

André Otavio Peres Protzek

Sensibilidade à insulina e à glicose, secreção
de insulina e distribuição de células β no
pâncreas endócrino do morcego frugívoro
Artibeus lituratus

Brasília

2009



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

Sensibilidade à insulina e à glicose, secreção de insulina e
distribuição de células β no pâncreas endócrino do morcego
frugívoro *Artibeus lituratus*

André Otavio Peres Protzek

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

Orientação: Profa. Dra. Eliana de Cássia Pinheiro

Brasília
2009

“A confusão é o começo de uma nova realidade”.
(Richard Bandler)

Agradeço sobretudo a vida, pela intriga, beleza e possibilidades que se apresentaram.

Também à **Prof^ª Dr^ª Eliana de Cássia Pinheiro**, por inicialmente me aceitar como membro de sua equipe e posteriormente como seu aluno, por me mostrar à beleza e o prazer na fisiologia comparada, na elaboração de um artigo científico e por me abrir os horizontes da vida acadêmica.

Aos meus pais **Sergio Reinaldo Protzek** e **Mariza Alice Beletti Peres Protzek**, por me incentivar e apoiar incondicionalmente em todos os momentos, as conversas e amizade neste processo impar.

A meu irmão **Julio Vinícius**, por estar sempre ao meu lado e ser um exemplo de professor e amigo.

A companheira **Fernanda Duarte**, pelo incentivo e amizade neste processo, as noites de estudo e os ensinamentos de nutrição.

Ao amigo **Alex Rafacho**, pela colaboração nos experimentos, discussão dos resultados e pelo incentivo no caminho da ciência.

Às amigas **Carolinne Isabella Dias Gomes** e **Joicy Queiroz** pelo ensino do manejo de animais, coleta no campo, realização de experimentos e companheirismo.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves** pelas diversas contribuições no conhecimento de estatística, metodologia e ensino.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro**, que participou como colaborador desta pesquisa e cedeu o laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da UNESP-Bauru para a realização de experimentos, sem o qual este trabalho não poderia se feito.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero**, que gentilmente cedeu o laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP para a realização de experimentos e agradeço pela colaboração em discutir os resultados.

A todos os professores do Dpt. de Ciências Médicas, em especial ao **Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto**, pelas valiosas sugestões, e especialmente pela confiança e amizade; e também aos funcionários da pós-graduação **Alessandro** e **Daniele** pela presteza e colaboração.

Ao **Sr. André Salles** e à **Roche Diagnóstica Brasil Ltda.**, por fornecer as fitas para o glicosímetro, material indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Integrado, **Profs. Drs. Alzira Rosa e Silva e Vanner Boere**; também aos amigos **Valter, Ingrid, Danielle, Gustavo, Anderson** e a todos que contribuíram para a fase experimental deste estudo.

A todos os colegas do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP e do laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da UNESP-Bauru, que de alguma forma colaboraram para a realização dos experimentos, em especial à **Julia, Danilo, Ana Paula e Ricardo** por terem me acolhido com tanta presteza e pela colaboração nos experimentos.

À Universidade de Brasília (UnB), à Universidade Julio de Mesquita filho (UNESP-Bauru), à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que possibilitaram a execução deste trabalho.

E a todos que embora não mencionados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

Protzek, André Otavio Peres Protzek.

Sensibilidade à insulina e à glicose, secreção de insulina e distribuição de células β no pâncreas endócrino do morcego frugívoro *Artibeus lituratus*.

viii +62p.

