



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

## **Metabolismo energético e resposta ao jejum do morcego hematófago *Diphylla ecaudata***

**Carolinne Isabella Dias Gomes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana de Cássia Pinheiro

Brasília  
2008

*À minha mãe, meu pai e minha irmã,  
pelo carinho e incentivo constantes*

“Só podemos preservar o que amamos, só podemos amar o que entendemos,  
só podemos entender o que nos foi ensinado.”  
(Autor desconhecido)

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para  
sempre.”  
(Mahatma Gandhi)

## **Agradecimentos**

**Em primeiro lugar agradeço à Deus, que esteve sempre comigo, me dando forças para lutar e chegar até aqui. E à Santo Expedito, que sempre ouviu meus pedidos;**

Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Eliana de Cássia Pinheiro**, que me permitiu estagiar em seu laboratório, e que confiou em meu trabalho para a realização deste projeto de Mestrado. Nosso período de convivência foi de grande aprendizado para mim, não só científico. Muito obrigada pela amizade, confiança, orientação e paciência;

À amiga e companheira de mestrado **Joicy Ferreira de Queiroz**. Sem sua presença o trabalho seria muito mais penoso e difícil. Obrigada pelo companheirismo e força no campo, no laboratório, e na vida! Sua amizade foi um dos melhores Resultados desta pesquisa;

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves**, por suas valiosas sugestões e críticas ao projeto, pela cuidadosa análise estatística dos dados, e principalmente por sua amizade;

Ao **Prof. Dr. Wilson Uieda**, que sacrificou parte de seu tempo para me ensinar o manejo dos animais no campo e em laboratório, etapas indispensáveis à realização deste projeto, e principalmente, por reforçar em mim os valores da gratidão e ajuda ao próximo;

Às Profas. Dras. participantes da Banca: **Elizabeth Maria Talá de Souza** e **Mariella Bomtempo Duca de Freitas**, obrigada pela atenção e importantes sugestões;

Ao **Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto**, coordenador desta Pós-Graduação, pelo apoio durante o período do mestrado;

Aos amigos do Laboratório Integrado, também colegas de pós-graduação: **Rosângela Vasconcelos** (a Rô sempre tinha à mão o que precisávamos); **Ingrid Oliveira**, **Luciana Peixoto**, **Denise Neves**, **Juscelino Blasczyk**, **Ita de Oliveira**, e demais colegas da pós-graduação, obrigada pelos bons momentos;

Ao estagiário **Igor Ferreira**, que me ensinou pacientemente os procedimentos experimentais para execução deste projeto; e ao estagiário **André Protzek**, pelo trabalho duro no campo;

Aos **Profs. Drs. Roque Magno, Vanner Boere e Jader Soares Marinho-Filho**;

À funcionária do Departamento de Ciências Fisiológicas **Danielle**, aos funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Médicas **Alessandro** e **Daniele**, ao funcionário do Laboratório de Biofísica **Chiquinho**, e demais funcionários do Instituto de Biologia;

Ao **Sr. João Bruno da Costa**, funcionário do Controle de Zoonoses de Brasília, e ao aluno de Doutorado **Roberto Andrade**, que acompanharam diversas coletas de animais no campo;

À Universidade de Brasília (**UnB**), que possibilitou a execução deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e à Fundação Universidade de Brasília (**FUB**), que financiaram esta pesquisa;

Agradeço especialmente a meus pais, **Maristella e Airton**, que sempre estimularam minha curiosidade e busca pelo conhecimento. O meu trabalho é fruto do sacrifício e esforço de vocês. Agradeço também à minha irmã **Giovanna**;

À amiga e irmã **Rachel Couto**, por seu apoio incondicional; ao **Guilherme Jaborandy**, por seu incentivo e apoio durante praticamente todo o período do projeto; e aos

amigos **Amanda loira, Livia, Fernanda Rios, Bruna, Fernanda Thees, Alê, Mila, Amanda morena, Flávio, Pinheiro, Caio, Antonio, Ely, Raphael, Nathália e Larissa** pela amizade, conselhos, e pelos momentos de descontração; e ao amigo **Hernani Oliveira**, por seu auxílio no campo e amizade desde a nossa graduação;

À minha tia **Maria**, meus padrinhos **Glória e Carlos**, minhas primas **Anninha, Daniella e Andrea**;

Ao querido morcególogo **Roberto Leonan Morim Novaes** (que me ensinou a amar ainda mais os morcegos e a pesquisa) por seu carinho, paciência e importantes sugestões ao meu trabalho;

À **natureza**, minha grande escola.

E a todos que, embora não citados, tenham feito parte deste projeto. Muito obrigada!

DIAS-GOMES, Carolinne Isabella.

METABOLISMO ENERGÉTICO E RESPOSTA AO JEJUM DO MORCEGO HEMATÓFAGO  
DIPHYLLA ECAUDATA.

vii + 49p.

- 1 – *Diphylla ecaudata*
- 2 – Metabolismo energético
- 3 – Dieta rica em proteínas
- 4 - Jejum

## Índice Geral

Índice de figuras.....	iii
Lista de Abreviações.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>14</b>
4.1. Locais de captura.....	14
4.2. Animais.....	14
4.3. Procedimentos experimentais.....	17
4.3.1. Determinação do período experimental máximo de jejum.....	17
4.3.2. Coleta de sangue para determinação da glicemia e de ácidos graxos livres plasmáticos (AGL).....	18
4.3.3. Determinação do glicogênio no fígado e músculo peitoral.....	18
4.3.4. Determinação da proteína total no fígado e músculo peitoral.....	18
4.3.5. Determinação dos lipídios totais no fígado e músculo peitoral.....	19
4.3.6. Determinação dos ácidos graxos totais de carcaça.....	19
4.4. Tratamento Estatístico.....	19
4.4.1. Tamanho amostral.....	19
4.4.2. Análise de dados.....	20
<b>5. Resultados.....</b>	<b>21</b>
5.1. Glicemia.....	21
5.2. Ácidos graxos livres (AGL).....	22
5.3. Glicogênio hepático e muscular.....	23
5.4. Proteína total hepática e muscular.....	25
5.5. Lipídio total hepático e muscular.....	27
5.6. Ácidos graxos totais de carcaça.....	29
<b>6. Discussão e Conclusões.....</b>	<b>30</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>42</b>

## Índice de Figuras

Figura 1: <i>Diphylla ecaudata</i> .....	15
Figura 2: Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L).....	21
Figura 3: Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (mmol/L).....	22
Figura 4: Concentrações de glicogênio no fígado e músculo peitoral ( $\mu$ mol unidades-glucosil/g).....	24
Figura 5: Concentrações de proteína total no fígado e músculo peitoral (g/100g).....	26
Figura 6: Concentrações de lipídios totais no fígado e músculo peitoral (g/100g).....	28
Figura 7: Ácidos graxos totais de carcaça (g/100g).....	30

## Lista de abreviações

AGL.....	Ácidos graxos livres
ALM.....	Alimentados
ANOVA.....	Análise de Variância
EPM.....	Erro Padrão da Média
g/100g.....	gramas/ 100 gramas
GLUT4.....	transportador de glicose 4
h.....	horas
HC.....	Rica em carboidratos
HP.....	Rica em proteínas
J24.....	Jejuados por 24 horas
J36.....	Jejuados por 36 horas
mg/100g.....	miligramas/ 100 gramas
mg/dL.....	miligramas/ decilitro
mL.....	mililitro
$\mu$ mol glucosil-unidades/g.....	micromol glucosil-unidades/ grama
mmol/L.....	milimol/ litro
PEPCK.....	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Rpm.....	rotações por minuto
v/v.....	por volume

## Resumo

A literatura tem mostrado que mamíferos alimentados com dietas ricas em proteína são mais resistentes ao jejum. Entretanto, ao contrário do observado o morcego vampiro-comum *Desmodus rotundus*, apesar de possuir uma dieta muito rica em proteínas (sangue), é marcadamente susceptível ao jejum.

Para esclarecer se a fragilidade frente à privação alimentar seria uma característica de *D. rotundus*, ou se poderia estar presentes também em outros morcegos de dieta hematófaga, este estudo utilizou o morcego *Diphylla ecaudata* para investigar as reservas energéticas desses animais alimentados e as respostas ao jejum. Para isso, foram determinadas as concentrações de glicose e ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos, ácidos graxos totais da carcaça, glicogênio, lipídios e proteínas totais hepáticas e musculares em morcegos alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 h (J36).

Nossos resultados sugerem que *D. ecaudata* possui um padrão metabólico similar ao observado para *D. rotundus*: pequenas reservas de carboidratos e lipídios no estado alimentado e ausência de mobilização das reservas de lipídios e proteínas durante o jejum, o que resulta em grande susceptibilidade à restrição alimentar por períodos superiores a 36 h. Porém, esse padrão metabólico difere do observado para a maior parte dos animais de dietas ricas em proteínas.

Além da pequena contribuição das reservas energéticas na resposta à privação alimentar, uma via metabólica normalmente associada à resposta ao jejum - a neoglicogênese - parece não estar ativa na espécie *D. ecaudata*, pelo menos nos animais jejuados por 36 h, hipótese reforçada, principalmente, pela grande queda da glicemia após 24 h de privação alimentar. No entanto, em animais J24, a glicemia mantém-se em níveis

similares aos vistos em animais alimentados, semelhantes aos normalmente observados em mamíferos com dietas ricas em proteínas. A glicogenólise e a neoglicogênese poderiam ser os mecanismos responsáveis pela manutenção da glicemia em *D. ecaudata* J24, porém, como as reservas de glicogênio são pequenas e também não foi observada mobilização protéica e lipídica, é possível que animais ALM e J24 mantenham a glicose circulante em níveis normais para mamíferos (entre 70 e 100 mg/dL) também a partir da glicose da dieta, ou seja, a partir do sangue de suas presas (aves). A glicemia das aves que costumam predar seria uma das responsáveis por manter a glicemia de *D. ecaudata* em níveis compatíveis com a vida de mamíferos até 24 h de jejum, período de privação alimentar normalmente enfrentado por estes animais em condições naturais. Não se pode, no entanto, desconsiderar a participação do glicogênio hepático na manutenção da homeostase glicêmica no jejum de 24 h.

A manutenção das altas concentrações de AGL plasmáticos no estado alimentado e J24, independente de mobilização lipídica significativa, também sugere a participação da dieta na manutenção desses metabólitos.

A maior fragilidade ao jejum observada em *D. ecaudata* parece ser uma característica de morcegos com dieta hematófaga. Essa susceptibilidade que coloca esses animais em risco freqüente de morte e até mesmo de extinção parece ter sido compensada pelo mecanismo de compartilhamento recíproco de alimento, um comportamento, portanto, fundamental para a perpetuação da espécie.

## Abstract

It has been demonstrated that mammals fed with protein-rich diets are more resistant to fasting. However, the hematophagous bat *Desmodus rotundus* exhibits high susceptibility when subjected to food deprivation, though its diet is rich in proteins. This study investigated whether the hematophagous bat *Diphylla ecaudata* also shows fragility in response to fasting. In order to answer this question, the concentrations of plasmatic glucose and free fatty acids (FFA), total fatty acids from carcass, glycogen, lipids and protein total concentrations in the liver and breast muscle in bats were determined in fed (FED) and 24-h (F24) and 36-h (F36) fasted individuals. Plasma glucose levels in FED and F24 bats were similar to other mammals, but after a 36 h without food these levels were markedly reduced. Plasma FFA levels in FED bats were higher than in other mammals and remained unaltered following a 24-h fasting. Liver glycogen content decreased significantly during fasting. The protein and lipid reserves were not modified in response to fasting. Our results suggest that glucose and plasmatic FFA of *D. ecaudata* could have an exogenous source, probably from the glucose content of the blood of its prey (pigeons). However, the contribution of the hepatic glycogen reserves of *D. ecaudata* to the maintenance of glucose homeostasis in response to a 24-h fasting can not be discarded.

Despite the decrease in liver glycogen, *D. ecaudata* is unable to keep their plasma glucose at adequate levels for mammal survival after only 36 h of food deprivation, suggesting the inefficiency of mechanisms usually present at fasting, such as gluconeogenesis. Low energy reserves found in FED bats and/or the absence of protein and lipid mobilization in fasting seem to corroborate our hypothesis and suggest that a hematophagous diet could be associated with high susceptibility in response to food shortage.

