

UCH-FC
MAD-B
S113
C.

INSECTIVORIA, DIGESTION Y DISACARIDASAS EN *Marmosa elegans*
(MARSUPICARNIVORA): ¿UNA RESTRICCIÓN FISIOLÓGICA-EVOLUTIVA?

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas
con mención en Zoología

Facultad de Ciencias

por

ALEJANDRO PABLO SABAT KIRKWOOD

Director de Tesis: Dr. Francisco Bozinovic
Co-Director de Tesis: Dr. Fernando Zambrano

- 1993 -



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato:

ALEJANDRO PABLO SABAT KIRKWOOD

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Zoología.

Director de Tesis:

Dr. Francisco Bozinovic

Co-Director de Tesis:

Dr. Fernando Zambrano

P. Bozinovic

F. Zambrano

Comisión Informante de Tesis

Dr. Luis Contreras

Dr. Sergio Iturri

Dr. Mario Rosenmann

Dr. Alberto Veloso

L. Contreras

S. Iturri

M. Rosenmann

A. Veloso



A mis padres.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Francisco Bozinovic y a Fernando Zambrano por haber dirigido esta tesis y por su aliento y estímulo constante. Especial reconocimiento a mi amigo Pancho quién no tuvo *pelos* en la lengua para expresar sus críticas siempre bien intencionadas. A mis amigos Fer, Claudio y Profe por su desinteresada y siempre oportuna ayuda.

Agradezco a los miembros de mi comisión de tesis por la revisión crítica del trabajo, además de su constante apoyo en el desarrollo de mi programa.

A los demás miembros del Laboratorio de Ecofisiología Animal, Mirian, Antonieta, Mari, Andrés y Willy quienes con su ayuda y estímulo hicieron posible el desarrollo de esta tesis. A V. Gaete y E. Kessi por su valiosa ayuda en mi lucha por comprender algunos aspectos de la teoría y práctica de la Bioquímica. Especial reconocimiento a mi cuate Carlos Martínez del Rio por su valiosa atención y ayuda en la fase final de mi trabajo.

A Pamela y mi Familia por su ayuda y apoyo incondicional.

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1930866 a Francisco Bozinovic y Beca de Tesis de Posgrado U. de Chile al autor (PG-094-93).



INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Resumen.....	ix
INTRODUCCION.....	1
<i>Marmosa elegans</i> como Modelo Experimental.....	8
Objetivos.....	10
Predicciones.....	11
MATERIALES Y METODOS.....	12
Animales y Captura.....	12
Aclimatación.....	12
Función Digestiva.....	13
Energética.....	14
Preferencia Trófica.....	14
Preparación y Ensayo de Actividades Enzimáticas....	15
Análisis Estadístico.....	17
RESULTADOS.....	18
Morfología.....	18
Preferencia Trófica.....	22
Actividades Enzimáticas.....	22
Cambio Estacional.....	28
Efecto de la Dieta.....	28
Gasto Metabólico.....	33



Función Digestiva.....	33
Relación entre Actividades Enzimáticas.....	36
DISCUSION.....	41
Niveles de Actividad Enzimática.....	41
Cambio Estacional y Efecto de la Dieta.....	44
Regulación y Relación de Actividades Enzimáticas...	46
Energética y Digestión.....	51
Modelo Explicativo.....	52
REFERENCIAS.....	56

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Masa corporal, peso y área del intestino delgado y número de animales.....	19
TABLA 2. Comparaciones múltiples (Prueba de Kruskal Wallis) de masa corporal, velocidad máxima y constante de afinidad.....	23
TABLA 3. Constantes de actividad y afinidad de las tres enzimas en dos estaciones.....	29
TABLA 4. Constantes de actividad y afinidad de las tres enzimas con dieta experimental.....	30
TABLA 5. Valores de materia y energía ingeridas y egestadas por <i>Marmosa elegans</i>	34

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1.	Relación entre la masa del intestino y la masa corporal en <i>M. elegans</i>	20
FIGURA 2.	Relación entre el área del intestino y la masa corporal en <i>M. elegans</i>	21
FIGURA 3.	Electividad de dos categorías de alimentos en individuos de <i>M. elegans</i> .	24
FIGURA 4.	Actividad de sacarasa en el homogenizado intestinal de <i>M.elegans</i>	25
FIGURA 5.	Actividad de maltasa en el homogenizado intestinal de <i>M.elegans</i>	26
FIGURA 6.	Actividad de trehalasa en el homogenizado intestinal de <i>M.elegans</i>	27
FIGURA 7.	Actividad enzimática estacional del homogenizado intestinal de <i>M. elegans</i> medida a una concentración de 28 mM...	31
FIGURA 8.	Actividad enzimática según la dieta del homogenizado intestinal de <i>M. elegans</i> medida a una concentración de 28 mM...	32
FIGURA 9.	Balance energético en individuos de <i>M. elegans</i> sometidos a dos dietas.....	35
FIGURA 10.	Relación entre las V_{max} de maltasa y sacarasa en <i>M. elegans</i> en verano y dietas.....	37
FIGURA 11.	Relación entre las V_{max} de maltasa y sacarasa en <i>M. elegans</i>	39
FIGURA 12.	Relación entre las V_{max} de trehalasa y sacarasa en <i>M. elegans</i>	40
FIGURA 13.	Modelo explicativo de los procesos de alimentación en <i>M.elegans</i>	55

RESUMEN

Las características digestivas en los vertebrados están estrechamente correlacionadas con la composición química de la dieta natural. Por ejemplo, la presencia de actividad hidrolítica de azúcares se correlaciona con las preferencias de los organismos por diferentes nutrientes, independiente de la abundancia en el ambiente. La capacidad de regular los mecanismos digestivos, de acuerdo a los sustratos dietarios, estaría presente en especies omnívoras y herbívoras, y ausente en especies carnívoras/insectívoras. De ser esto así, se espera que *Marmosa elegans*, marsupial insectívoro, tenga una restricción fisiológica evolutiva, tal que sea incapaz de hidrolizar azúcares presentes en frutos. Así, es posible esperar actividades enzimáticas ausentes o escasas de maltasa y sacarasa en el intestino delgado, y notoria actividad de la enzima trehalasa, que hidroliza treahalosa, azúcar de almacenamiento en insectos, independiente de la composición química del alimento.

Con la finalidad de dilucidar la interrogante planteada y someter a prueba la hipótesis de adaptación fisiológica evolutiva a la dieta, se midieron las actividades enzimáticas del intestino delgado involucradas en la digestión de disacáridos, en individuos de *M. elegans* sometidos a regímenes alimentarios experimentales de

insectos y frutas así como en animales capturados en dos estaciones con marcadas diferencias en la abundancia y disponibilidad de recursos tróficos. Los resultados demuestran que la actividad de trehalasa es significativamente menor que la de sacarasa y maltasa en todos los individuos estudiados. Por otra parte, además de la capacidad de ser moduladas por la composición química del alimento, la actividad enzimática experimentó variación estacional. Esto permite rechazar la hipótesis de restricción fisiológica evolutiva. Las características de las enzimas estudiadas difieren de aquellas documentadas en otros taxa, lo cual sugiere que tanto los mecanismos de regulación y expresión enzimática, como las enzimas, no sean únicas ni comunes en todos los vertebrados. Se discuten las implicancias de los mecanismos digestivos sobre los procesos conductuales de explotación de alimento.

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, fisiología comparada y evolución desde distintos niveles disciplinarios y de organización biológica (Karasov & Diamond, 1988; Martinez del Rio & Stevens, 1989; Stevens 1990; Bozinovic, 1993; Sabat et al., 1993).

La conducta trófica de los organismos está influenciada, en parte por la disponibilidad de recursos en el ambiente. Sin embargo, existen restricciones funcionales históricas en el sistema digestivo que limitan los procesos de alimentación, lo que se expresaría en un patrón de nicho trófico particular (Karasov & Diamond, 1988).

Por ejemplo, Martinez del Rio & Stevens (1989) y Martinez del Rio (1990), han demostrado que aves en cautiverio muestran variación en sus preferencias por azúcares simples y que estas preferencias parecen coincidir con la clase de azúcares que estas aves ingieren en la naturaleza. Así, la ausencia de la enzima sacarasa en el tracto digestivo de dos aves frugívoras (*Dumetella caroliniensis* y *Lamprotornis purpureiceps*) aparentemente

determina que estos organismos prefieran soluciones isocalóricas de fructosa y glucosa por sobre soluciones de sacarosa (Martínez del Río com. pers.). La ausencia de sacarasa en el tracto digestivo de *Sturnus vulgaris* determina que esta especie rechace alimentos ricos en sacarosa, independiente de su abundancia en el ambiente. En picaflores (aves nectarívoras que poseen la enzima sacarasa en su tracto digestivo) se observa una preferencia de sacarosa por sobre glucosa y fructosa (Martínez del Río, 1992). Es decir, la preferencia de las aves por diferentes nutrientes se correlaciona tanto con la capacidad de digerirlos y asimilarlos, como con la diversidad dietaria, la amplitud de nicho trófico y, probablemente con las relaciones coevolutivas entre frugívoros y frutos (Levey & Grajal, 1991).

Las características digestivas están altamente correlacionadas con la dieta natural de los individuos. Particularmente la actividad de las enzimas disacaridasas localizada en la membrana plasmática de los enterocitos de vertebrados es un buen ejemplo de ello. Animales que no incluyen en su dieta disacáridos, presentan escasa o nula actividad de las enzimas específicas. Este es el caso de algunas especies de marsupiales como el Canguro (*Macropus giganteus*) y el "Bandicoot" (*Isodon obesulus*) que no presentan actividad de sacarasa, y el Koala (*Phascolarctos cinereus*), que no presenta actividad de trehalasa (Kerry,

1969; Hume, 1982; Stevens, 1990). Este patrón también se presenta en otros taxa, tales como aves (Martínez del Río, 1990) reptiles y mamíferos (Kerry & Messer, 1968; Zoppi & Shmerling, 1969; Martínez del Río & Stevens, 1988; Stevens, 1990; Hernández & Martínez del Río, 1992).

En otros aspectos de la fisiología digestiva de los organismos ocurren situaciones similares a las descritas anteriormente. Así, el transporte de nutrientes, tales como prolina y glucosa en el intestino delgado de 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 y composición química del alimento. Al igual que en peces, el transporte de glucosa y prolina en aves, está correlacionado con el porcentaje de carbohidratos en la dieta de los individuos en la naturaleza (Karasov & Levey, 1990). Sin embargo, aunque la razón de transporte de glucosa/prolina se correlaciona con las diferencias en los contenidos de carbohidratos en la dieta natural de las especies, esta diferencia se debe a variaciones en el transporte de glucosa principalmente. El transporte de prolina varía menos y no depende de la composición química de la dieta.

Estas diferencias en el transporte, así como

variaciones en magnitud y también ausencias enzimáticas, parecen ser el resultado de una alta especialización, de carácter evolutivo a la dieta. Es decir, las diferencias encontradas en los mecanismos digestivos y procesos de selección de alimento de las especies especialistas no serían fenotípicamente plásticos, sino que más bien adaptaciones fisiológicas seleccionadas en tiempo evolutivo a las dietas naturales (véase Henning, 1981; Buddington et al., 1987; Karasov, 1987; Karasov & Diamond, 1988; Galluser et al., 1988; Karasov & Levey, 1990).

Según Karasov & Diamond (1988), la síntesis y mantención de la estructura molecular para hidrolizar, absorber y metabolizar nutrientes que no están disponibles en la dieta natural constituye un alto costo biosintético, y sería reprimida y posteriormente eliminada por selección natural. Desde esta perspectiva, es generalmente aceptado que la selección natural tiende a emparejar las capacidades de los organismos con la carga que ellos encuentran en circunstancias naturales, aún cuando existen márgenes de seguridad que permiten soportar las variaciones frecuentes del medio, como se ha descrito para el caso de transporte intestinal de glucosa en *Mus musculus* (Toloza et al., 1991; Diamond, 1991; Diamond & Hamond, 1992). Ejemplo de esto, es la correspondencia entre los niveles de actividad enzimática con los niveles de flujo natural de sustratos a través de las vías metabólicas (véase Hochachka & Somero,

1984), o el hecho que animales que no presentan lactosa en su leche, como pinipedios, han perdido la capacidad de digerirla (Kerry & Messer, 1968).

En esta línea, Dykhuizen (1978) realizó experimentos en dos cepas de *Escherichia coli* mantenidas en un medio de cultivo que contenía el aminoácido triptofano, encontrando que la cepa auxótrofa para triptofano (que no puede sintetizar este aminoácido) era seleccionada positivamente por sobre la cepa silvestre. Este autor plantea que las diferencias en el crecimiento de estas bacterias se debería a la capacidad de ahorro de energía y espacio por parte de la cepa auxótrofa. Es decir, el alto costo de mantener una maquinaria metabólica que no es usada implicaría costos en términos de adecuación biológica.

Así, retomando el modelo de animales vertebrados, en carnívoros/insectívoros la existencia de una estructura molecular necesaria para metabolizar carbohidratos sería inútil en función de la composición química de sus dietas (bajos contenidos de carbohidratos) y sería eliminada (Diamond, 1986). Sin embargo, dado que ciertos nutrientes como aminoácidos, son esenciales para todos los organismos, independiente de los hábitos alimentarios, la estructura encargada de hidrolizar proteínas y absorber aminoácidos se mantendría (Buddington et al., 1987).

