

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo de metagenômica e de metabolismo oxidativo comparativo em quatro espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares

Tese de Doutorado

Diego Antonio Mena Canata

Porto Alegre
2023

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo de metagenômica e de metabolismo oxidativo comparativo em quatro espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares

Diego Antonio Mena Canata

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2023

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Biofísica e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Para minha amada esposa Fernanda, que com amor, carinho, amizade, cumplicidade e compreensão possibilitaram a realização deste doutorado.

A toda minha família, pais, Carlos María, Antonia Isabel, irmãos, Carlos Enrique, Adriana Paola, Guillermo Raúl e todos meus sobrinhos, que de longe deram-me forças em todo momento.

“Amor y deseo son dos cosas diferentes; que no todo lo que se “Ama” se desea, ni todo lo que se “Desea se ama.”

Miguel de Cervantes. Don quijote de la Mancha, 1605.

“Tenho plena convicção da importância da Ciência não só na compreensão, diagnóstico e tratamento de doenças, mas também no desenvolvimento tecnológico em diversas áreas, além de ser uma das mais interessantes e complexas áreas do conhecimento”.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS. COMPOSTOS, SUBSTÂNCIAS E ELEMENTOS QUÍMICOS	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Características dos morcegos.....	14
1.2. Tipos de morcegos segundo a dieta	16
1.3. Modelos de estudos padrões e alternativos	20
1.4. Espécies reativas.....	21
1.5. Estresse oxidativo	22
1.6. Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas	22
1.7. Dietas pro-oxidantes e antioxidantes	25
1.8. Dietas pro-oxidantes e antioxidantes em morcegos.....	26
1.9. Microbioma e microbiota	27
2. JUSTIFICATIVA.....	29
2.1. Por que utilizar morcegos?.....	29
2.2. Por que utilizar coração?.....	29
2.3. Por que utilizar fígado?.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Principal	30
3.2. Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. CAPITULO 1	31
MICROBIOTA INTESTINAL.....	31
4.2. CAPITULO 2	32

ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
4.3. CAPITULO 3	33
VITAMINA C.....	33
6. RESULTADOS SUPLEMENTARES.....	45
6.1. CAPITULO 1 - MICROBIOTA.....	45
6.2. CAPITULO 3 – VITAMINA C	51
5. DISCUSSÃO GERAL	52
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. Perspectivas	57
7. ANEXOS.....	58
8. CURRICULUM VITAE	61
9. REFERÊNCIAS.....	62

AGRADECIMENTOS

Professora Doutora Mara da Silveira Benfato, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, dedicação, incentivo e orientação durante os quatro anos, que foi fundamental para o desenvolvimento do meu doutorado.

Professora Doutora Ana Paula Guedes Frazzon, pela orientação feita para o desenvolvimento deste doutorado.

Doutor Pabulo Henrique Rampelotto, pela participação ativa e indicações constantes no trabalho.

Doutor Tiago Boeira Salomon, pela ajuda em diferentes estágios do trabalho.

Professores Doutores Arthur Germano Fett Neto e Guido Lenz, pelo acompanhamento continuo do trabalho e interesse interesse demonstrado nele.

Aos colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo, Francielly e Nikolas, pelo apoio constante, ensinamentos diários, risadas e brincadeiras na hora do café.

MUITO OBRIGADO...

RESUMO

Os morcegos são importantes agentes ecológicos e econômicos por desempenharem e um papel crucial no reflorestamento polinizadores e dispersores de sementes, atuam no controle de pragas e também são agentes disseminadores de zoonoses. São os únicos mamíferos com voo livre, conhecidos por terem hábitos alimentares diversos. No presente estudo pretendemos compreender e comparar como dietas pró-oxidantes ou antioxidantes modificam o metabolismo oxidativo e a composição da microbiota intestinal utilizando morcegos como modelo experimental não canônico de estudos, por eles possuírem dietas estritas e extremas e órgãos como coração e fígado, utilizando quatro espécies morcegos neotropicais do Brasil, a saber: *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium*, *Molossus molossus* e *Desmodus rotundus*, com diferentes hábitos alimentares e investigar a relação entre suas diferentes dietas a microbiota e estado oxidativo. Acredita-se que os diversos hábitos alimentares se reflitam na composição e função de sua microbiota intestinal, que desempenha papéis importantes na aquisição de nutrientes, função imunológica e saúde geral. Nossas descobertas demonstram que os hábitos alimentares podem ter um impacto significativo na diversidade e composição da microbiota intestinal dos morcegos, como observado na diversidade alfa, onde houve diferenças significativas para Shannon ($p = 0,001$) e Simpson ($p = 0,001$), mostrando uma maior diversidade de microrganismos bacterianos em espécies nectarívoras e insetívoras em comparação com espécies frugívoras e hematófagas. A análise das vias funcionais na microbiota intestinal das quatro espécies de morcegos revelou diferenças significativas em seu potencial metabólico relacionado aos seus nichos alimentares, como exemplo, alta abundância de biossíntese de desoxirribonucleotídeos (biossíntese de desoxirribonucleotídeos e de ribonucleótidos de adenosina) em morcegos hematófagos é consistente com sua necessidade de síntese rápida de DNA para obter nutrientes das células sanguíneas que consomem. Por outro lado, as rotas metabólicas expressas diferencialmente em morcegos nectarívoros e frugívoros foram as de degradação de carboidratos (glicose, sacarose e frutose). Além disso, a identificação de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos: *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, entre outras, sugere que o transporte de patógenos microbianos por morcegos pode variar dependendo dos hábitos alimentares e de fatores específicos do hospedeiro. Essas descobertas têm

implicações importantes para a conservação das comunidades de morcegos, destacando a necessidade de promover diversos habitats e fontes de alimento para sustentar essas espécies ecologicamente importantes. Em termos de dano oxidativo, nossos achados revelaram grandes diferenças entre as quatro espécies de morcegos. A atividade de várias enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos no coração, fígado e rins também mostrou diferenças significativas entre as espécies de morcegos. A análise de correlação entre marcadores oxidativos e antioxidantes enzimáticos/não enzimáticos no coração, fígado e rim exibiu padrões distintos de correlações devido a variações nos mecanismos de defesa antioxidante e respostas ao estresse oxidativo em diferentes órgãos. As diferenças observadas no dano oxidativo, atividades de enzimas antioxidantes e correlações entre marcadores oxidativos e antioxidantes destacam a adaptabilidade e complexidade dos sistemas de defesa antioxidante nesses morcegos. Cada órgão parece ter demandas e adaptações específicas para lidar com o estresse oxidativo com base em suas funções fisiológicas e exposição aos componentes da dieta. Estas quatro espécies de morcegos não conseguem sintetizar a vitamina C, ao contrário da maioria dos animais, necessitando assim que esta vitamina seja obtida a partir da dieta. Ao analisar e comparar os níveis de vitamina C nas quatro espécies de morcegos, (independente do órgão), não foram observadas diferenças significativas. No entanto, ao analisar e comparar os níveis de vitamina C nos quatro órgãos (independente da espécie), foram observadas diferenças significativas, com as maiores concentrações no coração, seguidas do fígado e do cérebro, enquanto a menor concentração foi medida nos rins. Diferenças adicionais nos níveis de Vitamina C só foram observadas quando cada órgão foi analisado de acordo com a espécie/dieta. Esses resultados indicam um alto grau de homeostases redox em morcegos, apesar da diferença marcante no tipo de dieta. As implicações do nosso estudo vão além do escopo da biologia do morcego e fornecem informações sobre um campo mais amplo do metabolismo oxidativo, microbiota e saúde pública.

Palavras chaves: dieta; nutrição animal; microbiota intestinal; estresse oxidativo; frugívoros; nectarívoros; insetívora; hematófago.

ABSTRACT

Bats are important ecological and economic agents because they play a crucial role in reforestation, pollinators and seed dispersers, act in pest control and are also agents that disseminate zoonoses. They are the only free-flying mammals known to have diverse eating habits. In the present study we intend to understand and compare how pro-oxidant or antioxidant diets modify the oxidative metabolism and the composition of the intestinal microbiota using bats as a non-canonical experimental model of studies, because they have strict and extreme diets and organs such as heart and liver, using four Neotropical bat species from Brazil, namely: *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium*, *Molossus molossus* and *Desmodus rotundus*, with different eating habits and investigate the relationship between their different diets, microbiota and oxidative state. Diverse eating habits are thought to be reflected in the composition and function of your gut microbiota, which play important roles in nutrient acquisition, immune function, and overall health. Our findings demonstrate that dietary habits can have a significant impact on the diversity and composition of the intestinal microbiota of bats, as observed in alpha diversity, where there were significant differences for Shannon ($p = 0.001$) and Simpson ($p = 0.001$), showing a greater diversity of bacterial microorganisms in nectarivorous and insectivorous species compared to frugivorous and hematophagous species. Analysis of the functional pathways in the gut microbiota of the four bat species revealed significant differences in their metabolic potential related to their feeding niches, for example, high abundance of deoxyribonucleotide biosynthesis (biosynthesis of deoxyribonucleotides and adenosine ribonucleotides) in vampire bats is consistent with their need for rapid DNA synthesis to obtain nutrients from the blood cells they consume. On the other hand, the differentially expressed metabolic pathways in nectarivorous and frugivorous bats were the degradation of carbohydrates (glucose, sucrose and fructose). Furthermore, the identification of potentially pathogenic bacterial genera: *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, among others, suggests that the transport of microbial pathogens by bats may vary depending on feeding habits and specific host factors. These findings have important conservation implications for bat communities, highlighting the need to promote diverse habitats and food sources to support these ecologically important species. In terms of oxidative damage, our findings revealed large differences between the four bat species. The activity of several

antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants in the heart, liver and kidneys also showed significant differences between bat species. Correlation analysis between oxidative markers and enzymatic/non-enzymatic antioxidants in heart, liver and kidney showed distinct patterns of correlations due to variations in antioxidant defense mechanisms and responses to oxidative stress in different organs. The observed differences in oxidative damage, antioxidant enzyme activities and correlations between oxidative and antioxidant markers highlight the adaptability and complexity of antioxidant defense systems in these bats. Each organ appears to have specific demands and adaptations to deal with oxidative stress based on its physiological functions and exposure to dietary components. These four species of bats cannot synthesize vitamin C, unlike most animals, thus requiring this vitamin to be obtained from the diet. When analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four species of bats (regardless of the organ), no significant differences were observed. However, when analyzing and comparing vitamin C levels in the four organs (regardless of species), significant differences were observed, with the highest concentrations in the heart, followed by the liver and brain, while the lowest concentration was measured in the kidneys. Additional differences in Vitamin C levels were only observed when each organ was analyzed according to species/diet. These results indicate a high degree of redox homeostasis in bats, despite the marked difference in diet type. The implications of our study go beyond the scope of bat biology and provide insight into the broader field of oxidative metabolism, microbiota, and public health.

Keywords: diet; animal nutrition; gut microbiota; oxidative stress; frugivores; nectarivores; insectivorous; hematophagous.

LISTA DE ABREVIATURAS. COMPOSTOS, SUBSTÂNCIAS E ELEMENTOS QUÍMICOS

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

CAT: catalase;

CDNB: *1-cloro-2,4-dinitrobenzene*, “1-cloro-2,4-dinitrobenzeno”;

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

Cu: cobre;

DNA: *deoxyribonucleic acid*, “ácido desoxirribonucleico”;

ER: espécies reativas;

EROs: espécies reativas de oxigênio;

ERNs: espécies reativas de nitrogênio;

Fe: ferro;

GPx: *glutathione peroxidase*, “glutathiona peroxidase”;

GR: *glutathione reductase*, “glutathiona redutase”;

GSH: *reduced glutathione*, “glutathiona reduzida”;

GSSG: *oxidized glutathione*, “glutathiona oxidada”;

GST: *glutathione S-transferase*, “glutathiona S-transferase”;

H₂O₂: *hydrogen peroxide*, “peróxido de hidrogênio”;

HPLC: *high performance liquid chromatography*, “cromatografia líquida de alta performance”;

MDA: *malondialdehyde*, “malondialdeído”;

NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, “fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina”;

NO•: *nitric oxide*, “óxido nítrico”;

NO₂⁻ e NO₃⁻: *nitrite and nitrate*, “nitritos e nitratos”;

OTU: *operational taxonomic unit*, “unidade taxonômica operacional”;

PCR: *polymerase chain reaction*, “reação em cadeia da polimerase”;

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade;

SISGEN: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado;

SOD: *superoxide dismutase*, “superóxido dismutase”;

tGSH: *total glutathione*, “glutathiona total”;

Vit A: *vitamin A*, “vitamina A”;

Vit B: *vitamin B*, “vitamina B”;

Vit C: *vitamin C*, “vitamina C”;

Vit E: *vitamin E*, “vitamina E”;

Vit K: *vitamin K*, “vitamina K”.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características dos morcegos

Os morcegos são um grupo monofilético pertencente à ordem Chiroptera com dois subordens (Yangochiroptera e Yinpterochiroptera), tem aproximadamente 1200 a 1300 espécies, cerca de 25% das espécies de mamíferos atuais e têm hábitos noturnos, sendo os únicos mamíferos com voo livre¹. Devido aos seus hábitos noturnos, acreditava-se que os morcegos fossem cegos, porém possuem visão altamente desenvolvida². No entanto, a maioria dos morcegos podem enxergar em uma faixa de 310 nm (ultravioleta) até 510 nm (verde)³. Os morcegos são cosmopolitas, podendo habitar qualquer lugar exceto Ártico, Antártico e algumas ilhas remotas, onde não há registros desses animais habitando-o¹ (Figura 1).