## 1. Introdução

Todos os animais, incluindo mamíferos, utilizam adenosina trifosfato (ATP) como moeda energética universal indispensável à sobrevivência e reprodução. A energia proveniente dos principais nutrientes de sua dieta (carboidratos, lipídios e proteínas) que não é instantaneamente aproveitada para produção de ATP é alocada para regiões estratégicas do corpo, devendo ser mobilizada em sincronia com as necessidades celulares. Além das reservas lipídicas e protéicas, o organismo possui pequenas reservas de carboidratos, na forma de glicogênio, um polímero de glicose, que possui taxas máximas de produção de ATP maiores do que lipídios e proteínas, além de ser o único substrato energético que pode ser utilizado na ausência de oxigênio (Weber, 2001).

Embora em mamíferos a glicose seja uma importante fonte de energia para vários tecidos, a manutenção da homeostase glicêmica é particularmente importante para seu sistema nervoso, que praticamente não possui reservas de carboidratos, porém demanda uma média de 120g/dia de glicose, o que o torna muito dependente da glicose circulante para seus requerimentos energéticos (Brosnan, 1999; Taylor e Hirsch, 2007; Yeo e Sawdon, 2007). No estado pós-absortivo, mais de 90% do requerimento energético do cérebro é atendido pela glicose (Corssmit et al., 2001; Tirone e Brunicardi, 2001) e concentrações abaixo de 3 mmol/L ( $\approx$  50mg de glicose/dL de sangue) podem causar danos aos neurônios e falência cerebral, levando ao coma e morte do indivíduo (Beardsall et al., 2006). A hiperglicemia em mamíferos também resulta em danos ao organismo destes animais e níveis acima de 6 mmol/L ( $\approx$  100mg de glicose/dL de sangue) no jejum podem ter como conseqüências a glicosúria, retinopatia, nefropatia e acidentes vasculares, entre outras complicações típicas do Diabetes (Yeo e Sawdon, 2007).

A manutenção cuidadosa da glicemia em níveis constantes envolve diversos mecanismos responsáveis pela utilização da energia proveniente dos substratos da dieta ou da energia armazenada como combustível de reserva corporal (Genuth, 1998; Weber, 2001). Estes mecanismos compreendem múltiplas vias metabólicas, cujas ativações dependem de forma importante do estado nutricional (Beardsall et al., 2006; Yeo e Sawdon, 2007). A síntese de glicogênio no estado alimentado, a glicogenólise e, especialmente, a neoglicogênese no jejum são as principais vias metabólicas envolvidas no controle da homeostase glicêmica em mamíferos (Weber, 2001; Klover e Mooney, 2004; Beardsall et al., 2006). Além destas, a lipogênese, lipólise, síntese protéica, proteólise e cetogênese também estão envolvidas na regulação da homeostase glicêmica. Todas estas vias possuem controle hormonal preciso, exercido principalmente pela insulina no estado alimentado, e pelo glucagon e outros hormônios contra-regulatórios durante privação alimentar (Beardsall et al., 2006).

A ativação das diferentes vias metabólicas também sofre influência de metabólitos como a glicose, aminoácidos, ácidos graxos livres e de outros compostos de carbono como lactato e glicerol, que podem tanto inibir como ativar alostericamente enzimas-chave dessas vias. Estes metabólitos podem ser resultantes da degradação de reservas já existentes ou da ingestão alimentar (Weber, 2001; Roden e Bernroider, 2003). Como as reservas corporais também têm origem a partir da dieta, a ativação das diferentes vias metabólicas depende também do tipo de dieta ingerida (Kettelhut et al., 1980; Weber e Haman, 2004).

Desta forma, a resposta das principais vias metabólicas envolvidas na manutenção da homeostase glicêmica pode variar em animais que consomem dietas ricas em carboidratos (HC) ou ricas em proteínas (HP), dependendo do estado nutricional dos mesmos (Kettelhut et al., 1980; Tallas e White, 1988; Tawa et al., 1992; Pinheiro, 1995;

Weber e O'Connor, 2000; Mustonen et al., 2005; Beardsall et al., 2006; Nieminen et al., 2007).

Kettelhut e cols. (1980) estudaram o efeito do jejum em ratos alimentados com uma dieta HC e observaram diminuição significativa da glicemia e do glicogênio hepático nas primeiras 8 h de jejum. Já a capacidade neoglicogenética, pequena no estado alimentado, aumentou durante a privação alimentar.

Beardsall et al. (2006) observaram em humanos (dieta HC) submetidos a um aumento da ingestão de carboidratos que aproximadamente 50% da glicose captada pelos músculos é oxidada, 35% é armazenada na forma de glicogênio e 15% é liberada na forma de alanina ou lactato. Observaram, ainda, que o fígado utiliza, em média, 17% do total de glicose ingerida para síntese de glicogênio. Além disso, se os estoques de glicogênio corporais encontram-se repletos, o excesso de carboidratos é convertido em triacilgliceróis no tecido adiposo. Quando os indivíduos foram submetidos ao jejum observou-se secreção de glucagon, que promoveu glicogenólise hepática imediata, e após 8 h de privação alimentar ocorreu aumento da neoglicogênese, a partir de glicerol, lactato e aminoácidos, oriundos das reservas corporais.

Pinheiro (1995) investigou o metabolismo intermediário de duas espécies de morcegos frugívoros (dieta HC), *Artibeus lituratus* e *A. jamaicensis*, alimentados ou submetidos ao jejum. Esse estudo mostrou que a glicemia diminuiu cerca de 30% na resposta ao jejum, que esses animais utilizavam suas reservas de glicogênio hepático para o controle da glicemia no jejum de 24 h e que apenas após 48 h houve ativação neoglicogenética hepática (Pinheiro et al., 2006). Foi observado, ainda, que esses morcegos possuem baixo "turnover" protéico, possivelmente devido à deficiência deste substrato em suas dietas, fato já observado em humanos com dieta pobre em proteínas (Tawa et al.,

1992). Finalmente, mostrou-se que no jejum de 24 h o tecido adiposo abdominal é o principal fornecedor dos altos níveis de AGL plasmáticos e que, a partir de 48 h de jejum, a carcaça ocupa esse papel, com conseqüente esteatose hepática (Pinheiro, 1995).

Um estudo realizado em gatos (*Felis catus*) (dieta HP) por Kettelhut e cols. (1980) mostrou que estes animais apresentam no estado alimentado menores níveis glicêmicos e das reservas de glicogênio hepático e maior capacidade neoglicogenética hepática se comparados a gatos adaptados em laboratório a uma dieta HC. Após três dias de jejum, a glicemia e a capacidade neoglicogenética dos gatos mantiveram-se constantes, porém houve diminuição das reservas de glicogênio.

Os mesmos autores compararam as respostas metabólicas de ratos HC com ratos adaptados a uma dieta HP, ambos em estado alimentado, e observaram que estes últimos apresentaram o mesmo comportamento metabólico encontrado em gatos HP, como menores reservas de glicogênio hepático e maior atividade neoglicogenética no estado alimentado e no jejum (Kettelhut et al., 1980), sinalizando para o importante papel da dieta na definição do padrão metabólico dos animais.

Tallas e White (1988) verificaram em outro animal carnívoro (*Alopex lagopus*), a raposa do Ártico, os efeitos do jejum na homeostase glicêmica. A glicemia destes animais no estado alimentado, similar à encontrada para outros mamíferos carnívoros, como leões e tigres (Fowler, 1986; Opazo et al., 2004), não sofreu redução significativa após 24 h de privação alimentar. De acordo com os autores, a neoglicogênese seria a principal via envolvida na manutenção da glicemia destes animais durante o jejum de 24 h, e seus principais substratos seriam derivados das reservas de proteínas (aminoácidos) e de lipídios (glicerol) corporais.

Em um estudo realizado por Weber e O'Connor (2000) sobre o metabolismo energético de gambás (*Didelphis virginiana*), animais carnívoros, os autores observaram baixas reservas de glicogênio hepático em animais alimentados, que rapidamente se esgotaram com o jejum de 3 dias. Após o término dos estoques de carboidratos corporais, houve grande mobilização lipídica e aumento significativo da proteólise.

Mustonen et al. (2005) avaliaram em visons (*Mustela vison*), que também possuem dieta HP, as adaptações ao jejum. A glicemia dos animais manteve-se constante durante todos os períodos de privação alimentar avaliados (2, 3, 5 e 7 dias), e houve um aumento significativo de aminoácidos circulantes, com diminuição de reservas protéicas do músculo e fígado a partir de 5 dias de jejum. Os autores sugerem que o catabolismo protéico poderia contribuir para a manutenção da homeostase glicêmica destes animais durante o jejum.

Um estudo de Nieminen e cols. (2007) analisou os efeitos do jejum em fuínhas (*Martes americana*) (HP). Com o jejum de 48 h, a glicemia destes animais não sofreu mudança significativa e as reservas de glicogênio hepático e muscular diminuíram. Também houve diminuição de 35% das reservas lipídicas. No entanto, não houve redução significativa nas concentrações de proteína tecidual.

Em relação ao controle hormonal, em mamíferos alimentados com dietas ricas em carboidratos (HC), a maior ingestão deste substrato provoca aumento da glicemia durante o período absorptivo, o que estimula a secreção de insulina que, por sua vez, promove o uso da glicose pelos tecidos (oxidação) e a formação de reservas de glicogênio, lipídios e proteínas (Unger, 1981; Weber, 2001; Roden e Bernroider, 2003; Klover e Mooney, 2004; Beardsall et al., 2006; Langin, 2006; Yeo e Sawdon, 2007).

Já mamíferos alimentados com dietas ricas em proteína (HP), de maneira geral, apresentam durante o período absorptivo níveis glicêmicos um pouco menores, menor

concentração de glicogênio hepático, lipogênese reduzida e grande atividade neoglicogenética (Kettelhut et al., 1980; Schmid et al., 1984; Blouet et al., 2006; Westerterp-Plantenga et al., 2006). Nesse tipo de dieta, o controle hormonal é inicialmente exercido pelo glucagon, que promove a ativação neoglicogenética, tendo como substratos os aminoácidos da dieta. O aumento resultante na glicemia induz a liberação de insulina (Kettelhut et al., 1980; Krebs, 2005; Beardsall et al., 2006; Sethi e Vidal-Puig, 2007) que, por sua vez, promove os efeitos anabólicos conhecidos.

Por outro lado, para ambos os tipos de dieta, o controle da glicemia durante o jejum é feito de forma similar, com ativação da glicogenólise e da neoglicogênese (Krebs, 2005; Beardsall et al., 2006). Porém, em mamíferos com dieta HC, observa-se uma queda inicial na glicemia após as primeiras horas de jejum, mas esta se mantém em níveis compatíveis com a vida em mamíferos. Essa manutenção dos níveis glicêmicos deve-se à mobilização do glicogênio hepático e à atividade neoglicogenética (Kettelhut et al., 1980; Cryer, 1991; Tirone e Brunicardi, 2001; Beardsall et al., 2006). Já animais alimentados com dietas HP quando submetidos à restrição alimentar não apresentam uma queda inicial tão pronunciada na glicemia, devido, especialmente, à grande atividade da neoglicogênese já presente no estado alimentado, e que se mantém em altos níveis durante o jejum (Eisestein e Strack, 1971; Felig, 1979; Kettelhut et al., 1980; Tallas e White, 1988; Krebs, 2005; Mustonen et al., 2005; Blouet et al., 2006), tendo os aminoácidos das reservas protéicas corporais como substratos preferenciais (Spargo et al., 1979; Gazola et al., 2007).

Além de servir como substrato para a neoglicogênese, os aminoácidos aumentam diretamente a secreção de glucagon, importante estimulador de vias de produção endógena de glicose como a neoglicogênese e a glicogenólise, além de promover a lipólise e o conseqüente aumento plasmático das concentrações de glicerol, outro substrato para a

neoglicogênese, e de AGL, que estimulam indiretamente a via neoglicogenética (Corssmit et al., 2001; Roden e Bernroider, 2003; Krebs, 2005).

Devido, principalmente, à grande atividade neoglicogenética, o esperado para animais que se alimentam com dietas HP é uma maior resistência ao jejum (Eisestein e Strack, 1971; Kettelhut et al., 1980; Krebs, 2005), fato observado na maior parte dos animais citados nos trabalhos acima.