De acuerdo a Karasov & Diamond (1988), un cambio evolutivo desde una condición de carnivoría/insectivoría a herbivoría/frugivoría requiere un cambio genético. Es decir, es necesario generar un nuevo complejo molecular digestivo y nuevas estructuras. Paralelamente se ha señalado que la capacidad de regular los mecanismos digestivos de acuerdo a los sustratos dietarios está presente en especies omnívoras y herbívoras, pero no en carnívoras/insectívoras (Diamond & Buddington, 1987; Buddington *et al.*, 1987). De esta forma, los carnívoros no sólo presentarían niveles basales de transporte de glucosa sino que además no poseerían la maquinaria regulatoria que les permita incrementar la actividad de transportadores en la membrana de acuerdo a la dieta. Sin embargo, aunque esta plasticidad fenotípica está documentada ampliamente para el caso de transporte de nutrientes en el intestino de vertebrados, la capacidad de regulación de la actividad enzimática de disacaridasas frente a cambios en los niveles de sustrato en la dieta se estudiado casi exclusivamente en omnívoros/herbívoros (Deren *et al.*, 1967; Raul *et al.*, 1978). Este hecho dificulta hacer generalizaciones con respecto a la evolución de los mecanismos fisiológicos de la digestión y los procesos de alimentación en vertebrados.

La hipótesis de Karasov & Diamond (1988) que denominaré hipótesis de "construcción económica" se contrapone con la hipótesis de "construcción

momentáneamente excesiva" propuesta por Gans (1979). Este autor postula que muchos aspectos del fenotipo podrían exceder los requerimientos ordinarios de los individuos. De esta forma, los organismos presentarían una gran capacidad de reserva, permitiéndoles hacer frente a cambios catastróficos en el ambiente; en este caso cambios en la abundancia y uso de diferentes recursos tróficos. Existen varios ejemplos que apoyarían esta hipótesis. Crane (1975) observó que la capacidad máxima de transporte de glucosa en el intestino delgado de un hombre es de 5 Kg/día, cantidad excesiva para cualquier dieta concebible. Rosenmann & Morrison (1975) han documentado que la tolerancia a la hipoxia de una especie de roedor de baja altitud (*Microtus pennsylvanicus*) es comparable a la de especies de alta altitud. Bozinovic & Simonetti (1992) señalaron que la tolerancia de micromamíferos de Chile Central a temperaturas bajas exceden con mucho a las temperaturas jamás registradas en su hábitat natural.

Garland & Huey (1987) plantean que dentro de un sistema fisiológico pueden existir componentes excesivamente contruídos mientras que otros pueden constituir factores limitantes. Sin embargo Taylor & Weibel (1981) han discutido y planteado un principio de diseño económico idealizado, el cual llaman simorfosis. Estos autores señalan que si los animales estan realmente diseñados económicamente, no debieran existir pasos en una

cadena de transformaciones (o sistema) que sean tasa-limitante. Esto sería antieconómico puesto que en el conjunto de los pasos siguientes (componentes) del sistema se invertiría energía y espacio inútil en aquellas capacidades excesivas y no utilizadas.

***Marmosa elegans* como Modelo Experimental: ¿Restricción Fisiológica-Evolutiva sobre la Conducta de Alimentación?**

El pequeño marsupial *Marmosa elegans* (Marsupicarnivora: Didelphidae) o *Thylamys elegans* (véase Kirsch et al., 1993), constituye un caso adecuado para someter a prueba la hipótesis de adaptación fisiológica a la dieta, en un sentido evolutivo. *Marmosa elegans* es una de las especies del ensamble de pequeños mamíferos en el centro, norte y sur de Chile. Los estudios de nicho trófico en diferentes habitats han mostrado cambios espaciales y temporales en los hábitos alimentarios de estos micromamíferos. Cambios dietarios que se correlacionan con la abundancia y disponibilidad de recursos tróficos en el ambiente. Es decir, en general 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, más del 90% de la dieta anual de esta especie corresponde a insectos y la diferencia corresponde, en su mayoría, a

frutos y semillas. No se ha documentado variaciones estacionales o geográficas en la dieta de esta especie (Glanz, 1977; Meserve & Glanz, 1978; Meserve, 1981; Meserve et al., 1988).

Según Hume (1982) las especies del género *Marmosa* son primariamente insectívoras aunque ocasionalmente ingieren frutas, caracoles, lagartijas y huevos. Sin embargo, estos animales son incapaces de sobrevivir con una dieta exclusiva de frutos por más de unos pocos días, lo cual concuerda con mis observaciones personales de *M. elegans* en cautiverio.

A la luz de los antecedentes teóricos ya mencionados las siguientes preguntas son de interés: ¿Es *Marmosa elegans* capaz de modular fenotípicamente sus características digestivas en función de la composición dietaria?, o ¿existe una restricción fisiológica de carácter evolutivo sobre la conducta de alimentación en esta especie?. En otras palabras, ¿es aplicable la hipótesis de construcción económica o la de construcción excesiva a los mecanismos de regulación y expresión enzimática del sistema digestivo de este animal?

Objetivos

El objetivo de esta tesis es someter a prueba la hipótesis de adaptación fisiológica evolutiva a la dieta contrastándola con la hipótesis de construcción excesiva. Se estudiarán las características digestivas a nivel celular -- i.e. actividad de enzimas disacaridasas, último paso de la digestión de carbohidratos. Específicamente la hidrólisis de los disacáridos sacarosa, maltosa y trehalosa por las enzimas de la mucosa intestinal de *M. elegans*.

Sacarasa, maltasa y trehalasa son tres glicoproteínas integrales de la membrana de la chapa estriada de los enterocitos de vertebrados. Sacarasa (complejo sacarasa-isomaltasa) está compuesta de dos subunidades, una de 120 KD y otra de 140 KD, cada una de las cuales posee un único sitio activo. Esta enzima degrada sacarosa, azúcar presente en frutos, a fructosa y glucosa (hexosas). Posee además actividad catalítica sobre maltosa. Maltasa (complejo maltasa-glucoamilasa) posee un peso molecular de 250 KD y posee dos subunidades proteicas para el caso de mamíferos. En algunas aves se constituye de una sola cadena polipeptídica. Se encarga de la hidrólisis de maltosa, azúcar presente en tejido animal (glicógeno) y vegetal (almidón), liberando como producto glucosa. Trehalasa es una enzima simple, monomérica, de 65-75 KD dependiendo de la especie. Hidroliza trehalosa, disacárido presente en

artrópodos, hongos y algas liberando glucosa (véase Vonk & Western, 1984; Wall & Bailey, 1985; Galand, 1989; Stevens, 1990; Prosser, 1991).

Predicciones

Los insectos poseen altas concentraciones de lípidos y proteínas, y bajas concentraciones de carbohidratos (Bell, 1990). Debido a que *M. elegans* es una especie insectívora, si esta especie posee una restricción fisiológica evolutiva (i.e., adaptación a una dieta de composición química particular), se predicen actividades enzimáticas ausentes o comparativamente escasas de maltasa y sacarasa en el intestino delgado e importantes actividades enzimáticas de trehalasa, que hidroliza trehalosa, azúcar presente en la hemolinfa de insectos. Si, por el contrario, no existen restricciones en cuanto a las capacidades digestivas de esta especie (i.e. es aplicable la hipótesis de construcción exesiva) *M. elegans* debiera presentar actividades importantes de estas enzimas, aún cuando esta capacidad sea subutilizada. Si la incapacidad de modular los mecanismos digestivos por parte de los vertebrados carnívoros abarca también las actividades enzimáticas, *M. elegans* debería mostrar una actividad constante de las enzimas disacaridasas, independiente de variaciones temporales espaciales y el tipo de dieta experimental a la cual se la someta en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Animales y Captura

Los animales fueron capturados en Chile central en las localidades de El Pangue a 80 km NE de Santiago, y en Quebrada de la Plata (Maipú), utilizando trampas Sherman.

El estudio estacional de las disacaridasas de *Marmosa elegans* se realizó en la localidad de El Pangue en los meses de enero y septiembre, los cuales presentan marcadas diferencias en la disponibilidad de recursos tróficos, tanto vegetales (Montenegro 1989; R. Bustamante com. pers.) como en abundancia de insectos (López-Calleja & Diaz-Barraza 1991; F.F. Novoa com. pers.). Inmediatamente después de capturados, los animales se pesaron con una pesola AVINET (± 0.5 g) y se sacrificaron. Se extrajo el intestino delgado y luego de un lavado con solución 0.9% de NaCl se estimó su área midiendo su largo y ancho. Luego de esto se almacenaron las muestras en nitrógeno líquido para su posterior traslado al laboratorio en Santiago. El tiempo transcurrido desde el sacrificio de los animales hasta el almacenamiento en nitrógeno líquido fue inferior a 5 min.

Aclimatación

Los experimentos de aclimatación, realizados con el fin de apreciar la respuesta de las actividades de las

disacaridasas frente a cambios en la composición química de la dieta, se realizaron con individuos capturados en la localidad de Quebrada de la Plata en el mes de enero. Estos individuos fueron trasladados en jaulas individuales al laboratorio en donde se mantuvieron con dos dietas experimentales durante 10 días, tiempo suficiente para obtener una respuesta en la actividad de las enzimas, (Deren et al. 1967). Uno de los tratamientos consistió exclusivamente en la oferta de insectos y el otro en la oferta exclusiva de fruta cocida (dulce de membrillo y camote). Los individuos de ambos grupos se mantuvieron con agua *ad lib.* en jaulas individuales a 18 °C y un fotoperíodo L:D = 12:12. El peso corporal se controló diariamente (± 0.05 g) mediante una balanza electrónica SHIMADZU EB-2800. Los animales se sacrificaron al término de la aclimatación. En el intestino delgado extraído y lavado con solución fisiológica fría (NaCl al 0.9%), se determinó su área nominal (excluyendo vellosidades y microvellosidades) y peso (0.00005 g) en una balanza analítica AND ER-120A. Los tejidos se mantuvieron en nitrógeno líquido para una posterior determinación de proteínas y actividades enzimáticas.

Función Digestiva

Para la determinación de eficiencias de asimilación (o digestibilidad aparente) de materia y energía se

determinó gravimátricamente la ingesta y egesta de alimento, corrigiendo la pérdida de peso por evaporación, mediante un control. La digestibilidad aparente se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$D (\%) = [(I-E)/I] \times 100$$

donde I = ingesta en gramos/día, E = egesta en gramos/día.

Para expresar la digestibilidad aparente de energía, se multiplicó el valor en gramos por el contenido calórico de la muestra, el que se determinó utilizando una bomba calorimétrica PARR 1261.

Energética

A un tercer grupo de animales (n = 3) se les midió la tasa metabólica promedio diaria. Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron utilizando cámaras metabólicas de bronce y acero sumergidas en un baño termorregulado a 18 °C, conectadas a un respirómetro de circuito cerrado computarizado, basado en el modelo de Morrison (1951). Las mediciones se realizaron por 24 horas con un fotoperíodo L:D 12:12, con alimento (huevos y fruta) y agua *ad lib*.

Prueba de Preferencia Trófica

Para corroborar y cuantificar las preferencias dietarias de *Marmosa elegans* se realizaron pruebas de

preferencias tróficas. Estas fueron conducidas en sistemas de campo abierto (40 x 50 x 80 cm) con agua *ad lib.*, fotoperíodo y temperatura ambiente natural. Los experimentos se realizaron durante 48 horas en individuos a los que se les ofreció dos tipos diferentes de alimento: larvas de *Tenebrio molitor* y fruta (manzana y pera). La preferencia por cada tipo de dieta fué determinada calculando los valores de electividad de acuerdo a Ivlev (1961), esto es:

$$\text{Electividad} = [r(i) - p(i)]/[r(i) + p(i)]$$

siendo $r(i)$ = proporción del ítem (i) en la dieta, y $p(i)$ = proporción del ítem (i) en el sistema experimental o ambiente, en este caso una proporción estándar de 30 gramos para cada dieta. El rango de la medida va desde -1, si el ítem es fuertemente rechazado; 0, si el ítem es no-selectivo; a 1, si el ítem es fuertemente preferido.

Preparacion y Ensayo de Actividades Enzimáticas

El intestino obtenido de los individuos de los cuatro grupos experimentales, previamente trozado, se homogenizó con diez 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, se sometio a ultrasonido con el fin de disgregar

las partículas en suspensión. La concentración de proteínas se determino, usando albumina de suero bovino, como estándar (Peterson, 1977; Sabat et al. 1993).

Las actividades de disacaridasas se determinaron por medición de la concentración de glucosa liberada según el método de Dahlqvist (1964) modificado por Martínez del Rio & Stevens (1988). Luego de una preincubación a 35°C (temperatura corporal de esta especie), por 5 minutos la reacción se inició con la adición de 50 μ l de homogenizado intestinal. La incubación se continuó por 10 minutos adicionales y la reacción se detuvo con 3 ml de solución "Glucose (Trinder) 315-500" (Sigma Chemical Co.) disuelta en 500 ml de solución buffer fosfato 0.5 M, pH 7.0. Al término de 18 min de mantenida la reacción a 35 °C se leyó la densidad óptica a 505 nm. en un espectrofotómetro Beckman DU-7HS. Brevemente, la acción del Trinder es la siguiente: la glucosa es oxidada primero a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno mediante la enzima glucosa oxidasa obtenida de *Aspergillus niger*. El peróxido de hidrógeno formado, reacciona en presencia de peroxidasa con 4-aminoantipirina y sulfonato de p-hydroxybenceno formando quinoneimina coloreada, cuyo máximo de absorbancia se obtiene a 505 nm. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la concentración de glucosa en solución.