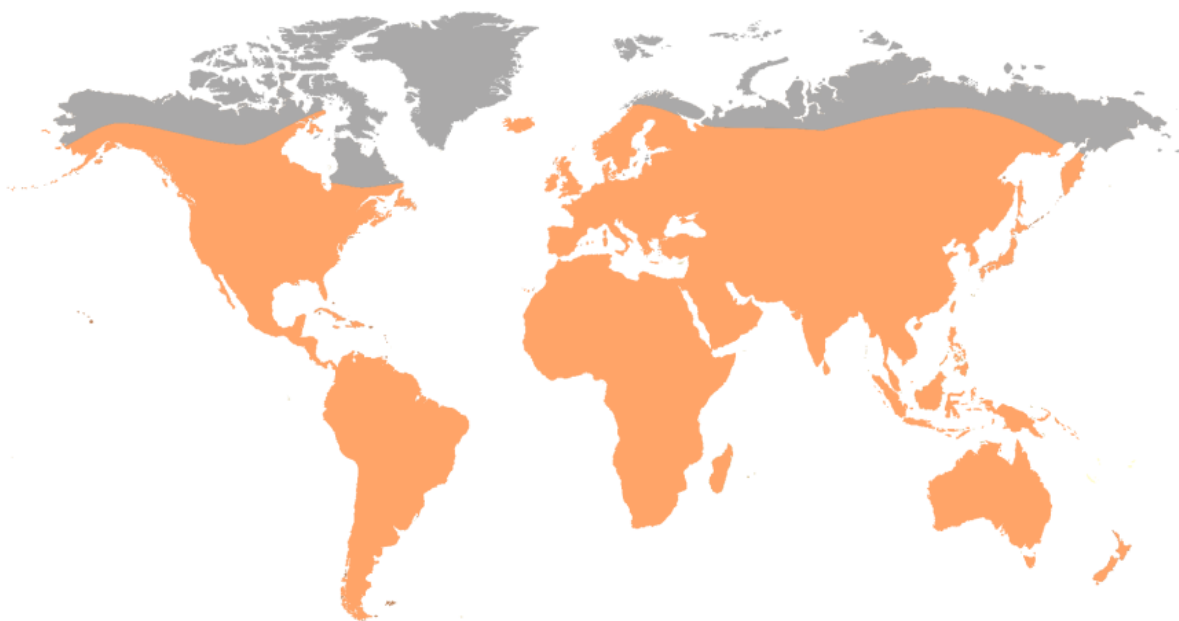


Figura 1: Distribuição dos morcegos, em laranja onde existem espécies de morcegos, em cinza onde não foi identificado a presença de espécies de morcegos (Figura adaptada de Laurindo, 2015).

Os morcegos da suborden Yangochiroptera têm um sexto sentido, a ecolocalização, que é um sistema que funciona como o sonar de um avião assim como nas baleias. A ecolocalização funciona da seguinte forma: o morcego emite ondas sonoras de alta frequência (que são inaudíveis para os humanos) e essas ondas, ao encontrar um obstáculo, retornam e são captadas por seu ouvido especial. Além de ajudar na orientação, a ecolocalização ajuda os morcegos a obter alimentos em ambientes completamente escuros. Com a ecolocalização, os morcegos podem medir a distância de obstáculos ou alimentos à sua frente, seu tamanho, velocidade e até detalhes de sua textura⁴ (Figura 2).



Figura 2: Modo de operação de ecolocalização, as ondas emitidas pelos morcegos, que ao encontrar um obstáculo retornam e são recebidas por os morcegos em seus ouvidos especiais, dando-lhe a localização e tamanho da presa (Figura adaptada de Griffin, 2000).

Os morcegos adultos variam em tamanho e massa corporal, o menor morcego (*Craseonycteris thonglongyai*) tem uma massa corporal aproximadamente de 1,2 a 2,7 gramas e com tamanho de 13 a 17 centímetros de envergadura enquanto o maior morcego (*Acerodon jubatus*) pode ter uma massa de 1,5 a 2 quilogramas e uma envergadura de 1,7 a 2 metros¹.

A alimentação dos morcegos depende da espécie, eles possuem dietas diversas e contrastantes o que não é encontrado em nenhum outro tipo de mamíferos⁵, podendo ser exclusivamente nectarívoros, frugívoros, insetívoros, hematófagos, ou amplamente onívoros. Das 1200 a 1300 espécies de morcegos somente três alimentam-se de sangue (*Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*)⁶.

Os morcegos são extremamente importantes para os ecossistemas devido à sua grande diversidade de hábitos alimentares, desempenhando papéis cruciais na manutenção de serviços ecológicos como polinização, dispersão de sementes e controle de populações de insetos, que podem se tornar pragas agrícolas ou vetores de doenças⁷.

1.2. Tipos de morcegos segundo a dieta

Muitas espécies de morcegos se alimentam do néctar secretado pelas flores, por isso são considerados excelentes polinizadores⁸. Quando estão consumindo o néctar, os morcegos têm contato com os grãos de pólen da planta que acabam aderindo à sua pelagem. Os morcegos nectarívoros desempenham papéis importantes na regeneração de áreas pois além de serem bons polinizadores, transportando o pólen de uma planta para outra e contribuindo assim na reprodução de centenas de espécies florais⁹.

Uma espécie de morcego nectarívoro é o *Glossophaga soricina* (Yangochiroptera), pode habitar florestas, pomares, formações de arbustos, áreas urbanas e rurais. Esta espécie refugia-se em cavernas, túneis, esgotos, minas abandonadas, buracos de árvores, troncos e residências^{10; 11}. A dieta desses morcegos é extremamente energética e consiste em uma mistura de vitaminas e néctar (solução de glicose, frutose e sacarose)¹².

A espécie *G. soricina* está distribuída geograficamente em grande parte das Américas, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guianas Francesas, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago. e Venezuela¹³ (Figura 3).



Figura 3: Distribuição geográfica da espécie *G. soricina*, em amarelo observa-se as localidades onde a espécie *G. soricina* pode ser localizada. (Figura adaptada de Hoffmann, 2001).

Morcegos frugívoros são os maiores reflorestadores naturais do planeta, pois comem frutas sem destruir suas sementes, que após serem ingeridas se espalham pela floresta, enquanto voam, através das fezes⁷. Além disso, muitos morcegos frugívoros não consomem seus alimentos no local, eles transportam os frutos em suas bocas e voam para consumi-lo em outro lugar¹⁴. Como consequência, muitos frutos acabam caindo no chão, para depois germinar e dar origem a uma nova planta^{8: 15}.

A espécie de morcegos *Sturnira lilium* (Yangochiroptera) é frugívora, com uma alta preferência pelos frutos de solanáceas e uma menor preferência pelos frutos de moráceas, piperáceas e bombanaceas¹⁴. Eles habitam formações florestais úmidas e semiáridas, bem como em áreas urbanas e abertas. Eles usam lugares escuros, como cavernas, buracos no solo ou buracos nas árvores como refúgio e podem formar

colônias de até dez indivíduos localizada geograficamente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai¹⁶; ¹⁷ (Figura 4).



Figura 4: Distribuição geográfica da espécie *S. liliium*, em amarelo observa-se as localidades onde a espécie *S. liliium* pode ser localizada. (Figura adaptada de Garcia, 2009).

A maioria das espécies de morcegos possui hábito insetívoro¹, podendo consumir grandes variedades de insetos, como mariposas, besouros, baratas, moscas, mosquitos, cupins, entre outros¹⁸. Apesar do termo insetívoro, esses morcegos também podem consumir outros artrópodes, como aranhas e escorpiões¹⁹.

Morcegos que se alimentam de insetos podem consumir o dobro do seu peso em insetos em uma única noite e, portanto, são os principais controladores naturais dos mesmos, sendo extremamente importantes para a agricultura²⁰ e o meio ambiente¹⁸.

Molossus molossus (Yangochiroptera) é uma espécie de morcego insetívoro. Possui nichos maiores, alimentando-se com mais frequência de coleoptera e com menos frequência de lepidoptera²¹. Vivem em florestas, formações de campo e áreas urbanas e podem formar grandes colônias de até quatrocentos indivíduos²². Estes indivíduos estão distribuídos geograficamente na Argentina, Belize, Brasil, Colômbia,

Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Estados Unidos (Flórida), Uruguai e Venezuela²³ (Figura 5).



Figura 5: Distribuição geográfica da espécie *M. molossus*, em amarelo observa-se as localidades onde a espécie *M. molossus* pode ser localizada. (Figura adaptada de Dolan, 1989).

Algumas espécies de morcegos se alimentam apenas de sangue animal (hematofagia) e são comumente chamadas de morcegos vampiros. O morcego hematófago normalmente se alimenta de grandes mamíferos como o gado; os morcegos vampiros de pernas peludas (*Diphylla ecaudata*) e os morcegos asas brancas (*Diaemus youngi*) se alimentam exclusivamente de sangue de pássaros²⁴.

Entre os indivíduos hematófagos, está a espécie *Desmodus rotundus* (Yangochiroptera), que pode viver em cavernas, poços velhos e abandonados, minas, buracos de árvores e edifícios abandonados, podendo formar colônias médias e grandes (com aproximadamente cinco mil indivíduos)^{11; 22}. As espécies *D. rotundus* habitam localidades na Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela²² (Figura 6).



Figura 6: Distribuição geográfica da espécie *D. rotundus*, em amarelo observa-se as localidades onde a espécie *D. rotundus* pode ser localizada. (Figura adaptada de Wilkinson, 1985).

Entre outros hábitos de alimentação de morcegos, encontramos carnívoros, que podem consumir peixes, lagartos, pequenos pássaros e sapos; folívoros, que consomem várias folhas e, finalmente, os onívoros que usam dois ou mais hábitos de alimentação já mencionados^{1; 2; 16}.

1.3. Modelos de estudos padrões e alternativos

Estudos com modelos padrões animais como camundongos (*Mus musculus*), ratos (*Rattus norvegicus*), nematoides (*Caenorhabditis elegans*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), apresentam diversas vantagens e desvantagens. As vantagens podem ser:

1. curto período na geração de descendentes,
2. banco de dados genômicos e transcriptômicos,
3. fácil acesso comercial a esses organismos e
4. disponibilidade de várias linhagens celulares^{25; 26}.

As desvantagens em modelos padrões animais são:

1. os trabalhos são restritos apenas a esses tipos de animais e
2. os modelos geralmente se concentram em linhagens puras^{25; 26}.

Como alternativa, surgem modelos animais não canônicos para um quadro mais geral. Os morcegos são ótimos modelos de estudos experimental não canônicos devido à sua considerável longevidade quando comparamos a outros mamíferos terrestres de tamanhos semelhantes além da baixa incidência de tumores e câncer²⁷.

Levando-se em consideração seu pequeno tamanho corporal e alta taxa metabólica, adaptada ao voo, é impressionante como algumas espécies de morcegos podem viver em média 25 anos. Além disso, é realmente intrigante como a espécie de morcego hematófago *Desmodus rotundus* vive em média 16 anos, e o insetívoro *Myotis velifer*, em média 10 anos²⁸, sendo a máxima longevidade descrita de 41 anos para um morcego insetívoro²⁹.

1.4. Espécies reativas

Espécies reativas (ER) são moléculas ou elementos químicos altamente reativos com a capacidade de interagir com outros elementos alterando sua estrutura e carga. A maioria das vezes estão centrados nas espécies reativas de oxigênio (EROs), embora existam também espécies reativas de nitrogênio (ERNs), cloro, bromo e carbono com uma grande importância biológica e estas estão classificadas como radicalares e não radicalares³⁰.

As propriedades tóxicas do oxigênio não eram totalmente claras antes da publicação da Teoria dos radicais livres de Gershman em 1954, que afirmou que sua toxicidade é devida a formas parcialmente reduzidas de oxigênio³¹. No mesmo ano Commoner e colaboradores descobrem radicais livres em amostras de materiais vivos³². Em 1956 as argumentações sobre as EROs ganhou força quando Harman desenvolveu a teoria do envelhecimento baseada na produção de ER³³.

A grande maioria dos EROs é gerada nas mitocôndrias através da cadeia de transporte de elétrons³⁴, mas há muitas outras fontes de ER nas células como na membrana plasmática, citosol, lisossomos, retículo endoplasmático entre outros. Posteriormente, descobriu-se que muitas proteínas geram ER em desequilíbrio da homeostase e que outras produzem ER para retornar à homeostase³⁵. Portanto, as

ER estão amplamente ligadas a funções metabólicas e possuem inúmeras funções benéficas para o organismo.

1.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo, em sistemas biológicos, é caracterizado pelo desequilíbrio entre as EROs e ERNs e seus respectivos agentes antioxidante em favor da ERs.