Entretanto, ao contrário do observado na literatura, o morcego-vampiro comum *Desmodus rotundus*, apesar de possuir uma dieta muito rica em proteínas (sangue), apresenta uma marcada fragilidade ao jejum. Tal fragilidade pode ser observada já no jejum de 24 h, quando os níveis glicêmicos desses animais caem para valores próximos a 1,7 mmol/L ( $\approx$  30 mg/dL de sangue) (Freitas et al., 2003), descritos como incompatíveis com a sobrevivência de mamíferos (Unger, 1981; Taylor e Hirsch, 2007). Essa vulnerabilidade, que leva *D. rotundus* à morte após 2 ou 3 dias consecutivos de privação alimentar (Altrigham, 1996), se deve, provavelmente, às baixas reservas de glicogênio e de lipídios encontradas em animais alimentados e à possível ausência de mobilização protéica e de ativação da neoglicogênese no jejum (Freitas et al., 2003; 2005). Esta fragilidade ao jejum só havia sido observada anteriormente em pequenos roedores silvestres granívoros e onívoros (*Microtus pennsylvanicus*, *Clethrionomys rutilus* e *Clethrionomys rufocanus*) por Nagy e Pistole (1988), Mosin (1982; 1984) e Mustonen e colaboradores (2007), que verificaram que estas espécies são levadas a óbito quando submetidas a mais de 20 h de privação alimentar. Porém, diferentemente de *Desmodus rotundus*, estes animais possuem uma dieta rica em carboidratos.

*D. rotundus* possui uma dieta muito rica em proteínas, então seria esperado que essa espécie de morcego fosse mais resistente ao jejum, fato que não ocorre. Como esse

comportamento metabólico difere de tudo o que existe na literatura para animais com dietas HP, existe uma possibilidade de que esse tipo de dieta (sangue) possa estar envolvido na formação deste padrão metabólico, onde se observam pequenas reservas energéticas no estado alimentado e fragilidade ao jejum.

O presente estudo teve por objetivo determinar o padrão metabólico de *Diphylla ecaudata* e, a partir disso, verificar se a fragilidade ao jejum observada em morcegos *Desmodus rotundus* seria uma característica somente dessa espécie ou se estaria presente em outros morcegos de dieta hematófaga.

Únicos mamíferos voadores, os morcegos possuem grande importância ecológica, como dispersores de sementes e controladores de populações de insetos, e para a saúde pública, como transmissores da Raiva (Bredt et al., 1998).

Em vários aspectos morfológicos e bioquímicos os morcegos se assemelham mais aos humanos do que ratos, comumente utilizados na experimentação científica. Diferente de roedores, os morcegos possuem vesícula biliar, pâncreas encapsulado, distribuição hepática da enzima PEPCCK (associada à neoglicogênese) similar a de humanos (Pinheiro et al., 2006), e o cortisol como principal glicocorticoide (Widmaier e Kunz, 1993). São animais longevos em relação a outros mamíferos de peso corporal similar, tendo sido encontrados registros de morcegos com até 30 anos de idade (Peracchi et al., 2006), enquanto ratos de mesmo peso vivem até 3 anos. Além disso, morcegos apresentam-se como um modelo experimental de grande valia, não só pela proximidade evolutiva com primatas (Pettigrew, 1986; Speakman, 2001), mas também pelo fato de possuírem uma enorme diversidade natural de hábitos alimentares, possibilitando assim o estudo das respostas metabólicas a diferentes tipos de dieta (Peracchi et al., 2006).

Os morcegos são mamíferos pertencentes à Ordem Chiroptera, que é dividida em duas subordens, Megachiroptera e Microchiroptera. A primeira possui distribuição restrita a regiões tropicais do Velho Mundo, e compreende apenas uma família, Pteropodidae, com 42 gêneros e 185 espécies (Simmons, 2005). Os microquirópteros compreendem 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies, com distribuição virtualmente mundial e uma grande diversidade de hábitos alimentares (Simmons, 2005; Peracchi et al, 2006).

Dentre as 1.113 espécies de morcegos existentes (Simmons, 2005) apenas três são hematófagas: *Desmodus rotundus* (Geoffrey, 1810), *Diphylla ecaudata* (Spix, 1823) e *Diaemus youngi* (Jentink, 1893), sendo *D. rotundus* a mais abundante (Greenhall et al., 1983).

*D. rotundus* ocorre desde o México até o norte da Argentina e Uruguai. Forma colônias de 20 a 100 indivíduos, em média, e prefere sangue de mamíferos domésticos - bois, cavalos, porcos, ovelhas - e, eventualmente, humanos (Greenhall et al., 1983).

*D. youngi* ocorre em regiões do norte do México, Panamá, e, na América do Sul, desde a região amazônica até o norte da Argentina. Alimentando-se tanto de sangue de mamíferos como de aves, essa espécie forma grupos de seis a 30 indivíduos (Greenhall e Schutt, 1996).

*D. ecaudata* ocorre somente em regiões tropicais - desde o México, América Central, Peru até o Brasil (Peracchi et al., 2006). De modo geral, esta espécie forma agrupamentos de até 12 indivíduos (Greenhall et al., 1984). Possui frequência de captura superior à de *D. youngi* (Aguiar et al., 2006), mas é de mais difícil manutenção em cativeiro (Schutt et al., 1999). Devido à dificuldade de manutenção em cativeiro e ao pequeno número de indivíduos por colônia, há poucos estudos sobre a biologia básica desta espécie

(Ellizalde-Arellano et al., 2007). Não é considerada uma espécie ameaçada de extinção, de acordo com a lista da IUCN (2006).

Dentre os três hematófagos, *D. ecaudata* é o que possui a dieta mais especializada, alimentando-se somente de sangue de aves, nas quais ataca especialmente as patas e a região cloacal (Greenhall et al., 1984). O tipo de alimentação veio acompanhado de uma série de modificações morfológicas no aparelho digestório, sendo o estômago extremamente alongado, com uma superfície de absorção muito maior em relação a outras espécies de morcegos (Rouk e Glass, 1970).

Neste trabalho investigou-se no morcego hematófago *Diphylla ecaudata* o padrão das reservas de carboidratos, lipídios e proteínas e as concentrações plasmáticas de glicose e AGL em animais alimentados e as variações desses parâmetros em resposta ao jejum por 24 e 36 h.

## 2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi determinar o padrão metabólico de *Diphylla ecaudata*. A partir disso, pode-se investigar se as pequenas reservas energéticas e a fragilidade ao jejum observadas em *D. rotundus* são características da espécie ou se estariam associadas ao tipo de dieta de sangue e rica em proteínas e, portanto, presentes em outros hematófagos.

Os objetivos específicos foram determinar as seguintes reservas e metabólitos de animais alimentados, e o comportamento destes em resposta ao jejum de 24 e 36 h:

- glicose e ácidos graxos livres plasmáticos;
- glicogênio muscular e hepático;
- proteína total muscular e hepática;
- lipídios totais de músculo e fígado;
- ácidos graxos totais de carcaça.

### 3. Justificativa

Uma das maneiras de se investigar a evolução dos processos de controle do metabolismo energético é o estudo do padrão metabólico de grupos de animais com hábitos alimentares característicos e sua resposta frente a situações nutricionais específicas.

Grande parte dos trabalhos sobre metabolismo energético utiliza roedores como animais de experimentação, principalmente ratos, na expectativa de que os resultados obtidos com esses animais possam refletir, em parte, os processos que ocorrem em humanos. Porém, atualmente tem sido demonstrado que nem sempre os resultados obtidos apenas com um determinado animal refletem, de maneira satisfatória, os processos estudados na clínica.

Nos últimos anos o Laboratório de Metabolismo Energético de Vertebrados, do Depto. de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da UnB tem se dedicado a estudar o metabolismo energético de diversos vertebrados, principalmente morcegos, que têm se mostrado um modelo experimental de grande valia no estudo do metabolismo energético comparativo. Uma das razões seria a grande proximidade evolutiva desses animais em relação aos primatas, incluindo o homem, e a outra seria a grande diversidade de hábitos alimentares apresentada por morcegos, que faz deles uma ferramenta muito interessante no estudo das adaptações metabólicas aos vários tipos de dieta e suas respostas à privação alimentar.

Os únicos três estudos com o intuito de estabelecer um padrão metabólico de morcegos e possíveis adaptações ao jejum, abordando o controle nutricional e hormonal de carboidratos, lipídios e proteínas, tiveram a participação da Dra. Pinheiro. O primeiro deles utilizando morcegos frugívoros como representantes de animais que se alimentam com

dietas ricas em carboidratos foi tema da tese de doutoramento desta pesquisadora (Dra. Pinheiro, 1995). Os outros dois foram realizados em morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, como representantes de animais que se alimentam com dietas ricas em proteínas (dissertação de mestrado e dissertação de doutorado sob orientação da Dra. Pinheiro).

Nos resultados com os morcegos frugívoros foi observado que esses morcegos possuem um padrão metabólico muito similar ao de outros animais, inclusive humanos, os quais possuem dietas ricas em carboidratos.

Já a partir dos achados obtidos com o morcego hematófago *Desmodus rotundus* foi observado que esses animais apresentam uma grande fragilidade frente ao jejum de 24 h e que possuem reduzidas reservas de carboidratos e lipídios no estado alimentado, ausência de mobilização das reservas lipídicas e protéicas, níveis baixos de insulina no plasma e baixa capacidade de secreção desse hormônio em resposta à glicose (Freitas, 2000; 2005).

Este padrão metabólico único encontrado em *D. rotundus* levou à escolha de outro morcego hematófago, *Diphylla ecaudata*, para o aprofundamento do estudo dos possíveis efeitos que uma dieta composta unicamente por sangue (sanguivoria) poderia exercer sobre o metabolismo energético de mamíferos.

O presente estudo utilizando o morcego hematófago *Diphylla ecaudata* pretende, assim, contribuir para o esclarecimento de importantes lacunas na compreensão do metabolismo energético associadas à dieta hematófaga. A partir disso, podemos apontar se a sanguivoria poderia ser responsável pela formação de padrão metabólico tão incomum.

Além disso, este estudo contribuirá para o conhecimento mais aprofundado da biologia e do comportamento de *Diphylla ecaudata*, já que há poucas publicações sobre essa espécie.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Locais de captura

A determinação dos locais de captura dos animais contou com a assessoria do técnico da Gerência e Controle de Zoonoses do Instituto de Saúde do Distrito Federal Sr. João Bruno da Costa. A escolha das quatro cavernas foi baseada em suas quiropterofaunas (Bredt et al., 1999):

**Gruta do Morro** (GO 072) – Padre Bernardo, Goiás: Fazenda Cristal (15°27'S, 48°09'W; altitude 840 m).

**Gruta das Orquídeas** (GO 112) – Padre Bernardo, Goiás: Fazenda Lagoa (15°29'S, 48°04'W; altitude 840 m).

**Gruta do Sal** (DF 005) – Brazlândia, Distrito Federal: Fazenda Palestina (15° 30'S, 48°10'W; altitude 805 m).

**Gruta da Saúva** (DF 003) - Sobradinho, Distrito Federal: Fazenda Sete Lagoas (15°32'S, 47°52'W; altitude 800 m).

### 4.2. Animais

Todas as coletas, transporte, manipulação, experimentação e sacrifício dos animais foram aprovados do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e autorizados pelo IBAMA (Processo nº 02008.0057/2006).

Para este estudo foram coletados 32 morcegos hematófagos adultos, machos e fêmeas (não-prenhes e não lactantes), pesando entre 17-28g, pertencentes à espécie

*Diphylla ecaudata* (nome comum: morcego-vampiro de pernas peludas) (Ordem Chiroptera, família Phyllostomidae, subfamília Desmodontinae).



Fig 1. *Diphylla ecaudata* (Foto retirada do site [www.dgidec.min-edu.pt](http://www.dgidec.min-edu.pt))

Os animais foram capturados entre 18 e 24h, intervalo em que a maioria dos morcegos desta espécie costuma sair de seus abrigos (Dalquest, 1955). As coletas foram realizadas com redes de neblina (“mist nets”), armadas na entrada das cavernas entre outubro de 2006 e setembro de 2007. Foram capturados animais nas estações seca e chuvosa, com a finalidade de eliminar uma possível influência da sazonalidade nas reservas energéticas.

As coletas foram realizadas de tal forma que cada caverna era visitada de 4 em 4 meses para que não houvesse diminuição significativa das populações de *D. ecaudata*, e sempre com o apoio de técnico da Gerência e Controle de Zoonoses, do Instituto de Saúde do Distrito Federal.

Apenas animais adultos, onde foi observada ossificação total do metacarpo por palpação foram amostrados. Fêmeas grávidas, identificadas por palpação abdominal, foram desprezadas para composição da amostragem, sendo libertas a seguir.

Após a captura, os animais foram transportados imediatamente para o Laboratório Integrado (Departamento de Ciências Fisiológicas - UnB), sendo mantidos em biotério à temperatura ambiente e no escuro, em gaiolas individuais teladas (25 x 30 x 45 cm) para evitar fuga de animais e apropriadas à sua posição de repouso.

Como *Diphylla ecaudata* alimenta-se exclusivamente do sangue de aves (Greenhall et al., 1984), para adaptação ao cativeiro cada animal recebeu por noite, durante 3 noites consecutivas, um pombo vivo e sadio (*Columba livia*) e água *ad libitum*.