Los ensayos enzimáticos se realizaron en un rango de concentraciones (de 0.5 a 100 mM) de sustratos (trehalosa, maltosa y sacarosa) con el fin de caracterizar la cinética y afinidad por el sustrato de las enzimas (K_m y V_{max}), para cada uno de los tratamientos experimentales. Sobre la base de las mediciones de absorbancia, las actividades disacaridásicas se calcularon como UI/mg de proteínas del homogenizado, siendo UI = micromoles de sustrato hidrolizado por minuto.

Análisis Estadístico

Las actividades disacaridásicas se compararon utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (véase Steel & Torrie, 1985). Para estimar tanto el efecto de los tratamientos como el de otras covariables (e.g. actividad sacarásica) sobre las actividades enzimáticas, se realizó un Análisis de Covarianza. Los datos se expresaron como media aritmética \pm DE. El nivel de rechazo para la hipótesis de nulidad fue de 5%.

RESULTADOS

Morfología

En la tabla 1 se muestran los valores de la masa corporal (M_b), área (A_{id}) y peso del intestino delgado (M_{id}) de los grupos de animales estudiados. La masa corporal (al momento de su captura) de individuos sometidos a dieta de fruta (25.02 ± 11.02 g) no es significativamente diferente a lo encontrado en individuos sometidos a una dieta de insectos (20.09 ± 2.96 g). Sin embargo, la masa corporal de individuos capturados en invierno (41.37 ± 10.22 g) es significativamente superior, tanto a la de individuos de verano (21.75 ± 2.17 g), como a la de los grupos de dietas experimentales ($p < 0.003$).

El ANCOVA revela que la relación entre masa corporal y el peso del intestino delgado no difiere significativamente entre tratamientos. Esta situación se observa tanto en la intersección al eje de las ordenadas ($F_{1,12} = 0.088$, $p > 0.05$), como en las pendientes ($F_{1,12} = 0.792$, $p > 0.05$). El peso del intestino delgado se relaciona isométricamente con el peso corporal ($r = 0.85$, $p < 0.001$), y es descrito por la ecuación: $M_{id} = 0.04M_b^{1.0}$ (figura 1). El área nominal del intestino delgado tampoco muestra diferencias significativas en la intersección al eje de las ordenadas ($F_{1,11} = 0.153$, $p > 0.05$) ni en las pendientes ($F_{1,11} = 0.752$, $p > 0.05$) en la relación con la

TABLA 1.- Masa corporal (M_b), peso (M_{id}) y area (A_{id}) del intestino delgado y número (n) de animales estudiados en las cuatro condiciones experimentales.

	n	M_b (g)	M_{id} (g)	A_{id} (cm ²)
Insecto	8	20.09 ± 2.96	0.92 ± 0.98	16.76 ± 4.48
Fruta	6	25.02 ± 11.02	0.79 ± 0.30	14.80 ± 9.30
Invierno	8	41.37 ± 10.22	1.83 ± 0.55	18.93 ± 4.90
Verano	7	21.75 ± 2.17	1.07 ± 0.28	11.88 ± 1.80

Todos los valores se presentan como $X \pm DE$.

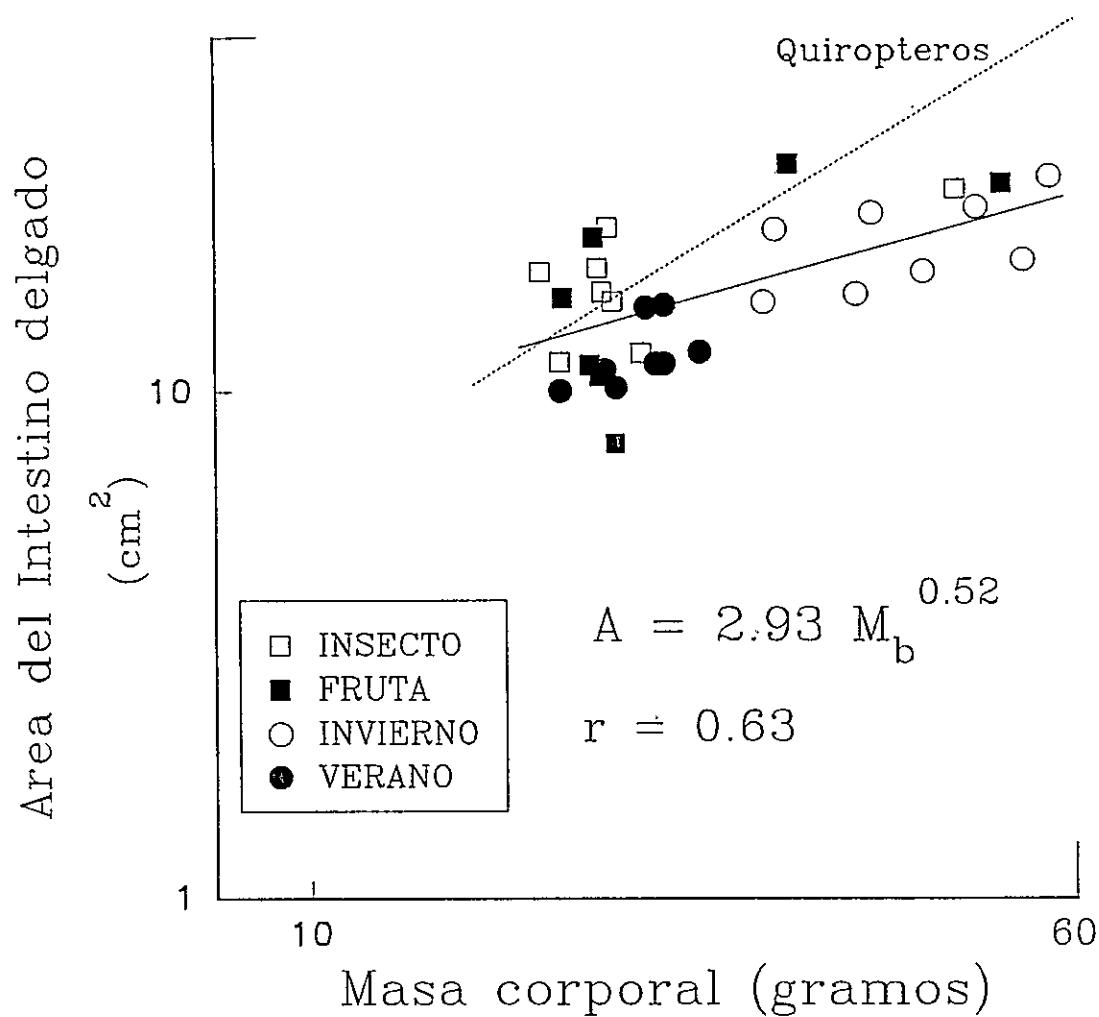


Figura 2.- Relación entre el área del intestino delgado y la masa corporal en *Marmosa elegans*. La línea segmentada corresponde a lo documentado por Martínez del Río (1992).

masa corporal de los diferentes tratamientos. Esta relación es alométrica con la masa corporal ($r = 0.63$, $p < 0.001$) y es descrita mediante la ecuación: $A_{id} = 2.93M_b^{0.518}$ (figura 2).

Prueba de Preferencia Trófica

Los resultados de la prueba de preferencia trófica de *Marmosa elegans* arrojó valores de 0.29 ± 0.04 y -0.75 ± 0.2 para el caso de insectos y fruta respectivamente (figura 3), lo que indica que los animales, enfrentados a estos dos ítemes tróficos, prefieren los insectos y rechazan las frutas.

Actividades Enzimáticas

Como se muestra en las figuras 4, 5 y 6, el comportamiento de las tres enzimas estudiadas en las condiciones experimentales descritas, se ajusta a una curva de tipo Michaeliana lo que se desprende de los gráficos de actividad versus concentración de sustrato.

La V_{max} de sacarasa experimenta diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($H = 17.61$, $p = 0.0005$). La actividad de maltasa también reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($H = 9.54$, $p = 0.02$), al igual que la actividad de trehalasa ($H = 5.039$, $p = 0.0072$).

Tabla 2.- Comparaciones múltiples (prueba de Kruskal-Wallis) de Masa corporal (M_b), Velocidad máxima (V_{max}) y constante de afinidad (K_m) de las tres enzimas, en las diferentes condiciones experimentales.

Condicion	M_b	SACARASA		MALTASA		TREHALASA	
		V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
Invierno-Verano	S	S	S	NS	S	NS	NS
Invierno-Fruta	S	S	NS	NS	S	S	NS
Invierno-Insecto	S	NS	S	NS	S	NS	NS
Verano-Fruta	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Verano-Insecto	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
Fruta-Insecto	NS	S	S	S	NS	S	NS

NS = Diferencias no significativas; S = Diferencias significativas.

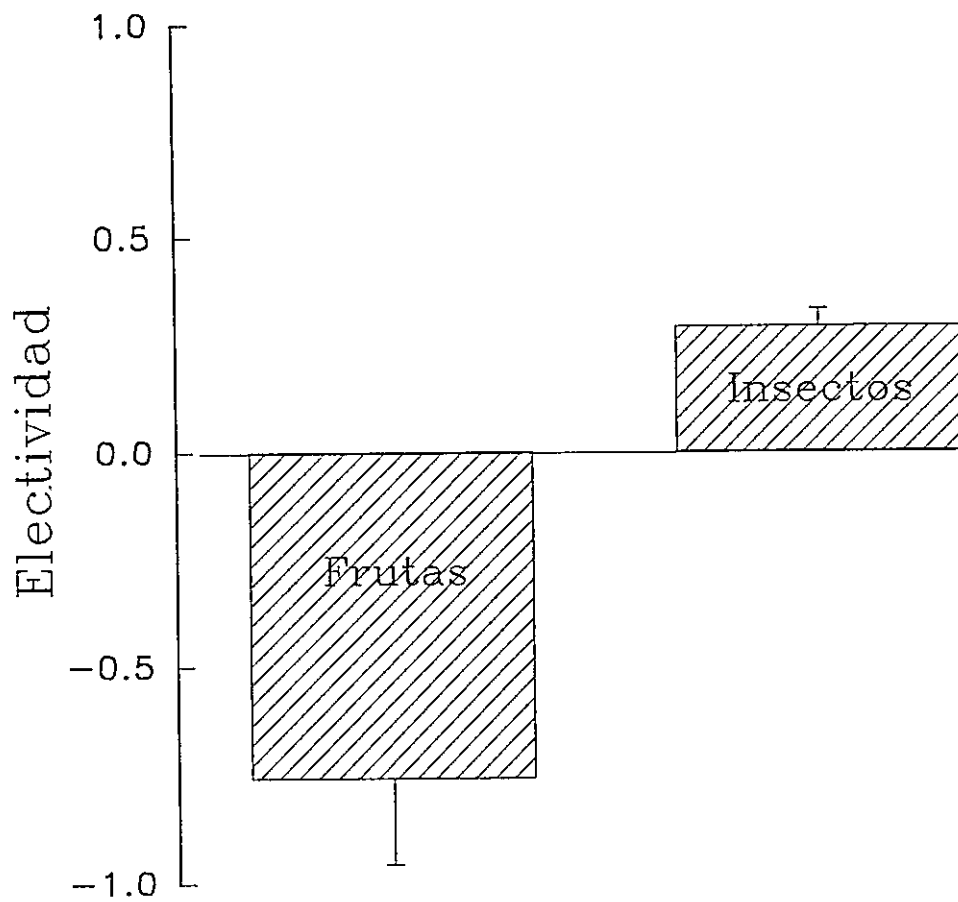


Figura 3.- Electividad de dos categorías de alimentos en individuos de *Marmosa elegans*.