Este desequilíbrio gera uma interrupção nas sinalizações e controle redox, gerando danos em macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos^{30;36}. Mas é importante lembrar que as ERs são produtos normais do metabolismo oxidativo e importantes para manutenção da vida. É necessário um equilíbrio entre as ER e antioxidantes e, por isso, os organismos desenvolveram ao longo da evolução, mecanismos de defesas antioxidantes³⁰.

As células são protegidas em virtude de um sistema antioxidante intrincado, que consiste em sistemas enzimáticos e não enzimáticos, os últimos podendo ser de origem endógenas ou exógenas, para manter o estado redox homeostático das células³⁷. Em paralelo, os organismos desenvolveram sistemas de regeneração de macromoléculas danificadas, especialmente o DNA, a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesas³⁸.

1.6. Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas³⁰. As defesas enzimáticas são endógenas, ou seja, são sintetizadas pelo organismo por meio de fatores de transcrição de acordo com as necessidades de cada uma delas. Essas enzimas estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e podem ser: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), fumarase, catalase (CAT), entre outras.

Estas são capazes de atuar em conjunto para reduzir os níveis EROs e ERNs. Por outro lado, existem defesas não enzimáticas, podemos citar a glutathione (GSH) que é o principal composto antioxidante intracelular, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A), ácido úrico, transferrina (principal proteína transportadora de ferro), carotenoides, flavonoides, e alguns hormônios como progesterona e estradiol, que desempenham papéis importantes na defesa das

biomoléculas³⁰. O ácido úrico, a GSH³⁹, a progesterona e o estradiol⁴⁰ são importantes exemplos de antioxidantes não enzimáticos endógenos.

O sistema antioxidante enzimático e a glutathione estão localizados predominantemente no meio intracelular, enquanto o sistema não enzimático encontra-se principalmente no meio extracelular, com exceção das vitaminas C e E, a primeira pode ser transportada no meio intracelular e a segunda está localizada na membrana celular^{30; 41}.

As principais formas de SOD em humanos são a cobre zinco (Cu-ZnSOD) localizada em lisossomos, citoplasma, núcleo e espaço entre as membranas externa e interna da mitocôndria; manganês (MnSOD) nas mitocôndrias e uma isoforma Cu-ZnSOD extracelular (EC-SOD)³⁰. A enzima SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 .

A CAT catalisa a decomposição do H_2O_2 a H_2O e O_2 . A GPx atua em peróxidos em geral, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como cofator e formando dissulfeto glutathione oxidada (GSSG)^{30; 42} (Figura 7).

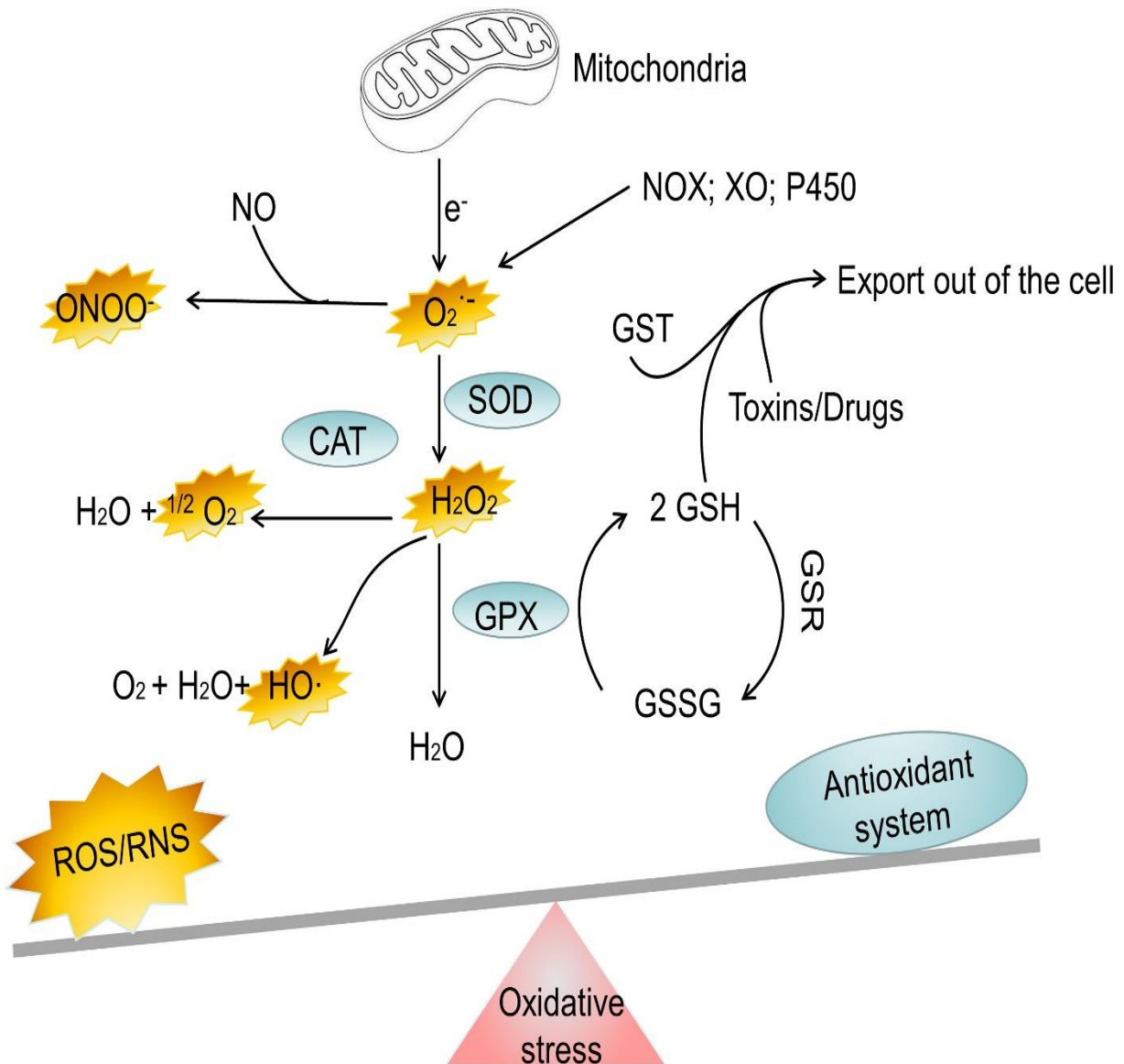


Figura 7: Modelo esquemático da relação entre SOD, CAT e GPX, a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 é catalisada pela enzima SOD. Esse H_2O_2 é transformado pela catalase e peroxirredoxinas em oxigênio molecular e água a GPx utiliza a glutatona como cofator para reduzir o peróxido de hidrogênio a água. (Figura adaptada de Lushchak e Semchyshyn ,2012).

1.7. Dietas pro-oxidantes e antioxidantes

Os primeiros humanos foram datados a mais de 2 milhões de anos, mas as necessidades nutricionais foram evoluindo durante mais de 25 milhões de anos de desenvolvimento evolutivo de primatas antropóides⁴³. Em 400 a.C Hipócrates escreveu “deixe que os alimentos sejam sua medicina e que sua medicina sejam os alimentos”, referente a isto sabemos que a saúde alimenta é um conceito bem antigo³⁰. Há aproximadamente 12000 anos começou a agricultura organizada e isso estimulou mudanças alimentares e sociais que ultrapassou em muita nossa capacidade biológica de adaptação⁴⁴.

Isso levou à várias hipóteses de que as “doenças da civilização” estão enraizadas em uma incompatibilidade crônica entre nossa programação nutricional antiga (mas ainda atual) e nossa entrada dietética contemporânea^{43; 44}, uma incompatibilidade chave entre o suprimento dietético e a necessidade fisiológica pode estar nos micronutrientes antioxidantes⁴⁵. Este conceito é apoiado por evidências crescentes de que o dano em macromoléculas (dano oxidativo) desempenha um papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, entre outras doenças crônicas, como as relacionadas à idade (artrite e artrose), e que os antioxidantes dietéticos se opõem a isso e reduzem o risco destas doenças⁴⁶.

A evidente participação dos radicais livres na fisiopatologia de doenças relacionadas ao envelhecimento colocou a dieta antioxidante como uma forte alternativa na prevenção de doenças. Essas doenças podem ser crônicas ou inflamatórias e alguns tipos de tumores e câncer. Segundo esta hipótese, a administração de suplementos alimentares antioxidantes poderia aumentar a expectativa de vida ao prevenir essas doenças.

Em particular, acredita-se amplamente que dietas ricas em frutas e vegetais (dieta antioxidante) desempenham um papel fundamental na prevenção de doenças humanas, em uma recente revisão concluiu-se que há evidências convincentes de que o aumento do consumo de vegetais e frutas reduz o risco de desenvolver doenças crônicas e inflamatórias⁴⁷.

Infelizmente, a maioria dos estudos em pacientes utilizando suplementação antioxidante têm apresentado resultados bastante decepcionantes, principalmente na administração de vitaminas, como a vitamina A, C e E^{48; 49; 50}.

Apesar disso, estudos populacionais mostram que dietas ricas em antioxidantes consumidas durante um longo período da vida dos indivíduos, como a dieta do mediterrâneo, e dietas ricas em vegetais, trazem benefícios tanto no aumento do tempo de vida como na prevenção de doenças^{51;52}. Corroborando esta ideia, dietas pro-oxidantes, como excessiva fonte de proteína animal, colesterol e graxas saturadas e poucos vegetais (dietas pro-oxidantes) podem promover danos no fígado, aterosclerose e diminuição da expectativa de vida e aumento, principalmente, de doenças cardiovasculares⁵².

1.8. Dietas pro-oxidantes e antioxidantes em morcegos

A restrição de nicho alimentar em morcegos se torna muito interessante sob o ponto de vista do estresse oxidativo, pois existem espécies que apresentam dietas altamente oxidantes, no caso dos hematófagos e altamente antioxidantes, como é o caso dos frugívoros. A ingestão exclusiva de sangue é considerada pró-oxidante devido a altas concentrações de ferro. Metais de transição como o ferro e o cobre são responsáveis pela formação de radicais livres altamente oxidantes através da reação de Fenton⁵³.

Por outro lado, uma dieta frugívora é considerada antioxidante devido à presença de importantes antioxidantes não-enzimáticos produzidos pelas plantas e presentes em altas concentrações nos frutos. Podemos destacar entre estes antioxidantes a vitamina C, carotenoides e flavonoides, dentre muitos outros. Além disso, frutos podem ser fonte de metais e outros elementos necessários para a atividade de enzimas antioxidantes⁵⁴. Um estudo prévio sugere que a dieta frugívora é a mais antioxidante quando compara à onívora e animalívora, porém utilizando apenas medidas de pró- e antioxidantes totais no plasma sanguíneo destes animais⁵⁵. Apesar de ser um indicativo de que a dieta frugívora realmente contribui na proteção contra o estresse oxidativo, não é possível compreender os mecanismos de dano e proteção nas espécies estudadas.

1.9. Microbioma e microbiota

O termo microbioma refere-se a todo o habitat, incluindo o microorganismos, composto principalmente por bactérias, seguido dos fungos e vírus e todos os seus genomas (ou seja, genes) e as condições ambientais circundantes. Essa definição é baseada na de “bioma”, os fatores bióticos e abióticos de determinados ambientes. A caracterização do microbioma pode ser realizada pela aplicação de uma ou combinações de metagenômica, metabolômica, metatranscriptômica e metaproteômica combinada com metadados clínicos ou ambientais⁵⁶. O microbioma intestinal é a relação simbiótica que existe entre esses microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) e o intestino de cada organismo⁵⁷.

Nos últimos anos a comunidade científica tem demonstrado um interesse significativo sobre a composição bacteriana do microbioma intestinal, pois ela tem sido associada a uma grande variedade de doenças humanas como diabetes, obesidade, inflamações intestinais e até câncer^{58; 59; 60; 61; 62}. A Figura 9 mostra algumas das funções do microbioma.

Ao longo da vida, a composição, e conseqüentemente o funcionamento do microbioma, pode sofrer influências de diferentes fatores, tais como: ambiente, alimentação, antibióticos, doenças, senescência, entre outros⁵⁷.

Já o termo microbiota é o conjunto de microorganismos presentes em um determinado meio ambiente. O termo microbiota foi definido pela primeira vez por Lederberg e McCray em 2001.

Eles enfatizaram a importância dos microorganismos que habitam o corpo humano na saúde e na doença. Este censo microbiano é estabelecido usando métodos moleculares baseados predominantemente na análise de genes *16S rRNA*, genes *18S rRNA* ou outros genes marcadores e regiões genômicas, amplificados e sequenciados de determinadas amostras biológicas. As atribuições taxonômicas são realizadas usando uma variedade de ferramentas que atribuem cada sequência a um táxon microbiano (bactérias, archaea ou eucariotos inferiores) em diferentes níveis taxonômicos de filo para espécie⁵⁶.