A escolha de pombos para a alimentação em cativeiro de *Diphylla ecaudata* deveu-se às seguintes razões: pombos estão entre as presas preferidas de *D. ecaudata* (Uieda, 1994); estas aves possuem concentrações plasmáticas de glicose similares às de galinhas domésticas (Da Silva et al., 2004; Lamosova et al., 2004), também uma das preferidas por esses morcegos (Greenhall et al., 1984); evitar que os morcegos fossem pisoteados ou bicados, no caso da utilização de galinhas, o que causaria mais estresse aos animais.

Os pombos foram colocados nas gaiolas em que estavam os morcegos às 19h e retirados na manhã seguinte, às 7h. Cada pombo foi oferecido para alimentação por apenas uma noite, sendo utilizadas três aves/morcego. Esse padrão de alimentação já foi amplamente testado e mostrou-se a única forma efetiva para a aceitação de alimento por essa espécie em cativeiro (Uieda, 1994).

A massa corporal desses animais varia no decorrer do dia (Delpietro e Russo, 2002). Para a certificação de que os animais tinham ingerido sangue e qual volume era ingerido, os morcegos tinham seu peso determinado antes de colocados os pombos nas gaiolas e após sua retirada. A partir dessa diferença de peso, pôde-se inferir uma ingestão média de 7,6 mL de sangue/indivíduo/dia.

Os animais posteriormente submetidos ao jejum por 24 e 36 h foram mantidos apenas com água *ad libitum*.

Para o grupo alimentado (ALM), os animais foram sacrificados logo após a retirada dos pombos das gaiolas (7h), quando se procedia à coleta de sangue e à retirada dos tecidos para a determinação das reservas (ver adiante). Para os grupos jejuados (J24 e J36), o sacrifício foi feito também às 7h da manhã.

A manipulação dos animais, bem como dos tecidos e do sangue dos mesmos foi feita de acordo com as normas de higiene e segurança, incluindo a vacinação anti-rábica e anti-tetânica prévia de todos os pesquisadores e pessoal técnico envolvido. Após a vacinação anti-rábica foi realizada a titulação para determinação da quantidade de anticorpos para o vírus da raiva, pois somente membros da equipe imunizados poderiam participar do projeto.

#### *4.3. Procedimentos experimentais*

##### *4.3.1. Determinação do período experimental máximo de jejum*

Para determinação do período máximo de jejum a que seriam submetidos os animais, 5 morcegos (3 machos e 2 fêmeas), após serem alimentados por 3 noites consecutivas, foram submetidos a jejum até que a glicemia alcançasse valores próximos a 3 mmol/L (ou  $\approx$  50 mg/dL de sangue), valor considerado mínimo para a sobrevivência de mamíferos (Freitas et al, 2003; Beardsall et al., 2006). Durante este período, somente água *ad libitum* foi oferecida aos animais. Como após 36 h de jejum os animais já apresentaram queda glicêmica para valores inferiores a 2 mmol/L, estabeleceu-se o período máximo de jejum de 36 h.

Assim, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, a saber: alimentados (ALM), jejuados por 24 h (J24) e jejuados por 36 h (J36).

#### *4.3.2. Coleta de sangue para determinação da glicemia e de ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos*

Após o deslocamento cervical sucedido por decapitação, procedeu-se à coleta de sangue a partir do tronco e por punção cardíaca em tubos heparinizados, posteriormente centrifugados (2000 rpm/10min) (centrífuga FANEM Excelsa Baby) para separação do plasma. A glicemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (*kit* GLUCOX 500 – DOLES; Trinder, 1969; Barham e Trinder, 1972). Para determinação dos ácidos graxos livres plasmáticos (AGL) foi utilizado o método enzimático colorimétrico da acil-coA sintetase acil-CoA oxidase 3-metil-N-etil-N-( $\beta$ -hidroxietil)-anilina (*kit* NEFA C – WAKO CHEM).

#### *4.3.3. Determinação do glicogênio no fígado e músculo peitoral*

Para as determinações de glicogênio hepático e do músculo peitoral, porções com pesos entre 0,2 e 0,5 g de tecido foram colocadas em 2 mL de KOH 30% e o procedimento posterior seguiu o método descrito por Sjörgren et al. (1938), com a utilização do reativo de Antrona.

#### *4.3.4. Determinação da proteína total no fígado e músculo peitoral*

Para a determinação da proteína total tecidual, porções com pesos entre 0,2 e 0,5 g do fígado e do músculo peitoral foram homogeneizadas em 10 mL de solução de NaCl

0,9%. A seguir, foi utilizado o método colorimétrico do ácido bicinconínico (*Kit* BCA-PIERCE).

#### *4.3.5. Determinação dos lipídios totais no fígado e músculo peitoral*

Para a extração dos lipídios totais hepático e muscular, porções destes tecidos com pesos entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em 25 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1) segundo Folch et al. (1957). Após a filtração e separação das fases por adição de solução salina 0,9%, uma alíquota da fase clorofórmica foi utilizada para determinação dos lipídios totais, pelo método gravimétrico.

#### *4.3.6. Determinação dos ácidos graxos totais de carcaça*

Os ácidos graxos totais da carcaça foram determinados após a retirada dos tecidos mencionados anteriormente, além do tubo digestivo (a partir da porção terminal do esôfago até o ânus). As carcaças, que tinham peso entre 17 e 28g, foram digeridas em 100 mL de KOH 6 N, sendo então filtradas e adicionadas de igual volume de álcool absoluto, resultando em uma solução de KOH – etanol 50% (v/v). Uma amostra desta dispersão foi lavada com éter de petróleo, corada com verde bromo cresol, acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 N, e finalmente submetida à extração com clorofórmio. Um volume conhecido desta fase foi utilizado para determinação dos ácidos graxos totais pelo método gravimétrico.

### *4.4. Tratamento Estatístico*

#### *4.4.1. Tamanho amostral*

Para a estimação do tamanho amostral, foram utilizados os dados de glicemia de um teste piloto com 5 animais alimentados. Foram obtidos os seguintes dados de média e

desvio-padrão:  $7,4 \pm 1,45$  mmol/L ( $132,6 \pm 26,12$  mg/dL). Face à dificuldade na manutenção do animal em cativeiro, além do pequeno número de animais por colônia, utilizou-se um poder de teste intermediário, correspondente a um erro igual a 15% da média, de forma que o tamanho amostral necessário não fosse grande. Nessas condições o n necessário estimado foi igual a 6 ( $n=1,96^2 \cdot \sigma^2 / E^2$ , onde  $\sigma$  =desvio-padrão e E=erro padrão médio).

#### 4.4.2. Análise dos dados

Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média). Foram verificadas a distribuição normal, através do teste de Shapiro-Wilk W, e a homocedasticidade, através do teste de homogeneidade da variância Brown-Forsythe, para cada grupo de dados. Para análise estatística foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), tendo como variável independente o estado nutricional. Para a análise post-hoc foi empregado o teste de Tukey para n desiguais. Para variáveis não-homogêneas ou que não apresentaram distribuição normal foi empregada a ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis), ou o teste Mann-Whitney U. O critério de significância foi de 5%.

## 5. Resultados

### 5.1. Glicemia

Os dados dos grupos ALM ( $5,99 \pm 0,66$  mmol/L), J24 ( $4,91 \pm 0,74$  mmol/L), e J36 ( $2,03 \pm 0,39$  mmol/L) distribuem-se segundo uma normal (valores de p iguais a 0,99, 0,32 e 0,40, respectivamente) e apresentam variâncias homogêneas ( $p=0,28$ ). Esses resultados autorizam, portanto, o uso do teste de ANOVA que, associado ao teste post-hoc de Tukey para n desiguais, mostrou que J24 não se diferencia de ALM ( $p=0,49$ ), mas que J36 é diferente de forma significativa ( $p=0,008$ ) (Fig 2).

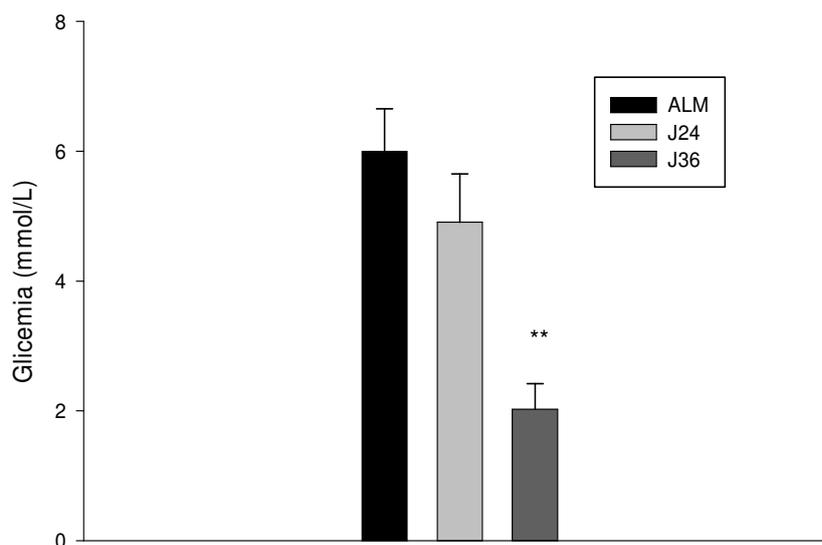


Fig. 2. Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) em *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 horas (J36). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 6-11 indivíduos por grupo experimental. \*\*  $p < 0,01$  em relação aos animais alimentados e jejuados por 24 h.

## 5.2. Ácidos Graxos Livres

Os dados do grupo ALM ( $0,81 \pm 0,07$  mmol/L) não seguem uma distribuição normal ( $p=0,02$ ) enquanto os do grupo J24 ( $0,84 \pm 0,16$  mmol/L), sim ( $p=0,59$ ). Esses resultados impõem o uso de um teste como o Mann-Whitney U, não paramétrico, que mostrou que não há diferenças entre os dois grupos ( $p \approx 1,0$ ) (Fig 3). Devido ao reduzido número de indivíduos e ao pequeno volume plasmático, não foi possível determinar os níveis de AGL em animais jejuados por 36 h.

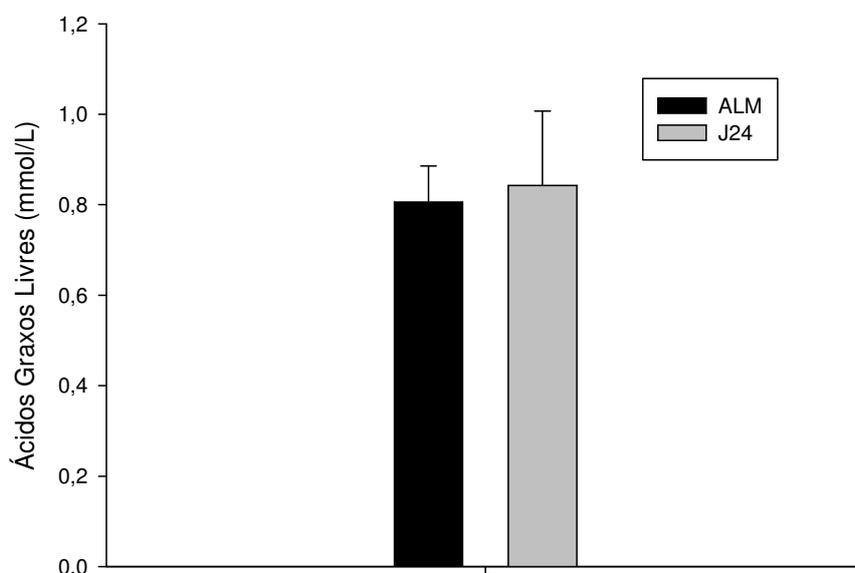


Fig. 3. Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL; mmol/L) em *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 horas (J24). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 10-11 indivíduos por grupo experimental.

### 5.3. Glicogênio hepático e muscular

Os dados para o glicogênio hepático nos grupos ALM ( $46,96 \pm 11,28$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,06$ ), J24 ( $1,74 \pm 0,49$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,005$ ) e J36 ( $0,94 \pm 0,26$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,018$ ) não seguem uma distribuição normal e, assim, sugerem o uso de um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis,  $H(2, N=27) = 18,57$ ), que mostrou que os dois últimos se diferenciam de forma significativa ( $p < 0,01$ ) do primeiro (Fig. 4).

