, e mensurados em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 370nm. O total de proteínas carboniladas foi calculado baseado no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ mM/cm}$ e expresso em nmole/mL.

A proteína total foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram expressos em mg/g de tecido.

6. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD é determinada em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 570nm (Dieterich et al., 2000 - modificado), baseado-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^* a peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação do pirogalol no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

7. Atividade da catalase

A atividade de catalase é determinada através da taxa de degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 -10 mM), em 1 minuto e lido em espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japão) a 240nm (Aebi, 1984). Os resultados foram expressos em U CAT/mg proteína.

8. Atividade da glutathiona S-transferase

A conjugação de glutathiona reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig et al., 1976). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 1 minuto foi realizado em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, CDNB 100 mM e GSH 100 mM. Como substrato iniciador foi utilizado 100 mM de CDNB. O coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 9,6 \text{ mM/cm}$) foi utilizado para os resultados que foram expressos em $\mu\text{mole/min/g}$. A atividade enzimática foi determinada em duplicatas usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japão).

2.5 Concentrações plasmáticas de ADH

O sangue total coletado no tubo de ensaio contendo anticoagulante (HEPAMAX-S; heparina sódica 5000 U.I/mL) foi centrifugado a 4°C, durante 10 minutos a 4000 rpm. O plasma obtido foi armazenado em eppendorf e conservado a -80°C até o dia do ensaio, que foi realizado seguindo o protocolo referente ao Mouse Antidiuretic Hormone/Vasopressin/Arginine Vasopressin (ADH/VP/AVP) ELISA kit (catalog number 36330, BIOMATIK). O espectro de detecção do kit utilizado é de 1.25pg/mL-80pg/mL.

2.6 Análises estatísticas

Os dados histológicos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e para as análises de capacidade antioxidante e da dosagem hormonal utilizamos o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados foram submetidos ao teste t para comparação de médias utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

3. Resultados

3.1 Análises Histológicas

Os resultados obtidos a partir das análises histológicas estão demonstrados na Tabela 1. Os parâmetros AG, IRS e VvG foram maiores para *D. rotundus* em comparação a *A. lituratus*. A VvT e o IMC não apresentaram diferenças entre as espécies.

Tabela 1 – Parâmetros calculados a partir das análises morfométricas e estereológicas para as espécies *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*

Parâmetros	<i>Artibeus lituratus</i>	<i>Desmodus rotundus</i>
AG (%)	0,003 \pm 0,001 ^a	0,005 \pm 0,001 ^b
IRS (%)	0,540 \pm 0,073 ^a	0,733 \pm 0,041 ^b
VvG (g)	1,651 \pm 0,424 ^a	2,924 \pm 0,350 ^b
VvT (g)	28,813 \pm 5,946 ^a	32,252 \pm 5,642 ^a
IMC (%)	1,090 \pm 0,133 ^a	1,205 \pm 0,209 ^a

AG (%) - área glomerular/área teste; IRS (%) - índice renal-somático; VvG (g) - densidade volumétrica dos glomérulos; VvT (g) - densidade volumétrica dos túbulos; IMC (%) - índice medula-córtex. Os resultados foram apresentados como Média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Nas imagens abaixo é possível observar a região de córtex renal para *A. lituratus* (Fig. 2A) e *D. rotundus* (Fig. 2B). Os glomérulos e túbulos renais das espécies frugívora (Fig. 2C) e hematófaga (Fig. 2D) estão evidenciados nas fotos obtidas a partir do escaneamento das lâminas.