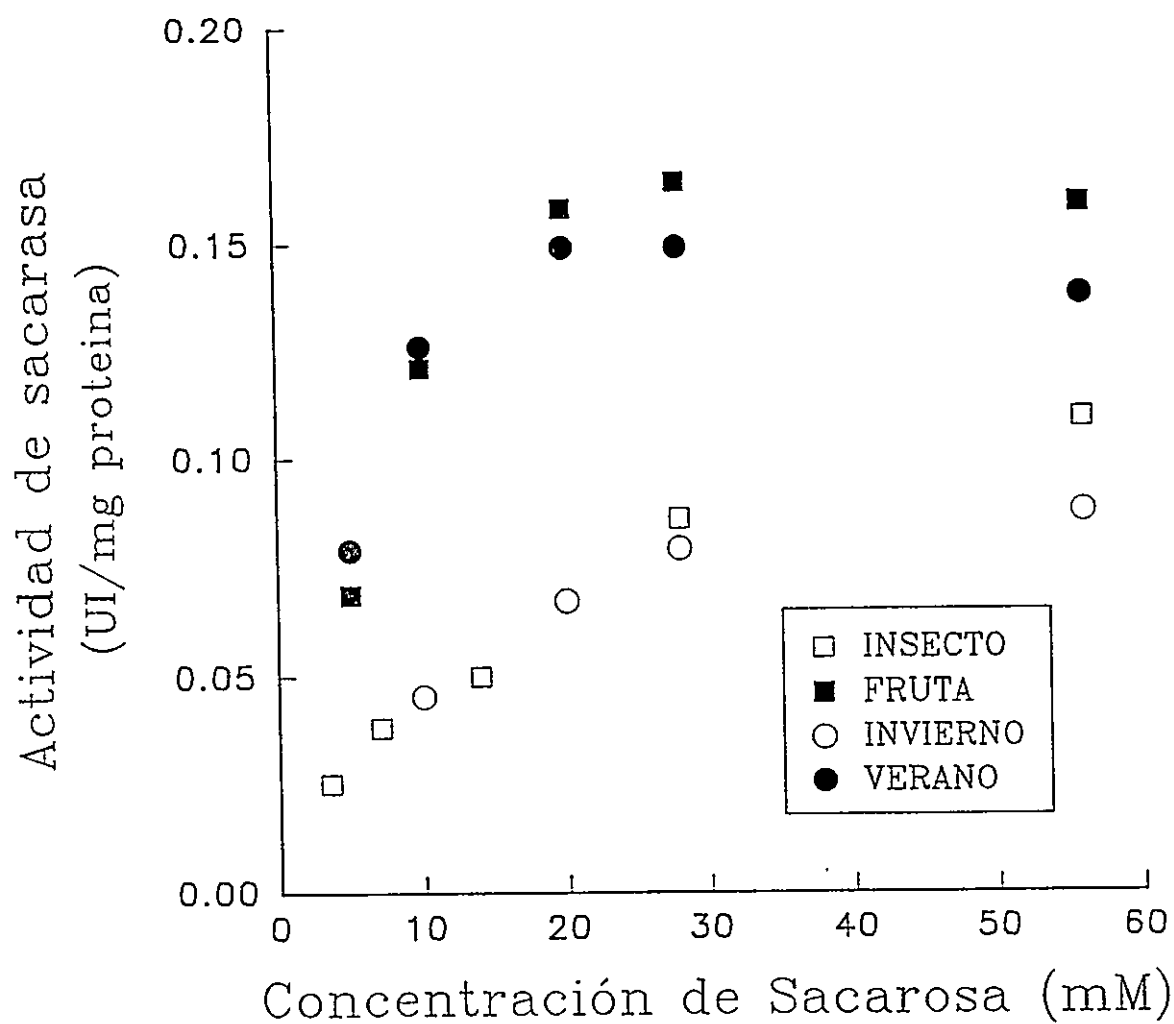


Figura 4.- Actividad de sacarasa en el homogenizado intestinal de *Marmosa elegans*, en función de la concentración de sustrato.

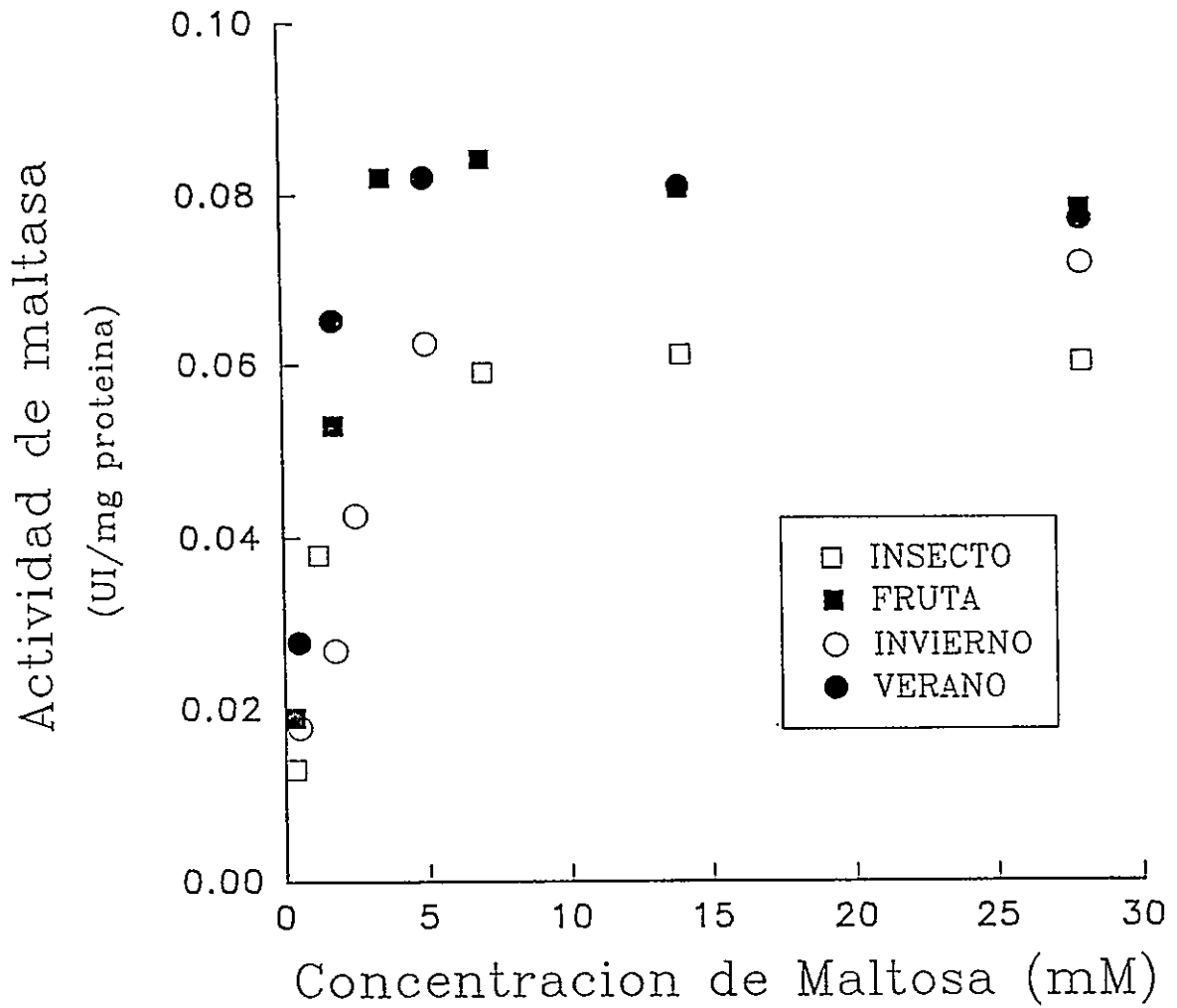


Figura 5.- Actividad de maltasa en el homogenizado intestinal de *Marmosa elegans*, en función de la concentración de sustrato.

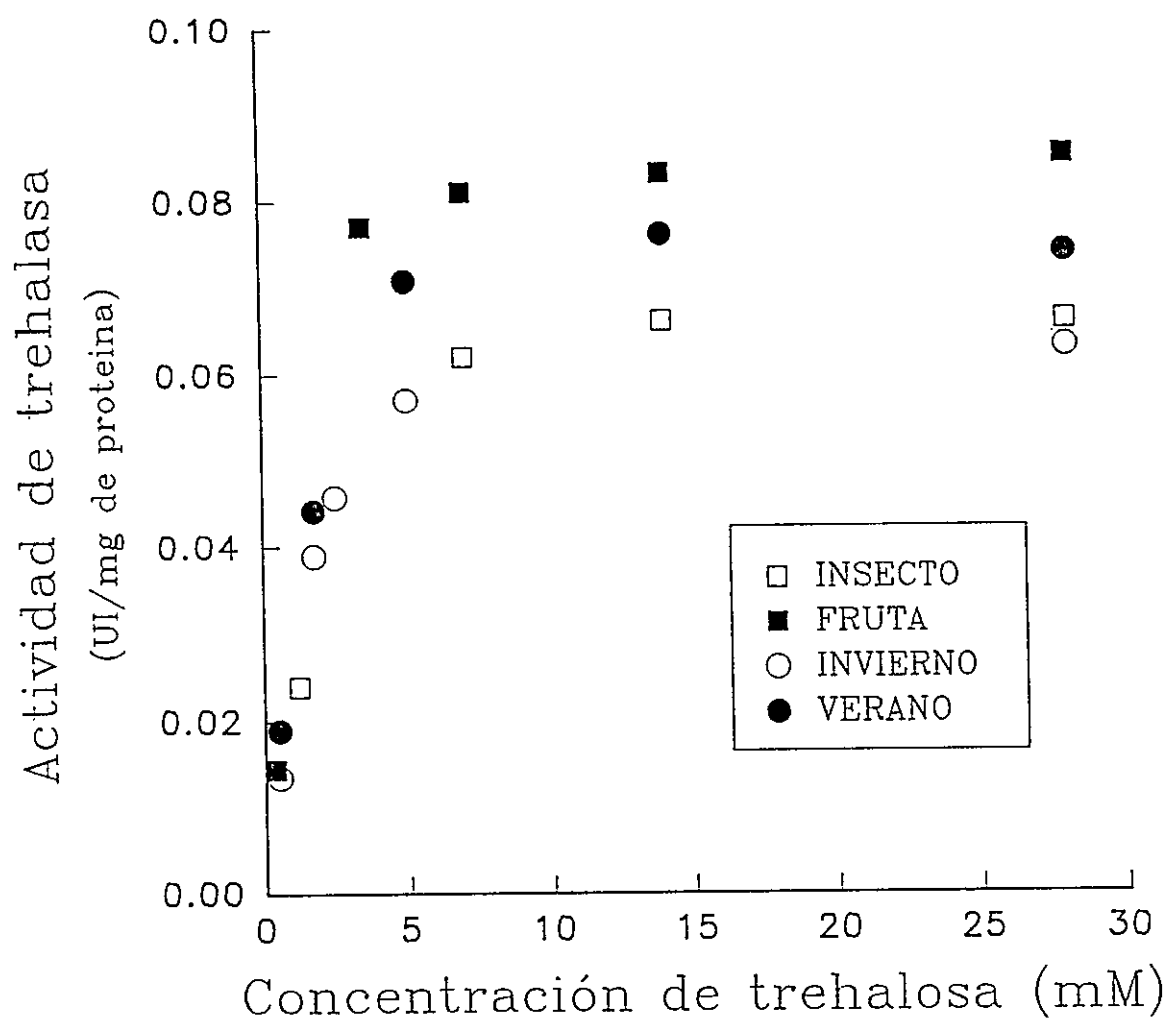


Figura 6.- Actividad de trehalasa en el homogenizado intestinal de *Marmosa elegans*, en función de la concentración de sustrato.

Los valores de K_m de sacarasa son significativamente diferentes entre los tratamientos ($H = 20.48$, $p = 0.0001$). Lo mismo ocurre con la maltasa ($H = 10.05$, $p = 0.018$), mientras que la afinidad de trehalasa no es significativamente diferente entre los tratamientos ($H = 3.94$, $p = 0.27$). Las comparaciones múltiples se muestran en la tabla 2.

Cambio Estacional

La tabla 3 muestra los valores de V_{max} y K_m de sacarasa, maltasa y trehalasa de individuos capturados en invierno y verano. La única actividad que mostró diferencias significativas fué sacarasa, que aumenta en un 78% su actividad en verano. Como se observa en la figura 7, la actividad expresada como UI/mg proteína a una concentración inicial de sustrato fija de 28 mM sigue el mismo patrón.

Efecto de la Dieta

En la tabla 4 se resumen las actividades enzimáticas de individuos sometidos a las diferentes dietas. La dieta de frutas induce un aumento de un 41% en la actividad de sacarasa, un 38% en la de maltasa y un 31% en la actividad de trehalasa, en comparación a la dieta de insectos. Al igual que en las variaciones estacionales la actividad a 28

TABLA 3.- Constantes de actividad (V_{\max}) y afinidad (K_m) de las tres enzimas estudiadas en animales de invierno y verano.

	Invierno	Verano	P

Sacarasa			
V_{\max} (UI/mg prot)	0.098 ± 0.03	0.174 ± 0.03	< 0.05
K_m (mM)	9.93 ± 2.64	3.75 ± 1.67	< 0.05
Maltasa			
V_{\max} (UI/mg prot)	0.079 ± 0.02	0.085 ± 0.01	> 0.05
K_m (mM)	1.47 ± 0.53	0.75 ± 0.08	> 0.05
Trehalasa			
V_{\max} (UI/mg prot)	0.071 ± 0.01	0.087 ± 0.02	> 0.05
K_m (mM)	1.91 ± 1.03	1.54 ± 0.73	> 0.05

Todos los valores se presentan como $X \pm DE$. N = 8 en invierno; N = 7 en verano.

TABLA 4.- Constantes de actividad (V_{\max}) y afinidad (K_m) de las tres enzimas estudiadas en animales sometidos a dietas experimentales.

DIETAS	Insectos	Frutas	P
Sacarasa			
V_{\max} (UI/mg prot)	0.135 ± 0.026	0.190 ± 0.016	< 0.05
K_m (mM)	16.81 ± 3.86	5.79 ± 4.20	< 0.05
Maltasa			
V_{\max} (UI/mg prot)	0.063 ± 0.010	0.087 ± 0.008	< 0.05
K_m (mM)	0.905 ± 0.12	0.86 ± 0.11	> 0.05
Trehalasa			
V_{\max} (UImg prot)	0.072 ± 0.008	0.094 ± 0.008	< 0.05
K_m (mM)	1.12 ± 0.45	1.36 ± 0.83	> 0.05

Todos los valores se presentan como $X \pm DE$. N = 8 en dieta de insectos; N = 6 en dieta de frutos.

