

Proteínas salivales relacionadas con la diversidad de dietas en murciélagos tropicales.

Salivary proteins related to the diversity of diets in tropical bats.

Leidi Verónica Jiménez Velasco^{1*}, Mariluz Gómez Rodríguez², Oscar Enrique Murillo García³

¹⁻² Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Calle 18 No. 118-250, Cali-Colombia.

³ Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 No. 100-00, Cali-Colombia

Recibido: Agosto 10 de 2020

Aceptado: Octubre 20 de 2020

*Correspondencia del autor: Leidi Verónica Jiménez Velasco

E-mail: leidi98@javerianacali.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i32.212>

Resumen

La familia Phyllostomidae presenta una gran diversidad de dietas que requieren adaptaciones fisiológicas para metabolizar los diferentes alimentos que consumen. En frugívoros de la familia Pteropodidae e insectívoros de las familias Vespertilionidae y Molossidae se han reportado proteínas salivales distintivas de cada dieta. Por ello, se planteó determinar moléculas salivales asociadas con las diferentes dietas de los filostómidos. Los organismos se encontraban en ayuno al tomar la muestra, a la cual se le adicionó un buffer inhibidor de proteasas y se almacenó a -20°C hasta su uso. Las proteínas se identificaron por medio de SDS-PAGE y se evaluó si su presencia en los individuos estaba asociada con la historia evolutiva de las especies. Además, se determinó si las proteínas encontradas estarían relacionadas con la dieta del individuo. Se capturaron 15 especies con dietas nectarívora, insectívora y frugívora. Se encontró una proteína de 60kDa en filostómidos herbívoros y una de 50kDa en vespertilionidos y filostómidos con alto consumo de insectos. Además, se registró una proteína de 30kDa en todos los filostómidos y en 2 de las 3 especies de vespertilionidos. Los análisis indicaron que la presencia de las proteínas no estaría relacionada con la cercanía filogenética y que, para las proteínas de 30 y 50kDa, tampoco sería explicada por la dieta como sí ocurre con la proteína de 60kDa. Los filostómidos habrían retenido de su dieta ancestral insectívora la proteína de 30kDa y adquirido evolutivamente la de 60kDa para procesar plantas y lograr la amplia diversificación ecológica que presentan.

Palabras clave: Alimentación animal, Diversidad Biológica, Evolución Biológica, Filogenia, Glándulas salivares, Phyllostomidae. (Fuente: ICYT, Mammals Species of the World)

Abstract

The Phyllostomidae family presents a great diversity of diets that require physiological adaptations to metabolize the different foods that they consume. In frugivores of the family Pteropodidae and insectivores of the families Vespertilionidae and Molossidae, distinctive salivary proteins of each diet have been reported. For this reason, it was proposed to determine salivary molecules associated with the different diets of the phyllostomids. The organisms were fasting when taking the sample, to which a protease inhibitor buffer was added and it was stored at -20°C until use. The proteins were identified by means of SDS-PAGE and it was evaluated whether their presence in individuals was associated with the evolutionary history of the species. In addition, it was determined whether the proteins found would be related to the individual's diet. 15 species were caught with nectarivorous, insectivorous and frugivorous diets. A protein of 60kDa was found in herbivorous phyllostomids and a 50kDa protein in vespertilionids and phyllostomids with high insect consumption. In addition, a 30kDa protein was recorded in all phyllostomids and in 2 of the 3 species of vespertilionids. The analyzes indicated that the presence of the proteins would not be related to the phylogenetic closeness and that, for the 30 and 50kDa proteins, it would not be explained by the diet as it is the case with the 60kDa protein. The phyllostomids would have retained the 30kDa protein from their ancestral insectivorous diet and evolutionarily acquired the 60kDa protein to process plants and achieve the broad ecological diversification they present.

Keywords: Biodiversity, Biological evolution, Animal nutrition, Phylogeny, Phyllostomidae, Salivary Glands. (Source: Mammals Species of the World, MeSH)

Introducción

El orden chiroptera es uno de los grupos más diversos de la clase mammalia, pues abarcan estrategias de forrajeo y alimentación muy variadas. Esta diversidad es ejemplificada por las especies de la familia Phyllostomidae, una familia de microquirópteros neotropicales altamente diversificada ecológica y fisiológicamente (1,2). La historia evolutiva de los murciélagos de esta familia se ha caracterizado por cambios ecológicos y evolutivos que han resultado en la evolución de diferentes dietas. Sus dietas incluyen gran diversidad de ítems alimentarios que van desde especies carnívoras y hematófagas, hasta especies que se alimentan de ítems vegetales como frutos o néctar (3). Los filostómidos abarcan más de 200 especies, de las cuales el 75% se alimentan de material vegetal (3,4,5,6). La diversificación en esta familia se presentó en gran medida por el consumo accidental de material vegetal por parte de un ancestro insectívoro al intentar capturar insectos directamente desde hojas o partes florales; se especula que ese fue el origen de las dietas frugívora y nectarívora (4,7,8). Por otro lado, existen familias más especializadas en la alimentación, como es el caso de la familia Vespertilionidae y Pteropodidae. La familia Pteropodidae es una familia de murciélagos frugívoros de gran tamaño que restringen su distribución al viejo mundo. Los vespertilionidos son un grupo de murciélagos microquirópteros que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el

mundo y que, salvo algunas excepciones, restringen su dieta al consumo de insectos (1,9,10).

La alimentación requiere adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permitan a los organismos metabolizar los ítems que consumen y extraer de ellos los nutrientes necesarios para suplir sus requerimientos energéticos y fisiológicos (8). Dentro de las características morfológicas y fisiológicas que varían con la dieta se encuentran la forma del cráneo, la estructura de los conductos gastrointestinales, la morfología de la lengua y los dientes, la estructura de las glándulas salivales, los órganos de los sentidos, la anatomía y la función renal (5,11,12,). Se ha observado que la estructura de las glándulas salivales y las moléculas que secretan varían acorde a la dieta de los organismos, Phillips et al. (13) reportaron que la producción de lisozima en las glándulas salivales estaría relacionada principalmente con dietas que incluyen insectos, ya que esta enzima cumpliría la función de una quitinasa. Además, Vandewege et al. (14) sugieren que el aparato de Golgi de las células de las glándulas salivales estuvo inmerso en la diversificación y adaptación de los filostómidos, dado que encontraron genes bajo selección positiva relacionados con la regulación del tráfico de proteínas. La composición de la saliva, fluido clave en la digestión de alimentos, es el producto directo de las glándulas y en ella se encuentran

inmersas las moléculas encargadas de la digestión (15). La saliva actúa como un amortiguador químico para contrarrestar el efecto del pH de los alimentos, como el ácido de las frutas, sobre el deterioro del esmalte dental (11). La comparación de las moléculas presentes en la saliva de murciélagos insectívoros de las familias Molossidae y Vespertilionidae y frugívoros de la familia Pteropodidae indicó una molécula distintiva de cada gremio trófico y otra molécula que diferencia las dos familias de insectívoros evaluados (16). Los frugívoros presentaron una proteína de 60 kDa que estaba ausente en insectívoros y que posiblemente sería una amilasa involucrada en la digestión de los carbohidratos de las frutas (16). En los insectívoros se hallaron proteínas de 30 kDa (Molossidae y Vespertilionidae) y 50 kDa (Molossidae) que pueden corresponder a anhidrasas carbónicas, las cuales estarían involucradas en la regulación del pH bucal, ya que estos murciélagos presentan una alta capacidad de amortiguamiento en su cavidad oral como mecanismo de protección (11,16).