Os dados para glicogênio muscular nos grupos ALM ( $26,62 \pm 8,40$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,001$ ), J24 ( $19,11 \pm 4,52$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,0025$ ) e J36 ( $11,81 \pm 0,71$   $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g,  $p=0,703$ ), não seguem uma distribuição normal e, assim, exigem o uso de um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis,  $H(2, N=27) = 4,095$ ), que mostrou que não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos ( $p = 0,129$ ) (Fig 4).

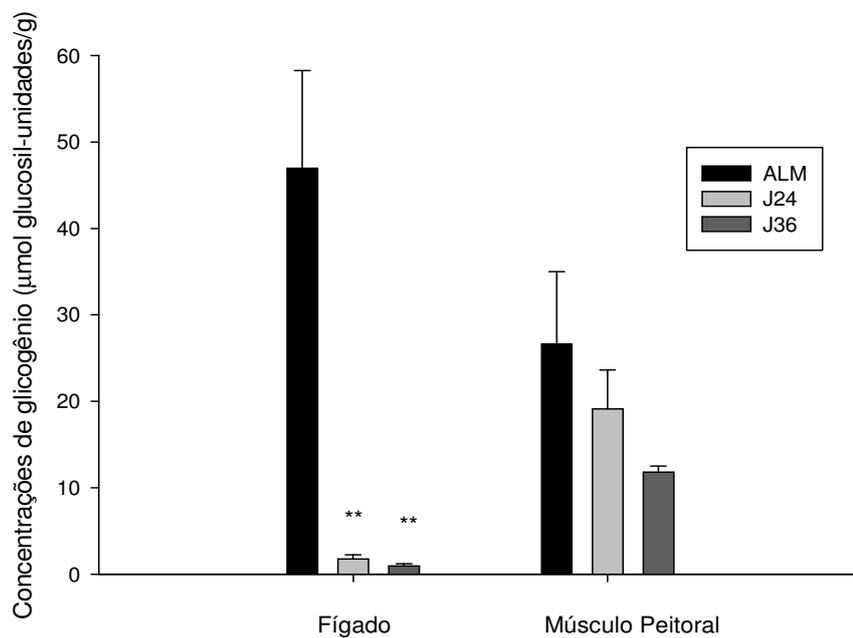


Fig. 4. Concentrações de glicogênio no fígado e músculo peitoral ( $\mu\text{mol glucosil-unidades/g}$ ) em *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 horas (J36). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 6-11 indivíduos por grupo experimental. \*\*  $p < 0,01$  em relação a animais alimentados.

#### 5.4. Proteína total hepática e muscular

As concentrações de proteínas totais hepáticas dos grupos ALM ( $11,49 \pm 1,23$  g/100 g), J24 ( $15,33 \pm 1,57$  g/100 g) e J36 ( $19,29 \pm 1,41$  g/100 g) distribuem-se segundo uma normal (valores de p iguais a 0,19, 0,84 e 0,24, respectivamente) e os três grupos apresentam variâncias homogêneas ( $p=0,64$ ). Esses resultados autorizam, portanto, o uso do teste de ANOVA que, associado ao teste post-hoc de Tukey para n desiguais, mostrou que J24 não se diferencia de ALM ( $p=0,15$ ), mas que J36 é diferente de forma significativa ( $p=0,062$ ) (Fig 4).

As concentrações de proteínas totais musculares dos grupos ALM ( $8,28 \pm 1,05$  g/100 g) e J36 ( $9,99 \pm 1,83$  g/100 g) seguem uma distribuição normal (respectivamente,  $p=0,20$  e  $p=0,07$ ); J24 ( $9,07 \pm 0,59$  g/100 g), entretanto, não apresenta o mesmo comportamento ( $p=0,039$ ) e, por isso, a opção pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico, que não detectou diferenças significativas ( $p=0,54$ ) (Fig 5).

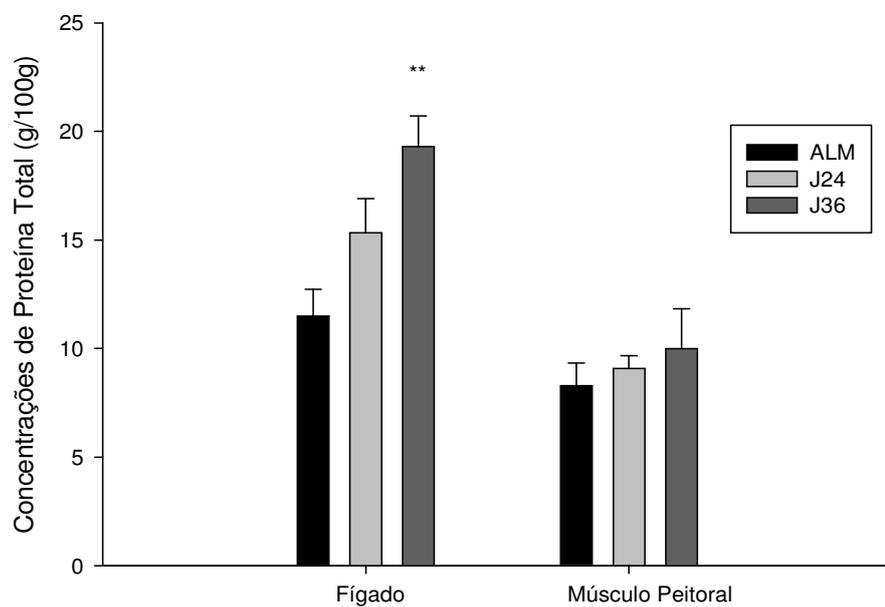


Fig. 5. Concentrações de proteínas totais (g/100g) no fígado e músculo peitoral de *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 horas (J36). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 6-11 indivíduos por grupo experimental. \*\*  $p < 0,01$  em relação aos animais alimentados e jejuados por 24 horas.

### 5.5. Lipídio total hepático e muscular

As concentrações de lipídios totais do fígado dos grupos ALM ( $7,63 \pm 0,65$  g/100 g), J24 ( $7,04 \pm 0,81$  g/100 g), e J36 ( $7,39 \pm 0,92$  g/100 g) distribuem-se segundo uma normal (valores de p iguais a 0,64, 0,58 e 0,14 respectivamente), e os três grupos apresentam variâncias homogêneas ( $p=0,87$ ). Esses resultados autorizam, portanto, o uso do teste de ANOVA, que não encontrou diferenças entre os grupos ( $p=0,85$ ) (Fig 6).

No caso do músculo, os dados dos grupos ALM ( $7,81 \pm 0,52$  g/100 g), J24 ( $8,17 \pm 0,70$  g/100) e J36 ( $7,01 \pm 0,64$  g/100 g) distribuem-se segundo uma normal (valores de p iguais a 0,38, 0,16 e 0,10 respectivamente) e os três grupos apresentam variâncias homogêneas ( $p=0,75$ ). Esses resultados autorizam, portanto, o uso do teste de ANOVA, que não encontrou diferenças entre os grupos ( $p=0,56$ ) (Fig 6).

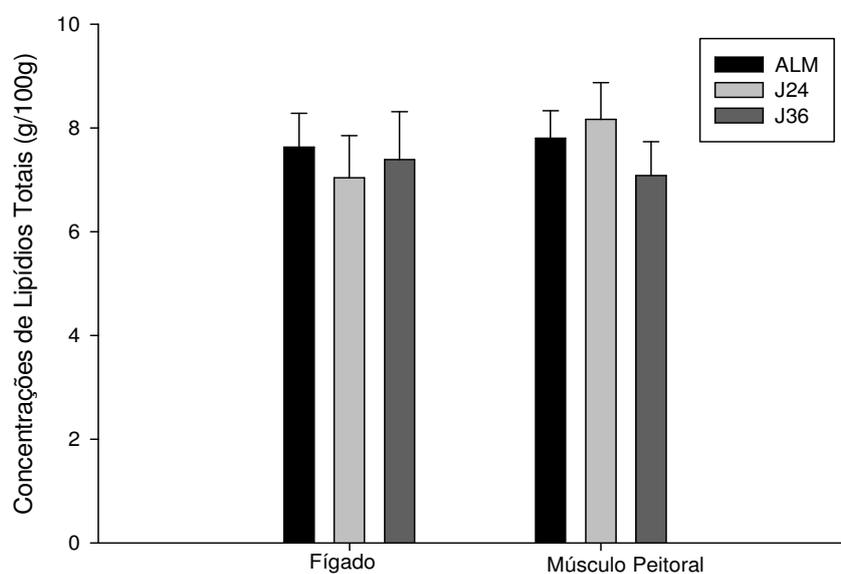


Fig 6. Concentrações de lipídios totais (g/100g) no fígado e músculo peitoral de *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 horas (J36). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 6-11 indivíduos por grupo experimental.

### 5.6. Ácidos graxos totais de carcaça

As concentrações de ácidos graxos totais de carcaça dos grupos ALM ( $3,80 \pm 1,47$  g/100g), J24 ( $3,64 \pm 0,32$  g/100 g) e J36 ( $3,79 \pm 0,69$  g/100 g) distribuem-se segundo uma normal (valores de p iguais a 0,31, 0,0505 e 0,81 respectivamente), e os três grupos apresentam variâncias homogêneas ( $p=0,68$ ). Esses resultados autorizam, portanto, o uso do teste de ANOVA que não detectou diferenças entre os grupos ( $p=0,96$ ) (Fig 7).

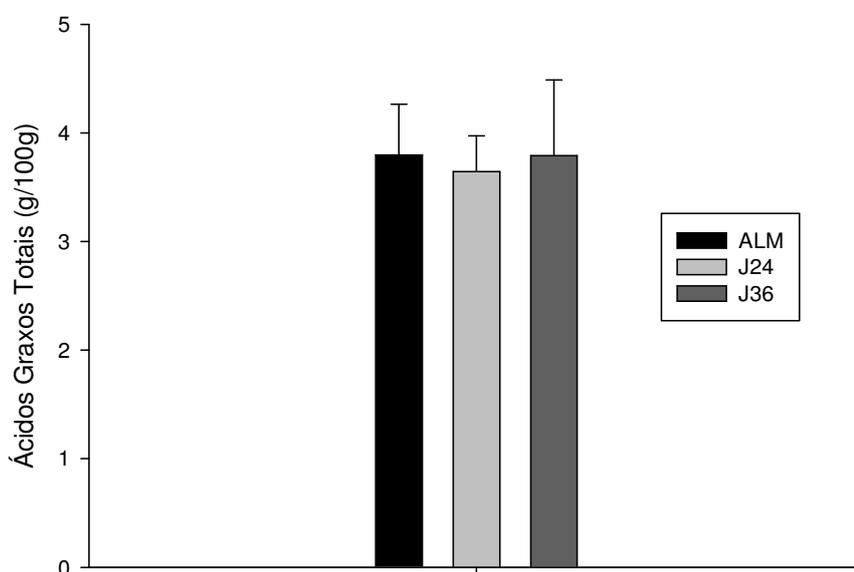


Fig. 7. Ácidos graxos totais de carcaça (g/100g) de *D. ecaudata* alimentados (ALM) e jejuados por 24 (J24) e 36 horas (J36). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  EPM de 6-11 indivíduos por grupo experimental.

## 6. Discussão e Conclusões

A glicemia de *D. ecaudata* no estado alimentado foi similar a de mamíferos alimentados com dietas HC, como humanos (Cryer, 1991), ratos (Eiseistein e Strack, 1971) e morcegos frugívoros (Widmaier e Kunz, 1993; Korine et al., 1999; Pinheiro et al., 2006), e similar também a de mamíferos que se alimentam com dietas HP, como gatos (Kettelhut et al., 1980), raposas (Tallas e White, 1988), leões, tigres, cães (Opazo et al., 2004) e morcegos hematófagos *D. rotundus* (Freitas et al., 2003). A glicemia de animais alimentados poderia estar sendo mantida através da neoglicogênese, como visto para animais HP (Kettelhut et al., 1980), e também da glicose presente no sangue de suas presas, como o sugerido para *D. rotundus* (Freitas et al., 2003).

O jejum de 24 h não provocou diminuição na concentração da glicose plasmática em *D. ecaudata*, semelhante ao observado em mamíferos de dietas HP, como gatos (Kettelhut et al., 1980), visons (Mustonen et al., 2005), fuínhas (Nieminen et al., 2007), raposas e outros carnívoros (Tallas e White, 1988), nos quais os níveis glicêmicos se mantêm constantes após este período de jejum. Porém, estes resultados diferem do observado em mamíferos com dietas HC, como humanos (Cryer, 1991), ratos (Eiseistein e Strack, 1971) e morcegos frugívoros (Widmaier e Kunz, 1993; Pinheiro et al., 2006), que apresentam queda inicial da glicemia da ordem de 30 a 40% no jejum de 24 h; e diferem mais fortemente dos estudos feitos por Freitas et al. (2003) que mostraram que morcegos *D. rotundus* apresentam diminuição de cerca de 70% na glicemia nesse período de jejum, ao contrário do visto para animais HP. Os resultados obtidos para *D. ecaudata* jejuados por 24 h, portanto, parecem seguir o observado para a maior parte dos mamíferos, onde,

independentemente do tipo de dieta, a estabilidade da glicemia no jejum é garantida pela glicogenólise e, principalmente, pela neoglicogênese hepática (Brosnan, 1999).