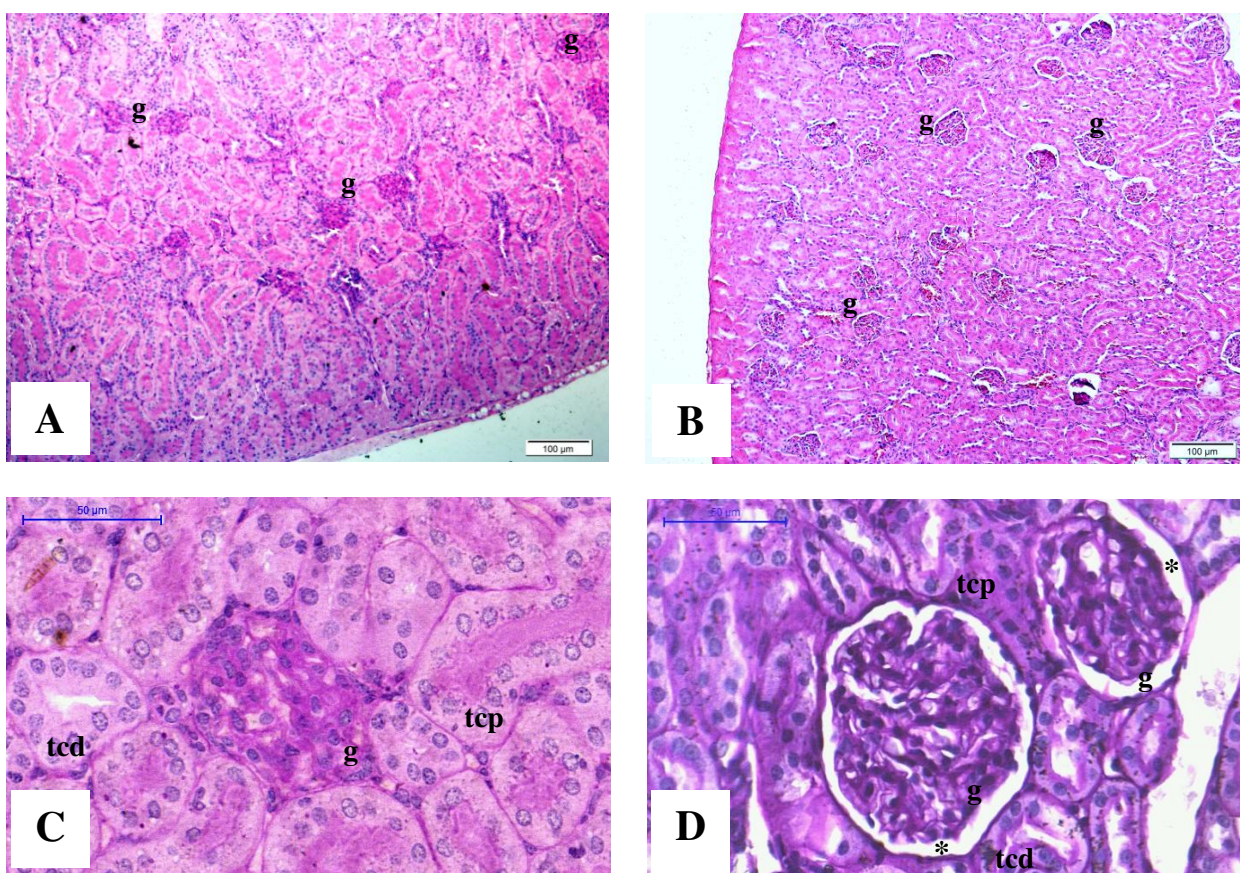


Fig. 2: Imagens obtidas através da microscopia de luz (lente objetiva 10x, coloração Hematoxilina-Eosina) indicando os glomérulos (g) no córtex de *A. lituratus* (A) e *D. rotundus* (B). Nas imagens obtidas através do escaneamento das lâminas (C e D) coradas pelo Ácido Periódico de Schiff estão evidenciados os glomérulos (g), túbulos contorcidos distais (tcd), túbulos contorcidos proximais (tcp) e o espaço capsular (*) em *A. lituratus* (C) e *D. rotundus* (D).

A visão panorâmica dos órgãos nas lâminas escaneadas está demonstrada na Figura 3. É possível observarmos que o rim da espécie frugívora (Fig. 3A) é microscopicamente dividido em três regiões: córtex, medula e papila. Para a espécie hematófaga (Fig. 3B), a divisão das regiões do órgão é diferente, sendo a medula subdividida. Sendo assim, os rins desses animais possuem quatro regiões: córtex, medula externa, medula interna e papila.

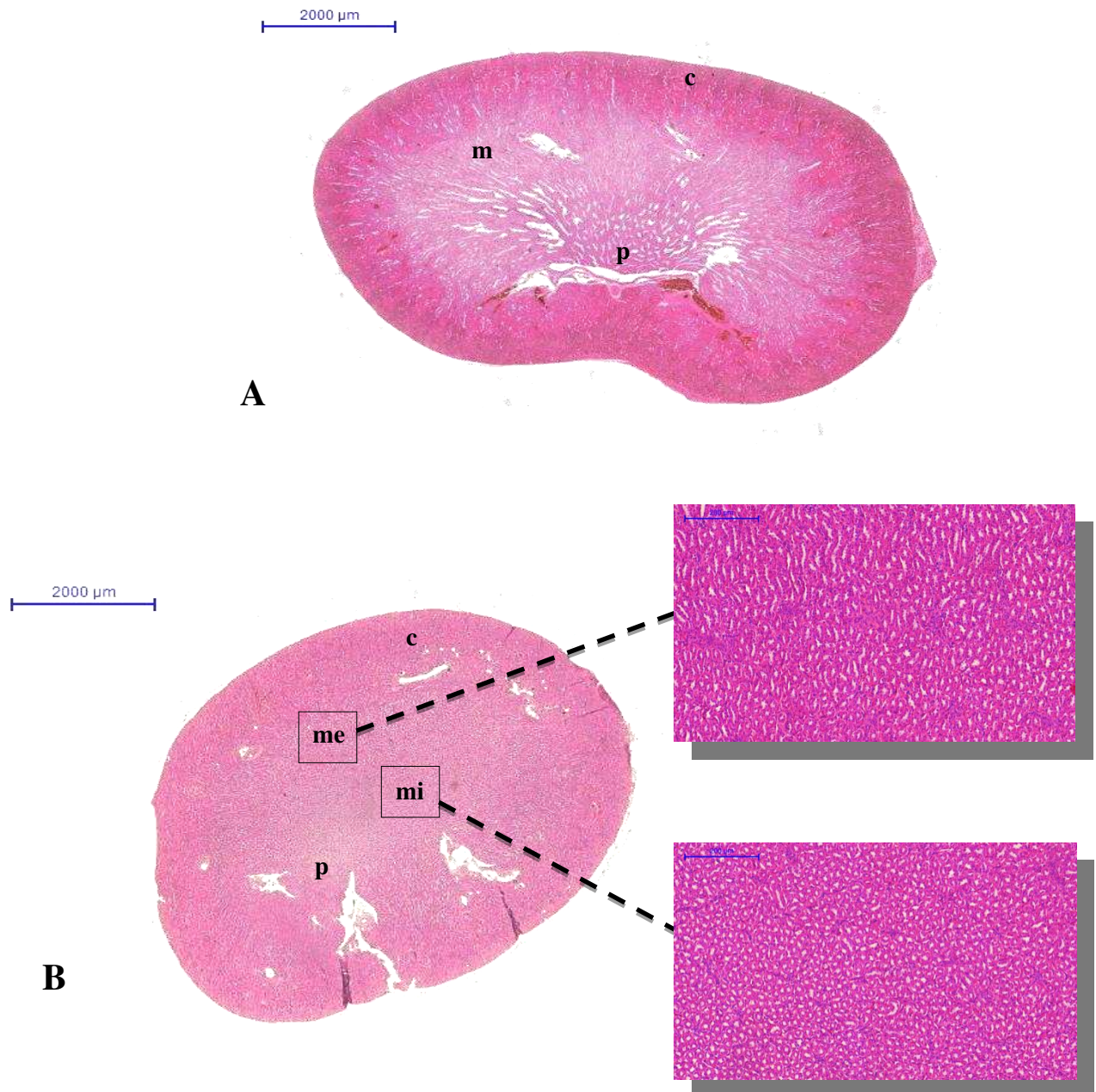


Fig. 3: Scanner dos rins de *A. lituratus* (A) e *D. rotundus* (B) obtidas a partir de cortes corados por Hematoxilina-Eosina. É possível observar as regiões de córtex (c), medula (m), medula externa (me), medula interna (mi) e papila renal (p).