Aunque se presenta variación en la composición de la saliva acorde a las diferentes dietas de los murciélagos, estas podrían explicarse por la comparación de familias diferentes. Por lo tanto, se requiere evaluar la variación de la composición salival en murciélagos de diferentes dietas pertenecientes a una misma familia y compararlos con especies de dietas similares de otras familias con el fin de contribuir al entendimiento de las adaptaciones implicadas en el cambio de dieta de los organismos. Por ello, se planteó identificar moléculas salivales asociadas con algunas dietas de la familia Phyllostomidae (nectarívora, insectívora y frugívora) y con la insectivoría estricta de vespertilionidos.

Materiales y métodos

Áreas de muestreo. Los murciélagos fueron capturados en los departamentos del Valle del Cauca, Cauca y Caquetá. Las localidades muestreadas en el departamento del Valle corresponden al Campus Universitario de la Universidad del Valle-Sede Meléndez (UV) en las coordenadas 3°22'42.5"N 76°31'53.9"O y 3°22'42.0"N 76°31'59.5"O y el Centro de Educación Ambiental (CEA) La Teresita (LT) con coordenadas 3°26'57.7"N 76°39'46.6"O. El Campus de la Universidad del Valle se encuentra ubicado en la zona urbana de la ciudad de Cali, sobre el valle geográfico del Río Cauca y a 1000 msnm, presenta una temperatura promedio de 25°C y un clima cálido-seco (17). El CEA La Teresita está ubicado sobre la cuenca del Río Felidia en la zona de amortiguamiento del Parque Nacional Natural (PNN) Farallones de Cali,

en un ecosistema de bosque de niebla que presenta una temperatura alrededor de 16°C (18). Las capturas realizadas en el departamento del Cauca se llevaron a cabo en las veredas Morales (CM), El Salado (CA) y en el límite urbano-rural del municipio de Caloto (CT) en las coordenadas 3°00'47.4"N 76°24'43.7"O, 2°59'18.5"N 76°24'22.5"O y 3°01'47.8"N 76°24'19.1"O, respectivamente. Estos sitios presentan un clima cálido y seco, una temperatura promedio de 25°C y una altitud aproximada de 1100 msnm (19). En el departamento del Caquetá el muestreo se realizó en el Resguardo Uitoto de Huitorá, municipio de Solano, donde se instalaron las redes dentro del caserío en las coordenadas 0°09'41.4"N 74°40'25.2"O y 0°09'41.2"N 74°40'30"O. El Resguardo se ubica a orillas del Río Caquetá y presenta un clima húmedo tropical, una temperatura alrededor de 26°C y una altitud de 200 msnm (19,20). Cabe aclarar que los individuos capturados en el departamento del Caquetá no fueron incluidos en el estudio

Captura de organismos. Las capturas se realizaron por medio de redes de niebla entre las 17:00 y las 24:00 h dado que los murciélagos presentan mayor actividad justo después de la puesta de sol (21,22). Los individuos capturados se identificaron por medio de la guía de identificación en campo de Díaz et al. (23) y comparando fotos de los individuos con los especímenes depositados en la colección de mamíferos de la Universidad del Valle. El gremio de cada especie fue establecido por medio de literatura que referenciaba los ítems alimenticios consumidos por cada una de las especies (24-30). La captura de individuos se realizó bajo el amparo del Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial otorgado a la Universidad del Valle.

Toma de muestras. Los murciélagos estuvieron en ayuno entre 4-7 horas antes de tomar la muestra de saliva. Seguidamente se estimularon vía oral con un agonista muscarínico que estimula el receptor de acetilcolina y da lugar a un aumento en la secreción salival (31,32). La saliva fue colectada con ayuda de una micropipeta de 1000 µl y depositada en un vial de 1.5 ml, el cual fue almacenado en una nevera de poliestireno expandido (icopor) provista de refrigeración para disminuir la actividad de proteasas y evitar la degradación de las proteínas durante la fase de campo (33,34). Los individuos fueron alimentados después de la toma de muestras y posteriormente liberados asegurando las cinco libertades del organismo (libre de tener sed o hambre,

libre de sentir incomodidad, libre de dolor o sufrimiento, libre de expresar comportamientos normales y libre de malestar o estrés). A cada muestra se le asignó un código considerando la especie y el lugar de colecta, las dos primeras iniciales hacen referencia al género y el epíteto de la especie y las dos letras siguientes al lugar de colecta.

Procesamiento de las muestras. Las muestras fueron centrifugadas (microcentrifuga 5418 Eppendorf®, Hamburgo, DE) a 10.000 rpm durante 10 min. Después se transfirió el sobrenadante a un vial de 1.5 ml y se descartó el pellet con el fin de descartar los residuos presentes en la saliva. Las proteínas de las muestras se conservaron por medio de la adición de un buffer compuesto por el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, St. Louis, US), ácido etilendiaminotetraacético (Na₂EDTA) (Sigma, St. Louis, US) para desactivar cofactores de proteasas, Tris (Sigma, St. Louis, US) pH 7.4 que actuó como tampón y le dió el pH a la solución e isopropanol (Sigma, St. Louis, US) que actuó como disolvente (35,36). Todas las muestras se almacenaron a -20°C antes y después de la adición del buffer.

Electroforesis SDS-PAGE. Las muestras fueron preparadas en buffer de carga Laemmli 2x (Sigma, St. Louis, US) en relación 1:1 (v:v) y se sometieron a denaturación a 95°C durante 10 minutos junto con el marcador de peso molecular para proteínas (New England Biolabs, Ipswich, US). La visualización de las proteínas se realizó por medio de electroforesis SDS-PAGE (Bio Rad, Hercules, US) en geles al 12% a 60 V los primeros 15 minutos y 120 V durante los 90 minutos restantes. El perfil de proteínas para cada muestra se definió mediante el peso molecular, utilizando como referencia un marcador de peso molecular (MW) que abarca un rango de 10 a 200 kDa. Las bandas del gel se visualizaron con la tinción de azul de Coomassie (Sigma, St. Louis, US). Las muestras en los geles se distribuyeron considerando la cercanía filogenética de los individuos y la similitud en la dieta. Los códigos escritos en cada gel solo incluyen el lugar de colecta, la especie se encuentra escrita en la parte superior de cada muestra.