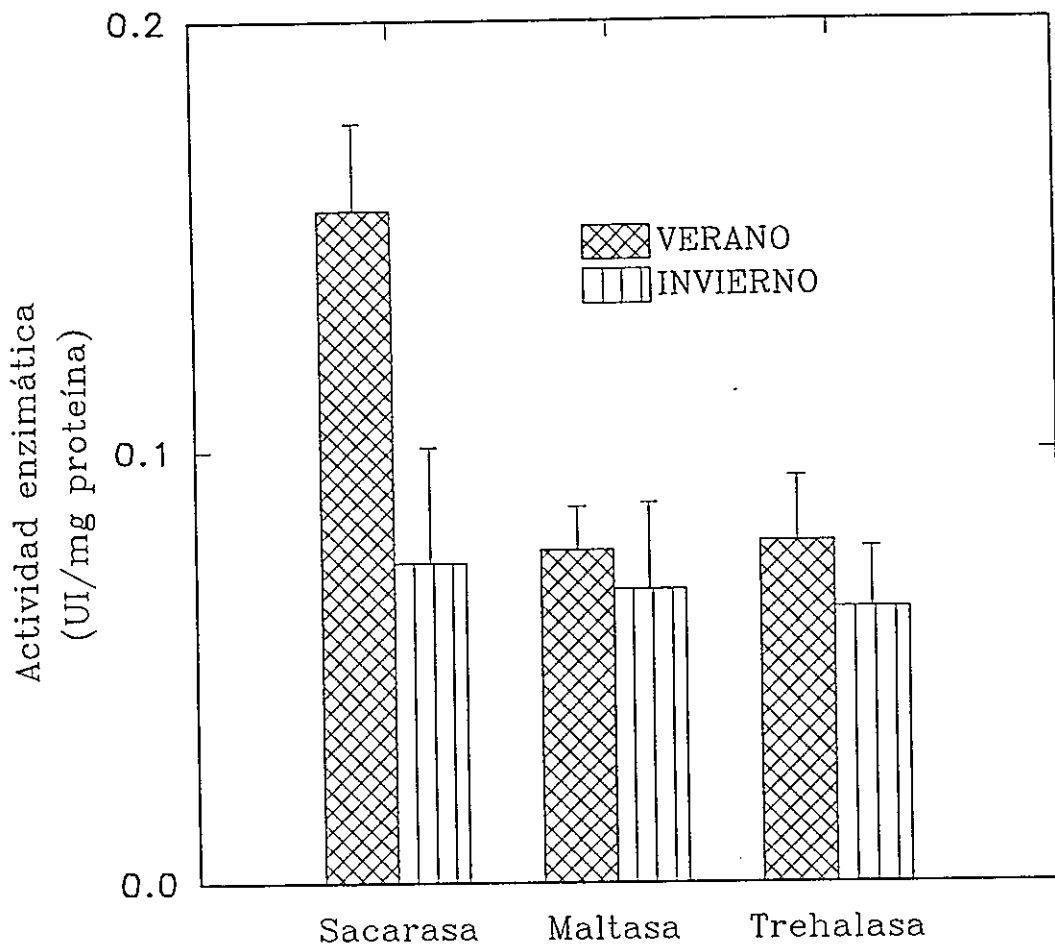


Figura 7.- Actividad enzimática estacional del homogenizado intestinal de *Marmosa elegans*, medida a una concentración de 28 mM.

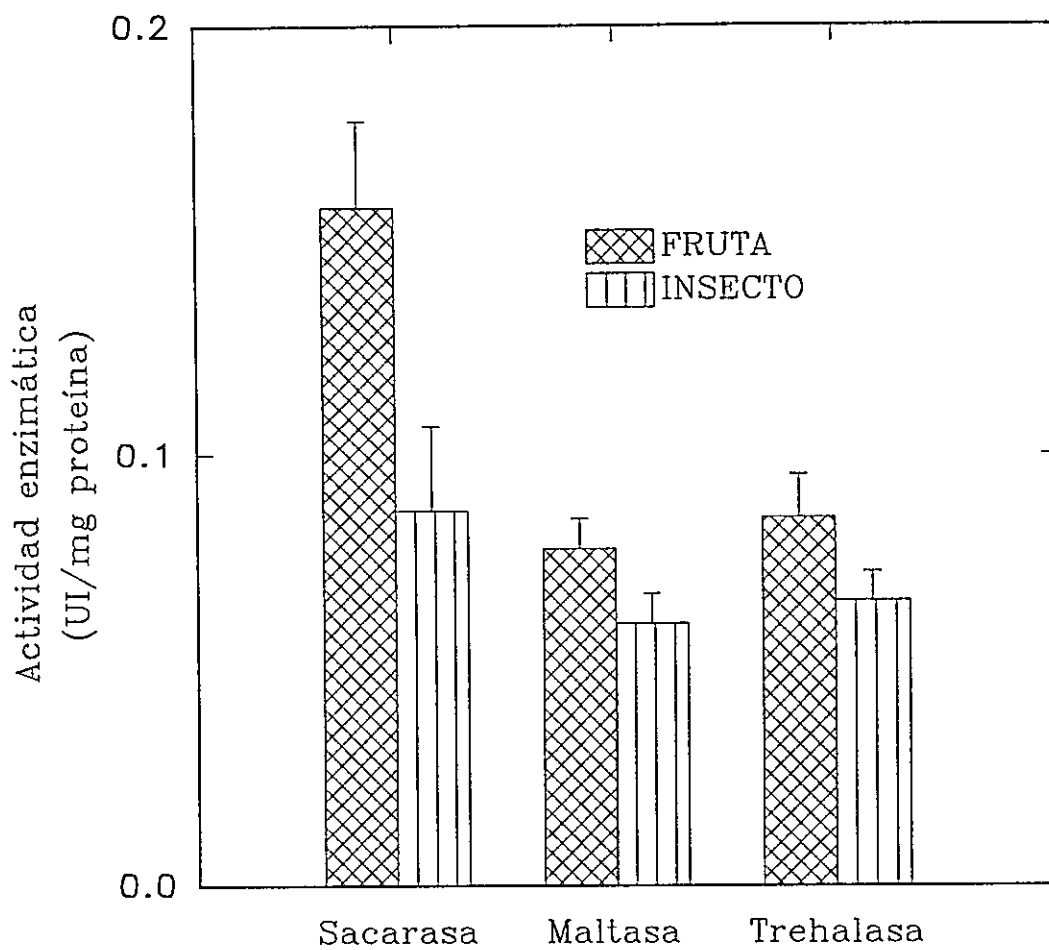


Figura 8.- Actividad enzimática según la dieta del homogenizado intestinal de *Marmosa élegans*, medida a una concentración de 28 mM.

mM de sustrato se comporta de forma similar a la V_{max} (figura 8).

Gasto Metabólico

El gasto metabólico promedio de los animales control medido a 18 °C en normotermia fué de 336.4 ± 12 cal/g día, mientras que el gasto promedio de los animales que entraron en sopor fué de 157.8 ± 23.6 cal/g día, lo que significa una reducción en el gasto energético diario de un 53% (figura 9). Estos valores concuerdan con los documentados por Rosenmann *et. al.* (1979; 1980)

Función Digestiva

La tabla 5 muestra los valores de materia y energía consumidas y egestadas por los individuos mantenidos con las dos dietas experimentales ya mencionadas. La ingesta y egesta expresada tanto en materia (peso seco), como en energía fué significativamente superior en los animales mantenidos con insectos.

La digestibilidad aparente de materia fué mayor en los animales que consumieron frutas por sobre los que consumieron insectos (91.46% y 58.9% respectivamente), aunque esta diferencia se hace menor cuando se expresa en unidades de energía (65% y 90% para insectos y frutas

TABLA 5.- Valores de materia y energía ingeridas y egestadas por *Marmosa elegans* mantenidos con dos dietas experimentales.

	DIETA		
	INSECTOS	FRUTOS	P
M_b (g)	20.09 ± 6.96	20.32 ± 4.24	> 0.05
Ingestión			
(g/día)	2.13 ± 0.22	1.09 ± 0.61	< 0.05
(Kcal/día)	9.59 ± 0.91	4.06 ± 2.28	< 0.05
Egestión			
(g/día)	0.88 ± 0.11	0.08 ± 0.04	< 0.05
(kcal/día)	3.35 ± 0.39	0.33 ± 0.17	< 0.05
Digestibilidad aparente			
Materia seca (%)	58.89 ± 3.06	91.46 ± 7.59	< 0.05
Energía (%)	65.14 ± 2.23	90.14 ± 2.89	< 0.05
Tiempo de recambio			
(h)	1.5 ± 0.76	4.26 ± 2.66	< 0.05

Todos los valores se presentan como $X \pm DE$. N = 8 en dieta de insectos; N = 7 en dieta de frutos.

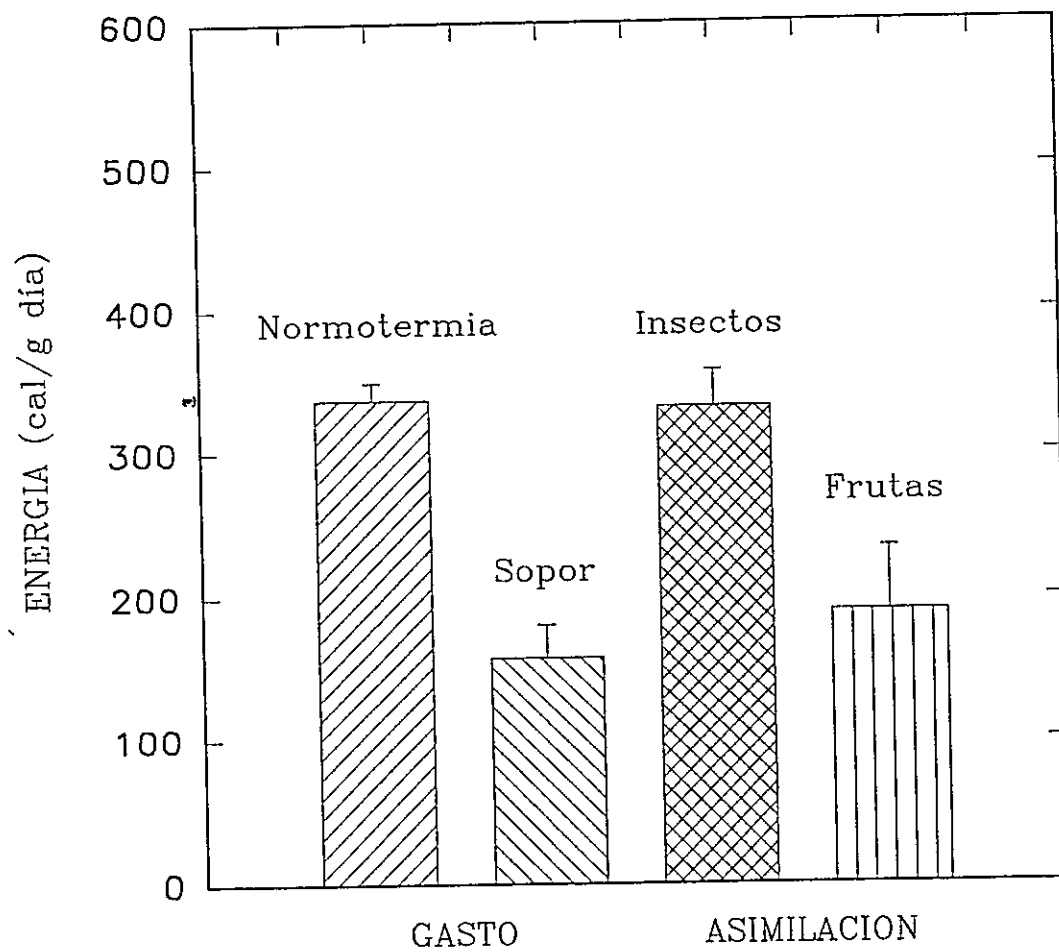


Figura 9.- Balance energético en individuos de *Marmosa elegans* sometidos a dos dietas. Los datos se obtuvieron a igual temperatura ambiente (18 °C).

respectivamente).

La asimilación neta de energía, calculada como la diferencia entre la ingesta y la egesta fué significativamente mayor en el caso de animales que fueron mantenidos con insectos (331.7 ± 25.5 cal/g día comparados con 189.8 ± 44 cal/g día. Estos valores son coherentes con el gasto metabólico en normotermia y sopor respectivamente (figura 9).

El tiempo de recambio (T) -- i.e., el tiempo promedio en que tarda en vaciarse el contenido total del tracto digestivo, calculado como: $T = [\text{Contenido del tracto}] / [\text{Tasa de Ingesta}]$; fué mayor en los animales mantenidos con frutas (4.26 ± 2.66 h versus 1.5 ± 0.76 h).

Relación entre las actividades Enzimáticas

El ANCOVA realizado para observar el efecto de los tratamientos y de la actividad sacarásica sobre la actividad enzimática de maltasa revela un efecto significativo de sacarasa ($F_{3,19} = 6.02, p < 0.05$). No existe efecto significativo de la dieta, estación o interacciones entre ambos factores. Sin embargo, debido a que los animales en invierno presentan una gran dispersión en los valores de actividad enzimática, se realizó un análisis excluyendo a este grupo. Al igual que en el caso

anterior, este análisis revela un efecto significativo de sacarasa ($F_{1,14} = 35.5$, $p < 0.001$) sobre la actividad de maltasa. No se encontró efecto significativo de la dieta, estación, o interacciones entre ambos factores ($F_{1,14} < 0.376$, $p > 0.05$). La ecuación que describe la actividad de Maltasa es la siguiente:

$$Y = 0.466X \text{ (r = 0.93, p = 0.0001)}$$

donde $Y = V_{\max}$ maltasa, $X = V_{\max}$ sacarasa (véase figura 10). Cuando los animales de invierno son nuevamente introducidos en el análisis, a pesar de no existir una diferencia significativa entre las pendientes, existe una tendencia ($0.05 < p < 0.1$) que sugiere que el punto de intersección con la ordenada, en la relación de las actividades enzimáticas de maltasa y sacarasa, sería diferente en este grupo (véase figura 11).