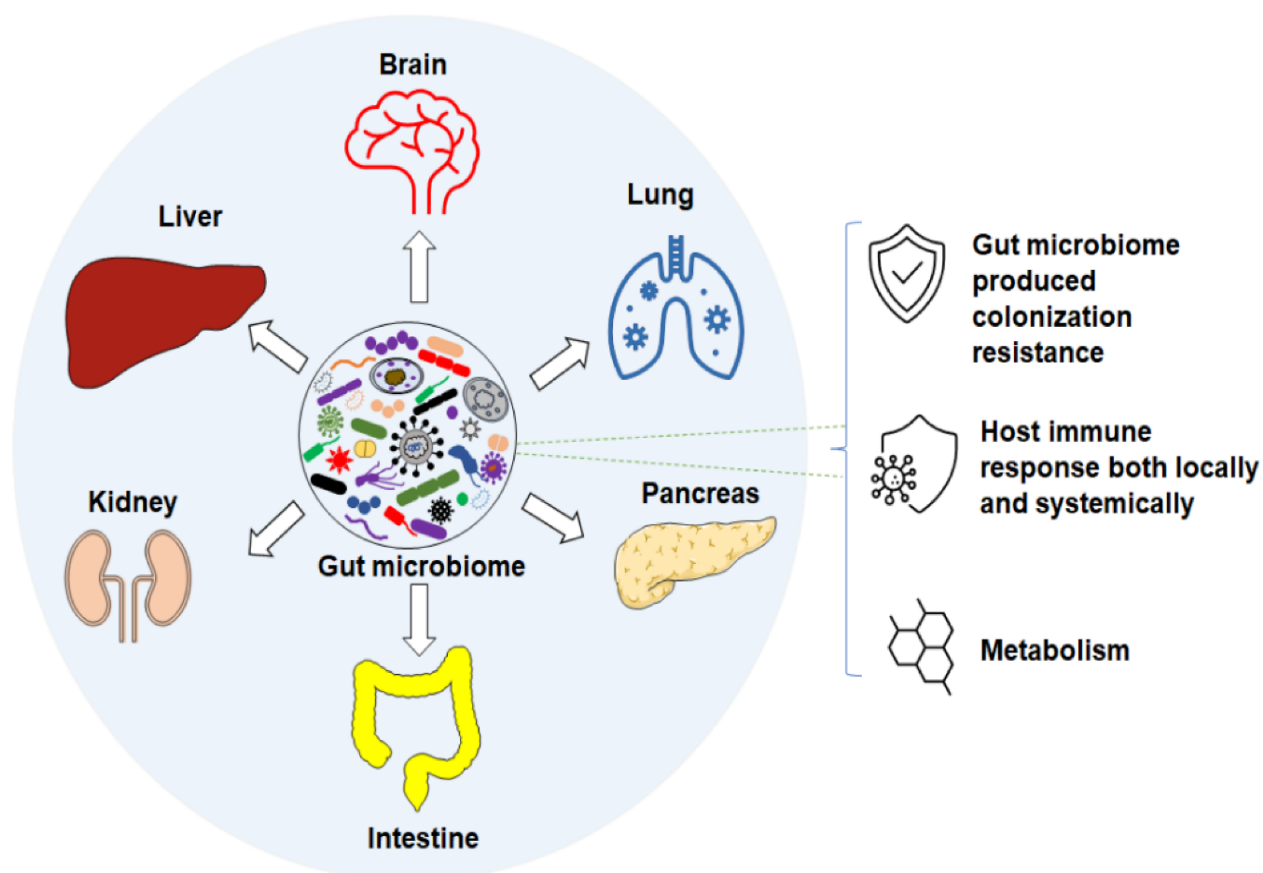


Figura 8: Funções do microbioma, o microbioma está envolvida na resistência, resposta imune e no metabolismo dos diversos órgãos (Figura adaptada de Zhang, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

No presente estudo pretendemos compreender e comparar como dietas pró-oxidantes ou antioxidantes modificam o metabolismo oxidativo e a composição da microbiota intestinal utilizando órgãos como coração e fígado de morcegos como modelo experimental.

2.1. Por que utilizar morcegos?

São modelos não canônicos de estudos, importantes ecológica e economicamente, baixa incidência de tumores e câncer, dietas extremas (frugívoras = antioxidantes e hematófagas = pro-oxidantes).

2.2. Por que utilizar coração?

Por ter uma alta frequência cardíaca nestes animais, alta taxa metabólica e frequência respiratória acelerada. Com tudo isso este órgão pode ter mais geração de ERs e por isso gerar mais dano oxidativo no tecido cardíaco.

2.3. Por que utilizar fígado?

O fígado é um órgão importante na detoxificação de xenobióticos lipossolúveis e produz e armazena antioxidantes não enzimáticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal

Investigar a relação entre as diferentes dietas alimentares e a resposta ao metabolismo oxidativo e a microbiota intestinal em quatro espécies de morcegos machos das espécies nectarívoras, frugívoras, insetívoras e hematófagas da fauna do sul do Brasil.

3.2. Específicos

Caracterizar e comparar a microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 1)**.

Avaliar a frequência de diferentes filos, classes, ordens familiares e gêneros microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 1)**.

Comparar a atividade metabólica em órgãos coração e fígado pela atividade da enzima fumarase microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 2)**.

Analisar e comparar marcadores de dano oxidativo em proteínas e lipídios em órgãos coração e fígado microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 2)**.

Analisar e comparar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx, GST e consumo de H₂O₂ em órgãos coração e fígado microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 2)**.

Analisar e comparar os níveis dos antioxidantes não enzimáticos glutathiona e nitritos e nitratos em órgãos coração e fígado microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 2)**.

Analisar e comparar os níveis de antioxidante não enzimático vitamina C em órgãos coração e fígado microbiota intestinal de quatro espécies de morcegos machos da fauna do sul do Brasil **(Capítulo 3)**.

4.MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.CAPITULO 1 MICROBIOTA INTESTINAL

(Artigo foi submetido à Revista Microbial Ecology na data 26-05-2023)

Contribuição do autor

Diego Antonio Mena Canata: Coleta e processamento de órgãos, extração e purificação de DNA, análises de resultados e manuscrito científico.

4.2. CAPITULO 2

ESTRESSE OXIDATIVO

(Artigo foi submetido à revista Antioxidants na data 18-05-2023)
(Os dados relacionados ao rim já foram apresentados na dissertação de mestrado da Francielly Dias Pereira)

Contribuição do autor

Diego Antonio Mena Canata: Coleta e processamento de órgãos, experimentos, análises de resultados e manuscrito científico.

4.3. CAPITULO 3

VITAMINA C

Contribuição do autor

Diego Antonio Mena Canata: Coleta e processamento de órgãos, experimentos, análises de resultados e manuscrito científico.



an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

Vitamin C Levels in Different Organs of Bat Species from Different Food Groups

Authored by:

Diego Antonio Mena Canata; Mara Silveira Benfato; Francielly Dias Pereira; Maria João Ramos Pereira; Pabulo Henrique Rampelotto

Published in:

Life 2022, Volume 12, Issue 12, 2121



Basel, December 2022



an Open Access Journal by MDPI

Vitamin C Levels in Different Organs of Bat Species from Different Food Groups

Diego Antonio Mena Canata: Mara Silveira Benfato: Francielly Dias Pereira: María João Ramos Pereira: Pabulo Henrique Rampelotto

2 . Volume 12. Issue 12. 2121



Communication

Vitamin C Levels in Different Organs of Bat Species from Different Food Groups

Diego Antonio Mena Canata ^{1,2}, Mara Silveira Benfato ^{1,2}, Francielly Dias Pereira ^{1,2}, María João Ramos Pereira ³ and Pabulo Henrique Rampelotto ^{4,*}



³ Graduate Program in Animal Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

⁴ Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

*Correspondence: prampelotto@hcpa.edu.br

Citation: Mena Canata, D.A.;

Benfato, M.S.; Pereira, F.D.; Pereira,

M.J.R.; Rampelotto, P.H. Vitamin C

Levels in Different Organs of Bat

Species from Different Food Groups.

Life **2022**, *12*, 2121. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/life12122121)

10.3390/life12122121

Academic Editor: Einar Ringø

Received: 31 October 2022

Accepted: 13 December 2022

Published: 15 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

² Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

Abstract: Unlike most animals, most bats cannot synthesize vitamin C endogenously. Consequently, this vitamin must be obtained from the diet. Among the bat species, there are several food groups, such as frugivorous, nectarivorous, insectivorous, and hematophagous. In this work, we measured and compared vitamin C levels in different organs of four species of bats, all collected in southern Brazil. When analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four bat species, (regardless of the organ), no significant differences were observed. However, when analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four organs (regardless of the species), significant differences were observed, with the highest concentrations in the heart, followed by the liver and brain, while the lowest concentration was measured in the kidneys. Additional differences in the levels of Vitamin C were only observed when each organ was analyzed according to the species/diet. These results indicate a high degree of metabolic homeostasis in bats despite the marked difference in the type of diet.

Keywords: ascorbic acid; bats; nectarivore; frugivore; insectivore; vampire bat

1. Introduction

L-ascorbic acid or vitamin C is an important nutrient necessary for a wide range of metabolic processes [1–4]. Although most organisms synthesize vitamin C, a limited number of mammalian species, primates of the suborder Haplorrhini (including humans and apes), and bats (most species) are deficient in their ability to synthesize this vitamin due to a lack of activity in the enzyme L-ascorbate gulonolactone oxidase (GULO), an enzyme that catalyzes the last step of biosynthesis. Consequently, vitamin C must be obtained from the diet, i.e., exogenously [5]. Among the bat species that do not synthesize vitamin C, there are several food groups, such as frugivorous, nectarivorous, insectivorous, and hematophagous.

Glossophaga soricina is a nectarivorous bat species distributed throughout South and Central America. It has a fast metabolism and can feed on the nectar of flowers and floral parts [6]. *Sturnira lilium* is a frugivorous bat species from South America (Brazil, Bolivia, Paraguay, Uruguay, and Argentina) that has a high preference for fruits from the Solanaceae family and a lower preference for fruits from the Moraceae, Piperaceae, and Bombanaceae families [7]. *Molossus molossus* is an insectivorous bat species distributed throughout South and Central

America. This species can feed on a wide variety of insects but mainly prefers Coleoptera. The common vampire bat *Desmodus rotundus* is a small bat native to South and Central America and the only species that feeds on the blood of domestic cattle [8].

These different bat species with different food groups need to obtain vitamin C from their diet. While fruits and nectar have a high and medium content of vitamin C, respectively, and are both reasonably accessible to the frugivorous and nectarivorous bat species, what happens to the insectivorous and hematophagous bats with less access to this vitamin? In addition, how is vitamin C distributed among the key organs of the body? To answer these questions, the aim of this work was to measure and compare the levels of vitamin C in different organs of four bat species that cannot synthesize this vitamin. All samples were collected in southern Brazil, namely: *G. soricina* (nectarivorous), *S. liliium* (frugivorous), *M. molossus* (insectivorous), and *D. rotundus* (hematophagous).

2. Material and Methods

2.1. Animals and Samples Collection

Thirty-nine adult male bats were captured between the summer of 2018 and the winter of 2019 using dip nets, mist nets, or harp traps, depending on the type of shelter, in southern Brazil (Table S1). The bat species captured were *G. soricina* ($n = 10$), *S. liliium* ($n = 10$), *M. molossus* ($n = 10$) and *D. rotundus* ($n = 9$). Capture happened at the beginning of the night to ensure that all bats were fasted and so that food intake did not bias vitamin C levels. The animals were euthanized after capture by intraperitoneal injection with a combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) to remove of all organs. Organs were frozen in liquid nitrogen immediately and stored at -80°C for further analysis and testing.

2.2. Organ Processing

Brains, hearts, livers, and kidneys were manually macerated by Potter with a 30 mmol/L phosphate buffer, 120 mmol/L KCl, 0.201 mmol/L PMSF 150 $\mu\text{mol/L}$ deferoxamine in pH 7.4 and centrifuged for 10 min, 14,000 \times g. The supernatant was aliquoted and frozen at -80°C for later analyses and assays.

2.3. Vitamin C Assay

Vitamin C levels were measured by HPLC employing a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm \times 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); samples were injected at a volume of 25 μL . The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm [9].

2.4. Statistical Analysis and Data Normalization

To test for significant differences among sample grouping, nonparametric permutationbased multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with 999 permutations, followed by a Bonferroni-corrected PERMANOVA pairwise comparison, was performed in PAST [10]. In addition, dendrogram analysis based on the Bray–Curtis dissimilarity metric was performed. All results were normalized to protein concentration determined with the Bradford method [11]. All assays in this study were independently performed in triplicate.

3. Results

When analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four bat species, (regardless of the organ), no significant differences were observed (Table 1). However, when analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four organs (regardless of the species), significant differences were observed (Figure 1). The highest concentrations of vitamin C were measured in the heart, followed by the liver and brain, while the lowest concentration was measured in the kidneys (PERMANOVA, $df = 3$, $MS = 624,765$, $F = 58.61$, $p < 0.0001$) (Figure 1A). The dendrogram showed a clear grouping of samples by organ according to the vitamin C levels (Figure 1B); only the liver presented 2 profiles: one grouping with brain samples and the other with the heart. This difference in liver profiles is due to the higher levels of vitamin C in the liver of insectivorous and frugivorous bats, which makes them close to the levels of vitamin C in heart samples.

Table 1. Pairwise PERMANOVA test among the group of samples grouped according to bat species. No significant difference was observed.