A Figura 4 mostra um importante componente da barreira de filtração glomerular, os podócitos renais, responsáveis por restringir a passagem de proteínas do sangue para a urina.

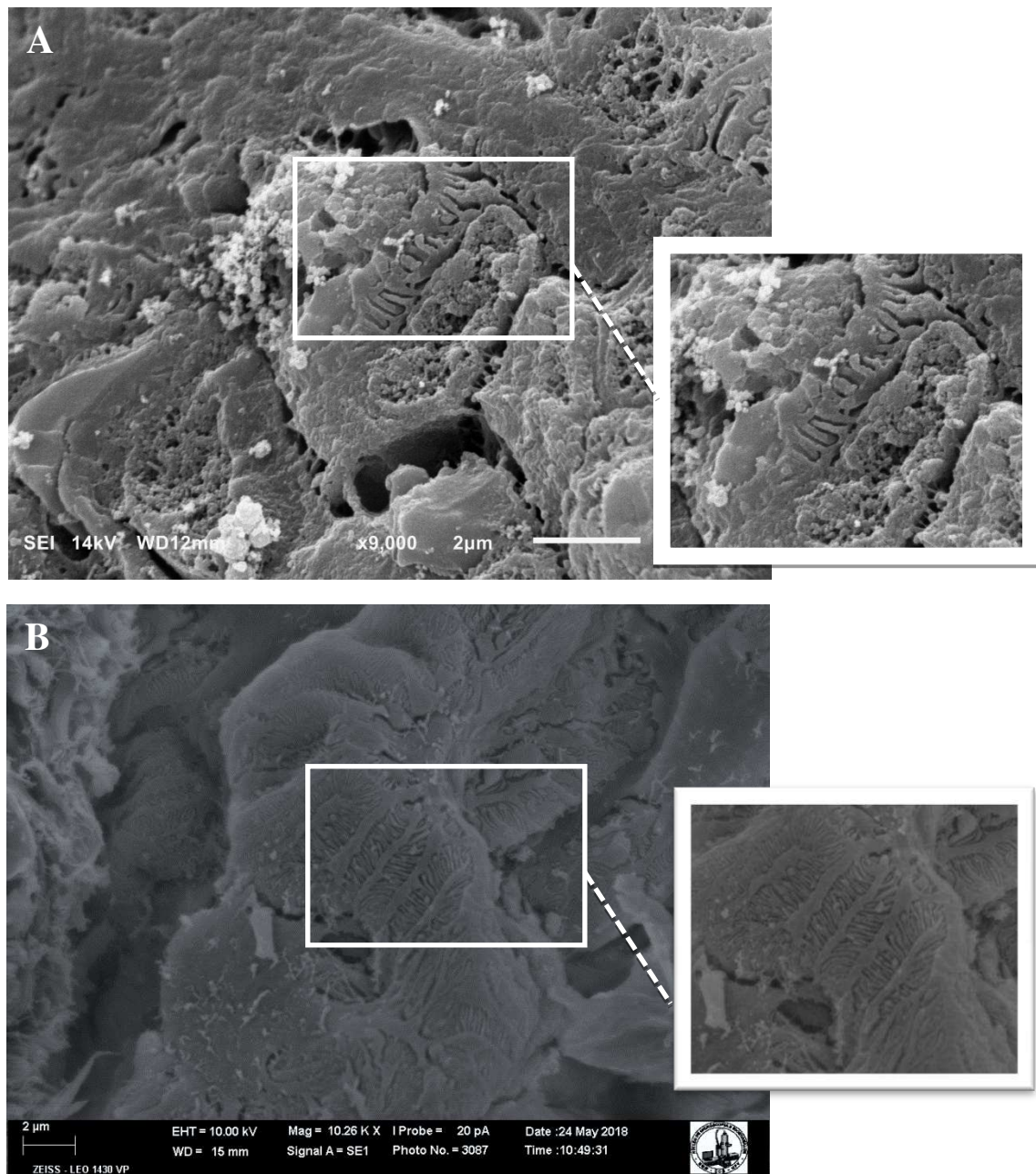


Fig. 4: Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura. As setas brancas indicam os podócitos renais em *Artibeus lituratus* (A) e *Desmodus rotundus* (B).

3.2 Análises de Capacidade Antioxidante

Os resultados obtidos a partir das análises de capacidade antioxidante estão demonstrados na Tabela 2. Quanto à quantificação de espécies reativas, os resultados de NO e FRAP foram maiores para *D. rotundus* ($8,53 \pm 0,486 > 1,78 \pm 0,154$ e $0,33 \pm 0,060 > 0,16 \pm 0,004$, respectivamente) e a produção de H_2O_2 não foi diferente entre as espécies. Em relação à presença de marcadores do estresse oxidativo, encontramos maior produção de MDA ($0,32 \pm 0,032 > 0,06 \pm 0,009$) para *D. rotundus*. O resultado da quantificação de PC não foi diferente entre as espécies. As atividades das enzimas SOD e CAT foram maiores para *A. lituratus* ($1,83 \pm 0,077 > 0,75 \pm 0,073$ e $15,72 \pm 1,233 > 7,06 \pm 0,592$, respectivamente) em comparação a *D. rotundus*. Já a atividade da enzima GST foi maior para a espécie hematófaga ($8,53 \pm 0,486 > 1,78 \pm 0,154$).

Tabela 2 – Avaliação da capacidade antioxidante dos rins de *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*.