Un análisis de regresión lineal simple entre la actividad enzimática de sacarasa y la actividad de trehalasa, reveló que tanto la pendiente como la intersección con el eje Y son significativamente distintos de cero ($r = 0.68$, $p < 0.0001$). La ecuación que describe la actividad de trehalasa es la siguiente:

$$Y = 0.04 + 0.27X$$

donde $Y = V_{\max}$ de trehalasa y $X = V_{\max}$ de sacarasa (véase figura 12).

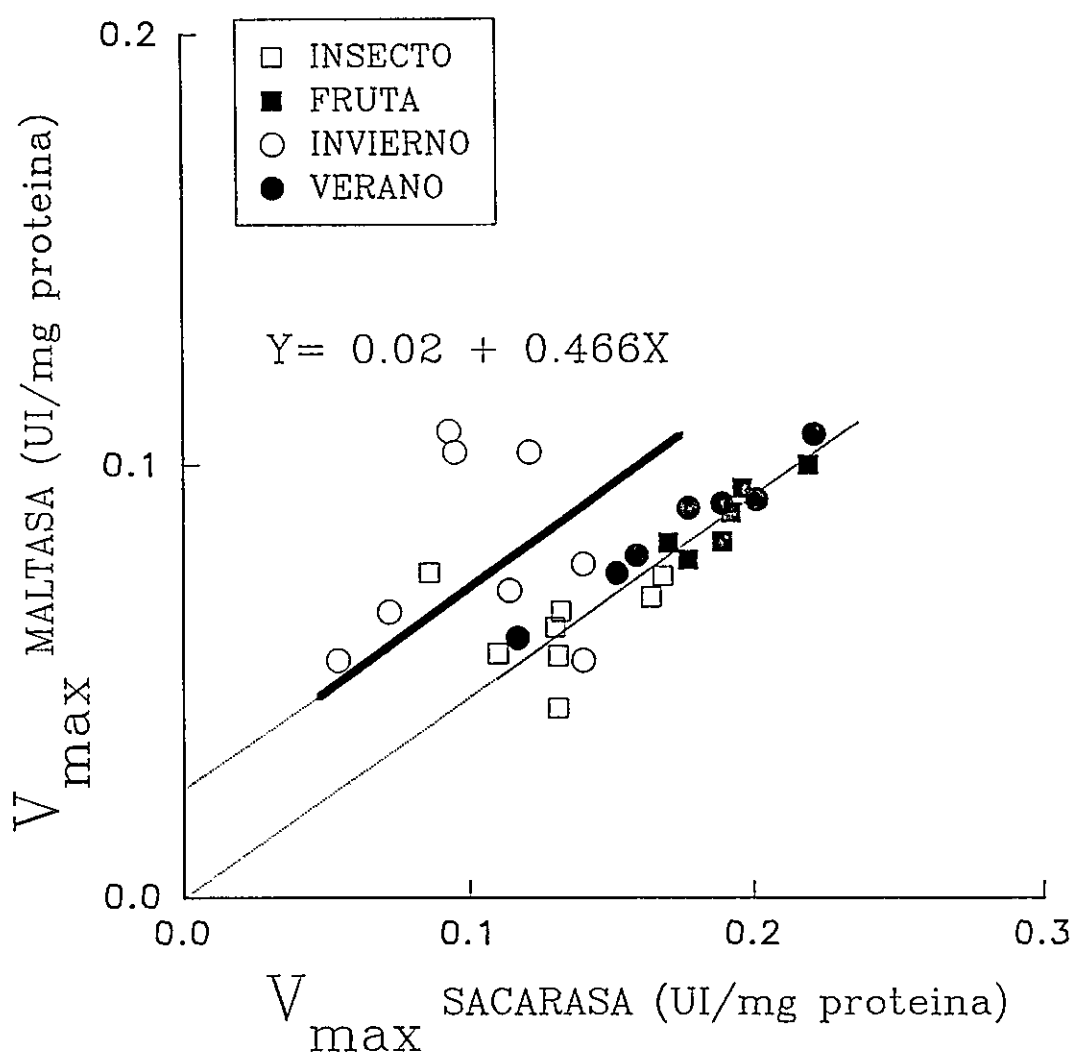


Figura 11.- Relación entre las V_{\max} de maltasa y sacarasa en *Marmosa elegans* en los tratamientos experimentales estudiados.

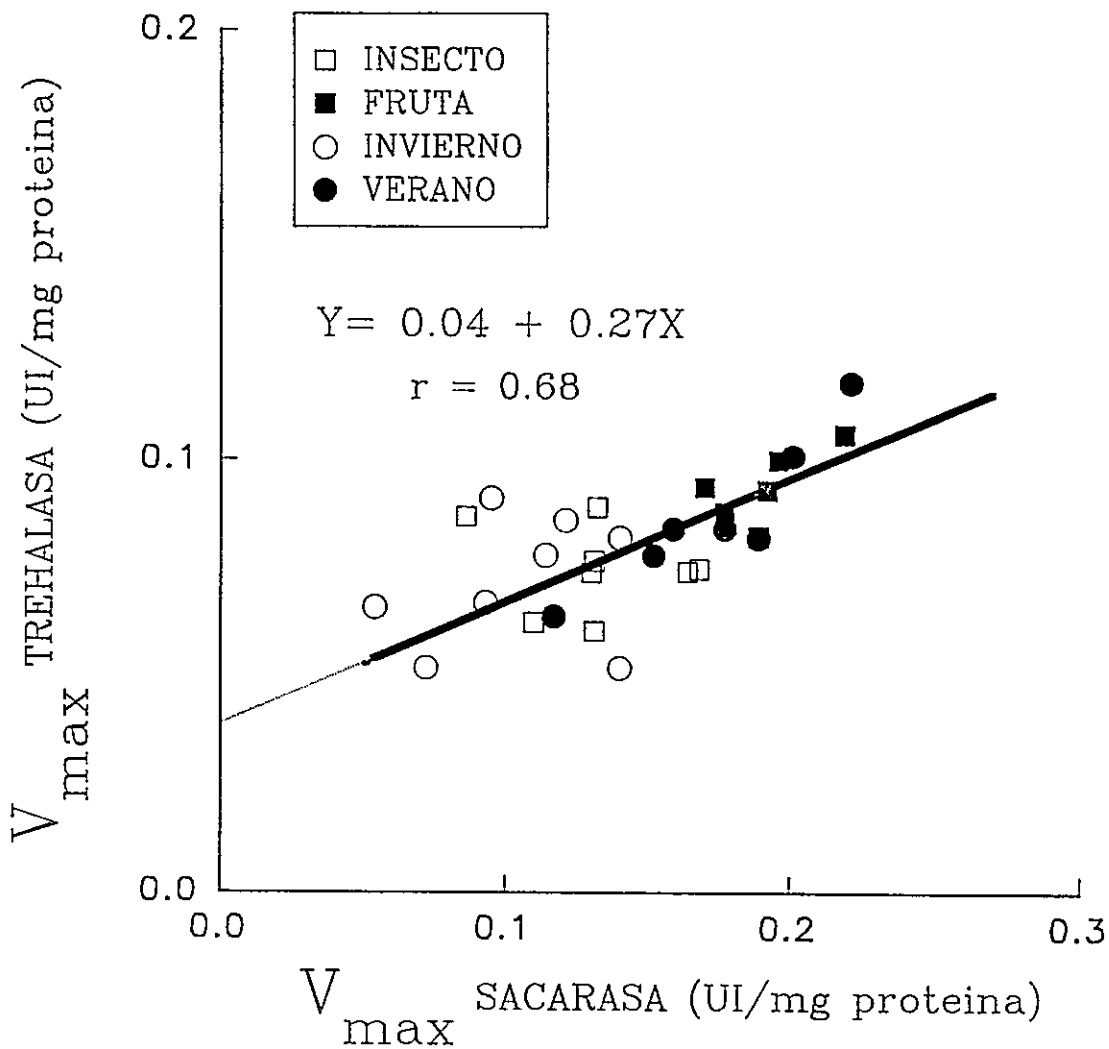


Figura 12.- Relación entre las V_{\max} de trehalasa y sacarasa en *Marmosa elegans* en los tratamientos experimentales estudiados.

DISCUSION

Niveles de Actividad Enzimática

El hecho que la actividad enzimática de trehalasa sea significativamente menor que la de sacarasa, tanto en animales recién capturados como en aquellos sometidos a las dietas experimentales, lo que se desprende de la pendiente de la regresión entre estas dos actividades (figura 12), permite rechazar las predicciones elaboradas a partir de las hipótesis de Karasov & Diamond (1988), en el sentido que el poseer o mantener una estructura molecular para hidrolizar nutrientes ausentes o poco importantes en la dieta constituye un costo biosintético inútil debiéndose eliminar por selección natural.

En efecto, la actividad de sacarasa es significativamente mayor que la actividad de maltasa y trehalasa en todos los animales estudiados y es comparable a la actividad documentada en la literatura para animales que ingieren mayoritariamente carbohidratos, incluso de grupos filogenéticamente distintos. Por ejemplo la actividad de sacarasa encontrada es comparable a la encontrada en hamster (*Cricetus cricetus*), roedor cricétido que ingiere frutos y semillas (Galluser et al. 1988), a la de la tortuga terrestre herbívora *Testudo hermanni* (Zoppi & Shmerling 1968) y a la documentada por Kerry (1969) en un marsupial herbívoro (*Trichosurus vulpecula*) (véase Stevens,

1990). Comparables, aunque mayores son los valores encontrados en aves de la familia *Trochilidae*, consumidores de néctar, recurso trófico de alto contenido en sacarosa (Martínez del Río, 1990). Otro grupo que consume altos contenidos de sacarosa en su dieta son los microquirópteros nectarívoros y frugívoros cuyos niveles de actividad sacarásica son comparables a *Marmosa elegans* (Hernandez & Martínez del Río 1993). Sin embargo, aunque la actividad de sacarasa en *M. elegans* sea importante, no es del todo inusual. Especies de marsupiales como *Antechinus stuartii* de la familia *Diasuridae*, caracterizadas como carnívoras, y *Parameles nasuta* animal insectívoro, presentan niveles similares a los encontrados en *M. elegans* (Kerry 1969).

La actividad de trehalasa de *M. elegans* es similar a la encontrada en marsupiales carnívoros e insectívoros y significativamente mayores que las de especies herbívoras y frugívoras (véase Stevens 1990). También en otros grupos, como los quirópteros, se encuentran niveles similares de actividad trehalásica. *Pteronotus personatus*, murciélago insectívoro, posee niveles de actividad similares a los de *M. elegans* y es el único que presenta esta actividad en las seis especies estudiadas por Hernández & Martínez del Río (1993). Sin embargo esta especie presenta niveles muy bajos de sacarasa y maltasa, -- i.e. casi cinco veces menores que los encontrados en los microquirópteros *Glosophaga soricina*, *Leptonictoris sanborni*, y *Artibeus jamaicensis*,

especies frugívoras y nectarívoras, respectivamente. En humanos, la actividad de trehalasa es mas baja que en *M. elegans* y no se ha detectado esta actividad en carnívoros como el león (*Felix leo*) y el gato (*Felix catus*) (Kerry 1969). Otros carnívoros como el perro (*Canis familiaris*) y un mustélido (*Mustela putorius*) presentan actividades comparativamente mas bajas que *M. elegans* y otras especies de insectívoros (Hore & Messer 1967).

Con respecto a la actividad enzimática de maltasa, los patrones son menos claros. Si bien la actividad de esta enzima es mínima en aves marinas carnívoras (Kerry 1969), el nivele detectado en *M. elegans* es muy similar al encontrado en el homogenizado de mucosa intestinal de *Sturnus vulgaris*, ave europea que incluye frutas como importante componente estacional de su dieta (Martinez del Río & Stevens 1989). Además, la actividad de maltasa es comparable a la actividad encontrada en el koala (*Phascolarctos cinereus*), especie folívora especialista, e incluso mayores que las documentadas para el canguro *Macropus giganteus*, animal herbívoro. Sin embargo, las actividades de estas enzimas son menores que las detectadas en marsupiales carnívoros e insectívoros y el hombre (Kerry, 1969; Stevens, 1990).

Sin embargo no es del todo sorprendente encontrar esta actividad en animales carnívoros. Los altos o

moderados niveles de maltasa pueden encontrarse en el tracto digestivo de estos organismos como producto de la hidrólisis de glicógeno presente en tejidos animales (Stevens, 1990).