Análisis de datos. Se determinó el peso molecular de las proteínas con ayuda del programa GelAnalyzer 2010, el cual arrojaba los datos de movilidad electroforética relativa (RF) de cada banda. Luego se halló la

ecuación para determinar el peso molecular a partir del RF en Microsoft Excel. Los resultados obtenidos se compararon con valores reportados en la literatura con el fin de realizar una aproximación a la identificación de la molécula.

Para los análisis se estimó la presencia-ausencia de bandas de 30, 50 y 60 kDa puesto que corresponden a proteínas salivales con una función previamente identificada (16). Finalmente, se evaluó la señal filogenética de las proteínas encontradas con el fin de establecer si las moléculas presentes en saliva estaban determinadas por la cercanía filogenética. En esta evaluación se incluyeron las especies estudiadas por Dumont et al. (16) con el fin de ampliar la muestra (Tabla 1). Se utilizaron especies hermanas de algunas especies que no se encontraban en la filogenia utilizada para los análisis (Tabla 1). Para determinar si existía o no señal filogenética se realizó un análisis que comparó el ajuste de tres modelos evolutivos que explicaban la existencia de relación evolutiva para la presencia de las proteínas contra el ajuste de un modelo no evolutivo. Los tres modelos evolutivos fueron Early Burst (37), delta de Pagel y lambda de Pagel (38), mientras que el modelo que representó ausencia de señal filogenética fue basado en white noise. Para el ajuste de los diferentes modelos se utilizó la función *fitDiscrete* del paquete *geiger* (39) en el lenguaje de programación estadística R (40) Para todos los análisis comparativos filogenéticos se utilizó la filogenia de Agnarsson de 2011 (41) podada para incluir sólo las especies de las que se obtuvieron datos.

Con el fin de establecer si la dieta podría estar relacionada con la presencia de las proteínas de 30, 50 y 60 kDa se evaluó el efecto de la dieta sobre la probabilidad de presencia de las proteínas a través de una regresión logística filogenética. Para el ajuste de los diferentes modelos se utilizó la función *phyloglm* del paquete *phyloglm* (42) en el lenguaje de programación estadística R (43). La determinación de la dieta para cada especie se estableció considerando la variabilidad de los ítems consumidos por especie. Se establecieron 4 dietas con las cuales se realizó el análisis (Tabla 1). La influencia de la dieta en la presencia de las bandas se determinó a partir de la comparación del ajuste de un modelo que incluyó la dieta (catTrait) contra un modelo nulo. Para identificar el mejor modelo evolutivo para cada una de las proteínas, se realizó la selección de modelos utilizando el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas-AICc (44).

Tabla 1. Especies incluidas en el análisis y especies hermanas sustituyentes.

Especies capturadas	Especies hermanas	Dieta
<i>Artibeus lituratus</i>		Frugívoro
<i>Carollia castanea</i>		Frugívoro-Insectívoro
<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Carollia brevicauda</i>	Frugívoro-Insectívoro
<i>Dermanura anderseni</i>	<i>Dermanura rosenbergi</i>	Frugívoro
<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Nectarívoro-Insectívoro
<i>Platyrrhinus dorsalis</i>		Frugívoro
<i>Sturnira lilium</i>	<i>Sturnira luisi</i>	Frugívoro
<i>Glossophaga soricina</i>		Nectarívoro-Insectívoro
<i>Myotis keaysi</i>		Insectívoro
<i>Myotis nigricans</i>		Insectívoro
<i>Eptesicus fuscus</i>		Insectívoro
<i>Chaerephon pumilla</i>		Insectívoro
<i>Mops candiylurus</i>		Insectívoro
<i>Myotis tricolor</i>		Insectívoro
<i>Pipistrellus africanus</i>	<i>Pipistrellus abramus</i>	Insectívoro
<i>Epomophorus labiatus</i>	<i>Epomophorus wahlbergi</i>	Frugívoro
<i>Epomophorus minor</i>		Frugívoro

Resultados

Se capturaron en total 54 individuos y 15 especies de los cuales 32 individuos y 10 especies presentaban una dieta predominantemente frugívora, 16 individuos y 2 especies una dieta nectarívora y 3 especies y 6 individuos dieta insectívora (Tabla 2). De estos individuos, 26 fueron capturados en el municipio de Caloto y pertenecían a las especies *Artibeus lituratus*, *Glossophaga soricina*, *Myotis nigricans*, *Carollia castanea*, *C. perspicillata*, *Eptesicus fuscus*, *Sturnira erythromos* y *S. lilium*. En la Universidad del Valle se capturaron 16 individuos de las especies *A. lituratus*, *Phyllostomus discolor* y *G. soricina*, y en el CEA La Teresita 12 individuos identificados como *C. perspicillata*, *Dermanura anderseni*, *Platyrrhinus dorsalis*, *P. vittatus*, *Myotis keaysi* y *Sturnira sp* fueron capturados. Cabe resaltar que algunas especies presentaban dietas que incluían recursos alimenticios de diversos gremios tróficos por lo cual se establecieron dentro de dietas mixtas al realizar los análisis estadísticos, como fue el caso de la especie *Glossophaga soricina* que presenta una dieta nectarívora-insectívora (Tabla 1). De cada individuo se colectó entre 1-1000 µl de saliva.

Dentro de las especies capturadas se encontraban 3 especies de insectívoros estrictos de la familia Vespertilionidae, los cuales fueron incluidos en el estudio dada la ausencia de capturas de filostómidos predominantemente insectívoros, por ello, los objetivos del proyecto se ajustaron y se ampliaron, considerando que inicialmente el estudio se enfocaba únicamente en la familia Phyllostomidae. El gremio trófico hematófago se excluyó del estudio dado que no se capturaron ejemplares de este gremio.

Tabla 2. Lista de especies capturadas y número de individuos capturados agrupados según la dieta predominante de cada especie. La dieta de cada especie se estableció acorde al ítem trófico con mayor consumo reportado en la literatura.