Parâmetros	<i>Artibeus lituratus</i>	<i>Desmodus rotundus</i>
NO ($\mu\text{mole/L}$)	$1,78 \pm 0,154^a$	$8,53 \pm 0,486^b$
H_2O_2 ($\mu\text{mole/L}$)	$79,60 \pm 10,070^a$	$68,54 \pm 10,770^a$
FRAP ($\mu\text{mole/L}$)	$0,16 \pm 0,004^a$	$0,33 \pm 0,060^b$
MDA ($\mu\text{mole/mg}$ proteína)	$0,06 \pm 0,009^a$	$0,32 \pm 0,032^b$
PC (nmole/mL)	$20,42 \pm 2,428^a$	$15,86 \pm 1,953^a$
SOD (U/mg proteína)	$1,83 \pm 0,077^a$	$0,75 \pm 0,073^b$
CAT (U/mg proteína)	$15,72 \pm 1,233^a$	$7,06 \pm 0,592^b$
GST ($\mu\text{mole/min/g}$)	$1,78 \pm 0,154^a$	$8,53 \pm 0,486^b$

NO - óxido nítrico; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; FRAP - habilidade de redução férrica do plasma; MDA - malondialdeído; PC - proteína carbonilada; SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GST – glutathione S-transferase. Os resultados foram apresentados como Média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$).

3.3 Concentrações plasmáticas do ADH

O resultado para a dosagem das concentrações plasmáticas do hormônio antidiurético em *A. lituratus* e *D. rotundus* está demonstrado na Figura 5. Não detectamos diferenças nas concentrações de ADH no plasma das espécies em questão.

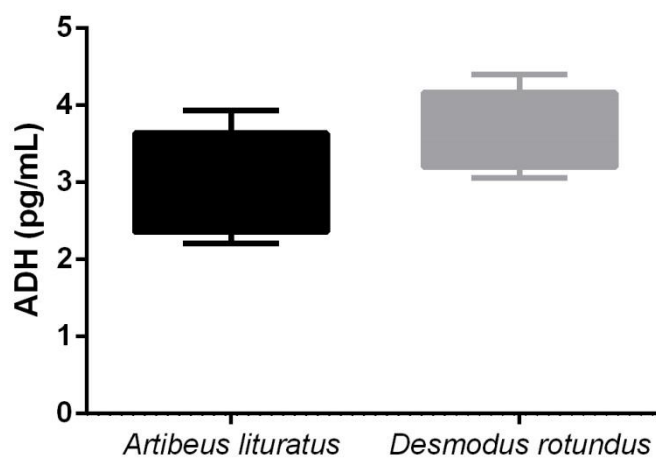


Fig. 5: Concentração em pg/mL do hormônio antidiurético no plasma de *A. lituratus* e *D. rotundus*.

4. Discussão

Estudos com vertebrados mostram que dietas têm o potencial para agir como uma força seletiva que molda a função, metabolismo e estrutura renal de mamíferos, mostrando que mudanças em tratos fisiológicos acompanhadas de diferenças dietéticas são adaptativas (Studier et al., 1983; Schondube et al., 2001; Rabinowitz et al., 1973). Dietas HP, como a de *D. rotundus*, podem induzir hiperfiltração glomerular e induzir adaptações morfofisiológicas (Patil, 2013), concordando com os resultados encontrados neste trabalho.

Os resultados para as análises histológicas sugerem que os rins destas duas espécies de mamíferos possuem adaptações morfológicas decorrentes da composição da dieta naturalmente ingerida. Os rins dos animais da espécie hematófaga representam uma maior proporção corporal dos indivíduos em comparação aos animais da espécie frugívora, como demonstra a diferença encontrada para o IRS. Os efeitos renais produzidos pelas diferenças no teor de proteínas alimentares são independentes das alterações associadas ao tamanho e composição do corpo (Skov et al., 1999). O consumo de dietas proteicas induz um considerável aumento no peso dos rins de ratos e na área dos glomérulos (Aparicio et al., 2013). Alguns estudos demonstraram que o alto consumo proteico reflete no tamanho dos rins, tornando-os maiores, devido à maior carga de trabalho recebida pelo órgão, secundária à filtração aumentada de metabólitos proteicos, especialmente ureia (Pérez-Guisado et al., 2008; Escribano et al., 2011).

A maior ingestão de proteínas resulta na formação de um grande número de produtos nitrogenados como ureia, ácido úrico e creatinina, sendo todos excretados pelos rins (Bankir et al., 2015). Esses compostos podem ser tóxicos para as células e tecidos, portanto não devem ser acumulados. A equação alométrica de Sthal (Stahl, 1965) prevê que para mamíferos de peso médio de 26g a taxa de filtração glomerular (TFG) é de 0,29 ml/min. Nesta equação o expoente para a TFG é uma combinação dos expoentes para dois parâmetros estruturais, como o número de glomérulos e a área glomerular. Dessa forma, sugerimos que o maior VvG e AG para *D. rotundus* em comparação a *A. lituratus* indica um aumento na TFG, principalmente devido à alta carga de subprodutos da digestão de proteínas que a espécie hematófaga necessita excretar.

A VvT e o IMC não foram diferentes entre as espécies, o que indica que tanto *D. rotundus* quanto *A. lituratus* contam com diferentes mecanismos, até mesmo compensatórios, para reabsorver sódio e água sem que nenhum dano seja causado ao tecido renal. Patil et al. (2010) descreve que os rins de animais que ingerem dietas proteicas possuem a medula relativamente espessa, dividida em zonas externa e interna, e apresentam longos túbulos

uriníferos, sendo uma adaptação para conservação de água. Um fator que afeta a habilidade de conservar água e concentrar urina é a ocorrência de lesões nos capilares e túbulos renais, que resulta em alterações permanentes na função dos rins (Basile et al., 2018), características nunca observadas sob condições naturais nas espécies envolvidas nesse estudo. Assim, sugere-se que a estratégia adaptativa à dieta de sangue desenvolvida por *D. rotundus* provavelmente não envolve a habilidade de concentrar urina.