Al parecer entonces, es mas estrecho el correlato de la actividad de trehalasa con la dieta, que la de sacarasa. Existen varios factores que podrían explicar la presencia de disacaridasas en organismos carnívoros/insectívoros. La ausencia de disacaridasas en el tracto digestivo de un animal que ingiere azúcares puede generar un cuadro de diarrea osmótica asociada a malabsorción de carbohidratos, resultando incluso letal para el organismo (Rey & Frezal 1967). Esto sugiere que la presencia de disacaridasas en animales estrictamente carnívoros puede constituir un mecanismo de defensa frente a la ingesta casual u ocasional de presas no animales ricas en disacáridos, o bien por la presencia de carbohidratos en el tracto digestivo de las presas animales (ver Reeder, 1970).

Cambio Estacional y Efecto de la Dieta

De las tres actividades enzimáticas estudiadas, la actividad de sacarasa es la única que evidencia un cambio estacional significativo. En efecto, esta actividad tanto expresada como V_{max} (tabla 3) o como actividad a 28 mM (figura 7), es mayor en verano. Paralelamente, debido a que

las actividades enzimáticas son moduladas por la composición química de la dieta (tabla 4, figura 8), el aumento en la actividad de sacarasa en verano estaría correlacionado con un aumento en la ingesta de frutos en esta temporada, es decir, por un efecto directo de la dieta.

Resulta interesante que las actividades enzimáticas sean modulables fenotípicamente en esta especie principalmente carnívora/insectívora. Según Diamond & Buddington, (1987) las características digestivas serían rígidas en las especies carnívoras y no podrían ser moduladas por el sustrato dietario. Claramente, esta hipótesis no puede ser extensiva a todas las características fisiológicas digestivas, y estaría restringida al fenómeno de transporte de nutrientes por las células epiteliales del intestino delgado (Diamond & Buddington, 1987; Buddington *et al*, 1987). Por otro lado, según el principio de diseño económico idealizado o simorfosis (Taylor & Weibel, 1981), en una cadena de transformación no debieran existir pasos intermedios que sean limitantes. Esta hipótesis no se verificaría si este animal fuera incapaz de regular el transporte intestinal de glucosa junto con la regulación de la actividad de disacaridasas observada. Efectivamente, un aumento en la hidrólisis de disacáridos generaría un aumento en la concentración de glucosa libre disponible en el intestino,

la que no podría ser ingresada al organismo en forma eficiente al mantenerse constante el transporte intestinal.

Desde esta perspectiva, es probable que la hipótesis planteada por Diamond & Buddington (1987) a partir de datos de transporte de nutrientes en peces, esté restringida a solo algunas especies carnívoras, siendo esta hipótesis de poco valor heurístico.

Regulación y Relación de Actividades Enzimáticas

Los datos obtenidos en las dos estaciones, como en los individuos aclimatados a dietas específicas, indican que la modulación de las actividades enzimáticas sería una respuesta directa a la dieta. Sin embargo, es poco claro el hecho que la actividad de maltasa sea tan alta en invierno, temporada en la cual la actividad de sacarasa está más deprimida (véase la tabla 3). Como la actividad de sacarasa es más alta en verano que en invierno, no así la de maltasa, es posible pensar en la presencia de isoenzimas que posean actividad maltásica, cuyos mecanismos de regulación podrían ser independientes al de sacarasa. Un aumento en estas isoenzimas compensarían la pérdida o no expresión de la actividad debido a los bajos niveles de sacarasa-isomaltasa en las membranas.

Como se mostró en la sección de resultados, la pendiente de la relación entre la actividad de maltasa y la de sacarasa es 0.466 (figura 10 y 11). Este hecho es diferente a lo documentado para otros mamíferos, como quirópteros (Hernandez & Martínez del Río, 1992), primates (Welsh & Walker, 1973) y aves (Martinez del Río, 1990). En todos estos estudios la pendiente es siempre positiva (los valores oscilan entre 2 y 3), y el intercepto con el eje de las ordenadas es un estimador de la actividad de maltasa que es independiente del complejo sacarasa-isomaltasa. Esta actividad estaría dada por la presencia del complejo maltasa-glucoamilasa (Galand, 1989; Prosser, 1991).

Dado que la pendiente de la relación entre maltasa y sacarasa en *M. elegans* es mas baja, este hecho sugiere que el complejo sacarasa-isomaltasa en esta especie posee una menor actividad maltásica que lo documentado para otras especies. Además, la intersección con la ordenada, de esta relación, no es significativamente diferente de cero, sugiriendo que estos animales no presentan la actividad del complejo maltasa glucoamilasa. Sin embargo, se ha visto que los animales en invierno muestran una tendencia diferente a los otros tres grupos de individuos. La figura 11 muestra que el punto de intersección al eje de las ordenadas en este grupo sería diferente a cero, lo que indicaría que estos sí presentarían actividad de maltasa independiente del complejo sacarasa-isomaltasa. Esta actividad sería el

resultado de la presencia del complejo maltasa-glucoamilasa, lo que estaría dando cuenta de los niveles elevados de maltasa en invierno, comparable a los niveles encontrados en verano (véase tabla 2). Otro dato que refuerza esta idea es que las características bioquímicas de maltasa en invierno son diferentes, como se deduce del hecho que la afinidad por el sustrato es significativamente menor (mayor K_m) que la de los otros grupos estudiados (tabla 2, 3 y 4).

Al igual que lo sucedido con la actividad de sacarasa, la modulación de la actividad de maltasa-glucoamilasa (u otra maltasa) podría estar asociada a cambios en la composición química de la dieta. Como se ha dicho, el disacárido que es hidrolizado por maltasa (maltosa) puede provenir de tejidos vegetales y animales, en forma de polisacáridos complejos como el almidón y glicógeno. Así, los animales en la temporada de invierno podrían estar consumiendo mayor cantidad de estos sustratos, los que podrían activar o inducir la producción de este complejo enzimático en las células epiteliales del intestino delgado. El mayor tamaño corporal de estos individuos (tabla 1) probablemente tenga implicancias sobre la dieta natural de los individuos. Individuos mas grandes podrían tener acceso a presas animales mayores como pequeños reptiles, mamíferos y aves (Mann, 1978), presas con altos contenidos de glicógeno, -i.e. sobre el 2% del

peso fresco de músculos y del 10% del hígado (Lehninger, 1982).

La gran variabilidad encontrada en los niveles de maltasa en animales de invierno podría deberse a una mayor sensibilidad de los mecanismos de regulación de la expresión del complejo maltasa-glucoamilasa, de manera que la historia inmediata de alimentación tendría una importancia crucial. De esta forma, aquellos animales que hubiesen consumido recientemente algunas presas ricas en glicógeno, mostrarían niveles de maltasa significativamente mayores.

El hecho que la K_m de sacarasa muestre variación, tanto estacional como debido a la dieta, plantea la posibilidad de que existan isoenzimas del complejo sacarasa-isomaltasa. Los valores de esta constante son menores en aquellos tratamientos en que la V_{max} es mayor, es decir en verano y en los animales aclimatados a la dieta de frutas. Estos resultados no concuerdan con lo encontrado por Martínez del Río (1990), quien descubrió una correlación positiva entre K_m y V_{max} en algunas especies de aves. Este fenómeno se debería al efecto que tiene sobre la actividad enzimática la existencia de membranas celulares no agitadas en el procedimiento experimental. Para el caso de *M. elegans* es probable que este efecto no se aprecie, y que las diferencias en los parámetros cinéticos de este

complejo enzimático se deban precisamente a diferentes formas enzimáticas que podrían ser inducidas por la composición química de la dieta. Sin embargo, existe la posibilidad que, manteniéndose las formas enzimáticas, sus propiedades bioquímicas sean afectadas por algún tipo de efector que produzca modificaciones alostéricas en la enzima, como es el caso de varias enzimas del metabolismo aeróbico (Stadtman & Chock, 1978).

La única enzima que mantiene invariable su K_m es trehalasa. Sin embargo, aunque la V_{max} es modulada por la dieta la actividad es menor en los animales que ingieren el sustrato específico, trehalosa en los insectos. Esto plantea un problema adicional. ¿Por que la actividad de sacarasa y maltasa se ven potenciadas en función de sus sustratos específicos y no así los de trehalasa?; ¿Son los mecanismos de regulación y expresión enzimática de estas disacaridasas independientes?

La figura 11 muestra la relación ente la actividad de sacarasa y trehalasa, observándose que existe una directa correlación entre estas dos actividades. Probablemente la expresión de ambas enzimas estén sujetas a un único mecanismo de regulación, el cual sería sustrato dependiente, para este caso, sacarosa. Así, el complejo sacarasa-isomaltasa y trehalasa se expresarían juntos, como ha sido documentado en ratas sometidas a tratamientos

hormonales (Galand, 1989).

Tomando en cuenta que en algunos casos las características bioquímicas de las disacaridasas de *M. elegans*, como por ejemplo la actividad relativa de maltasa y sacarasa (expresada como la pendiente de la relación entre las actividades de estas dos enzimas) son diferentes a lo documentado en otros taxa, apoya y extiende la hipótesis en el sentido de que tanto la regulación de la expresión enzimática como las formas moleculares involucradas en ella, no sean únicas ni comunes en todos los vertebrados (Martinez del Río & Stevens, 1988). Esfuerzos posteriores, como aislación, purificación y caracterización de proteínas, son muy necesarios para determinar si efectivamente *Marmosa elegans* posee enzimas diferentes a las encontradas en otros mamíferos como también isoenzimas, que den cuenta de las actividades de sacarasa y maltasa.

Energética y Digestión

La digestibilidad aparente, en términos de materia y/o energía es mayor en los animales que consumen frutas artificiales. Sin embargo, la asimilación neta es menor, puesto que la ingesta de fruta (dulce de membrillo y camote) es menor que la ingesta de insectos. El tiempo de recambio del contenido intestinal juega en este caso un rol

importante. Si bien un tiempo de recambio mayor (tiempos de tránsito del alimento menor) se traduce en una mayor digestibilidad, esto obliga al animal a reducir su tasa de ingesta con lo cual se reduce también su asimilación neta. Esto se traduce en que los animales aclimatados a una dieta exclusiva de frutas, asimilen una cantidad de energía tal que les impide satisfacer los costos de mantención diario promedio en eutermia, y sólo puedan mantener los niveles de gasto promedio en condiciones de sopor (figura 9). Por el contrario, los animales sometidos a una dieta de insectos, asimilan tanta energía como la necesaria para su mantención en eutermia (figura 9).

Modelo Explicativo

Esta proposición mecanicista, basada en observaciones de laboratorio, en la que se han utilizado algunas situaciones artificiales (e.g. dieta de frutos), ayuda a entender los procesos de alimentación y mecanismos de digestión en esta especie, y realizar predicciones hacia situaciones naturales. A pesar que evidentemente *Marmosa elegans* posee la capacidad hidrolítica para digerir y asimilar la energía contenida en los disacáridos, este animal poseería restricciones de diseño en su aparato digestivo tales que permiten explicar los procesos de alimentación observados en condiciones naturales.

Así, y como ocurre en aves frugívoras (véase Karasov

& Levey 1990), los tiempos de tránsito cortos, producto del gran contenido de material refractario a la digestión de los frutos silvestres, unido a un área y tamaño pequeño del tracto digestivo de esta especie (figura 2), impedirían la hidrólisis eficiente de azúcares y su posterior transporte intestinal incluso en presencia de las enzimas específicas. En efecto, un tiempo de tránsito corto del alimento a través del tracto digestivo, no proveería el tiempo necesario para procesar sustratos que deben ser primero hidrolizados por enzimas digestivas para luego ser transportados hacia el interior de las células de la mucosa intestinal.

Luego, desde la perspectiva de la fisiología ecológica, postulo que las preferencias tróficas de *M. elegans* podrían ser explicadas por la elección de nutrientes cuya asimilación sea más eficiente (véase figura 13). Esta hipótesis es apoyada por el experimento de preferencia trófica efectuado en los individuos de *Marmosa elegans* los cuales prefieren insectos por sobre frutos (figura 3). Mis observaciones indican que *M. elegans* es incapaz de sobrevivir sólo con fruta por un largo tiempo (no más de unos pocos días), lo cual sugiere que esta especie requiere otros nutrientes esenciales en su dieta, como por ejemplo, lípidos y aminoácidos esenciales. Sin embargo, este animal sometido a una dieta exclusiva de fruta, no la rechaza, lo que probablemente se relaciona con

la explotación de frutos como recurso energético en períodos que signifiquen un cuello de botella nutricional. Con respecto a este punto, cabe hacer notar la dificultad que encierra definir el límite de carnivoría/insectivoría y omnivoría. En el caso de marsupiales como *M. elegans* esto se debe, al menos en parte, a la ausencia de información suficientemente detallada de la ecología de campo e historia natural del animal. De acuerdo con Hume (1984) las técnicas usuales para determinar el contenido estomacal no permiten un grado de resolución tal que sea posible establecer las proporciones relativas de los diferentes ítems tróficos consumidos. Por otro lado, si se desea contribuir en forma significativa a los aspectos teóricos y aplicados del forrajeo y digestión animal, pienso que es mucho más importante determinar la composición química de los recursos tróficos, mas que el origen de éstos. Esto permite establecer tanto correlaciones válidas entre las características digestivas de los organismos y su dieta natural, como las implicancias evolutivas de tales características.