	<i>G. soricina</i> (Nectarivorous)	<i>S. liliium</i> (Frugivorous)	<i>M. molossus</i> (Insectivorous)	<i>D. rotundus</i> (Hematophagous)
<i>G. soricina</i> (nectarivorous)		0.3234	0.3708	0.8576
<i>S. liliium</i> (frugivorous)	0.3234		0.9719	0.7154
<i>M. molossus</i> (insectivorous)	0.3708	0.9719		0.4864
<i>D. rotundus</i> (hematophagous)	0.8576	0.7154	0.4864	

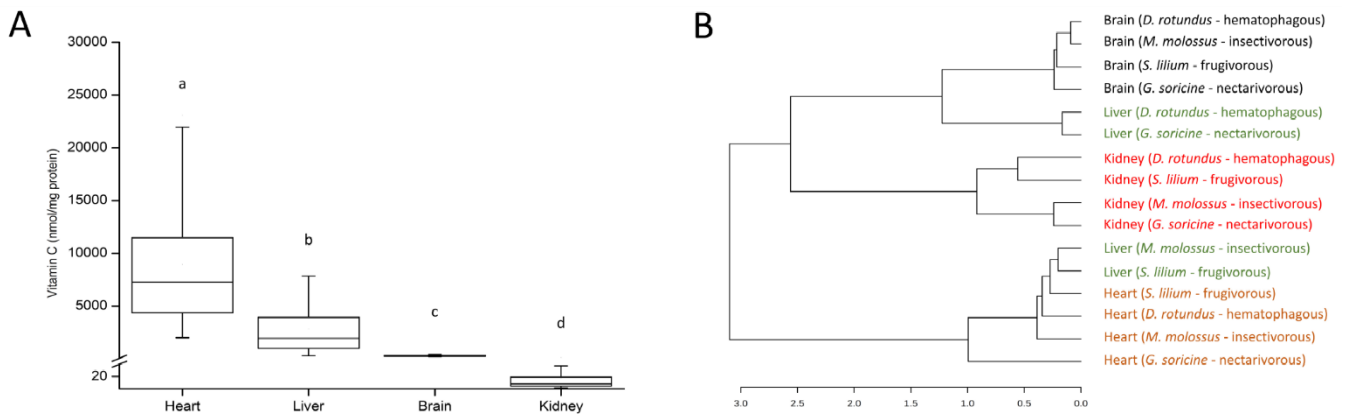


Figure 1. Vitamin C levels in each tissue regardless of the bat species (A); error bars represent the standard deviation of the mean; different letters represent statistical significance assessed by PERMANOVA and pairwise test (corrected p-value < 0.05). Dendrogram clustering using Bray-Curtis dissimilarity index (B); colors were used to differentiate the different tissues.

Vitamin C levels in each organ were analyzed and significant differences were observed according to the bat species (PERMANOVA, $df = 3$, $MS = 318,309$, $F = 24.49$, $p < 0.0001$) (Figure 2). The heart of the nectarivorous species presented significantly higher levels of vitamin C compared to the other three species (Figure 2A). In the liver, significantly higher levels were observed in frugivorous and insectivorous bats when compared to nectarivorous and hematophagous bats (PERMANOVA, $df = 3$, $MS = 394,172$, $F = 17.55$, $p < 0.0001$) (Figure 2B). In the brains of the four bat species, no significant differences were found in the levels of vitamin C (PERMANOVA, $df = 3$, $MS = 13,631$, $F = 1.53$, $p = 0.222$) (Figure 2C). In the kidneys, significantly higher levels were observed in the frugivorous species (PERMANOVA, $df = 3$, $MS = 4641$, $F = 33.93$, $p < 0.0001$) (Figure 2D).

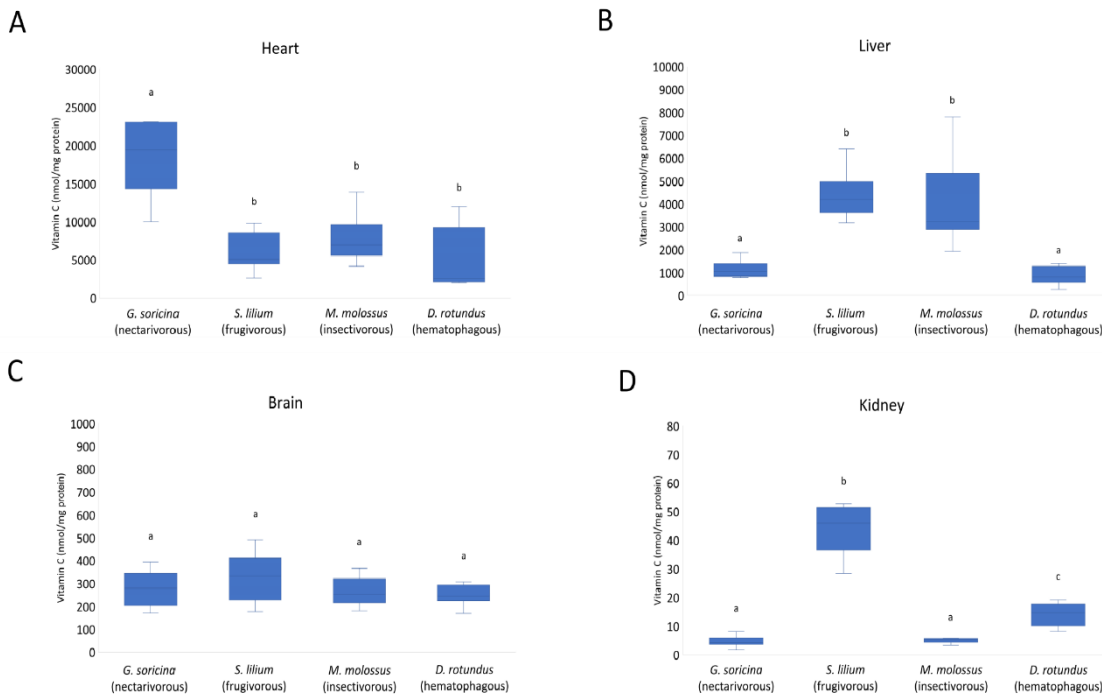


Figure 2. Vitamin C levels in each tissue and bat species. Heart (A). Liver (B). Brain (C). Kidney (D). Error bars represent the standard deviation of the mean; different letters represent statistical significance assessed by PERMANOVA and pairwise test (corrected p -value < 0.05).

4. Discussion

In this work, we measured and compared vitamin C levels in different organs of four species of adult male bats from different feeding groups (i.e., nectarivorous, frugivorous, insectivorous, and hematophagous). In general, it is expected that the concentration of vitamin C is higher in frugivorous and nectarivorous bats and lower in insectivorous and hematophagous bats. This expectation is primary based on their feeding diets as high concentrations of vitamin C are found mainly in fruits [12] but also in nectar [13,14]. On the other hand, there are still doubts about whether insects synthesize vitamin C, although some studies show the presence of this and other vitamins in Coleoptera, which is the main food of *M. molossus* [15–17]. Also, hematophagous bats must acquire vitamin C from the blood plasma of their prey, which is a particularly low source of vitamins. The presence of cattle is common in the region where blood-sucking bats were collected, and we assume that cattle are the food source for these bats.

It was surprising to find no significant differences in the level of vitamin C in these quite distinct bat species. However, when analyzing and comparing the levels of vitamin C in the four organs (regardless of the species), significant differences were observed, which indicates a high degree of metabolic homeostasis. The homeostasis and absorption of vitamin C in the body depends directly on the amount ingested and is regulated by intestinal absorption, tissue accumulation and distribution, utilization and recycling rate, and excretion [18]. The incorporation of this vitamin in tissues is due to sodium–vitamin C transporters (SVCTs) with two isoforms: SVCT 1 and 2. The SVCT2 isoform seems to be the most important for introducing ascorbate into tissues, except in red blood cells [19]. The lethality of SVCT1 and SVCT2 knockout mice reveals the importance of both transporters in vitamin C homeostasis [20].

Additional differences in the levels of vitamin C were only observed when each organ was analyzed according to the species/diet. In this regard, bats are known to have a high metabolism and heart rate [21], so we can assume that the distribution of vitamin C is mainly towards the heart, and even more so in the nectarivorous species since these animals, such as hummingbirds, must maintain flight while feeding [22]. With the high heart rate, oxidative damage could be generated and, to try to prevent or reduce it, the distribution of this vitamin to this vital organ is prioritized.

Liver is the main organ where vitamin C is metabolized and stored, which explains the high rates of this vitamin in the liver. Also, in the areas where the bats were collected, plantations of Moraceae, Bromeliaceae, and Musaceae were observed. Such plantations use pesticides, which may explain the higher levels of vitamin C in the liver of frugivorous and insectivorous. When frugivorous and insectivorous bats feed on the fruits and insects in these plantations, they may be incorporating pesticides, leading to a high burden on the liver, the organ known for detoxifying xenobiotics [23,24]. Vitamin C could be involved in the process of eliminating toxic free radicals and other reactive species, thus benefiting the proper functioning of the liver in these species of bats. [25].

In the brain, vitamin C is an essential molecule. Beyond its antioxidant role, it also has several other important functions, participating as a co-factor in several metabolic pathways [26]. In mammals, the highest concentrations of vitamin C in the body are found in the brain and neuroendocrine tissues [27]. However, the levels of vitamin C in bats were found to be low when compared to the heart and liver. In addition, no difference was found in its levels in the four brain species, indicating a strict regulation on keeping a regular and low concentration of this vitamin in the brain of bats, regardless the type of diet.

The kidneys filter an excess of vitamins from the body, so low levels of vitamin C are expected in this organ. The particularly higher levels of vitamin C in the kidneys of frugivorous may be explained by the high levels of vitamin C in fruits, which may exceed the necessary intake for bats and need to be filtered and eliminated from their body. Indeed, the toxic effect of a high vitamin C supplementation in fruit bats have already been reported [28].

In summary, the fact that these bat species do not present differences in the concentration of vitamin C, despite the marked difference in the type of diet, while keeping a high degree of metabolic homeostasis, leads us to question which stage would be responsible for these intriguing results: Would intestinal uptake be more efficient in animals with diets containing lower concentrations of vitamins? Or would there be transporters present in the tissues? These questions need to be answered in future studies. A better understanding on the body homeostasis of vitamin C may shed new light on the functional roles of this vitamin in animal.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life12122121/s1>. Table S1: Location and coordinates of each sample collection site in Southern Brazil.

Author Contributions: D.A.M.C.: Organ collection and processing, analysis of results and writing. F.D.P.: organ collection and processing. M.J.R.P.: Collection of animals, identification of sex and species. M.S.B.: Research orientation and writing. P.H.R.: Analysis of results and writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work had the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), No. 88887.798411/2022-00.

Institutional Review Board Statement: This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS, No. 28645). In addition, this work followed the guidelines of the Law of Procedures for the Scientific Use of Animals—Law No. 11,794 and the Guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), with a license for the collection of zoological material authorized in the SISBIO Biodiversity Information and Authorization System (No. 47202-1), National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) and National Council for the Control of Animal Experimentation (No. 33339).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: To the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology (PPGBCM) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

Conflicts of Interest: The authors declare that there were no conflict of interest.

5. References

1. Padh, H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.* **1990**, *68*, 1166–1173. [[CrossRef](#)]
2. Padayatty, S.J.; Levine, M. Vitamin C: The known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* **2016**, *22*, 463–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Harrison, F.E.; Dawes, S.M.; Meredith, M.E.; Babaev, V.R.; Li, L.; May, J.M. Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 821–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brabson, J.P.; Leesang, T.; Mohammad, S.; Cimmino, L. Epigenetic regulation of genomic stability by vitamin C. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 675780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cui, J.; Yuan, X.; Wang, L.; Jones, G.; Zhang, S. Recent loss of vitamin C biosynthesis ability in bats. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lemke, T.O. Foraging ecology of the long-nosed bat, *Glossophaga soricina*, with respect to resource availability. *Ecology* **1984**, *65*, 538–548. [[CrossRef](#)]
7. Jacomassa, F.A.F.; Bernardi, I.P.; Passos, F.C. Seasonal diet variation, preferences and availability of resources consumed by *Sturnira lilium* (É. Geoffroy St.-Hilaire, 1810) (Chiroptera: Phyllostomidae) in Brazilian seasonal deciduous forest. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2021**, *93*, e20201571. [[CrossRef](#)]
8. Mantovan, K.B.; Menozzi, B.D.; Paiz, L.M.; Sevá, A.P.; Brandão, P.E.; Langoni, H. Geographic distribution of common vampire bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) shelters: Implications for the spread of rabies virus to cattle in Southeastern Brazil. *Pathogens* **2022**, *11*, 942. [[CrossRef](#)]
9. Karatepe, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LC-GC N. Am.* **2004**, *22*, 362–365.
10. Anderson, M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* **2001**, *26*, 32–46. [[CrossRef](#)]
11. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fenech, M.; Amaya, I.; Valpuesta, V.; Botella, M.A. Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 2006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Silva, F.A.; Guirgis, A.; Thornburg, R. Nectar analysis throughout the genus *Nicotiana* suggests conserved mechanisms of nectar production and Bbiochemical action. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Horner, H.T.; Healy, R.A.; Ren, G.; Fritz, D.; Klyne, A.; Seames, C.; Thornburg, R.W. Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *Am. J. Bot.* **2007**, *94*, 12–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jedlicka, P.; Cvacka, J.; Sláma, K. Juvenile hormone-stimulated synthesis of acyl-glycerols and vitamin E in female accessory sexual glands of the fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2009**, *72*, 48–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ooninx, D.; Finke, M.D. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *J. Insects Food Feed.* **2021**, *7*, 639–659. [[CrossRef](#)]
17. Krishnan, N.; Kodrik, D.; Kludkiewicz, B.; Sehna, F. Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 180–188. [[CrossRef](#)]
18. Lindblad, M.; Tveden-Nyborg, P.; Lykkesfeldt, J. Regulation of vitamin C homeostasis during deficiency. *Nutrients* **2013**, *5*, 2860–2879. [[CrossRef](#)]
19. Savini, I.; Rossi, A.; Pierro, C.; Avigliano, L.; Catani, M.V. SVCT1 and SVCT2: Key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* **2008**, *34*, 347–355. [[CrossRef](#)]
20. Rivas, C.I.; Zúñiga, F.A.; Salas-Burgos, A.; Mardones, L.; Ormazabal, V.; Vera, J.C. Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem.* **2008**, *64*, 357–375. [[CrossRef](#)]
21. Wilhelm Filho, D.; Althoff, S.L.; Dafré, A.L.; Boveris, A. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 214–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ingersoll, R.; Haizmann, L.; Lentink, D. Biomechanics of hover performance in Neotropical hummingbirds versus bats. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaat2980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Calao-Ramos, C.; Gaviria-Angulo, D.; Marrugo-Negrete, J.; Calderón-Rangel, A.; Guzmán-Terán, C.; Martínez-Bravo, C.; Mattar, S. Bats are an excellent sentinel model for the detection of genotoxic agents. Study in a Colombian Caribbean region. *Acta Trop.* **2021**, *224*, 106141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cai, X.; Young, G.M.; Xie, W. The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166101. [[CrossRef](#)]