Outro fator envolvido nas alterações renais promovidas pelo alto consumo de proteínas é o desenvolvimento da acidose metabólica, ocasionada pela elevada produção de corpos cetônicos, resultante do metabolismo proteico e lipídico (Tirosh et al., 2013). Tal fator está associado à hipertrofia renal, hiperfiltração glomerular, alterações na morfologia renal, e aumento na produção de espécies reativas, com conseqüente aumento do estresse oxidativo em humanos adultos saudáveis expostos a uma dieta HP durante 6 semanas (Juraschek et al., 2013). O estresse oxidativo pode ser causado pela ausência de compostos antioxidantes ou pela produção excessiva de espécies reativas, causando uma condição de desequilíbrio da homeostase redox (Birben et al., 2012).

Nossos resultados relativos à produção de espécies reativas nas análises de capacidade antioxidante mostraram maiores valores de NO e FRAP para *D. rotundus* quando comparado a *A. lituratus*. A produção de H₂O₂ não foi diferente entre as espécies. A alta concentração de NO da espécie hematófaga provavelmente está relacionada aos seus efeitos anti-hipertensivos e protetores renais, prevenindo danos nos rins e nas suas estruturas como um todo, sendo imprescindível à manutenção das condições fisiológicas ideais para essa espécie. O ON tem vários efeitos renais, incluindo a regulação da hemodinâmica renal e inibição da secreção de renina, reabsorção de Na⁺, feedback tubuloglomerular e atividade nervosa simpática (Garvin et al., 2011; Mount & Power, 2006). A habilidade antioxidante de redução do ferro também pode ser considerada um dos mecanismos desenvolvidos pela espécie hematófaga para lidar com a sobrecarga de ferro na dieta e viver tão bem adaptado à dieta hematófaga. Ratos Wistar com doença renal crônica induzida demonstraram alta habilidade de redução férrica como resultado do ensaio de FRAP, sendo uma defesa do organismo no sentido de atenuar a injúria renal (Gyurászová et al., 2019). A presença similar de H₂O₂ para ambas as espécies sugere que há outros mecanismos pelos quais cada uma lida com os danos que podem induzir estresse oxidativo no tecido renal.

Quanto aos marcadores do estresse oxidativo, encontramos maior produção de MDA para *D. rotundus* e não identificamos diferenças nas concentrações de PC nos rins dos animais das diferentes espécies. O MDA é um dos produtos metabólicos da LPO causada pelas EROs (Hanaditha et al., 2019), e é frequentemente usado como um marcador biológico de estresse

oxidativo tecidual (Kwiecien et al., 2014). A maior produção de MDA nos rins de morcegos hematófagos sugere que essa dieta impõe desafios a esses animais, apesar de serem bem adaptados à dieta de sangue. Entretanto, o aumento deste marcador de estresse oxidativo em *D. rotundus* não foi acompanhado por alterações histológicas renais identificáveis, o que indica que a ultraestrutura renal está preservada, provavelmente devido à ação aumentada da GST na defesa celular contra a LPO na espécie hematófaga.

Em relação às defesas enzimáticas, encontramos maiores atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT para a espécie frugívora. O superóxido, assim como a grande maioria dos radicais livres, é uma das EROs formadas a partir do transporte de elétrons, e a SOD juntamente com outras enzimas antioxidantes como a CAT atua como primeira linha de defesa antioxidante para transformar os radicais livres, como o superóxido, em moléculas menos nocivas às células e tecidos (Fukai & Ushio-Fukai, 2011; Lei et al., 2016). O incremento de antioxidantes na dieta e os níveis mais altos da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos rins dos morcegos frugívoros deste estudo sugerem que esses morcegos podem contar com uma eficiente primeira linha de defesa antioxidante (Wilhelm Filho et al., 2007; Schneeberger, Czirják & Voigt, 2014). As enzimas SOD e CAT parecem atuar de forma coordenada aos antioxidantes dietéticos naturais dos morcegos frugívoros para atenuar possíveis efeitos negativos do estresse oxidativo no tecido renal. Uma vez que o superóxido é a principal ERO, produzida a partir de uma variedade de fontes, a sua dismutação por SOD é de importância primordial para cada célula (Birben et al., 2012). A CAT se associa ao NADPH como equivalente redutor para prevenir a formação de moléculas nocivas às células, atuando na degradação do peróxido de hidrogênio, que é uma potencial fonte de espécies reativas (Kirkman et al., 1999).

A atividade da enzima GST foi maior para a espécie hematófaga em comparação à espécie frugívora. A GST possui um papel importante na defesa das células contra o estresse oxidativo (Huber, 2008). Um estudo recente com camundongos tratados com sobrecarga de ferro detectou aumento da atividade da GST nos rins dos animais, avaliando diferentes formas de expressão gênica da enzima (Desmots et al., 2017). O íon ferro, fortemente presente na dieta hematófaga, é bioquimicamente perigoso (Emerit, Beaumont & Trivin, 2001) devido à grande produção de radicais livres associados a altas concentrações circulantes deste íon (Araújo et al., 2011), o que pode causar danos aos tecidos e células caso as defesas enzimáticas e não-enzimáticas não sejam suficientes para tamponar esse excesso de radicais livres. As GSTs têm múltiplos papéis biológicos e estão envolvidas em funções catalíticas. Entre os compostos que a enzima reduz estão os fosfolipídios, ácidos graxos, e

hidroperóxidos de DNA produzidos pela peroxidação lipídica (LPO) (Allocati et al., 2018), que identificamos ser aumentada para *D. rotundus* em comparação a *A. lituratus*.