Gremio trófico	Especie	Nº individuos
Frugivoría	<i>Artibeus lituratus</i>	9
	<i>Carollia castanea</i>	1
	<i>Carollia perspicillata</i>	5
	<i>Dermanura sp.</i>	1
	<i>Dermanura anderseni</i>	1
	<i>Platyrrhinus dorsalis</i>	1
	<i>Platyrrhinus vittatus</i>	1
	<i>Sturnira erythromos</i>	1
	<i>Sturnira lilium</i>	10
	<i>Sturnira sp.</i>	2
Nectarivoría	<i>Glossophaga soricina</i>	6
	<i>Phyllostomus discolor</i>	10
	<i>Myotis keaysi</i>	4
Insectivoría	<i>Myotis nigricans</i>	1
	<i>Eptesicus fuscus</i>	1

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de proteínas salivales para 12 especies de las 15 capturadas, puesto que en 3 de ellas se degradaron las proteínas por la temperatura ambiente a la que fueron expuestas en campo. En cada perfil se observaron proteínas entre 15 a 250 kDa (Figura 1, Tabla 3).

Tabla 3. Peso molecular de las proteínas salivales detectadas en cada especie.

Especie	kDa																					
	250	200	150	100	85	70	60	55	50	47	46	40	37	35	30	27	25	23	20	18	15	
<i>Artibeus lituratus</i>	x	x		x	x	x	x						x	x	x							x
<i>Carollia castanea</i>		x		x		x	x								x	x						
<i>Carollia perspicillata</i>		x		x		x	x						x		x	x		x		x	x	
<i>Dermanura anderseni</i>		x				x									x							
<i>Phyllostomus discolor</i>		x	x		x	x	x							x	x		x	x				x
<i>Platyrrhinus dorsalis</i>						x									x			x				
<i>Sturnira lilium</i>	x	x				x	x	x	x				x	x	x	x		x				x
<i>Sturnira sp.</i>						x	x								x			x				
<i>Glossophaga soricina</i>						x	x		x	x				x	x		x		x			x
<i>Myotis keaysi</i>		x	x	x		x			x	x	x	x	x		x							
<i>Myotis nigricans</i>					x	x			x	x	x	x	x		x				x			
<i>Eptesicus fuscus</i>									x			x	x									

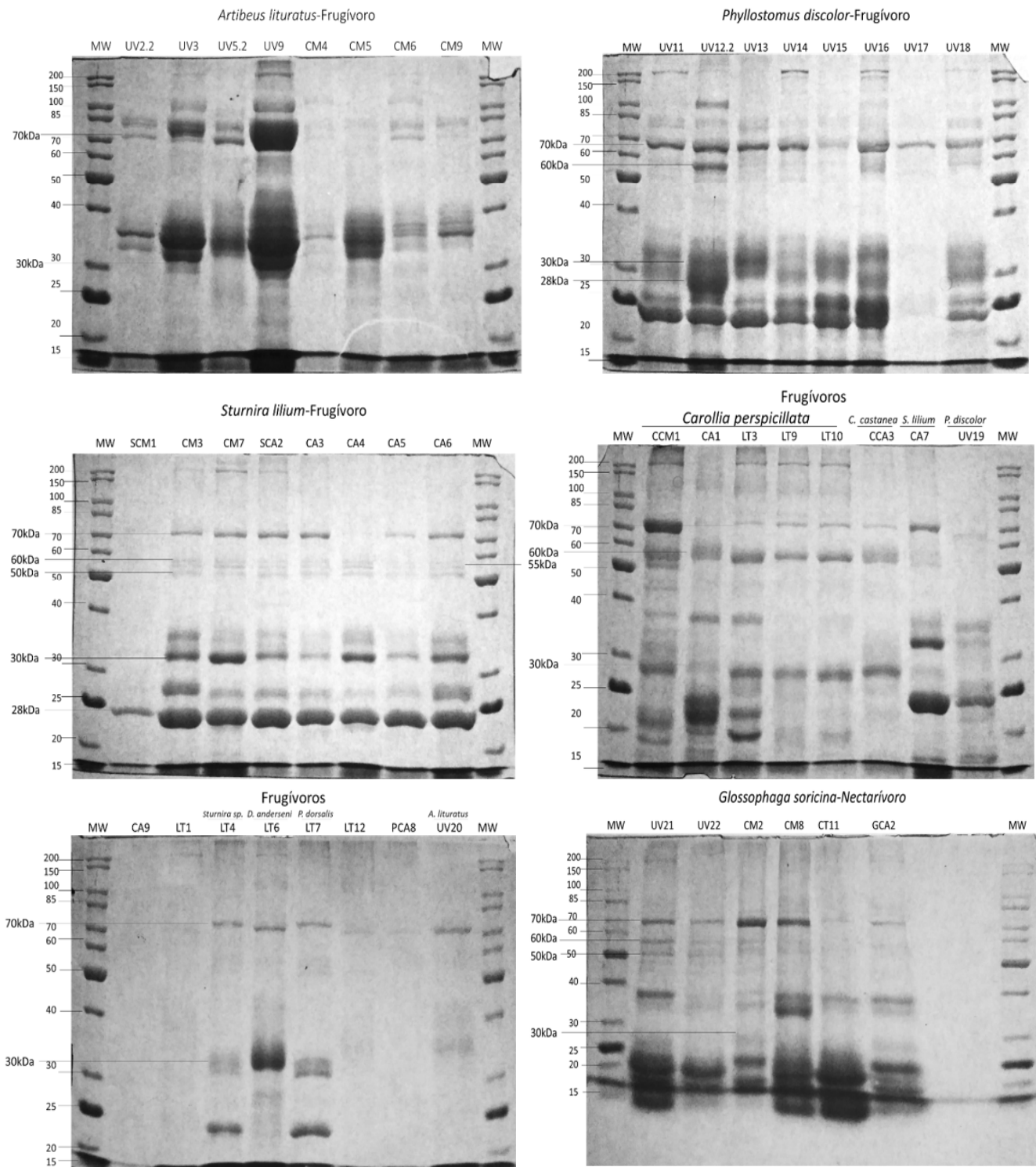


Figura 1. Perfil electroforético de proteínas salivales para especies herbívoras (A) e insectívoros estrictos (B).

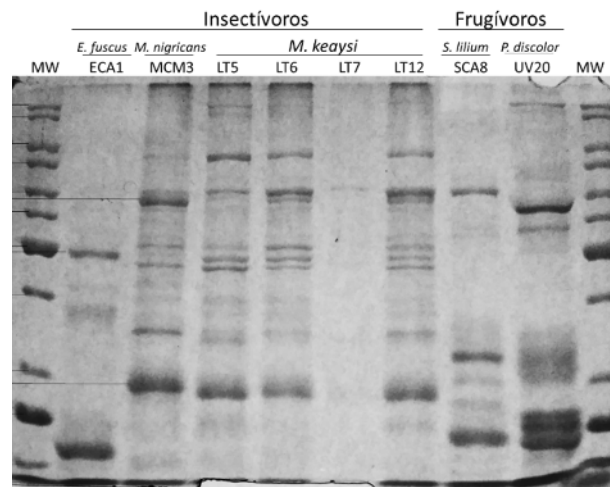


Figura 1. Perfil electroforético de proteínas salivales para murciélagos herbívoros (A) e insectívoros estrictos (B). MW = peso molecular. Los códigos escritos en cada gel incluyen el lugar de colecta (ver materiales y métodos muestreo), la especie se encuentra escrita en la parte superior de cada muestra.