25. Arrigoni, O.; De Tullio, M.C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1569*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Travica, N.; Ried, K.; Sali, A.; Scholey, A.; Hudson, I.; Pipingas, A. Vitamin C status and cognitive function: A systematic review. *Nutrients* **2017**, *9*, 960. [[CrossRef](#)]
27. Harrison, F.E.; May, J.M. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 719–730. [[CrossRef](#)]
28. Crawshaw, G.; Oyarzun, S.; Valdes, E.; Rose, K. Hemochromatosis (Iron Storage Disease) in Fruit Bats. In Proceedings of the First Conference on Zoo and Wildlife Nutrition, AZA Nutrition Advisory Group, Scarborough, OT, USA, 1 May 1995.

6. RESULTADOS SUPLEMENTARES

6.1. CAPITULO 1 - MICROBIOTA

Figura suplementar 1: Curva de rarefação

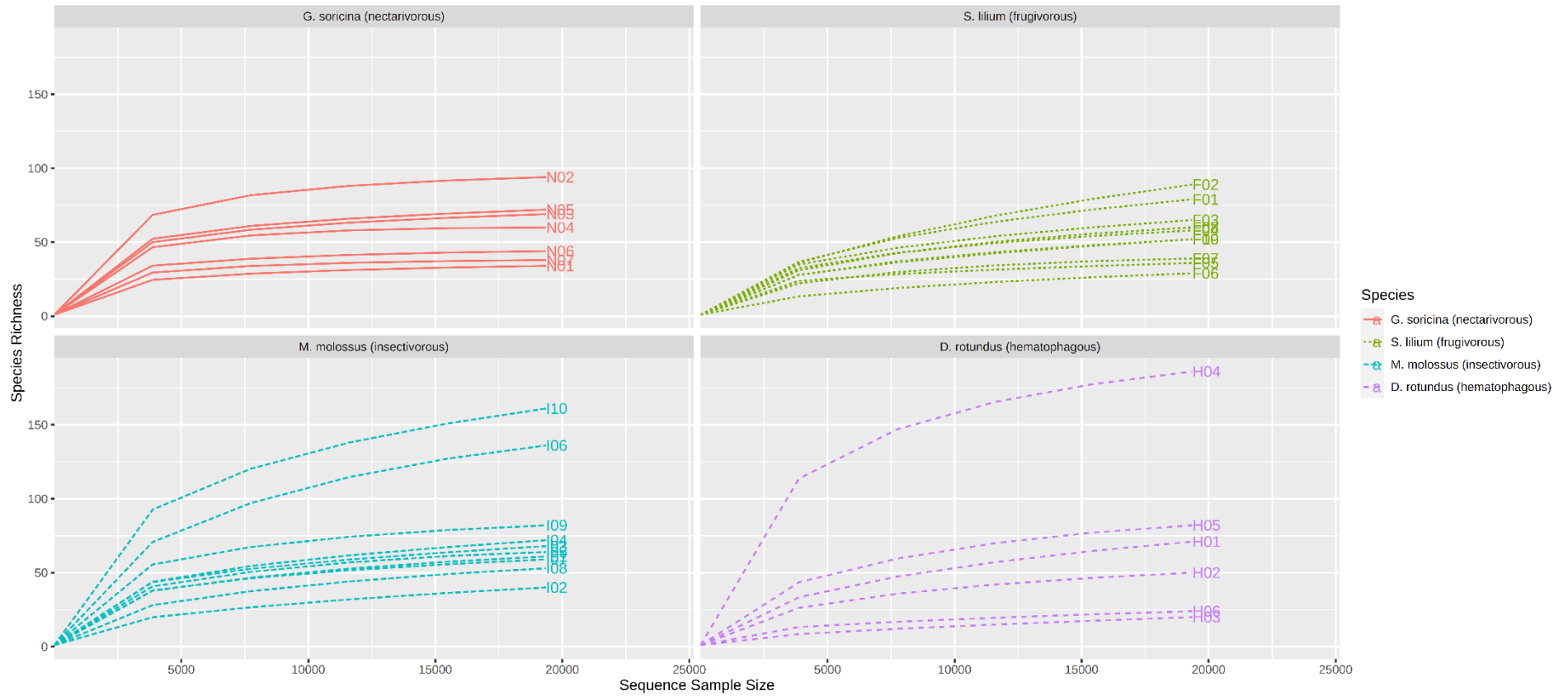


Figura suplementar 2C: Abundância relativa. Gênero.



Figura Suplementar 1: Abundância relativa onde a escala taxonômica é apresentada em níveis de: A. Filo, B. Família e C. Gênero respectivamente, em cada grupo de morcegos.

Tabela suplementar 1: Lista de gênero das quatro espécies de morcegos

Genus
<i>Mycoplasma</i>
<i>Enterobacteriaceae_un</i>
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
<i>Clostridiaceae_un</i>
<i>Pasteurellaceae_un</i>
<i>Streptococcus</i>
<i>Neisseriaceae_un</i>
<i>Bacilli_un</i>
<i>Lactobacillales_un</i>
<i>Lactobacillus</i>
<i>Lactococcus</i>
<i>Helicobacter</i>
<i>Pseudomonas</i>
<i>Micrococcaceae_un</i>
<i>Acinetobacter</i>
<i>Staphylococcus</i>
<i>Comamonadaceae_un</i>
<i>Lactobacillaceae_un</i>
<i>Lachnospiraceae_un</i>
<i>Corynebacterium</i>
<i>Dietzia</i>
<i>Bacteroides</i>
<i>Lawsonella</i>
<i>Limosilactobacillus</i>
<i>Faecalibacterium</i>
<i>Enterobacterales_un</i>
<i>Ligilactobacillus</i>
<i>Ruminococcaceae_un</i>
<i>Oscillospiraceae_un</i>
<i>Peptostreptococcaceae_un</i>
<i>Rhizobiaceae_un</i>
<i>Chryseobacterium</i>
<i>Butyricoccus</i>
<i>Erysipelatoclostridium</i>
<i>Bacillales_un</i>
<i>Hafnia_Obesumbacterium</i>
<i>Alistipes</i>
<i>Brevibacterium</i>
<i>Shewanella</i>
<i>Parabacteroides</i>
<i>Sphingomonadaceae_un</i>
<i>Stenotrophomonas</i>
<i>UCG_005</i>
<i>Brachybacterium</i>
<i>Romboutsia</i>

Tabela Suplementar 2: Lista de taxa no nível de gênero exclusivo para um grupo.

Insectivorous	Hematophagous	Frugivorous	Nectarivorous
<i>Murdochiella</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Chlamydiales_un</i>	<i>Ureaplasma</i>
<i>Arcanobacterium</i>	<i>WPS_2_ge</i>	<i>Pir4_lineage</i>	<i>Alysiella</i>
<i>Actinomycetaceae_un</i>	<i>Gemmataceae_un</i>	<i>JG30_KF_CM45_ge</i>	<i>Wolbachia</i>
<i>Corynebacteriaceae_un</i>	<i>Bergeyella</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Bartonella</i>
<i>Weeksellaceae_un</i>	<i>Unknown_Family_ge</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Paraclostridium</i>
<i>Mageeibacillus</i>	<i>Ktedonobacteraceae_un</i>	<i>Intrasporangiaceae_un</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Zoogloea</i>	<i>Tomitella</i>	<i>Micromonosporaceae_un</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Dysgonomonas</i>	<i>Pygmaibacter</i>	<i>Moraxellaceae_un</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Cardiobacteriaceae_un</i>	<i>Corynebacteriales_un</i>	<i>Rhodobacteraceae_un</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Campylobacterales_un</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Cardiobacterium</i>
<i>Family_XI_un</i>	<i>Aminobacter</i>	<i>Actinotignum</i>	<i>Nocardiaceae_un</i>
<i>Leptotrichiaceae_un</i>	<i>Crossiella</i>		
<i>Oscillibacter</i>	<i>alphaI_cluster</i>		
<i>Proteocatella</i>	<i>Aquisphaera</i>		
<i>Saccharimonadaceae_un</i>	<i>DSSD61</i>		
<i>CAG_873</i>	<i>Nocardia</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>Christensenellaceae_R_7_group</i>		
<i>NK4A214_group</i>	<i>Globicatella</i>		
<i>Sulfuricurvum</i>	<i>Marvinbryantia</i>		
<i>UCG_002</i>	<i>Mogibacterium</i>		
<i>Burkholderiales_un</i>	<i>Erysipelotrichaceae_ge</i>		
<i>M2PB4_65_termite_group_ge</i>	<i>Rhizobiales_un</i>		
<i>Nosocomiicoccus</i>			
<i>Trichlorobacter</i>			
<i>Aminomonas</i>			
<i>Desulfobulbaceae_un</i>			
<i>Geobacteraceae_un</i>			
<i>Ruminococcus</i>			
<i>Tolomonas</i>			
<i>Gastranaerophilales_ge</i>			
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>			
<i>Anaerolineaceae_UCG_001</i>			
<i>Ferribacterium</i>			
<i>Geobacter</i>			
<i>Oxalobacteraceae_un</i>			
<i>Selenomonadaceae_un</i>			
<i>Brachymonas</i>			
<i>Flavobacterium</i>			
<i>Lachnospiraceae_UCG_010</i>			
<i>Oscillospirales_un</i>			
<i>Propionivibrio</i>			
<i>Rhodopirellula</i>			

6.2. CAPITULO 3 – VITAMINA C

Tabela Suplementar 3: Localização e coordenadas de cada local de coleta de amostras no Sul do Brasil

Bat Species	Food Group	n	Location (City - State)	Coordinates
<i>G. soricina</i>	Nectarivorous	10	Dom Pedro Alcântara - RS	29°24'22.35"S49°51'4.56"W
<i>S. liliium</i>	Frugivorous	10	Dom Pedro Alcântara - RS	29°24'22.35"S49°51'4.56"
<i>M. molossus</i>	Insectivorous	10	Treviso - SC	28°30'47.52"S49°27'26.6"
<i>D. rotundus</i>	Hematophagous	9	Criciúma -SC	28°41'27.7"S 49°25'50.6"

5. DISCUSSÃO GERAL

Os morcegos são economicamente e ecologicamente importantes. No primeiro caso, auxiliam no controle de pragas (insetos e outros invertebrados) que podem ser prejudiciais à agricultura, e ecologicamente importantes, pois são os reflorestadores das florestas, atuando como agentes polinizadores e dispersores de sementes^{8; 63}.

Nos últimos anos os morcegos têm chamado a atenção dos pesquisadores como animais de experimentação, por apresentarem baixa incidência de tumores, sistema imunológico eficiente, alta expectativa de vida em comparação com mamíferos do mesmo porte e por possuírem dietas restritivas e diferenciadas²⁷.

Além disso, os morcegos são reservatórios não só de ectoparasitas (pulgas, carrapatos, fungos, entre outros), mas também de vírus como raiva, ebola, coronavírus, hantavírus, etc., que podem causar doenças zoonóticas^{64; 65}.

Visto dessa forma, não só os vírus neles contidos podem causar zoonoses, mas também as bactérias presentes na microbiota intestinal desses animais. Neste trabalho foram coletadas quatro espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares, todas elas coletadas no sul do Brasil (Tabela Suplementar 3).