Outro mecanismo utilizado nesse estudo na tentativa de identificarmos as adaptações morfofisiológicas desenvolvidas pela espécie hematófaga foi a mensuração da concentração plasmática do hormônio antidiurético para ambas as espécies. Sabe-se que a secreção dos hormônios glucagon e ADH é estimulada após uma refeição proteica, uma infusão de aminoácidos ou uma ingestão prolongada de dietas ricas em proteínas (Bankir et al., 2015). Uma ingestão crônica de dietas HP induz aumento crônico no ADH plasmático e melhora a habilidade de concentração urinária em ratos e humanos (Chan et al., 1988; Daniels & Hostetter, 1990; Bouby et al., 1988; Epstein et al., 1957). A maior secreção de ADH deve estar relacionada à taxa de filtração glomerular e à hipertrofia renal (Bankir et al., 2015), porém neste estudo não foram encontradas diferenças significativas na concentração plasmática deste hormônio entre as duas espécies.

Estudos avaliando a concentração de ADH no plasma de mamíferos silvestres não são muito comuns. Zenteno-Savin & Castellini (1998) reportaram que a concentração média de ADH plasmático para o leão-marinho-do-norte (*Eumetopias jubatus*) é de 14.2 ± 1.5 pg/mL, de 15.9 ± 2.5 pg/mL para focas comuns (*Phoca vitulina*), e de 7.9 ± 4.9 pg/mL para filhotes de elefantes-marinheiros (*Mirounga angustirostris* e *Mirounga leonina*), todos habitantes de regiões frias. Wilkes & Janssens (1986) descreveram que a concentração de ADH no plasma dos marsupiais conhecidos como Wallaby (*Macropus eugenii*) que habitam o sudeste e o sudoeste da Austrália é de, em média, 21.5 ± 4.4 pg/mL. Portanto, sugere-se que a concentração desse hormônio no plasma dos animais sofre influências do ambiente ao qual eles são naturalmente adaptados. Não é possível concluirmos se o resultado da análise hormonal ocorreu devido às concentrações de ADH diminuídas no plasma das duas espécies de morcegos em relação aos demais mamíferos já estudados. Portanto, outros testes são necessários para que esse resultado seja elucidado. O fluxograma abaixo (Fig. 6) sintetiza os resultados discutidos.

Diferenças morfológicas e fisiológicas

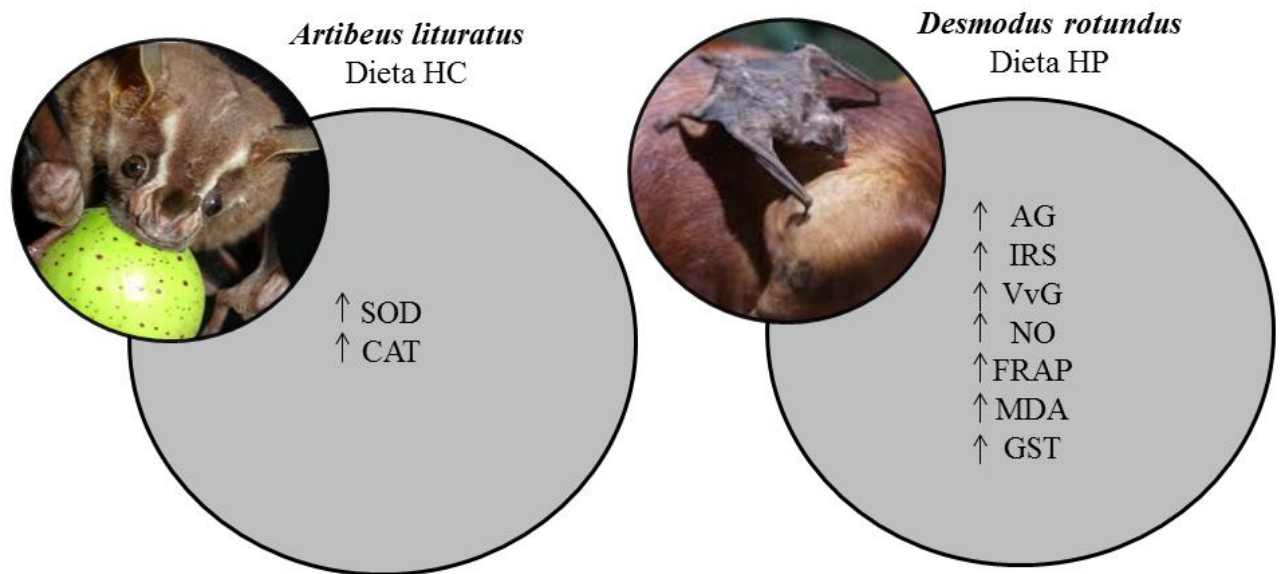


Fig. 6: Síntese dos resultados encontrados. Os valores para a razão AG, o IRS, a VvG, as concentrações de NO e FRAP, a atividade de GST e a concentração de MDA foram maiores para *D. rotundus*. As atividades das enzimas SOD e CAT foram maiores para *A. lituratus*.

5. Conclusão

Sugerimos que as adaptações identificadas foram desenvolvidas pelos morcegos hematófagos, junto a mecanismos compensatórios, para lidar com a alta carga proteica ingerida na dieta sem que haja consequentes danos ao tecido renal. Pela primeira vez, foram avaliadas as diferenças na morfologia e fisiologia renal de morcegos frugívoros e hematófagos, com ênfase nos mecanismos desenvolvidos pela espécie hematófaga. As adaptações desenvolvidas pela espécie *D. rotundus* se destacaram em relação às adaptações desenvolvidas pela espécie *A. lituratus*. Para lidar com a grande carga de produtos nitrogenados que necessita ser excretada após a digestão das proteínas, os morcegos hematófagos apresentam maior AG, maior VvG, e também maior IRS, relacionado à hipertrofia renal. As análises de capacidade antioxidante mostraram que a dieta rica em ferro resulta em maior produção de NO e maior habilidade de redução férrica do plasma para *D. rotundus*, ambas aparecendo como mecanismos protetores contra injúrias. A maior atividade da enzima GST demonstrou a ação dessa enzima como defesa celular contra a peroxidação lipídica aumentada, no sentido de preservar a ultraestrutura renal. É importante salientar que nenhum outro mamífero de tamanho semelhante é conhecido por ser capaz de sobreviver a dietas HP sem que sejam identificados danos no tecido renal.