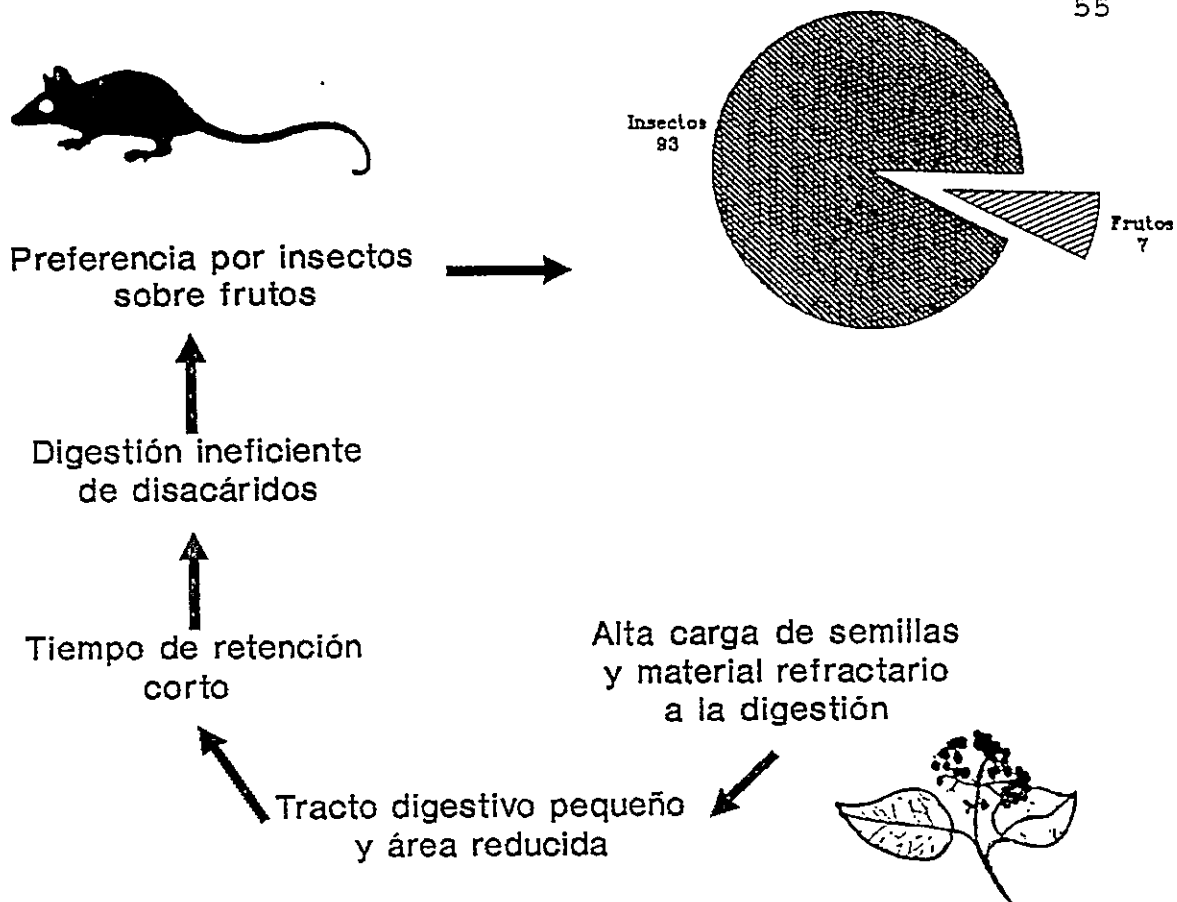


Figura 13.- Modelo explicativo de los procesos de alimentación en *Marmosa elegans*.

LITERATURA CITADA

BELL, G.P. (1990) Birds and mammals on an insect diet: a primer on diet composition analysis in relation to ecological energetics. In: 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 601-604

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. *Physiol. Zool.* 65: 000- 000.

BOZINOVIC, F., F.F. NOVOA & C. VELOSO (1990) Seasonal changes in energy expenditure and digestive tract of *Abrothrix andinus* in the Andes range. *Physiol. Zool.* 63: 1216-1231.

BOZINOVIC, F. & S.J. ITURRI (1991) Seasonal changes in glucose and tyrosine uptake of *Abrothrix andinus* (Cricetidae) inhabiting the Andes range. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A: 437-440.

BOZINOVIC, F. & J.A. SIMONETTI (1992). Thermoregulatory constraints on the microhabitat use by cricetid rodents in central Chile. *Mammalia* 56: 363-369.

BUDDINGTON, R.K., J.W. CHEN & J.M. DIAMOND (1987) Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393:261-281.

CRANE, R. K. The physiology of the intestinal absorption of sugars. In: *Physiological effects of food carbohydrates*. Washington D.C. Am. Chem. Soc., 1975.

DALQVIST, A. (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. *Ann. Biochem.* 7: 18-25.

DIAMOND, J.M. (1986) Why do disused proteins become genetically lost or repressed?. *Nature* 321:565-566.

DIAMOND, J.M., & R.K. BUDDINGTON (1987) Intestinal nutrient in herbivores and carnivores. In: *Comparative Physiology: Life in Water and on Land* (P. Dejours, L Bolis, C.D. Taylor, E.R. Weibel). Fidia Research Series, Volume 9. Liviana Press, Springer. Verlag.;556 pp.

- DIAMOND, J.M. (1991) Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but too much. *News Phys. Sci.* 6: 92-96
- DIAMOND, J.M. & K. HAMOND (1992) The matches achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia* 48:551-557.
- DEREN, J.J., S.A. Broitman & N. Zamchek (1967) Effect of diet upon intestinal disaccharidases and disaccharide absorption. *J. Clin. Inv.* 46:186-195.
- DYKHUIZEN, D. (1978) Selection for tryptophan auxotrophs of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats as a test of the energy conservation hypothesis of evolution. *Evolution* 32:125-150.
- GALLUSER, M., F. RAUL & B. CANGUILLHEM (1988) Adaptation of intestinal enzymes to seasonal and dietary changes in a hibernator: the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J. Comp. Physiol.* 158B: 143-149.
- GANS, C. (1979) Momentarily excessive construction as the basis for protoadaptation. *Evolution* 33: 227-233.
- GALAND, G. (1989) Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 1-11.
- GARLAND, T. & R.B. HUEY (1987) Testing symmorphosis: does structure match functional requirements. *Evolution* 41: 1404-1409.
- GLANZ, W. (1977) Comparative ecology of small mammals communities in California and Chile. Ph.D. diss. University of California, Berkeley.
- HENNING, S.J. (1981) Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am. J. Physiol.* 241G: 199-214.
- HERNANDEZ, A. & C. MARTINEZ DEL RIO (1992) Intestinal disaccharidases in five species of Phyllostomid bats with contrasting feeding habits. *Comp. Biochem. Physiology* 103B: 105-111
- HOCHACHKA P. W. & N. SOMERO (1984) Biochemical adaptation. Princeton University Press, Princeton 538 pp.
- HORE P. & M. MESSER (1968) Studies on disaccharidase activities of the small intestine of the domestic cat and other carnivorous mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 717-

725.

HUME, I.D. (1982) Digestive physiology and nutrition of marsupials. Cambridge University Press. Cambridge. 256 pp.

IVLEV, V.S. (1961) Experimental ecology of the feeding of fishes. Yale University Press, New Haven, Conn.

KARASOV, W.H. (1987) Nutrient requirements and the design and function of guts in fish, reptiles, and mammals. In: Comparative Physiology: Life in Water and on Land (P. Dejours, L. Bolis, C.D. Taylor, E.R. Weibel). Fidia Research Series, Volume 9. Liviana Press, Springer. Verlag. ;556 pp.

KARASOV, W.H. & J.M. DIAMOND (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* 38: 602-611.

KARASOV, W.H. & D.J. LEVEY (1990) Digestive trade-offs and adaptations of frugivorous birds. *Physiol. Zool.* 63: 1248-1270.

KERRY, K.R. (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). *Comp. Biochem. Physiol.* 29: 1015-1022.

KERRY, K.R. & M. MESSER (1968) Intestinal Glicosidases of three species of seals. *Comp. Biochem. Physiol.* 25: 437-446.

KIRSCH, J.A., R.E. BLEIWEISS, A.W., DICKERMAN & O.A., REIG (1993) DNA/DNA hybridization studies of carnivorous Marsupials. III. Relationships among Species of *Didelphis* (Didelphidae). *J.Mamm. Evol.* 1: 75-97.

LEHNINGER, A.L. (1982) Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, 1011 pp.

LEVEY J. D. & GRAJAL A. (1991) Evolutionary implications of fruit-processing limitations in cedar waxwings. *Am. Nat* 138: 171-189.

LOPEZ-CALLEJA, M.V. & M. DIAZ-BARRAZA (1991) Comportamiento trófico del *Zonotrichia capensis* (Paseriformes) y fluctuación temporal en la disponibilidad de alimento. *Arch. Biol. Med. Exper.* 24:R197.

MANN, G. (1978) Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana: Zoología*, 40: 1-342.

MARTINEZ DEL RIO, C. (1990) Dietary and phylogenetic correlates of intestinal sucrase and maltase activity in

birds. *Physiol. Zool.* 63: 987-1011.

MARTINEZ DEL RIO, C. & B.R. STEVENS (1988) Intestinal Brush border membrane-bound disaccharidases of the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B: 751-754.

MARTINEZ DEL RIO, C. & B.R. STEVENS (1989) Physiological constraint on feeding behavior: intestinal membrane disaccharidases of the starling. *Science* 243: 794-796.

MARTINEZ DEL RIO, C., H. G. BAKER & I. BAKER (1992) Ecological and evolutionary implications of digestive processes: bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Experientia* 48: 544-550.

MESERVE, P.L. (1981) Trophic relationship among small mammals in a Chilean semiarid thorn scrub community. *J. Mamm.* 62: 304-314.

MESERVE, P.L. & W. GLANZ (1978) Geographical ecology of small mammals in the northern Chilean arid zone. *J. Biogeo.* 5: 135-148.

MESERVE, P.L., B.K. LANG & B. PATTERSON (1988) Trophic relationships of small mammals in a Chilean temperate rainforest. *J. Mamm.* 69: 721-730.

MONTENEGRO, G., G. AVILA, M.E. ALJARO, R. OSORIO & M. GOMEZ (1989) Chile. In: *Plant Pheno-morphological Studies in mediterranean type ecosystems*. G Orshan (ed.). Kluwer Acad. Press, Dordrecht.

MORRISON, P. (1951) An automatic manometer respirometer. *Rev. Sci. Instrum.* 22: 264-267.

MUÑOZ-PEDREROS, A., R. MURUA & L. GONZALEZ (1990) Nicho ecológico de micromamíferos en un agroecosistema forestal de Chile central. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 63: 267-277.

PETERSON, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Chem.* 83: 346-356.

PROSSER, C.L. (1991) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss New York.

RAUL, F., P.M. SIMON, M. KEDINGER, J.F. GRENIER & K. HAFFEN (1978) Sucrase and lactase synthesis in suckling rat intestine in response to substrate administration. *Biol. Neonate.* 33: 100-105.

REEDER W.G. (1970) The digestive system. En *Physiology of Amphibia*, Moore, J., Editor; Academic Press, New York, pp

136.

REY J. & J FREZAL (1967) Les anomalies des disaccharidases. Archives Francaises de Pediatrie. 24: 65-101.

ROSENMAN M. & P. R. MORRISON (1974) Metabolic response of highland and lowland rodents to simulated high altitudes and cold. Comp. Biochem. Physiol. 510: 523-530.

ROSENMAN, M., G. RUIZ , A. CORTEZ & A. CERDA (1979) Termoregulación en *Marmosa elegans*. Arch. Biol. Med. Exp. 12:541.

ROSENMAN, M., P. BARAHONA & L. CONTRERAS (1980) Metabolismo energético y sopor en *Marmosa elegans*. Arch. Biol. Med. Exp. 13:105

SABAT, P., F. BOZINOVIC Y F. ZAMBRANO. (1993) Insectivoría en *Marmosa elegans* (marsupicarnívora): ¿una restricción fisiológica-evolutiva? Rev. Chil. Hist. Nat. 66: 87-92.

STADTMAN, E.R. & P.B. CHOCK (1978) Interconvertible Enzyme Cascades in metabolic regulation. Curr. Top. Cell. Regul. 13:53-95.

STEEL, R.G. & J.H. TORRIE (1985) Bioestadística: principios y aplicaciones. McGraw-Hill, Bogotá, Colombia. 662 páginas.

STEVENS, C.E. (1990) Comparative Physiology of the vertebrate digestive system. Cambridge university Press, Cambridge. 300 pp.

TAYLOR C.R. & E.R. WEIBEL (1981) Design of the mammalian respiratory system. I. Problem and strategy. Respir. Physiol. 44: 1-10.

TOLOZA E. M., M. LAM & J DIAMOND (1991) Nutrient extraction by cold-exposed mice: a test of digestive safety margins. Am. J. Physiol. 261: G608-G620

VONK, H.J. & J. R. WESTERN (1984) Comparative Biochemistry and Physiology of enzymatic digestion. Academic Press, London.

WALL, J.C. & D.S. BAILEY (1985) Two-dimensional isoelectric focussing/sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoretic mapping and some molecular characteristics of the proteins of the adult guinea-pig small intestinal microvillus membrane. Bioch. Bioph. Acta 815: 175-183.

WELSH, J.D. & A.W. WALKER (1973) Intestinal disaccharidase activity of non-human primates-II. Lorisidae, Hapalidae, Cebidae. Comp. Biochem. Physiol. 46A: 549-557.

ZOPPI, G. & D.H. SHMERLING (1969) Intestinal
disaccharidase activities in some birds, reptiles and
mammals. Comp. Biochem. Physiol. 29: 289-294.