Normalmente, mamíferos que se alimentam ou foram adaptados a uma dieta rica em carboidratos apresentam, no jejum de 24 até 48 h, queda da glicemia para valores entre 3 e 4 mmol/L ( $\approx$  50-70 mg/dL) e após 72 h de privação alimentar há a estabilização desses valores em torno de 4 mmol/L ( $\approx$  70mg/dL) (Felig, 1979). Por outro lado, mamíferos de dieta HP apresentam glicemia no jejum similar ao estado alimentado (Kettelhut et al., 1980; Krebs, 2005; Mustonen et al., 2005; Nieminen et al., 2007). Quando *D. ecaudata* foi submetido ao jejum de 36 h observou-se queda na glicemia para valores em torno de 2 mmol/L ( $\approx$  35 mg/dL), o que difere do observado para a maior parte dos mamíferos, tanto os de dietas HC, incluindo morcegos frugívoros (Pinheiro et al., 2006), quanto HP (Mustonen et al., 2005). Uma queda glicêmica de tal magnitude em resposta a tão curto período de jejum em mamíferos só havia sido observada anteriormente no morcego hematófago *D. rotundus* jejuado por 24 h (Freitas et al., 2003) e em ratos granívoros de pradaria jejuados por 12 h (Mosin, 1982; Mustonen et al., 2007). Porém, a comparação entre *D. ecaudata* e ratos granívoros de pradaria torna-se pouco útil, uma vez que a dieta destes últimos é rica em carboidratos. Por outro lado, comparando-se *D. ecaudata* e *D. rotundus*, espécies hematófagas e com dieta HP, observa-se que a glicemia de *D. ecaudata* no jejum de até 24 h se mantém em valores similares aos do estado alimentado, enquanto que em *D. rotundus* esta diminui aproximadamente 70%. Porém, a semelhança surge no jejum superior a 24 h, onde as duas espécies apresentam queda glicêmica para níveis incompatíveis com a sobrevivência em mamíferos (Altrigham, 1996; Freitas et al., 2003).

A literatura tem mostrado que, na maior parte dos mamíferos, a degradação das reservas hepáticas de glicogênio, além da neoglicogênese e da utilização de fontes

exógenas de carboidratos contribuem para a manutenção da homeostase glicêmica, principalmente no início do jejum (Felig, 1979; Corssmit et al., 2001; Beardsall et al., 2006; Voigt e Speakman, 2007). *D. ecaudata* possui pequenas reservas de glicogênio quando comparadas as de outros mamíferos tanto de dieta HC quanto HP (~1%), porém não se pode descartar a participação das mesmas na manutenção da glicemia no jejum de 24 h.

O conteúdo hepático de glicogênio de *D. ecaudata* foi inferior ao observado para a maior parte dos animais, tanto os de dieta HC, como morcegos frugívoros (Okon et al., 1978; Pinheiro et al., 2006), humanos (Brosnan, 1999) e ratos (Kettelhut et al., 1980), como os de dieta HP, como gatos (Kettelhut et al., 1980), fuínhas (Nieminen et al., 2007) e humanos adaptados a este tipo de dieta (Bisschop et al., 2000; Allick et al., 2004), onde estas reservas variam entre 170  $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g (3 mg/100g) em gatos (Kettelhut et al., 1980), 450  $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g (8 mg/100g) em fuínhas (Nieminen et al., 2007) e 550  $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g (10 mg/100g) em humanos (Corssmit et al., 2001). Porém, mais uma vez, essa reserva de *D. ecaudata* se assemelha à encontrada em *D. rotundus*, cujo valor foi de 55  $\mu\text{mol}$  glucosil-unidades/g (1 mg/100g) (Freitas et al., 2003).

A neoglicogênese hepática, a partir de aminoácidos, lactato e glicerol, contribui para a manutenção da homeostase glicêmica na maior parte dos mamíferos submetidos ao jejum, como ratos, coelhos (Spargo et al., 1979), humanos (Brosnan, 1999), visons (Mustonen et al., 2005) e morcegos insetívoros e frugívoros (Okon et al., 1978; Yacoe et al., 1982). A propósito, a neoglicogênese está presente de forma mais intensa em mamíferos com dietas HP, onde sua ativação já ocorre no estado alimentado e se mantém alta no jejum (Krebs, 2005; Mustonen et al., 2005). Da mesma forma que para *D. rotundus* (Freitas et al., 2003) e para ratos de pradaria (Mosin, 1982; Mustonen et al., 2007), a ausência de mobilização das

proteínas e do glicogênio musculares sugere que, também em *D. ecaudata*, haveria pequena participação dessas reservas no fornecimento de substratos para a neoglicogênese.

As concentrações de proteínas hepáticas de *D. ecaudata*, inferiores às encontradas tanto em mamíferos HC quanto HP (Kettelhut, 1981; Pinheiro, 1995), porém similares a *D. rotundus* (Freitas et al., 2003) não sofreram modificação com o jejum de 24 h. O aumento desta reserva no jejum de 36 h pode ser resultado de um aumento de atividade enzimática da  $\beta$ -oxidação no fígado destes animais, e conseqüente produção de corpos cetônicos.

O tecido adiposo também exerce papel importante no controle dos níveis glicêmicos da maior parte dos mamíferos (Sethi e Vidal-Puig, 2007) e, embora os ácidos graxos livres (AGL) não sejam substratos diretos para a neoglicogênese, podem estimular esta via, contribuindo para a elevação da glicose circulante (Corssmit et al., 2001; Roden e Bernroider, 2003; Allick et al., 2004). Isto porque a oxidação dos ácidos graxos no fígado gera moléculas de acetil-CoA que ativam alostericamente a enzima piruvato carboxilase, potencializando a síntese *de novo* de glicose (Felig, 1979; Roden e Bernroider, 2003; Jitrapakdee et al., 2007). Os AGL também contribuem para a redução do uso da glicose pelos tecidos, através da inibição da via glicolítica e da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (Weber e Haman, 2004).

*D. ecaudata* alimentados apresentaram níveis circulantes de AGL (0,8 mmol/L) superiores aos vistos tanto em animais com dietas HC, como ratos (0,5 mmol/L) (Almeida e Mello, 2004), humanos (0,4 mmol/L) (Issekutz et al., 1967) e morcegos frugívoros (0,7 mmol/L) (Pinheiro, 1995), quanto em animais com dietas HP, como gatos (0,4 mmol/L) (Kettelhut, 1981). Os níveis de AGL de *D. ecaudata* alimentados, porém, foram menores do que os encontrados no morcego *D. rotundus* em mesma condição nutricional (1,2 mmol/L) (Freitas et al., 2003). No jejum de 24 h as concentrações de AGL não se

modificaram em *D. ecaudata*, o que difere do encontrado para a maioria dos animais citados acima, nos quais o jejum provoca aumento deste parâmetro, como em humanos (1,2 mmol/L) (Issekutz et al., 1967), morcegos frugívoros (2,1 mmol/L) (Pinheiro, 1995) e gatos (0,5 mmol/L) (Kettelhut, 1981). Esse comportamento difere, também, do visto para *D. rotundus* jejuados por 24 h, onde houve diminuição desse parâmetro para valores em torno de 0,8 mmol/L (Freitas et al., 2003).

Possivelmente os altos valores de AGL encontrados no plasma de *D. ecaudata* alimentados sejam provenientes de sua dieta, ou seja, do sangue de suas presas (pombos) que apresentam níveis de AGL da ordem de 0,85 mmol/L de plasma (Da Silva et al., 2004). Esses valores observados no plasma de pombos foram similares aos observados em *D. ecaudata*. A permanência dos altos níveis de AGL no jejum de 24 h parece, também, ser resultante da dieta de *D. ecaudata*, como veremos a seguir.

As concentrações lipídicas totais hepáticas de *D. ecaudata* alimentados foram superiores às encontradas em morcegos frugívoros (Okon et al., 1978), além de outros mamíferos de dietas HC, como ratos (Kettelhut et al., 1980, Noguchi et al., 2001) e humanos (Felig, 1979; Corssmit et al., 2001), ou de dieta HP, como gambás (Weber e O'Connor, 2000) e o morcego *D. rotundus* (Freitas et al., 2003). Não foi observada diminuição dos lipídios totais hepáticos na resposta ao jejum de 24 e 36 h em *D. ecaudata*, que se manteve em níveis superiores aos animais citados acima, exceto para morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* e *A. jamaicensis*, cujos níveis de lipídios hepáticos no jejum foram muito superiores aos encontrados em *D. ecaudata* (Pinheiro, 1995).

Os altos níveis de AGL plasmáticos encontrados em *D. ecaudata* alimentados e jejuados por 24 h poderiam estar contribuindo para o aumento dos lipídios totais hepáticos nestes animais.

As reservas lipídicas totais musculares de *D. ecaudata* alimentados, similares às de morcegos frugívoros (Okon et al., 1978) e *D. rotundus* (Freitas et al., 2003), não sofreram alterações em nenhum dos dois períodos de jejum. Essa resposta sugere que, da mesma forma que para *D. rotundus* (Freitas et al., 2003) e para morcegos frugívoros e insetívoros (Yacoe et al., 1982), as reservas lipídicas musculares devam contribuir apenas para o metabolismo muscular e não para o fornecimento de AGL para a circulação.

As restrições aerodinâmicas, o tamanho corporal reduzido e o alto requerimento energético do voo tornam a oxidação lipídica ideal para as exigências metabólicas, principalmente do músculo peitoral (Yacoe et al., 1982; Brosnan, 1999; Sethi e Vidal-Puig, 2007). Como as reservas de glicogênio do músculo peitoral de *D. ecaudata* mostraram-se pequenas, inclusive no estado alimentado, é possível que este músculo utilize preferencialmente lipídios como fonte energética, como foi sugerido por Yacoe et al. (1982) para 10 espécies de morcegos sul-americanos. Esses autores observaram grande atividade da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, enzima-chave da  $\beta$ -oxidação, no músculo peitoral destes animais.

As concentrações de ácidos graxos totais da carcaça de *D. ecaudata* alimentados foram pequenas se comparadas às encontradas em morcegos frugívoros (Pinheiro, 1995) e ratos (Schmid et al., 1984), e similares às observadas em *D. rotundus* (Freitas et al., 2003). Não houve modificação destas reservas após os dois períodos de jejum em *D. ecaudata*, como visto em *D. rotundus* (Freitas et al., 2003). Esses resultados, porém, diferiram do observado em morcegos frugívoros e ratos (Schmid et al., 1984; Pinheiro, 1995), onde foi observada mobilização dos lipídios da carcaça em resposta à privação alimentar.

Em ambientes que ultrapassam os limites de sua temperatura fisiológica, os mamíferos necessitam gastar energia para manter a temperatura corpórea em níveis

constantes. Assim, em ambientes de baixas temperaturas a manutenção da endotermia requer produção de calor metabólico e em ambientes com altas temperaturas ocorre gasto energético para o resfriamento corporal (McNab, 2002). Morcegos apresentam uma grande diversidade de padrões termo-regulatórios (Speakman e Thomas, 2003), que podem depender do tipo de dieta e do estado nutricional (McNab, 1969). Em particular, morcegos hematófagos apresentam baixa capacidade termo-regulatória devido, provavelmente, ao baixo valor energético do sangue e às pequenas reservas corporais. A termo-regulação fica ainda mais difícil quando esses animais são submetidos à privação alimentar (McNab, 1973). Portanto, é possível que as pequenas reservas lipídicas da carcaça tenham um papel preponderante na manutenção da endotermia em *D. ecaudata* e, por isso, parecem ser poupadas na resposta ao jejum.