Entre las especies predominantemente frugívoras no hubo mayor variación en las bandas que presentaban, excepto algunas diferencias observadas en *Artibeus lituratus* y *Dermanura anderseni* donde se observó un barrido difuso entre 16 y 30 kDa en comparación con la banda marcada por debajo de 30 kDa presentada por *Platyrrhinus dorsalis*, *Sturnira sp.* y *Carollia castanea* y las tres bandas entre 16 y 30 kDa presentadas por *Sturnira lilium*, *Carollia perspicillata* y *Phyllostomus discolor*, este último con dieta predominantemente nectarívora e insectívora y los restantes con una dieta principalmente frugívora. *Glossophaga soricina*, al igual que los frugívoros, presentó alta concentración de proteínas con peso molecular inferior a los 30 kDa. En el vespertilionido *Eptesicus fuscus* se observó una banda fuertemente marcada de aproximadamente 20 kDa que no se presentó en el género *Myotis*; este género tampoco presentó proteínas por debajo de los 30 kDa. En todas las especies se observó una proteína de 70 kDa, excepto en *E. fuscus*. En *Sturnira lilium* se detectó una proteína de 55 kDa presente únicamente en esta especie. La muestra CCM1 de *C. perspicillata* fue descartada del análisis debido a la contaminación con sangre. Entre filostómidos y vespertilionidos se observaron dos proteínas que los diferenciaban, una de aproximadamente 55 kDa presente únicamente en filostómidos y otra de 40 kDa detectada únicamente en vespertilionidos. Cabe resaltar que se desconoce la fisiología de las proteínas distintivas encontradas en cada familia y en cada gremio trófico.

Los resultados de señal filogenética indicaron que la presencia de las tres proteínas en las especies evaluadas no fue explicada por la relación evolutiva de las especies. Esta ausencia de señal filogenética se determinó dado que el modelo mejor ajustado a los datos fue el modelo no-evolutivo (White, Tabla 4), el cual representa un modelo en el que no hay señal filogenética y en el que la presencia-ausencia de las bandas se debe a otro factor posiblemente ecológico, como podría ser la dieta. En el caso de las proteínas de 30 y 50 kDa, el modelo no-evolutivo fue el de mejor ajuste a los datos por presentar el menor valor de AIC. Además, pese a que el delta AIC en todos los modelos fue menor a 2 unidades, valor establecido para determinar diferencias en el soporte entre los modelos, el número de parámetros del modelo no evolutivo fue menor y por tanto fue el modelo más parsimonioso. La proteína representada por la banda de 60 kDa arrojó dos modelos diferentes al nulo con menor valor AIC. Sin embargo, dado que los valores de delta AIC se encontraban por debajo de 2, no hubo un modelo mejor soportado por los datos que el modelo no-evolutivo que presentó el menor número de parámetros y por ello representa la explicación más parsimoniosa para explicar la distribución de la proteína de 60 kDa en las especies evaluadas. Según esto, la presencia de la proteína de 60 kDa tampoco estaría determinada por las relaciones evolutivas de las especies.

Tabla 4. Resultados del análisis de señal filogenética. lnL=máxima verosimilitud, params=número de parámetros, AIC=Criterio de información de Akaike, deltaAIC=diferencia de AIC con respecto al modelo de menor AIC.

A. Proteína de 30 kDa					
	modelo	lnL	AICc	params	detaAICc
1	white	-6,03	14,34	1	0
2	delta	-5,3	15,51	2	1,16
3	EB	-5,6	16,13	2	1,79
4	lambda	-5,78	16,47	2	2,13
B. Proteína de 50 kDa					
	modelo	lnL	AICc	params	detaAICc
1	white	-10,96	24,21	1	0
2	EB	-9,86	24,65	2	0,43
3	delta	-10,25	25,42	2	1,21
4	lambda	-10,35	25,63	2	1,42
C. Proteína de 60 kDa					
	modelo	lnL	AICc	params	detaAICc
1	delta	-9,53	23,99	2	0
2	lambda	-9,62	24,16	2	0,17
3	white	-10,96	24,21	1	0,23
4	EB	-9,65	24,23	2	0,24

El análisis de relación entre dieta y presencia de proteínas en los individuos arrojó que para la proteína de 30 kDa el modelo que mejor se ajustó a los datos, según el valor de AIC, fue el modelo nulo, por lo que en este caso la dieta no explicaría la presencia de dicha proteína (Tabla 5). La probabilidad promedio de presentar la proteína indicó que a pesar de que la dieta nectarívoro-insectívoro tuvo una mayor probabilidad de presentar esta proteína (probabilidad esperada=0,65, Intervalo de confianza = [0,05, 0,98]), los intervalos de confianza se traslaparon ampliamente con las otras dietas (Frugívoro=[0,02, 0,97], Frugívoro-Insectívoro = [0,02, 0,98], Insectívoro = [0,02, 0,97]), lo que indica que la presencia de esta proteína no estuvo asociada a la dieta de las especies.

Los análisis señalan que para la proteína de 50 kDa tampoco se encuentra la dieta como explicación a la presencia-ausencia de la proteína, dado que el modelo mejor ajustado fue el modelo nulo (AIC-catTrait = 26,98 Null model =24,62). El coeficiente de probabilidad de presencia de la proteína fue más alto en especies que incluyen insectos en su alimentación, excepto en frugívoros-insectívoros (Insectívoro =0,69, Nectarívoro-Insectívoro=0,5, Frugívoro-Insectívoro = 0,17, Frugívoro=0,25) y los valores de los intervalos de confianza de dietas con consumo de insectos fueron mayores que los expuestos por frugívoros estrictos (Frugívoro = [0,04, 0,71], Frugívoro-Insectívoro = [0,005, 0,89], Nectarívoro-Insectívoro = [0,06, 0,94], Insectívoro = [0,31, 0,91], ello indica que los insectívoros estrictos y facultativos tendieron a presentar la proteína de 50 kDa en mayor medida.