1 – *Artibeus lituratus*

2 – Insulina

3 – Glicose

4 – Célula β

ÍNDICE

Índice de figuras.....	iv
Índice de tabelas	v
Lista de abreviaturas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Introdução.....	01
Pâncreas endócrino.....	01
Mecanismo de secreção de insulina.....	02
Receptor de insulina.....	03
Substrato receptor de insulina.....	04
PI3-quinase e proteína quinase B (PKB/Akt).....	05
Influência de macronutrientes ou substratos da dieta na secreção hormonal e ativação de vias metabólicas.....	07
Justificativa.....	10
Objetivos Gerais.....	11
Específicos.....	11
Materiais e métodos.....	12
Área de estudo.....	12
Animais.....	12
Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT).....	14
Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (ipITT)	15
Insulina plasmática	15
Secreção <i>in vitro</i> de insulina	16
Imunocitoquímica para células β	17
Quantificação e fosforilação da Akt por “Western Blot”	17
Análise Estatística.....	18

Resultados	19
Discussão e conclusões.....	25
Referências bibliográficas.....	28
Anexos.....	37

Índice de figuras

Figura A: Esquema simplificado do mecanismo de secreção de insulina.....	03
Figura B: Representação simplificada da via de sinalização da insulina nas células....	04
Figura C: Ativação da PI3K.....	06
Figura D: <i>Artibeus lituratus</i>	12
Figura E: Determinação da glicemia a partir de sangue obtido da veia da asa, procedimento utilizado nos ipGTT e ipITT	14
Figura 1: Teste de tolerância a Glicose (ipGTT)	19
Figura 2: Teste de Tolerância a Insulina (ipITT).....	20
Figura 3: Concentrações plasmáticas de insulina	21
Figura 4: Secreção <i>in vitro</i> de insulina	21
Figura 5: Fotomicrografia de ilhotas de <i>A. lituratus</i>	23
Figura 6: Imunobloting para fosforilação da proteína Akt	24

Índice de tabelas

Tabela 1: Resumo das ações da Akt em tecidos insulino-sensíveis.....	07
Tabela 2: Glicemia e insulinemia	21

Lista de abreviações

ADP.....	adenosina di-fosfato
ANOVA.....	análise de Variância
ATP	adenosina tri-fosfato
Ca ²⁺	Íon Cálcio
EPM	erro Padrão da Média
g/Kg	grama/ kilograma
GLUT 2.....	transportador de glicose 2
GLUT4.....	transportador de glicose 4
ipGTT	teste de tolerância à glicose intraperitoneal
ipITT	teste de tolerância à insulina intraperitoneal
IR	receptor de insulina
IRS	substratos receptores de insulina
m.c.	massa corporal
mg/dL.....	miligramas/ decilitro
mMol	milimol
PDK-1	quinase 1 depende te de fosfatidilinositol
PH	pleckstream homology
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	fosfatidilinositol 3,4-fosfato
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato
PKB/Akt	PI3-quinase e proteína quinase B
Rab	GTPase activating protein
SGLT1.....	cotransportador de sódio e glicose
SH2.....	homologia Src2
U/kg.....	unidades por quilograma

Resumo

O morcego frugívoro *Artibeus lituratus* absorve grandes quantidades de glicose em curtos períodos de tempo, além de mantém a normoglicemia, mesmo após prolongado período de jejum. Com base nesses dados, nosso objetivo foi investigar diversos aspectos relacionados à homeostase da glicose: concentrações plasmáticas de glicose e insulina; teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina (*ipGTT* e *ipITT*), secreção de insulina em fragmentos de pâncreas estimulados por glicose (2,8, 5,6 ou 8,3 mM), distribuição das células β nas ilhotas pancreáticas, e conteúdo e atividade da pAkt/Akt no músculo peitoral e fígado do morcego frugívoro *Artibeus lituratus*. A glicose plasmática de morcegos alimentados foi superior a de morcegos jejuados, enquanto que os níveis de insulina foram semelhantes em ambas às condições. Os valores da área sob curva obtida a partir do *ipGTT* foram significativamente mais elevados quando os morcegos receberam 2 ou 3g/ kg m.c. de glicose em comparação com o controle (salina). Estes morcegos também apresentaram um decréscimo significativo dos valores de glicose no sangue após a administração de insulina durante o *ipITT*. A secreção de insulina a partir de fragmentos de pâncreas estimulados por concentrações fisiológicas de glicose (5,6 ou 8,3 mM) foi semelhante, mas superior à secreção induzida por 2,8 mM de glicose. *A. Lituratus* apresentou grande quantidade de células β distribuídas não apenas na região central da ilhota pancreática. A fosforilação de Akt induzida por insulina foi superior no músculo peitoral em relação ao fígado. A alta sensibilidade à glicose e à insulina, a intensa secreção de insulina em resposta à glicose e a grande população de células β podem representar adaptações que garantem o controle apropriado da homeostase glicêmica nesta espécie, constantemente submetida a um grande influxo de glicose, proveniente de sua dieta rica em carboidratos.