Como *D. ecaudata* não apresentou diminuição significativa das reservas lipídicas corporais na resposta ao jejum de até 36 h, estas não devem estar contribuindo para os altos níveis de AGL nesse estado nutricional. Esses achados são similares ao visto em *D. rotundus*, onde a mobilização lipídica ocorreu somente a partir de jejum de 72 h e, mesmo assim, não acarretou aumento concomitante de AGL no plasma (Freitas et al., 2003). Assim, como não foi observada mobilização lipídica em *D. ecaudata* durante o jejum de 24 h, é possível que os altos níveis de AGL encontrados sejam provenientes de outras reservas lipídicas não investigadas aqui, de aminoácidos contidos na dieta (através de sua transformação em aceto-acetil Coa e posteriormente em ácidos graxos livres) ou, ainda, de AGL oriundos da dieta.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que, da mesma forma que o indicado para *D. rotundus* (Freitas et al., 2003) e para ratos de pradaria (Mustonen et al., 2007), a neoglicogênese parece não exercer um papel essencial no controle glicêmico de *D.*

*ecaudata*, pelo menos no jejum superior a 24 h. Embora não se possa descartar a ativação desta via em animais alimentados e jejuados por 24 h, esse processo parece não estar presente, pelo menos, em morcegos jejuados por 36 h, pois a glicemia cai para níveis muito baixos neste período.

No período absorptivo e, possivelmente, no jejum de 24 h a manutenção da glicemia em *Diphylla ecaudata* parece ter alguma contribuição da glicose presente na dieta, sugestão já feita anteriormente para *D. rotundus* alimentados (Freitas et al., 2003). O fato de que em *D. rotundus* ocorre queda glicêmica no jejum de 24 h e em *D. ecaudata* isso acontece apenas no jejum de 36 h poderia estar associado aos diferentes tipos de presa. Ou seja, como a glicemia de pombos alimentados é quase quatro vezes superior à de mamíferos domésticos (Fröhli e Blum, 1988; Da Silva et al., 2004), *D. ecaudata* teria maior suprimento de glicose a partir de sua alimentação do que *D. rotundus*, que prefere o sangue de mamíferos. Nossa hipótese parece ser corroborada por estudos feitos em morcegos nectarívoros (*Glossophaga soricina*) onde, no estado alimentado, ocorre oxidação preferencial da glicose exógena em detrimento da sua utilização para a síntese de glicogênio e lipídios. Esse padrão possivelmente se deve ao alto custo energético da estocagem de glicose na forma de glicogênio e ao alto peso destas reservas, o que poderia prejudicar o desempenho deste pequeno animal durante o vôo (Voigt e Speakman, 2007). Não se pode, no entanto, descartar a contribuição do glicogênio hepático para a manutenção da homeostase glicêmica no jejum de 24 h em *D. ecaudata*. Em *G. soricina*, além de significativa metabolização de carboidratos exógenos após a ingestão, também há mobilização de reservas lipídicas e de glicogênio em resposta à privação alimentar (Voigt e Speakman, 2007).

Outro estudo demonstrou que, principalmente no estado alimentado, *D. rotundus* oxida AGL vindos do sangue do gado, além da metabolização de suas reservas endógenas (Breidenstein, 1982; Voigt et al., 2007), fenômeno corroborado pela diminuição dos níveis de AGL quando esses morcegos são submetidos ao jejum (Freitas et al., 2003). Os achados destes autores sobre o uso de AGL reforçam a nossa hipótese de que talvez a dieta possa ter participação na manutenção da glicemia e dos níveis de AGL plasmáticos em *D. ecaudata* alimentados e jejuados por 24 h.

*D. ecaudata* costuma sair de seus abrigos em busca de alimento após o pôr-do-sol, retornando depois de um período médio de 30 minutos. Esses animais saem novamente apenas no dia seguinte, enfrentando assim um jejum de aproximadamente 24 h (Dalquest, 1955; Uieda, 1994). Como visto nos resultados desse trabalho, durante a privação alimentar por 24 h *D. ecaudata* mantém a glicemia entre 4 e 6 mmol/L, valores necessários para a sobrevivência de outros mamíferos (Unger, 1981; Taylor e Hirsch, 2007). Porém, a partir de 36 h, estes animais apresentaram queda glicêmica muito pronunciada, o que poderia levá-los a óbito por inanição. É possível que as maiores concentrações de glicose contidas no sangue das aves que costumam pregar sejam também responsáveis por manter a glicemia de *D. ecaudata* em níveis compatíveis com a vida de mamíferos até 24 h de jejum, que é o período de privação alimentar normalmente enfrentado por estes animais em condições naturais.

Como *D. ecaudata* apresenta grande especialização alimentar, ingerindo somente sangue de aves, enfrenta maior probabilidade de não-obtenção de alimento. A grande fragilidade frente ao jejum, aliada à maior especialização alimentar, demonstram que o estresse alimentar é importante para esta espécie. Essas características, aliadas ao maior grau de encefalização de morcegos-vampiros em relação a outras espécies de quirópteros

(Greenhall et al., 1984), poderiam ter facilitado a evolução do comportamento da partilha alimentar entre parceiros, comportamento descrito, inicialmente, apenas para *D. rotundus* (Wilkinson, 1984), mas que também tem sido verificado para *D. ecaudata* (Ellizalde-Arellano et al., 2007). Embora alguns relatos na literatura afirmem que *D. ecaudata* possui hábitos solitários (Dalquest, 1955; Greenhall et al., 1984), o que tornaria mais difícil a partilha recíproca de alimento, Bredt et al. (1999) sugere que o comportamento solitário descrito para essa espécie poderia simplesmente representar o início de uma colônia maior. A colonização de abrigos por *D. ecaudata* é sempre feita por um ou poucos indivíduos machos à espera de fêmeas para formar novas colônias, e que o descrito na literatura poderia apenas se referir ao início da formação da colônia e não um hábito constante na vida dos animais.

A partilha recíproca, através da qual um indivíduo que obteve sucesso na busca por alimento regurgita parte de seu conteúdo estomacal em proveito de outro indivíduo da mesma unidade social que não teve a mesma sorte, aumenta as chances de sobrevivência do indivíduo jejuado e compensa possíveis insucessos de forrageamento. Esse padrão comportamental deve, inclusive, auxiliar na perpetuação da espécie, compensando o nicho alimentar estreito, a fragilidade frente ao jejum superior a 24 h e as baixas taxas de fecundidade de *D. ecaudata* (Greenhall et al., 1984).

Wilkinson (1990) sugere que sem a partilha recíproca a mortalidade entre morcegos hematófagos da espécie *D. rotundus* seria altíssima e que rapidamente estes animais se extinguiriam. Como *D. rotundus* é a espécie de morcego hematófago que possui as colônias mais numerosas dentre as espécies hematófagas, destaca-se ainda mais a importância deste comportamento altruísta também para *D. ecaudata*.

Quanto à seleção de presas, as diferenças entre o comportamento alimentar de *D. ecaudata* e de *D. rotundus* poderiam explicar as maiores populações deste último, já que suas presas existem em maior quantidade, têm maior biomassa, e pela própria facilidade de visualização destas. Isso permitiria maior facilidade de adaptação aos mais variados ambientes. No entanto, é importante lembrar que a maior especialização na alimentação de *D. ecaudata* pode reduzir a competição em ambientes em que estas duas espécies coexistam (Schutt et al., 1999).

Finalmente, as pequenas reservas de carboidratos e lipídios, e a fragilidade ao jejum apresentadas por *D. ecaudata* e por *D. rotundus* sugerem alguma relação entre a dieta hematófaga e esse padrão metabólico. A interferência da dieta da mãe no desenvolvimento fetal foi demonstrada em estudos feitos em humanos e ratos, que mostraram que o ambiente intra-uterino poderia influenciar positiva ou negativamente o metabolismo de nascituros, o qual dependeria da saúde, alimentação e status metabólico da mãe. Fetos subnutridos ou supernutridos têm um desenvolvimento irregular do pâncreas endócrino, gerando tanto uma redução da população de células  $\beta$  pancreáticas, quanto de células pouco capazes de lidar com estresses metabólicos e oxidativos durante a vida do animal. Essas alterações estão, possivelmente, associadas à disfunções das mitocôndrias em células  $\beta$  devido à falta ou excesso de nutrientes. A massa de células  $\beta$  presente ao fim do desenvolvimento embrionário determina a massa das ilhotas de Langerhans na idade adulta, já que a produção de novas células secretoras de insulina é pequena após o nascimento. Dessa forma, um ambiente uterino desbalanceado energeticamente devido a uma dieta deficitária da mãe poderia ocasionar graves alterações endócrinas, inclusive diminuição de massa de células  $\beta$  pancreáticas e redução da sensibilidade tecidual à insulina (McCurdy e Friedman, 2006; Reusens e Remacle, 2006).

Assim, a dieta predominantemente protéica e com baixa quantidade de glicose ingerida por fêmeas prenhes de *D. rotundus* poderia ser um dos fatores que explicariam a diminuição da massa de células  $\beta$ , a pequena secreção pancreática de insulina e as baixas concentrações plasmáticas deste hormônio já observadas para essa espécie (Freitas, 2005). Como o padrão metabólico visto para *D. rotundus* é muito similar ao de *D. ecaudata*, tal fenômeno poderia estar ocorrendo, também, neste último.

Morcegos hematófagos, comparados às outras espécies de quirópteros e de outros mamíferos de tamanho similar (ratos e camundongos) possuem maior tempo de gestação (Schmidt, 1988; Reusens e Remacle, 2006), submetendo o feto por mais tempo a um ambiente pobre em carboidratos, o que poderia comprometer o pâncreas destes animais. Como o desenvolvimento de células  $\beta$  depende particularmente de glicose, o suprimento reduzido deste substrato para os fetos desses hematófagos poderia resultar em diminuição da proliferação deste tipo celular durante a embriogênese. Uma consequência disso seria uma redução dos níveis de síntese e secreção de insulina, já demonstrado para *D. rotundus*, e que poderia também estar presente em *D. ecaudata*. Isso explicaria suas baixas e/ou ausência de reservas energéticas corporais, possíveis fatores para sua fragilidade ao jejum tão incomum entre mamíferos. E, em torno desta fragilidade, adaptações comportamentais, como o compartilhamento recíproco de sangue através da regurgitação, teriam importante papel para a sobrevivência dessas espécies.

## 7. Referências Bibliográficas

- AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, W. R.; PORTELLA, A. S. (2006). Occurrence of white-winged vampire bat, *Diaemus youngi* (Mammalia: Chiroptera), in the Cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, **23** (3): 893-896.
- ALLICK, G.; BISSCHOP, P. H.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; MEIJER, A. J.; KUIPERS, F.; SAUERWEIN, H. P.; ROMIJN, J. A. (2004). A low-carbohydrate/high-fat diet improves glucoregulation in type 2 Diabetes Mellitus by reducing postabsorptive glycogenolysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**: 6193-6197.
- ALTRIGHAM, J. D. Bats: biology and behaviour. Oxford University Press. Inc. New York, 1996.
- ALMEIDA, P. B. L.; MELLO, M. A. R. (2004). Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.*, **18** (1): 17-30.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. (1972). An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, **97**: 142-145.
- BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. (2006). Applied physiology of glucose control. *Curr. Paediatr.*, **16**: 434-438.
- BISSCHOP, P. H.; PEREIRA ARIAS, A. M.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; PIJL, H.; KUIPERS, F.; MEIJER, A. J.; SAUERWEIN, H. P.; ROMIJN, J. A. (2000). The effects of carbohydrate variation in isocaloric diets on glycogenolysis and gluconeogenesis in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**: 1963-1967.
- BLOUET, C.; MARIOTTI, F.; AZZOUT-MARNICHE, D.; BOS, C.; MATHÉ, V.; TOMÉ D.; HUNEAU, J. F. (2006). The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J. Nutr.*, **136**: 1849-1854.
- BREDT, A.; ARAÚJO, F. A. A.; CAETANO-JR, J.; RODRIGUES, M. G. R.; YOSHIZAWA, M.; SODRÉ, M. M.; HARMANI, N. M. S.; MASSUNAGA, P. N. T.; BÜRER, S. P.; PORTO, V. A. R.; UIEDA, W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle. Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 1998.

- BRETT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. (1999). Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Rev. Bras. Zool.*, **16** (3): 731-770.
- BREIDENSTEIN, C. P. (1982). Digestion and assimilation of bovine blood by a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J. Mamm.*, **63** (3): 482-484.
- BROSNAN, J. T. (1999). Comments on metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **53**: S107-S111.
- CRYER, P. E. (1991). Regulation of glucose metabolism in man. *J. Intern. Med.*, **229**: 31-39.
- CORSSMIT, E. P.; ROMIJN, J. A.; SAUERWEIN, H. P. (2001) Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism*, **50** (7): 742-755.
- DA SILVA, R. A.; OLIVEIRA, S. T.; HACKL, L. P. N.; SPILERE, C. I.; FARIA, M. S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M. A. (2004). Ingestive behaviours and metabolic fuels after central injections of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1D/1B</sub> receptors agonists in the pigeon. *Brain. Res.*, **1026**: 275-283.
- DALQUEST, W. W. (1955). Natural History of the Vampire Bats of Eastern Mexico. *Amer. Midl. Nat.*, **53**: 79-87.
- DELPIETRO, V. H. A.; RUSSO, R. G. (2002). Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. *Mamm. Biol.*, **67**: 65-78.
- EISENSTEIN, A. B.; STRACK, I. (1971). Effect of high protein feeding on gluconeogenesis in rat liver. *Diabetes*, **20** (9): 577-585.
- ELLIZALDE-ARELANO, C.; LÓPEZ-VIDAL, J. C.; ARROYO-CABRÁLES, J.; MEDELLÍN, R. A.; LAUNDRÉ, J. W. (2007). Food sharing behavior in the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. *Acta Chirop.*, **9**: 314-319.
- FELIG, P. (1979). Starvation. In *Endocrinology* (ed. L. J. DeGroot), pp. 1927-1940. New York: Grune and Stratton
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLODNE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497.