La presencia de la proteína de 60 kDa se podría asociar con la dieta de la especie (AIC-dieta=19,09; Null model=23,21) ya que la probabilidad promedio de que las especies presentaran la proteína fue mayor en especies que incluyen frutas y néctar en su dieta (Frugívoro=0,58, frugívoro-insectívoro=0,83, nectarívoro-insectívoro=0,83, insectívoro=0,06) y los intervalos de confianza de las especies que consumen plantas no se traslapó ampliamente con el intervalo de los insectívoros estrictos (Frugívoro=[0,19, 0,89], Frugívoro-Insectívoro=[0,11, 0,99], Nectarívoro-Insectívoro=[0,11, 0,99], Insectívoro=[0,003, 0,59]). Por esto, se infiere que las especies que incluyen plantas en su dieta tendieron a presentar la proteína de 60 kDa.

Tabla 5. Resultados del análisis de relación entre dieta y presencia de una proteína. lnL=máxima verosimilitud, params=número de parámetros, AIC=Criterio de información de Akaike, deltaAIC= diferencia de AIC con respecto al modelo de menor AIC.

A. Modelos para la proteína de 30 kDa					
	Modelo	lnL	params	AIC	detaAIC
1	Modelo nulo	-5,85	2	15,69	0
2	Dieta	-6,81	5	23,62	7,93
B. Modelos para la proteína de 50 kDa					
	Modelo	lnL	params	AIC	detaAIC
2	Modelo nulo	-9,6	2	24,62	0
1	Dieta	-4,55	5	26,98	2,36
C. Modelos para la proteína de 60 kDa					
	model	lnL	params	AIC	detaAIC
1	Dieta	-4,55	5	19,1	0
2	Modelo nulo	-9,6	2	23,21	4,11

Discusión

Se observaron diferencias en las proteínas salivales a dos escalas: entre especies con diferentes dietas y entre especies con diferente especialización por la dieta insectívora. Dumont et al. (16) reportaron una proteína de 50 kDa en molossidos pero no en vespertilionidos pese a exhibir la misma dieta. La proteína fue identificada como una anhidrasa carbónica con acción en la alta capacidad de tamponamiento de los insectívoros (11,16). En este estudio, murciélagos filostómidos y vespertilionidos presentaron la proteína, posiblemente dado por el solapamiento de dieta (insectívora facultativa en filostómidos e insectívora estricta en vespertilionidos). Adicionalmente, se encontró que la presencia de dichas proteínas está más asociada con la dieta de las especies que con la historia evolutiva. Por lo tanto, los resultados sugieren que la proteína de 60 kDa puede estar implicada en el consumo de plantas de los filostómidos y por ello, pudo haber contribuido con esta adaptación importante para la radiación y diversificación de dietas en filostómidos.

En especies frugívoras como *S. liliium*, y especies nectarívoras-insectívoras como *P. discolor* y *G. soricina* se observaron proteínas con pesos moleculares menores a 30 kDa. Dichas proteínas se esperaría que estén presentes en todas las especies que incluyen el consumo de plantas en sus dietas, dado que los mamíferos herbívoros presentan proteínas entre 5 y 25 kDa ricas en prolinas para contrarrestar la acción de los taninos de las plantas (45,46). Los taninos se encuentran a lo largo de toda la planta y en concentraciones que afectan la digestibilidad de proteínas en los organismos que las consumen, por ejemplo, pueden disminuir la concentración de nitrógeno en el organismo uniéndose a

proteínas salivales y de la mucosa (45,47). Lo anterior también explicaría por qué los individuos insectívoros del género *Myotis* no presentan bandas por debajo de 30 kDa. La ausencia de proteínas por debajo de 30kDa en especies frugívoras como *A. lituratus* y *D. anderseni* se pudo dar por una baja concentración de proteínas en las muestras de estas especies.

La presencia de la proteína de 30 kDa en la mayoría de las especies estudiadas, a excepción de *E. fuscus*, implica que las especies cercanamente relacionadas no son más similares en promedio que las especies distantemente relacionadas, lo cual explicaría la ausencia de señal filogenética para la presencia de dicha proteína. La retención o presencia de este carácter en especies con dietas diferentes a insectos posiblemente represente una adaptación para el consumo ocasional de insectos que presentan los filostómidos. Por ejemplo, *Phyllostomus discolor* incluye insectos en su dieta cuando disminuye la disponibilidad de frutas, polen y néctar, por tanto, su dieta se solapa con insectívoros estrictos como los vespertilionidos. Algo similar se observa en *Glossophaga soricina*, un nectarívoro que consume insectos ocasionalmente (25,26,48,49,50,51,52,53). Se considera que la dieta ancestral de los filostómidos fue insectívora, la cual aún la incluyen muchas de las especies estudiadas, en ellas se ha reportado el consumo ocasional de insectos con el fin de mantener los niveles de nitrógeno requeridos (4,26,49,54,55). Además, Dumont et al. (16) reportan la banda de 30kDa como una proteína presente únicamente en murciélagos insectívoros de las familias Vespertilionidae y Molossidae y ausente en pteropodidos que son frugívoros especializados. Lo anterior es consistente con la presencia de una proteína de 30kDa

en todas las especies capturadas, puesto que se podría considerar como una proteína retenida a lo largo de la historia evolutiva de las especies para metabolizar tejidos de insectos. Dumont *et al.* (16) sugieren que la proteína de 30 kDa podría corresponder a una anhidrasa carbónica encargada de mantener un pH básico y de conferirle alta capacidad de amortiguamiento a la saliva de murciélagos insectívoros, lo que concuerda con los datos obtenidos por Dumont (11) en los que especies de filostómidos que incluyen insectos en la dieta, como las del género *Carollia*, exhiben valores mayores de pH y una mayor capacidad de amortiguamiento. Además, los pesos moleculares y la función de la anhidrasa carbónica reportadas por Fernley *et al.* (56) concuerdan con el reporte de peso molecular y fisiología que exponen Dumont *et al.* (16).

Las proteínas de 50 y 60 kDa no presentaron señal filogenética y su presencia en las especies estudiadas pudo ser explicada, en parte, por su dieta. Se ha reportado que insectívoros de la familia Molossidae presentan una proteína de 50 kDa, la cual tendría acción en la regulación del pH; mientras que frugívoros pteropodidos exhiben una proteína de 60 kDa que sería una α -amilasa encargada de procesar los carbohidratos consumidos en las frutas (17). Da Costa *et al.* (57) afirman que la dieta alta en taninos, dietas herbívoras, estimulan los receptores adrenérgicos dando lugar a una mayor secreción de amilasa. La estimulación de los receptores se genera por el estrés inducido por la toxicidad de los taninos (57,58). La banda de 55 kDa presente en *Sturnira lilium* podría inferirse que es una amilasa, dado que el rango de peso molecular de las amilasas encontradas por Da Costa *et al.*, (57) estuvo entre 48 a 66 kDa, la diferencia en el peso depende de la glicosilación de la proteína. Además, la función proteica de la amilasa coincide con la dieta frugívora de *S. lilium*. La ausencia de respaldo estadístico para la dieta como variable explicativa se pudo generar por el tamaño muestral, puesto que la familia Phyllostomidae abarca más de 200 especies y el número de especies capturadas en este estudio fue de ocho. Algo similar sucedió con los vespertilionidos, ya que fueron incluidas solo cinco especies, considerando que se incluyeron las especies estudiadas por Dumont *et al.* (16) (1,3,5,6,9). Por ello, se sugiere aumentar el número de especies y con ello también se ampliarían las estrategias de alimentación a evaluar.