6. Referências

1. **Casotti G, Herrera LGM, Flores JJM, Mancina CA, Braun EJ.** Relationships between renal morphology and diet in 26 species of new world bats (suborder microchiroptera). *Zoology*, v. 109, p. 196–207, 2006.
2. **Ciprandi A, Horn F, Termignoni C.** Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 25, n. 4, p. 250-262, 2003.
3. **Caviedes-Vidal E, Karasov WH, Chediack JG, Fasulo V, Cruz-Neto AP, Otani L.** Paracellular Absorption: A Bat Breaks the Mammal Paradigm. *PLoS ONE*, v. 3, n. 1, p. e1425, 2008.
4. **Bernard E.** Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. *Ciência Hoje*, v. 36, n. 214, p. 44-49, 2005.
5. **Breidenstein CP.** Digestion and assimilation of blood by a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Journal of Mammalian*, v. 63, n. 3, p. 482-484, 1982.
6. **Freitas MB, Queiroz JF, Dias CI et al.** General and Comparative Endocrinology Reduced insulin secretion and glucose intolerance are involved in the fasting susceptibility of common vampire bats. *General and Comparative Endocrinology*, v. 183, p. 1–6, 2013.
7. **Patil KG.** Morphological Adaptations in the Kidney and Urine Concentrating Ability in Relation to Dietary Habit in the Three Species of Bats. *World Journal of Zoology*, v. 8, n 2, p. 198-205, 2013
8. **Bankir L, Roussel R, Bouby N.** Protein- and diabetes-induced glomerular hyperfiltration: role of glucagon, vasopressin, and urea. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 309, n. 1, p. F2–F23, 2015.
9. **Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, Laouari D, Kleinknecht C, Grunfeld JP, Kriz W, Bankir L.** Role of the urinary concentrating process in the renal effects of high protein intake. *Kidney International*, v. 34, n.1, p. 4–12, 1988.
10. **Epstein FH, Kleeman CR, Pursel S, Hendrikx A.** The effect of feeding protein and urea on the renal concentrating process. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 36, n.5, p. 635–641, 1957.

11. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
12. **Fibach E, Rachmilewitz EA.** Iron overload in hematological disorders. *La Presse Médicale*, v. 46, n. 12, p. e296–e305, 2017.
13. **Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, v. 29, n.1, p. 113, 2006.
14. **Barbosa KBF, Costa NMB, Alfnas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J.** Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios; Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*. 23(4), 629-643, 2010.
15. **Zortéa ME, Mendes SL.** Folivory in the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in eastern Brazilian. *Journal of Tropical Ecology* 9: 117- 120, 1993.
16. **Silva SSPE, Peracchi AL.** Visits of bats to flowers of *Lafoensia glyptocarpa* Koehne (Lythraceae). *Revista Brasileira de Biologia* 59 (1): 19-22, 1999.
17. **Passos JGE, Passamani M.** *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae): biologia e dispersão de sementes no Parque do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa, ES. *Natureza online* 1 (1): 1-6, 2003.
18. **Gardner AL.** Feeding habits. In: Baker, R.J.; Jones Jr. J.K. e Carter, D.C. (Eds). *Biology of the bats of the New World family Phyllostomidae. Special Publications Museum Texas Tech University*, vol.13. 364p, 1977.
19. **Fábian ME, Rui AME, Waechter JL.** Plantas utilizadas como alimento por morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Brasil. In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L. e Santos, G.A.S.D. (Org.) *Ecologia de morcegos*. Londrina, *Technical Books Editora*. p. 51-70, 2008.
20. **Tapiero H, Townsend DM, Tew KD.** The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 58. n. 2, p. 100–110, 2004.
21. **Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R.** Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.
22. **Singh PB, Singh V, Nayak PK.** Pesticide residues and reproductive dysfunction in different vertebrates from north India. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 7, p. 2533-2539, 2008.

23. **Schondube JE, Herrera-M LG, Martínez Del Rio C.** Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zoology*, v. 104, n. 1, p. 59–73, 2001.
24. **Díaz MM, Solari S, Aguirre LF, Aguiar L & Barquez RM.** Clave de Identificación de los murciélagos de Sudamérica—Chave de identificação dos morcegos da America do Sul. *Publicación Especial*, n. 2, 2016.
25. **Griess P.** Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedik, Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, v. 12, n.1, p. 426–428, 1879.
26. **Wang QH, Yu LJ, Liu Y, Lin L, Lu RG, Zhu JP., ..., Lu ZL.** Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta*, v. 165, p. 709–720, 2017.
27. **Oliveira JM, Losano NF, Condessa SS, de Freitas RMP, Cardoso SA, Freitas MB & de Oliveira LL.** Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 684–69, 2018.
28. **Benzie IF and Strain JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
29. **Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J.** Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, v. 101, n. 1, p. 33–39, 2000.
30. **Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121–126, 1984.
31. **Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB.** Glutathione S- Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.
32. **Buege JA and Aust SD.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302–310, 1978.
33. **Levine RL, Garland D, Oliver CN.** Amici A. Climent I. Lenz A. G. Ahn B.W. Shaltiel S. Stadtman E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v.186, p. 464–478, 1994.
34. **Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–75, 1951.
35. **Studier EH, Wisniewski SJ, Feldman AT, Dapson RW, Boyd BC, Wilson DE.** Kidney Structure in Neotropical Bats. *Journal of Mammalogy*, v. 64, n. 3, p. 445–452,

1983.