- FOWLER, M. E. Zoo and Wild Animal Medicine. W. B. Saunders, Philadelphia, 1986.
- FREITAS, M. B. (2000). Metabolismo energético do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas – UnB.
- FREITAS, M. B.; WELKER, A. F.; MILLAN, S. F.; PINHEIRO, E. C. (2003). Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. *J. Comp. Physiol. B*, **173**: 703-707.
- FREITAS, M. B. (2005). Respostas Metabólicas e Hormonais induzidas pelo Jejum em *Desmodus rotundus*: Implicações Relativas à Susceptibilidade da Espécie. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas – UnB, 2005.
- FRÖHLI, D.; BLUM, J. W. (1988). Effects of fasting on blood plasma levels, metabolism and metabolic effects of epinephrine and norepinephrine in steers. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **118**: 254-259.
- GAZOLA, V. A. F. G.; GARCIA, R. F.; HARTMANN, E. M.; BARRENA, H. C.; ALBUQUERQUE, G. G.; SOUZA, H. M.; BAZOTTE, R. B. (2007). Glycemia recovery with oral amino acid administration during experimental short-term insulin-induced hypoglycemia. *J. Diabetes Complications*, **21**: 320-325.
- GENUTH, S. (1998). For aggressive preventive management of type 2 Diabetes. What is the evidence and is it enough? *J. Farm. Pract.*, **47** (5): S23-26.
- GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U.; SEIDEL, M. R. (1983). *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*, **202**: 1-6.
- GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U.; JOERMANN, G. (1984). *Diphylla ecaudata*. *Mammalian Species*, **227**: 1-3.
- GREENHALL, A. M.; SCHUTT Jr, W. A. (1996). *Diaemus yongi*. *Mammalian Species*, **533**: 1-7.
- ISSEKUTZ Jr., B.; BORTZ, W. M.; MILLER, H. I.; PAUL, P. (1967). Turnover rate of plasma FFA in humans and in dogs. *Metabolism*, **16** (11): 1001-1009.
- JITRAPAKDEE, S.; SURINYA, K. H.; ADINA-ZADA, A.; POLYAK, S. W.; STOJKOSKI, C.; SMYTH, R.; BOOKER, G. W.; CLELAND, W. W.; ATTWOOD, P. V.; WALLACE, J. C. (2007). Conserved Glu40 and Glu433 of the

- biotin carboxylase domain of yeast pyruvate carboxylase I isoenzyme are essential for the association of tetramers. *J. Biocel.*, **39**: 2120-2134.
- KETTELHUT, I. C., FOSS, M. C., MIGLIORINI, R. H. (1980). Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high protein diet. *Am. J. Physiol.*, **239**: R437-R444.
- KETTELHUT, I. C. (1981). Efeito da composição da dieta sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios em mamífero carnívoro (gato) e onívoro (rato). Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP.
- KLOVER, P. K.; MOONEY, R. A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **36**: 753-758.
- KORINE, C.; ZINDER, O.; ARAD, Z. (1999). Diurnal and seasonal changes in blood composition of free-living Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *J. Comp. Physiol. B*, **169**: 280-286.
- KREBS, M. (2005) Amino acid-dependent modulation of glucose metabolism in humans. *Eur. J. Clin. Invest.*, **35**: 351-354.
- LANGIN, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biologies*, **329**: 598-607.
- LAMOSOVA, D.; MAAJOVA, M.; ZEMAN, M. (2004). Effects of short-term fasting on selected physiological functions in adult male and female Japanese quail. *Acta Vet. (Brno)*, **73**: 9-16.
- McCURDY, C. E.; FRIEDMAN, J. E. (2006). Early foetal programming of hepatic gluconeogenesis: glucocorticoids strike back. *Diabetologia*, **49**: 1138-1141.
- McNAB, B. K. (1969). The economics of temperature regulation in neotropical bats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **31**: 227-268.
- McNAB, B. K. (1973). Energetics and the distribution of vampires. *J. Mammal.*, **54**: 131.
- McNAB, B. K. The Physiological ecology of vertebrates: A view from energetics. Cornell University Press. Ithaca, 2002.
- MOSIN, A. F. (1982). Some physiological and biochemical features of starvation and refeeding in small wild rodents (Microtinae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **71A**: 461-464.

- MUSTONEN, A.; PUUKKA, M.; PYYKÖNEN, T.; NIEMINEN, P. (2005). Adaptations to fasting in the American mink (*Mustela vison*): nitrogen metabolism. *J. Comp. Physiol. B*, **175**: 357-363.
- MUSTONEN, A.; SAARELA, S.; NIEMINEN, P. (2007). Food deprivation in the common vole (*Microtus arvalis*) and the tundra vole (*Microtus oeconomus*). *J. Comp. Physiol. B*, **178** (2): 199-208.
- NAGY, T. R.; PISTOLE, D. H. (1988). The effects of fasting on some physiological parameters in the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91A** (4): 679-684.
- NIEMINEN, P.; ROUVINE-WATT, K.; SAARELA, S.; MUSTONEN, A. (2007). Fasting in the American marten (*Martes americana*): a physiological model of the adaptations of a lean-bodied animal. *J. Comp. Physiol. B*, **177**: 787-795.
- NOGUCHI, R.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; HOSOKAWA, M.; FUKUNAGA, K.; MIYASHITA, K. (2001). Dietary effects of bitter melon oil on blood and liver lipids of rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **396** (2): 207-212
- OKON, E. E., UMUKORO, R. M., AJUDUA, A. (1977). Diurnal variations of the glycogen and fat stores in the liver and the breast muscle of the fruit bat, *Eidolon helvum* (Kerr). *Physiol. Beh.*, **20**: 21-123.
- OPAZO, J. C.; SOTO-GAMBOA, M.; BOZINOVIC, F. (2004). Blood glucose concentration in caviomorph rodents. *Comp. Biochem. Physiol.*, **137A**: 57-64.
- PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; ORTÊNCIO-FILHO, H. (2006). Ordem Chiroptera. In "Mamíferos do Brasil" (N. R. Reis, A. L. Peracchi; A. L.; W. A. Pedro e I. P. Lima, Eds.), pp 153-230. Londrina-PR, Brasil.
- PETTIGREW, J. D. (1986). Are Flying Foxes Really Primates? *Bat Magazines*, **3** (2): 1-2.
- PINHEIRO, E. C. (1995). Metabolismo intermediário de morcegos frugívoros. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP.
- PINHEIRO, E. C.; TADDEI, V. A.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I.C. (2006). Effects of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **143B**: 279-284.
- REUSENS, B.; REMACLES, C. (2006). Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **38**: 913-922.

- RODEN, M.; BERNROIDER, E. (2003). Hepatic glucose metabolism in humans: its role in health and disease. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **17** (3): 365-383.
- ROUK, C. S.; GLASS, B. P. (1970). Comparative gastric histology of five north and central American bats. *J. Mammal.*, **51** (3): 455-472.
- SCHMID, H.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. (1984). Reduced lipogenesis in rats fed a high-protein carbohydrate-free diet. *Metabolism*, **33** (3): 219-223.
- SCHMIDT, C. (1988). Reproduction. In "Natural history of vampire bats" (A. M. Greenhall e U. Schmidt, Eds), pp 99-109.
- SCHUTT, W. A.; MURADALI, E.; MONDOL, N.; Joseph, K.; BROCKMANN, K. (1999). Behaviour and maintenance of captive white-winged vampire bats, *Diaemus youngi*. *J. Mammal.*, **80** (1): 71-81. Boca Raton-FL, EUA.
- SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. (2007). Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid. Res.*, **48**: 1253-1262.
- SIMMONS, N. B. (2005). Order Chiroptera. In "Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference" (D. E. Wilson e D. M. Reeder, Eds.), pp. 312-529. Baltimore: Johns Hopkins University Press
- SJÖRGREN, B.; NOERDENSKJÖLD, T.; HOLMGEENOL, H.; MÖLLERSTRÖM, J. (1938). Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glykogen, Phosphor und Calcium in der Kaninchenleber). *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **240**: 427.
- SPARGO, E.; PRATT, O. E.; DANIEL, P. M. (1979). Metabolic functions of skeletal muscles of man, mammals, birds and fishes: a review. *J. R. Soc. Med.*, **72**: 921-925.
- SPEAKMAN, J. R. (2001). The evolution of flight and echolocation in bats: another leap in the dark. *Mammal Rev.*, **31**: 111-130.
- SPEAKMAN, J. R.; THOMAS, D. W. (2003). Energetics and physiological ecology of bats. In Kunz, T. H. and Fenton, M. B. (2003) *Bat Ecology*, pp. 430-490. Chicago: Chicago University Press
- TALLAS, P. G.; WHITE, R. G. (1988). Glucose turnover and defense of blood glucose levels in arctic fox (*Alopex lagopus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **91A** (3): 493-498.
- TAWA JR, N. E.; KETTELHUT, I. C.; GOLDBERG, A. (1992). Dietary protein deficiency reduces lysosomal and non lysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am. J. Physiol.*, **263**: E263-334

- TAYLOR, C.; HIRSCH, N. (2007). Applied cerebral physiology. *Anaesth. Intens. Care. Med.*, **8**: 407-412.
- TIRONE, T. A.; BRUNICARDI, F.C. (2001). Overview of glucose regulation. *World J. Surg.*, **25**: 461-467.
- TRINDER, P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.*, **22**: 158-161.
- UIEDA, W. (1994). Comportamento alimentar de morcegos hematófagos ao atacar aves, caprinos e suínos, em condições de cativeiro. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- UNGER, R. H. (1981). The milieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetologia*, **20**: 1-11.
- VOIGT, C. C.; SPEAKMAN, J. R. (2007). Nectar-feeding bats fuel their high metabolism directly with exogenous carbohydrates. *Funct. Ecol.*, **21**: 913-921.
- VOIGT, C. C.; GRASSE, P.; REX, K.; HETZ, S. K.; SPEAKMAN, J. R. (2007). Bat breath reveals metabolic substrate use in free-ranging vampires. *J. Comp. Physiol. B*, **178** (1): 9-16.
- WEBER, J-M. (2001). Energy Cycle in Vertebrates. *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- WEBER, J-M.; O'CONNOR, T. (2000). Energy metabolism of the Virginia opossum during fasting and exercise. *J. Exp. Biol.*, **203**: 1365-1371.
- WEBER, J-M.; HAMAN, F. (2004). Oxidative fuel selection: adjusting mix and flux to stay alive. *3rd International Conference of Comparative Physiology and Biochemistry*, **1275**: 22-31.
- WESTERTEP-PLANTENGA, M. S.; LUSCOMBE-MARSH, N.; LEJEUNE, M. P. G. M.; DIEPVENS, K.; NIEUWENHUIZEN, A.; ENGELEN, M. P. K. J.; DEUTZ, N. P. E.; AZZOUT-MARNICHE, D.; TOMÉ, D.; WESTERTEP, K. R. (2006). Dietary protein, metabolism, and body-weight regulation: dose-dependent effects. *Int. J. Obes.*, **30**: S16-S23.
- WIDMAIER, E. P.; KUNZ, T. H. (1993). Basal, diurnal, and stress-induced levels of glucose and glucocorticoids in captive bats. *J. Exp. Zool.*, **265**: 533-540.

- WILKINSON, G. S. (1984). Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature*, **309**: 181-184.
- WILKINSON, G. S. (1990). Food sharing in vampire bats. *Sci. Amer.*, **262** (2): 76.
- YACOE, M. E.; CUMMINGS, J. W.; MYERS, P.; CREIGHTON, K. (1982). Muscle enzyme profile, diet, and flight in South American bats. *Am. J. Physiol.*, **11**: R189-R194.
- YEO, R.; SAWDON, M. (2007). Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesth. Intens. Care. Med.*, **8** (7): 295-298.