La proteína de 50 kDa se identificó principalmente en murciélagos con alto consumo de insectos, como lo reporta Dumont *et al.* (16) y aunque la identificó como una

anhidrasa carbónica su peso molecular no coincide con el encontrado para estas proteínas, alrededor de 30kDa (56). Por lo cual, la función que cumple esta proteína en la dieta insectívora es desconocida. Sin embargo, se debe resaltar que el peso de 50 kDa sí se encuentra en el rango de pesos de las α -amilasas, por lo que podría tratarse de una amilasa con glicosilación diferente a la glicosilación de los frugívoros (57). También se debe considerar que, pese a la insectivoría estricta de los vespertilionidos, también requieren de proteínas para procesar los carbohidratos que consumen en su dieta. Pese a que se sugiere la posible fisiología de las proteínas encontradas, es importante identificar su estructura y función para determinar su rol en la alimentación y en la diversificación de las dietas.

Cabe resaltar que la ausencia de determinadas proteínas que podrían estar relacionadas con la dieta en perfiles electroforéticos de especies con dietas similares podría estar relacionada con la concentración de la proteína de interés en la muestra, en comparación con la concentración de las proteínas totales de la muestra. Ello se infiere considerando que no se midió la concentración de proteínas totales ni de proteínas de interés en las muestras, lo que indica la importancia de realizar esta medición en futuras investigaciones.

La bioquímica salival en murciélagos se encuentra más relacionada con la dieta que con su historia evolutiva, puesto que las proteínas de 50 y 60 kDa encontradas presentaron relación con las dietas insectívora y herbívora, respectivamente, y la de 30 kDa podría ser una proteína retenida para el consumo ocasional de insectos. Por ello, podrían jugar un papel importante en la adaptación a los diferentes tipos de dieta, en especial la proteína de 60 kDa que podría ser una adaptación para el consumo de frutas y néctar en filostómidos. Esta proteína le habría permitido a los filostómidos metabolizar alimentos de origen vegetal, por lo cual pudo estar involucrada en la radiación adaptativa y diversificación ecológica de la familia. Además, dentro de los filostómidos las proteínas salivales presentaron similitud entre especies predominantemente frugívoras y especies herbívoras con consumo de insectos, mientras que entre filostómidos y vespertilionidos se observó mayor diferencia pese a que ambos consumen insectos.

Agradecimientos

Agradecemos a Alexander Velásquez de la Universidad de la Amazonia, al Centro de Investigación de la Biodiversidad Andino Amazónica INBIANAM, a la comuni-

dad del Resguardo Indígena Huitoto de Huitorá municipio de Solano-Caquetá, a la Dirección del Programa de Biología y la Oficina de Investigación y Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana Cali y al área de Mastozoología de la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses y financiación

Declaramos que no existen conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo. Éste trabajo fue financiado por la Dirección del Programa de Biología y la Oficina de Investigación y Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana Cali, Semillero de Investigación “Epigenética”.

Referencias

1. Fleming TH. Foraging strategies of plant-visiting bats. En: Kunz TH, editor. *Ecology of Bats*. Boston: Springer; 1982. p. 287–325.
2. Peixoto FP, Villalobos F, Cianciaruso MV. Phylogenetic conservatism of climatic niche in bats. *Glob Ecol Biogeogr*. 2017; 26(9): 1055–65.
3. Villalobos F, Arita H. The diversity field of New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae). *Glob Ecol Biogeogr*. 2009; 19(2): 200–11.
4. Rojas D, Vale Á, Ferrero V, Navarro L. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Mol Ecol*. 2011; 20(10): 2217–28.
5. Baker R, Solari S, Cirranello A, Simmons N. Higher level classification of phyllostomid bats with a summary of DNA synapomorphies. *Acta Chiropt*. 2016; 18(1): 1–38.
6. Jobson S. Leaf-nosed bat species richness (Chiroptera: Phyllostomidae) across habitat types in a neotropical wet forest of the Osa Peninsula, Costa Rica. *Metamorphosis*. 2018; 1-10.
7. Eisenberg JF, Wilson DE. Relative brain size and feeding strategies in the Chiroptera. *Evolution*. 1978; 32(4): 740–51.
8. Schondube J, Herrera-ML, Martínez del Rio C. Diet and the evolution of digestion and renal function in Phyllostomid bats. *Zoology*; 2001; 104(1): 59–73.
9. Pirlot P, Stephan H. Encephalization in Chiroptera. *Can J Zool*. 1970; 48(3): 433–44.
10. Novaes RL, Souza R, Ribeiro E, Siqueira A, Greco A, Moratelli R. First evidence of frugivory in *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae, Myotinae). *Biodivers. Data J*. 2015; (3), e6841. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e6841>
11. Dumont E. Salivary pH and buffering capacity in frugivorous and insectivorous bats. *J Mammal*. 1997; 78(4): 1210–19.
12. Phillips CD, Baker RJ. Secretory gene recruitments in vampire bat salivary adaptation and potential convergences with sanguivorous leeches. *Front Ecol Evol*. 2015; 3:122. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00122>
13. Phillips CJ, Weiss A, Tandler B. Plasticity and patterns of evolution in mammalian salivary glands: comparative immunohistochemistry of lysozyme in bats. *Eur J Morphol*. 1998; 36:19-26.
14. Vandewege MW, Sotero-Caio CG, Phillips CD. Positive selection and gene expression analyses from salivary glands reveal discrete adaptations within the ecologically diverse bat family Phyllostomidae. *Genome Biol Evol*. 2020; 12(8): 1419–28.
15. Carpenter G. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*. 2013; 4(1): 267–76.
16. Dumont E, Etzel K, Hempel D. Bat salivary proteins segregate according to diet. *Mammalia*. 1999; 63(2): 159-66.
17. CVC, CIAT, DAGMA. Estudio para la microzonificación climática para el municipio de Santiago de Cali. Santiago de Cali: Corporación Autónoma del Valle del Cauca (CVC); 2015.
18. CVC. Centro de Educación Ambiental La Teresita CVC [Internet]. CVC. 2018 [citado 28 de septiembre de 2020]. Recuperado de: <https://www.cvc.gov.co/node/450>
19. MinVivienda, CAMACOL, IFC, EAER. Mapa de clasificación del clima en Colombia según la temperatura y la humedad relativa y listado de municipios [Internet]. Santafé de Bogotá: ISMD Ingeniería Sostenible; 2013. Recuperado de: <http://ismd.com.co/wp-content/uploads/2017/03/Anexo-No-2-Mapa-de-Clasificaci%C3%B3n-del-Clima-en-Colombia.pdf>
20. Rendón J. Coreguaje [Internet]. Ministerio del Interior. 2013 [citado 28 de septiembre de 2020]. Recuperado de: https://www.mininterior.gov.co/sites/default/files/upload/SIIC/PueblosIndigenas/pueblo_coreguaje.pdf