A partir do Capítulo 1 (Microbiota), as sequências obtidas do Sistema Miseq foram processadas e analisadas e utilizou-se um filtro de qualidade das amostras, fazendo-se uma curva de rarefação (Suplementar Figura 1), onde as sequências com baixa qualidade, com comprimento de reads incorreto, com bases ambíguas ou sequências que poderiam ser potencialmente quimeras foram eliminadas automaticamente (o que aconteceu com as amostras insetívoros 10 e 6 e hematófago 4). Essas sequências incorretas geralmente vêm de purificação PCR ou sequenciamento.

Os resultados da microbiota intestinal nas quatro espécies de morcegos demonstram que os hábitos alimentares dos morcegos podem ter um impacto significativo na diversidade das comunidades bacterianas intestinais.

Quando o número de táxons foi medido pelos índices de Shannon e Simpson, observamos uma diferença de diversidade significativamente maior em morcegos nectarívoros e insetívoros, ou seja, uma maior diversidade de comunidades bacterianas quando comparados a morcegos frugívoros e hematófagos.

Esses resultados podem sugerir que as diferenças nas dietas podem estar associadas aos diferentes papéis ecológicos (polinizadores e controladores de

pragas) e preferências por determinados habitats ou recursos, como por exemplo, morcegos nectarívoros e insetívoros podem alimentar-se de um número muito amplo de espécies. Em relação aos morcegos hematófagos esta dieta tão especializada faz com que a diversidade bacteriana seja baixa.

Apesar de sua extensa dieta de frutas, baixa diversidade bacteriana foi observada em morcegos frugívoros. Uma possível explicação para essa observação é que o sistema digestivo do morcego pode ter evoluído para digerir e extrair nutrientes de sua dieta com eficiência, resultando em uma diversidade bacteriana reduzida no intestino. Esse fenômeno já foi observado em outros animais, onde o sistema digestivo do hospedeiro favorece seletivamente certas espécies bacterianas em detrimento de outras, resultando em baixa diversidade de comunidades bacterianas^{66; 67; 68}.

Os resultados da diversidade beta (PCoA) das quatro espécies de morcegos corroboram mais fortemente o que foi observado na diversidade alfa, que a composição microbiana difere com os hábitos alimentares, mas observa-se uma associação entre os grupos, pois observando o que foi encontrado em componentes microbianos únicos e compartilhados (Diagrama de Veen), vemos que morcegos insetívoros e hematófagos compartilham 93 gêneros bacterianos e morcegos nectarívoros e frugívoros compartilham 63 gêneros bacterianos. Uma possível explicação é que este pode ser o componente majoritário de cada alimento, no primeiro grupo "insetívoros e hematófagos" sua alimentação é principalmente baseada em proteínas e no segundo grupo "nectarívoros e frugívoros" sua dieta é baseada principalmente em carboidratos.

A lista de gêneros únicos para cada espécie pode ser visualizada na tabela Suplementar 2.

Em relação à composição microbiana ao nível de filo, observamos maior abundância relativa para Firmicutes com 72% para as quatro espécies, seguido de Proteobacteria com 14% e Campylobacterota com 5%, os outros filós não excederam 5% de abundância (Figura Suplementar 2A). As famílias dominantes com abundância relativa maior que 10% foram Mycoplasmataceae (15%), Acholeplasmataceae (12%) e Streptococcaceae (11%) (Figura Suplementar 2B).

Ao nível do gênero, *Mycoplasma* (0,13%), *Acholeplasmataceae_un* (12%), *Streptococcus* (10%), *Peptostreptococcaceae_un* (9%) e *Enterobacteriaceae_un* (5%) foram os gêneros com maior abundância relativa (Figura Suplementar 3C), os demais

gêneros não excederam 5%, a lista de gêneros das quatro espécies pode ser observada na tabela Suplementar 1.

Conforme demonstrado neste trabalho, foram encontrados 12 gêneros de bactérias potencialmente patogênicas nas quatro espécies de morcegos, a saber: *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium_ss_1*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Peptostreptococcaceae_unclassified*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Treponema*. É importante levar em consideração esses achados, pois a cada dia estamos mais em contato com esses animais, devido às mudanças em seu habitat natural, e não apenas os morcegos hematófagos podem transmitir vírus e/ou bactérias aos seres humanos.

Um total de 23 vias metabólicas foram diferencialmente abundantes. As análises das vias funcionais na microbiota intestinal das quatro espécies de morcegos revelaram diferenças significativas em seu potencial metabólico relacionado aos seus nichos alimentares.

Observando e analisando os resultados do capítulo 2 (estresse oxidativo), podemos dizer que os danos às macromoléculas (neste caso proteínas e lipídios) revelaram variações entre as diferentes espécies e órgãos de morcego. Os níveis de grupos carbonila e malonaldeído exibiram padrões distintos no coração, fígado e rim.

Os morcegos hematófagos apresentaram baixos níveis de dano oxidativo no coração, mas altos níveis no fígado. Este achado sugere que os morcegos hematófagos possuem mecanismos de defesa antioxidantes eficientes no coração, o que pode ser atribuído aos seus hábitos alimentares únicos e adaptações fisiológicas associadas.

Os resultados obtidos em relação as enzimas antioxidantes também demonstraram variações nas atividades destas enzimas entre os diferentes grupos de alimentação e órgãos.

Os antioxidantes não enzimáticos também apresentaram variações entre as espécies e órgãos dos morcegos. Morcegos hematófagos exibiram proporções GSSG/GSH mais altas no coração, indicando um desequilíbrio no estado redox, potencialmente devido à presença de pró-oxidantes na alimentação destes morcegos.

Curiosamente, os morcegos nectarívoros exibiram maiores razões GSSG/GSH no fígado e no rim, sugerindo uma maior demanda por reciclagem de GSH e capacidade antioxidante nesses órgãos. A razão GSSG/GSH é um importante indicador de estresse oxidativo e equilíbrio redox, e sua elevação em órgãos

específicos reflete a natureza dinâmica dos mecanismos de defesa antioxidante em morcegos.

Com relação ao capítulo 3 (Vitamina C), diferenças adicionais nos níveis de vitamina C só foram observadas quando cada órgão foi analisado de acordo com a espécie/dieta. A este respeito, sabe-se que os morcegos têm um metabolismo e uma frequência cardíaca elevados, pelo que podemos supor que a distribuição da vitamina C é principalmente para o coração, e ainda mais nas espécies nectarívoros, uma vez que estes animais, como os beija-flores, devem manter o vôo enquanto se alimentam⁶⁹. Com a frequência cardíaca elevada, pode ser gerado dano oxidativo e, para tentar preveni-lo ou reduzi-lo, prioriza-se a distribuição dessa vitamina para esse órgão vital.

Em resumo, o fato dessas espécies de morcegos não apresentarem diferenças na concentração de vitamina C, apesar da diferença marcante no tipo de dieta, mantendo um alto grau de homeostase metabólica, nos leva a questionar qual estágio seria o responsável por esses resultados intrigantes: A absorção intestinal seria mais eficiente em animais com dietas contendo menores concentrações de vitaminas? Ou haveria transportadores presentes nos tecidos?

Esses achados contribuem para nossa compreensão da intrincada relação entre hábitos alimentares, microbiota intestinal e metabolismo oxidativo em espécies de morcegos neotropicais.

As dietas restritivas variadas dos morcegos não apenas moldam suas estruturas morfológicas, mas também modulam seus padrões metabólicos e microbiota intestinal. Essas adaptações permitem que eles mantenham processos energéticos normais durante o vôo, minimizando os efeitos dos danos oxidativos adversos.

Podemos ressaltar que, apesar dos morcegos possuírem altos picos metabólicos, os efeitos prejudiciais são mínimos devido à oxidação. Esse fenômeno sugere um sistema único de regulação metabólica em morcegos que mitiga efetivamente os efeitos adversos da oxidação. A capacidade de manter um alto nível de atividade metabólica com estresse oxidativo mínimo destaca as impressionantes adaptações fisiológicas dos morcegos e ressalta a importância de estudar seus processos metabólicos.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo fornece evidências de que os hábitos alimentares dos morcegos podem influenciar a diversidade e composição de suas comunidades bacterianas e nas respostas aos danos oxidativos através das enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos. A análise das vias funcionais na microbiota intestinal das quatro espécies de morcegos revelou diferenças significativas em seu potencial metabólico relacionado aos seus nichos alimentares como assim também nas análises do metabolismo oxidativo netas espécies estudadas.

Além disso, a identificação de bactérias potencialmente patogênicas sugere que o transporte de patógenos microbianos por morcegos pode variar dependendo dos hábitos alimentares e de fatores específicos do hospedeiro. Essas descobertas têm implicações importantes na saúde pública e também para a conservação das comunidades de morcego destacando a necessidade de promover diversos habitats e fontes de alimento para sustentar essas espécies ecologicamente importantes.

Os padrões distintos observados no dano oxidativo, nas atividades das enzimas antioxidantes e os níveis de antioxidantes não enzimáticos entre os diferentes órgãos e espécies de morcegos sugerem que cada órgão tem suas próprias demandas e adaptações específicas para lidar com o estresse oxidativo com base em suas funções fisiológicas e exposição a diferentes componentes da dieta.

Em relação às vias metabólicas e ao metabolismo oxidativo, não foi observado sinergismo entre elas, podendo estar presentes, mas não relativamente abundantes como demonstrado para outras vias metabólicas relacionadas aos hábitos alimentares de cada espécie. Estudos e/ou trabalhos relacionando essas vias com o metabolismo oxidativo devem ser aprofundados.

Trabalhos futuros devem ter como objetivo investigar os mecanismos moleculares subjacentes responsáveis pelas variações observadas no status antioxidante entre espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares. Além disso, estudos longitudinais que examinam os perfis antioxidantes e as respostas ao estresse oxidativo de morcegos em diferentes contextos ambientais e condições fisiológicas aumentarão nossa compreensão da natureza dinâmica dos sistemas de defesa antioxidante.

7. Perspectivas

Projetos futuros envolvendo morcegos machos e fêmeas devem ser realizados para investigar possíveis diferenças específicas de sexo em suas características metabólicas.

Diferentes espécies coletadas de outras regiões e/ou países também devem ser incluídas para comparar não apenas o metabolismo oxidativo, mas também a microbiota desses animais.

7. ANEXOS

A. Carta de Aprovação para uso de animais



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33339

Título: ADAPTAÇÃO A DIETAS PRO- E ANTIOXIDANTES: ESTUDO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DE DIFERENTES GUILDAS ALIMENTARES

Vigência: 02/01/2018 à 30/12/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador desde 02/01/2018
 MARIA JOAO VELOSO DA COSTA RAMOS PEREIRA - coordenador desde 02/01/2018
 FERNANDA SCHÄFER HACKENHAAR - pesquisador desde 02/01/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 28/08/2017 - SALA 330 DO ANEXO - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 80 morcegos, 10 machos e 10 fêmeas de cada espécie (espécies hematófagas, insetívoras, onívoras e frugívoras), provenientes de fauna do RS, com a finalidade de (captura e coleta), possuindo autorização da SISBIO Nº 47202-1; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 8 de Setembro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
 Coordenador da comissão de ética

B. Licença para coleta de material zoológico SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 47202-1	Data da Emissão: 26/01/2015 16:52
Dados do titular	
Nome: Maria João Veloso da Costa Ramos Pereira	CPF: 704.293.951-40
Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Outras ressalvas

1	A pesquisadora titular Maria João Veloso da Costa Ramos Pereira, de nacionalidade estrangeira, tem vínculo de Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor Adjunto na UFRGS. Dispensada de autorização do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.
---	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Chiroptera
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36714429



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 47202-1	Data da Emissão: 26/01/2015 16:52
Dados do titular	
Nome: Maria João Veloso da Costa Ramos Pereira	CPF: 704.293.951-40
Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36714429



Página 2/2

8. CURRICULUM VITAE



PROFILE

Graduated in Biology - Universidad Nacional de Asuncion (UNA) in 2007. Master's degree in Cellular and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) in 2016. PhD in progress by UFRGS, in the second year. Has experience in Molecular Techniques such as Polymerase Reaction (PCR), Western Blot, ELISA, Unidimensional and Bidimensional Electrophoresis, Zimograms, Dot Blot and Liquid and gas chromatography. Experience in quantification and purification of Proteins and Nucleic Acids. Has experience in Medicine, with emphasis on Oxidative Stress. Biochemical analysis of enzymatic antioxidant activities and levels of non-enzymatic antioxidants.

CONTACT: Telephone

(+5551)9-8552-9457

Site:

<http://lattes.cnpq.br/2169160081489265>

e-mail:

menacanatadiego@gmail.com

UFRGS

MASTER (2014 – 2016)

Oxidative Stress Study in Patients with Nasal Polyposis.
Análises Bioquímica de enzimática e não-enzimática antioxidantes.

PhD (2019 – 2023)

Adaptation to pro and antioxidant diets: a study of oxidative metabolism in bat species of different food guilds.

EXPERIENCES

I have experiences in the area of education, research, monitoring and guidance.

Experience in quantification and purification of Proteins and Nucleic Acids in Medicine, with emphasis on Oxidative Stress.

During a full six years in the Oxidative Stress Laboratory (LEO), my interest in topics of Oxidative Metabolism led me to develop new techniques for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the development of spectrophotometric techniques on plastic and quartz microplates.