36. **Rabinowitz L, Gunther RA, Shoji ES, Freedland RA, Avery EH.** Effects of high and low protein diets on sheep renal function and metabolism. *Kidney International*, v. 4, n. 3, p. 188–207, 1973.
37. **Skov AR, Toubro S, Büllow J, Krabbe K, Parving H-H, Astrup A.** Changes in renal function during weight loss induced by high vs low-protein low-fat diets in overweight subjects. *International Journal of Obesity*, v. 23, p. 1170-1177, 1999.
38. **Aparicio VA, Nebot E, Garcia-del Moral R, Machado-Vilchez M, Porres JM, Sanchez C, Aranda P.** High-protein diets and renal status in rats. *Nutricion hospitalaria*, v. 28, n. 1, p. 232-237, 2013.
39. **Pérez-Guisado J, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A.** Spanish ketogenic mediterranean diet: a healthy cardiovascular diet for weight loss. *Nutrition Journal*, v. 30, n. 7, p. 1-7, 2008.
40. **Escribano J, Luque V, Ferre N, et al.** Increased protein intake augments kidney volume and function in healthy infants. *Kidney International*, v. 79, n. 7, p. 783-790, 2011.
41. **Stahl WR.** Organ Weights in Primates and Other Mammals. *Science*, v. 150, n. 3699, p. 1039-1042, 1965.
42. **Patil KG, Janbandhu KS and Ramteke AV.** Renal Morphology of Indian Palm Civet *Paradoxurus hermaphroditus hermaphroditus* (Schrater); Order- Carnivora, Mammalia. *Hislopia Journal*, v. 3, n. 2, p. 179-184, 2010.
43. **Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL.** Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2018.
44. **Tirosh A, Golan R, Harman-Boehm I, Henkin Y, Schwarzfuchs D, Rudich A, et al.** Renal function following three distinct weight loss dietary strategies during 2 years of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, v. 36, n. 8, p. 2225-2232, 2013.
45. **Juraschek SP, Appel LJ, Anderson CAM, Miller ER.** Effect of a high-protein diet on kidney function in healthy adults: results from the omniheart trial. *American journal of kidney diseases: the Official Journal of the National Kidney Foundation*, v. 61, n. 4, p. 547-554, 2013.
46. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n.1, p. 9–19, 2012.
47. **Garvin JL, Herrera M, Ortiz PA.** Regulation of renal NaCl transport by nitric oxide, endothelin, and ATP: Clinical implications. *Annual Review of Physiology*, v.

- 73, p. 359–76, 2011.
48. **Mount PF, Power DA.** Nitric oxide in the kidney: Functions and regulation of synthesis. *Acta Physiologica*, v. 187, n.4, p. 433–46, 2006.
 49. **Gyurászová M, Kovalčíková AG, Renczés E, Kmet'ová K, Celec P, Bábíčková J, Tóthová E.** Oxidative Stress in Animal Models of Acute and Chronic Renal Failure. *Disease Markers*, 2019.
 50. **Hanadhita D, Satyaningtijas AS, Agungpriyono S.** Bats Oxidative Stress Defense. *Jurnal Riset Veteriner Indonesia (Journal of The Indonesian Veterinary Research)*, v. 3, n. 1, 2019.
 51. **Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R, Brzozowski B, ... Brzozowski T.** Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, v. 65, n. 5, p. 613–622, 2014.
 52. **Fukai T & Ushio-Fukai M.** Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011.
 53. **Lei XG, Zhu J-H, Cheng W-H, Bao Y, Ho Y-S, Reddi AR., ... Arnér, ESJ.** Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiological Reviews*, v. 96, n. 1, p. 307–364, 2016.
 54. **Wilhelm Filho D, Althoff SL, Dafré A., & Boveris, A.** Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 146, n. 1-2, p. 214-220, 2007.
 55. **Schneeberger K, Czirják GÁ, Voigt CC.** Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. *Naturwissenschaften*, v. 101, n. 4, p. 285–290, 2014.
 56. **Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF.** Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *Journal Biological Chemistry*, v. 274, n.20, p. 13908–13914, 1999.
 57. **Huber PC.** Revisão, v. 31, p. 1170–1179, 2008.
 58. **Desmots F, Risse, M, Pigeon C, Loyer P, Lorél O, & Guillouzo A.** Differential effects of iron overload on GST isoform expression in mouse liver and kidney and correlation between GSTA4 induction and overproduction of free radicles. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 1, p. 93-101, 2002.
 59. **Emerit J, Beaumont C, Trivin F.** Iron metabolism, free radicals, and oxidative

- injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 55, n.6, p. 333-339, 2001.
60. **Araújo LR, Martins MV, Silva JC, Da Silva RR.** Aspectos gerais da deficiência de ferro no esporte, suas implicações no desempenho e importância do diagnóstico precoce. *Revista de Nutrição*, v. 24, n. 3, p. 493–502, 2011.
 61. **Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, & Federici L.** Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.
 62. **Chan AYM, Cheng ML, Keil LC, Myers BD.** Functional response of healthy and diseased glomeruli to a large, protein-rich protein meal. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 81, n. 1, p. 245–254, 1988.
 63. **Daniels BS, Hostetter TH.** Effect of dietary protein intake on vasoactive hormones. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 258, n. 5, p. R1095–R1100, 1990.
 64. **Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, Laouari D, Kleinknecht C, Grunfeld JP, Kriz W, Bankir L.** Role of the urinary concentrating process in the renal effects of high protein intake. *Kidney International*, v. 34, n.1, p. 4–12, 1988.
 65. **Epstein FH, Kleeman CR, Pursel S, Hendrikx A.** The effect of feeding protein and urea on the renal concentrating process. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 36, n. 5, p. 635–641, 1957
 66. **Zenteno-Savin T & Castellini MA.** Plasma angiotensin II, arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide in free ranging and captive seals and sea lions. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 119, n. 1, p. 1-6, 1998.
 67. **Wilkes GE & Janssens PA.** Development of urine concentrating ability in pouch young of a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Journal of Comparative Physiology B*, v. 156, n. 4, p. 573-582, 1986.