21. Taylor RJ, Oneill MG. Summer activity patterns of insectivorous bats and their prey in tasmania. *Wildl Res.* 1988; 15(5): 533-39.
22. Hayes JP. Temporal Variation in Activity of Bats and the Design of Echolocation-Monitoring Studies. *J Mammal.* 1997; 78(2): 514-24.
23. Díaz MM, Solari S, Aguirre LF, Aguiar LMS, Bárquez RM. Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica. Publicación N° 2, PCMA (Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina. 2016; 160 pp.
24. Dominique PC. Feeding strategy and activity budget of the frugivorous bat *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) in French Guiana. *J Trop Ecol.* 1991; 7: 243-56.
25. Fleming TH, Nuñez RA, Sternberg LD. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia.* 1993; 94(1): 72-75.
26. Kwiecinski GG. *Phyllostomus discolor*. *Mamm. Species.* 2006; 801: 1-11.
27. Hooper SR, Solari S, Larsen PA, Bradley RD, Baker RJ. Phylogenetics of the fruit-eating bats (Phyllostomidae: Artibeina) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ocass Pap Mus Tex Tech Univ.* 2008; 277:1-16.
28. Aroca AK, González LA, Hurtado MA, Murillo-García OE. Preferencia en la dieta de murciélagos frugívoros (Phyllostomidae) en un fragmento de bosque seco tropical. *Rev. Cienc.* 2016; 20: 139-46.
29. Kraker-Castañeda C, Cajas-Castillo JO, Lou S. Opportunistic feeding by the little yellow-shouldered bat *Sturnira lilium* (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in northern Guatemala: a comparative approach. *Mammalia.* 2016; 80(3): 349-52.
30. Castaño JH, Carranza JA, Pérez-Torres J. Diet and trophic structure in assemblages of montane frugivorous phyllostomid bats. *Acta Oecol.* 2018; 91: 81-90.
31. Cartwright T, Hawkey C. Activation of the blood fibrinolytic mechanism in birds by saliva of the vampire bat (*Diaemus youngi*). *J Physiol.* 1969; 201: 45-46.
32. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 1995; 16(1-2): 33-37.
33. Cartwright T. The plasminogen activator of vampire bat saliva. *Blood.* 1974; 43(3): 317-26.
34. Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR, et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. *J Dent Res.* 2011; 90(11): 1325-30.
35. Wu F, Wang M. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal Biochem.* 1984; 139(1): 100-103.
36. Lawler J. The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood.* 1986; 67: 1197-1209.
37. Harmon LJ, Losos JB, Davies JT, Gillespie RG, Gittleman JL, Jennings BW, et al. Early bursts of body size and shape evolution are rare in comparative data. *Evolution.* 2010; 64: 2385-96.
38. Pagel M. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature.* 1999; 401: 877-84.
39. Harmon LJ, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W. GEIGER: Investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics.* 2008; 24: 129-31.
40. Motani R, Schmitz L. Phylogenetic versus functional signals in the evolution of form-function relationships in terrestrial vision. *Evolution.* 2011; 65(8): 2245-57.
41. Agnarsson I, Zambrana-Torrel CM, Flores-Saldana NP, May-Collado LJ. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr.* 2011. doi: 10.1371/currents.RRN1212
42. Ho LST, Ane C. A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. *Syst Biol.* 2014; 63(3):397-408.
43. Gerhold P, Ribeiro EMS, Santos BA, Sarapuu J, Tabarelli M, Wirth R, et al. Phylogenetic signal in leaf-cutting ant diet in the fragmented Atlantic rain forest. *J Trop Ecol.* 2019; 35(3): 144-47.
44. Burnham KP, Anderson DR. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach: Second edition. New York: Springer-Verlag; 2002. 488 p.
45. Shimada T. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *J Chem Ecol.* 2006; 32(6): 1149-63.
46. Manconi B, Castagnola M, Cabras T, Olianias A, Vitali A, Desiderio C, et al. The intriguing heterogeneity of human salivary proline-rich proteins. *J Proteomics.* 2016; 134: 47-56.
47. Zucker WV. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *Am Nat.* 1983; 121: 335-65.
48. Sazima I, Sazima M. Solitary and group foraging: two flower-visiting patterns of the lesser spear-nosed bat *Phyllostomus discolor*. *Biotropica.* 1977; 9(3): 213-15.

49. Willig MR, Camilo GR, Noble SJ. Dietary Overlap in Frugivorous and Insectivorous Bats from Edaphic Cerrado Habitats of Brazil. *J Mammal.* 1993; 74(1): 117–28.
50. Alvarez T, Sánchez-Casas N. Diferenciación alimentaria entre los sexos de *Glossophaga soricina* (Chiroptera: Phyllostomidae) en México. *Rev Biol Trop.* 1999; 47(4): 1129-36.
51. Arias E, Cadenillas R, Pacheco V. Diet of nectarivorous bats from the National Park Cerros de Amotape, Tumbes. *Rev Peru Biol.* 2009; 16(2): 187-90.
52. Pedrozo AR, Gomes LAC, Uieda W. Feeding behavior and activity period of three neotropical bat species (Chiroptera: Phyllostomidae) on *Musa paradisiaca* inflorescences (Zingiberales: Musaceae). *Iheringia, Sér Zool.* 2018; 108: e2018022. doi: 10.1590/1678-4766e2018022
53. Gnocchi AP, Huber S, Srbek-Araujo AC. Diet in a bat assemblage in Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Trop Ecol.* 2019; 60(3): 389-404.
54. Mello MAR, Kalko EKV, Silva WR. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian Montane Atlantic Forest. *J Mammal.* 2008; 89(2): 485-92.
55. Montoya-Bustamante S, Zapata-Mesa N. Accidental consumption of *Atta Cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) by *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *MaNo.* 2017; 4(1): 25-26.
56. Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. *FEBS Press.* 1979; 105(2): 299-302.
57. Da Costa G, Lamy E, Capela e Silva F, Andersen J, Sales Baptista E, Coelho AV. Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *J Chem Ecol.* 2008; 34(3): 376-87.
58. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol.* 2005; 55(3): 333–42.