I have full conviction of the importance of Cellular and Molecular Biology not only in the understanding, diagnosis and treatment of diseases, but also in the technological development in various areas, apart from being one of the most interesting and complex areas of knowledge.

PUBLISHED ARTICLES

Canata, Diego Antonio Mena; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Schüller, Ártur Krumberg; da Silva, Guilherme Luis Franche; Teixeira, Cassiano; Benfato, Mara Silveira. Role of asthma and intolerance to acetylsalicylic acid on the redox profile in nasal polyp tissue. *European Archives of oto-rhino-laryngology*, v. 275, p. 2027-2033, 2018.

Schüller, Ártur Krumberg; Mena Canata, Diego Antonio; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Engers, Vanessa Krüger; Heemann, Fernanda Maciel; Putti, Jordana Salete; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara Silveira. Effects of lipoic acid and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid on the liver ovariectomized rat model of menopause. *Pharmacological reports*, v. 70, p. 263-269, 2018.

Diego Antonio Mena Canata, Mara Silveira Benfato, Francielly Dias Pereira, Maria João Ramos Pereira, Pabulo Henrique Rampelotto. Vitamin C levels in different organs of bat species from different food groups. pmid: 36556485. pmcid: pmc9783699. doi: 10.3390/life12122121

ABILITY

Punctuality. Teamwork. Fellowship. Order. Discipline. Knowledge. Recognition and solution of problems.

9. REFERÊNCIAS

- 1 FENTON M, S. N. In: **Bats: a world of science and mystery**. Chicago Press: 2015.
- 2 LAURINDO, R. L. M. N. A. R. D. S. **Desmitificando os morcegos**. Monte Belo: 2015.
- 3 WINTER, Y.; LOPEZ, J.; VON HELVERSEN, O. Ultraviolet vision in a bat. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 612-614, Oct 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185801000035 >.
- 4 BERNARD, E. Ecos na escuridão: o fascinantes sistema de orientação dos morcegos. **Ciência Hoje**, p. 14-20, 2003.
- 5 CALOURO, A. M. **Os morcegos**. Bichos na escola: 26 p. 2008.
- 6 BERNARD, E. **Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito**. Ciência Hoje: 44-49 p. 2005.
- 7 MELLO, M. A. R. **Morcegos e frutos: interação que gera florestas**. Ciência Hoje: 30-35 p. 2007.
- 8 HODGKISON, R. et al. Fruit bats (Chiroptera : Pteropodidae) as seed dispersers and pollinators in a lowland Malaysian rain forest. **Biotropica**, v. 35, n. 4, p. 491-502, Dec 2003. ISSN 0006-3606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188002400005 >.
- 9 ARITA, H. T.; SANTOS-DEL-PRADO, K. Conservation biology of nectar-feeding bats in Mexico. **Journal of Mammalogy**, v. 80, n. 1, p. 31-41, Feb 1999. ISSN 0022-2372. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078738800004 >.
- 10 DA COSTA, C. L., DOS SANTOS, J. A. A., DOS SANTOS, K. R. P., & DE AGUIAR JÚNIOR, F. C. A. **ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSEO MADURO DE *Glossophaga soricina* (PHYLLOSTOMIDAE: CHIROPTERA)**. Ciência Animal Brasileira: 13(4) p. 2012.
- 11 BARQUEZ, R. P., S., MILLER, B. AND DIAZ, M. **The IUCN Red List of Threatened species**. The IUCN Red List of Threatened species 2015.
- 12 BAKER, H. G.; BAKER, I.; HODGES, S. A. Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 559-586, Dec 1998. ISSN 0006-3606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078081800009 >.
- 13 HOFFMANN, F. G.; BAKER, R. J. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera : Phyllostomidae) and phylogeography in *G-Soricina* based on the cytochrome-b gene. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 1092-1101, Nov 2001. ISSN 0022-2372. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172387500020 >.
- 14 MELLO, M. **Interações entre o morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) e plantas da família Solanaceae**. Interações entre o morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) e plantas da família Solanaceae. Campinas, São Paulo, Brasil 2006.
- 15 MELLO, M. A. R.; KALKO, E. K. V.; SILVA, W. R. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic forest. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 2, p. 485-492, Apr 2008. ISSN 0022-2372. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255306200023 >.

- 16 VELAZCO, P., AND PETERSON, B. **The IUCN Red List of Threatened species**. The IUCN Red List of Threatened species 2017.
- 17 GARCIA, G.; MORENO, N. Migration and differentiation of primordial germ cells in *Sturnira lilium* and *Artibeus jamaicensis*. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 418-419, Jul 2009. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267777900114 >.
- 18 WRAY, A. K. et al. Incidence and taxonomic richness of mosquitoes in the diets of little brown and big brown bats. **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 3, p. 668-674, Jun 2018. ISSN 0022-2372. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000434058500007 >.
- 19 KRISTA J PATRIQUIN, C. G., JOSHUA HINDS, JOHN M RATCLIFFE. Male and female bats differ in their use of a large urban park. **Journal of Urban Ecology**, p. 1-13, 2019.
- 20 DOLAN, P. G. **Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus***. . Dolan, P.G. 1989. Systematics of Middle American Special Publications of the Museum of Texas Tech University: 29: 1–71. p. 1989.
- 21 FREEMAN, P. W. CORRESPONDENCE OF FOOD-HABITS AND MORPHOLOGY IN INSECTIVOROUS BATS. **Journal of Mammalogy**, v. 62, n. 1, p. 166-173, 1981. ISSN 0022-2372. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LJ90300018 >.
- 22 WILKINSON, G. S. THE SOCIAL-ORGANIZATION OF THE COMMON VAMPIRE BAT .1. PATTERN AND CAUSE OF ASSOCIATION. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 17, n. 2, p. 111-121, 1985. ISSN 0340-5443. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985ALZ3500003 >.
- 23 DOLAN, P. G. **Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus***. Dolan, P.G. 1989. Systematics of Middle American Special Publications of the Museum of Texas Tech University: 29: 1–71. p. 1989.
- 24 GREENHALL, A. M. Bats in Agriculture. **A Ministry of Agriculture Publication**, p. 1-8, 1961.
- 25 HOLTZE, S. et al. Alternative Animal Models of Aging Research. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, May 2021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000656133600001 >.
- 26 BUFFENSTEIN, R. et al. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 99-109, Sep 2008. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258881300004 >.
- 27 WILKINSON, G. S.; SOUTH, J. M. Life history, ecology and longevity in bats. **Aging Cell**, v. 1, n. 2, p. 124-131, Dec 2002. ISSN 1474-9718. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182895400008 >.
- 28 CONDE-PEREZPRINA, J. C. et al. DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity. **Age**, v. 34, n. 6, p. 1473-1492, Dec 2012. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310536200013 >.
- 29 PODLUTSKY, A. J. et al. A new field record for bat longevity. **Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 60, n. 11, p. 1366-1368, Nov 2005. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233923800014 >.

- 30 GUTTERIDGE, B. H. A. J. **Free Radicals in Biology & Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2015.
- 31 GERSCHMAN, R. et al. OXYGEN POISONING AND X-IRRADIATION - A MECHANISM IN COMMON. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-626, 1954. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1954UA93100002 >.
- 32 COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. FREE RADICALS IN BIOLOGICAL MATERIALS. **Nature**, v. 174, n. 4432, p. 689-691, 1954. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1954UA40600025 >.
- 33 HARMAN, D. AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY. **Journals of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1956CHD5000009 >.
- 34 KOOPMAN, W. J. H. et al. Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 12, p. 1431-1470, Jun 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277345500005 >.
- 35 HOLZEROVA, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 63, p. 16-20, Jun 2015. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000355710800004 >.
- 36 SUZUKI, Y. J. et al. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1683-1692, May 2006. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237685900001 >.
- 37 KABUTO, H. et al. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. **Environmental Research**, v. 93, n. 1, p. 31-35, Sep 2003. ISSN 0013-9351. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184451500004 >.
- 38 STEVEN, T. et al. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1-2, p. 77-84, Jun 1998. ISSN 0027-5107. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000075166300010 >.
- 39 VINA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **Febs Letters**, v. 579, n. 12, p. 2541-2545, May 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229051600001 >.
- 40 MOORTHY, K. et al. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 4, p. 295-302, Apr 2005. ISSN 0531-5565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228682700005 >.
- 41 VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, Sep-Oct 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249501000046 >.

- 42 LUSHCHAK, V., & SEMCHYSHYN, H. **Oxidative stress: molecular mechanisms and biological effects**. Rijeka: IntechOpen, 2012.
- 43 MILTON, K. Back to basics: Why foods of wild primates have relevance for modern human health. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 480-483, Jul-Aug 2000. ISSN 0899-9007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088374900006 >.
- 44 EATON, S. B.; KONNER, M.; SHOSTAK, M. STONE AGERS IN THE FAST LANE - CHRONIC DEGENERATIVE DISEASES IN EVOLUTIONARY PERSPECTIVE. **American Journal of Medicine**, v. 84, n. 4, p. 739-749, Apr 1988. ISSN 0002-9343. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988M848400014 >.
- 45 PAULING, L. EVOLUTION AND NEED FOR ASCORBIC ACID. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 67, n. 4, p. 1643-&, 1970. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970I017400001 >.
- 46 AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. OXIDANTS, ANTIOXIDANTS, AND THE DEGENERATIVE DISEASES OF AGING. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, Sep 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LV64400003 >.
- 47 CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-646S, Aug 2000. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088634200021 >.
- 48 BARDIA, A. et al. Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 1, p. 23-34, Jan 2008. ISSN 0025-6196. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252114400005 >.
- 49 BAIRATI, I. et al. Antioxidant vitamins supplementation and mortality: A randomized trial in head and neck cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2221-2224, Nov 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240674000031 >.
- 50 PAGANINI-HILL, A.; KAWAS, C. H.; CORRADA, M. M. Antioxidant Vitamin Intake and Mortality. **American Journal of Epidemiology**, v. 181, n. 2, p. 120-126, Jan 2015. ISSN 0002-9262. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000348184300007 >.
- 51 BONACCIO, M.; IACOVIELLO, L.; DE GAETANO, G. The Mediterranean Diet and reduced cardiovascular disease. **European Heart Journal**, v. 38, n. 8, p. 535-536, Feb 2017. ISSN 0195-668X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000396509800002 >.
- 52 FUNG, T. T. et al. Low-Carbohydrate Diets and All-Cause and Cause-Specific Mortality Two Cohort Studies. **Annals of Internal Medicine**, v. 153, n. 5, p. 289-+, Sep 2010. ISSN 0003-4819. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281605500002 >.
- 53 HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease, the value of cell culture and animal models. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. S3-S3, Sep 2015. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000360568700005 >.
- 54 PEREIRA, M. C. et al. Mineral characterization of native fruits from the southern region of Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 258-266, Apr-Jun 2014. ISSN 0101-2061. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000340598900006 >.

- 55 SCHNEEBERGER, K.; CZIRJAK, G. A.; VOIGT, C. C. Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 4, p. 285-290, Apr 2014. ISSN 0028-1042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334069400003 > .
- 56 MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, Jul 2015. ISSN 2049-2618. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363238200001 > .
- 57 JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, Aug 2015. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000360189600005 > .
- 58 WU, H. J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 4-14, 2012. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000525665100003 > .
- 59 FELIX, K. M.; TAHSIN, S.; WU, H. J. J. Host-microbiota interplay in mediating immune disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1417, n. 1, p. 57-70, Apr 2018. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000431488700004 > .
- 60 CHERVONSKY, A. V. Microbiota and Autoimmunity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, Mar 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315985200011 > .
- 61 ATARASHI, K.; HONDA, K. Microbiota in autoimmunity and tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 761-768, Dec 2011. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298623100010 > .
- 62 VOGELZANG, A. et al. Microbiota - an amplifier of autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 55, p. 15-21, Dec 2018. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000454374400004 > .
- 63 DUCUMMON, S. L. Ecological and economic importance of bats. **Bat Conservation and Mining: a Technical Interactive Forum, Proceedings**, p. 7-16, 2001. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178264200002 > .
- 64 MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 10, p. 469-472, Dec 2003. ISSN 0931-1793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187276100001 > .
- 65 HUANG, Y. Y. et al. The Threat of Potentially Pathogenic Bacteria in the Feces of Bats. **Microbiology Spectrum**, ISSN 2165-0497. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000876985000001 > .
- 66 MENDOZA, M. L. Z. et al. Hologenomic adaptations underlying the evolution of sanguivory in the common vampire bat. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 4, p. 659-668, Apr 2018. ISSN 2397-334X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000431612000020 > .

- ⁶⁷ WANG, K. et al. Molecular adaptation and convergent evolution of frugivory in Old World and neotropical fruit bats. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 22, p. 4366-4381, Nov 2020. ISSN 0962-1083. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000550460600001 >.
- ⁶⁸ GAULKE, C. A. et al. Ecophylogenetics Clarifies the Evolutionary Association between Mammals and Their Gut Microbiota. **Mbio**, v. 9, n. 5, Sep-Oct 2018. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000449472200012 >.
- ⁶⁹ INGERSOLL, R.; HAIZMANN, L.; LENTINK, D. Biomechanics of hover performance in Neotropical hummingbirds versus bats. **Science Advances**, v. 4, n. 9, Sep 2018. ISSN 2375-2548. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000449224000022 >.