Palavras-chave: *Artibeus lituratus*; morcego frugívoro; insulina; glicose; células- β

Abstract

The fruit bat *Artibeus lituratus* absorbs large amounts of glucose in short periods of time and maintains normoglycemia even after a prolonged starvation period. Based on these data, we aimed to investigate various aspects related with glucose homeostasis analyzing: blood glucose and insulin levels, intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (*ip*GTT and *ip*ITT), glucose-stimulated insulin secretion (2.8, 5.6 or 8.3 mM glucose) in pancreas fragments, cellular distribution of β cells, and the amount of pAkt/Akt in the pectoral muscle and liver. Blood glucose levels were higher in fed bats than fasted bats, whereas insulin levels were similar in both conditions. The values of the area-under-curve obtained from *ip*GTT were significantly higher when bats received 2 or 3 g/ kg *b.w.* compared with control (saline). These bats also exhibited a significant decrease of blood glucose values after insulin administration during the *ip*ITT. Insulin secretion from fragments of pancreas under physiological concentrations of glucose (5.6 or 8.3 mM) was similar but higher than in 2.8 mM glucose. These bats showed a marked islet distribution along the pancreas, and the pancreatic β cells are not exclusively located at the central part of the islet. The insulin-induced Akt phosphorylation was more pronounced in the pectoral muscle, compared to liver. The high sensitivity to glucose and insulin, the proper insulin response to glucose, and the large β -cell population could represent benefits for the management of high influx of glucose from a carbohydrate-rich meal, which permits appropriate glucose utilization.

Keywords: *Artibeus lituratus*; Fruit bat; Insulin action; Insulin and glucose sensitivity; Islets and β -cell distribution

Introdução

A manutenção da normoglicemia em mamíferos é fundamental para o metabolismo de tecidos que utilizam a glicose como fonte primordial para seus requerimentos energéticos, tais como o sistema nervoso e medula renal (Nordlie et al., 1999; Yeo and Sawdon, 2007), independentemente do estado (absortivo, pós-absortivo ou jejum). A manutenção da glicemia necessita da interação precisa entre o sistema nervoso, pâncreas, tecido hepático, muscular e adiposo. Esses tecidos são essenciais para o fornecimento e a captação de glicose (Tirone and Brunicardi, 2001), através da ativação de vias metabólicas específicas, como as responsáveis pela estocagem de macronutrientes oriundos da dieta ou mobilização das reservas corporais.

O tipo de dieta pode modular as diferentes vias metabólicas (Felig, 1979), de tal forma que, no geral, o padrão metabólico do estado alimentado é distinto quando se ingere dieta rica em carboidrato ou rica em proteína (Beardsall et al., 2006).

O estado nutricional também influencia a ativação das vias metabólicas (Yeo and Sawdon, 2007), sendo que, no estado alimentado a glicogenogênese é a principal via metabólica envolvida na homeostase glicêmica e, durante o jejum, a neoglicogênese e glicogenólise predominam (Beardsall et al., 2006).

Outro importante modulador da homeostase glicêmica é a ação hormonal, que controla tanto a captação como a produção de glicose (Beardsall et al., 2006; Klover and Mooney, 2004). O Pâncreas Endócrino, representado pelas Ilhotas de Langerhans tem papel fundamental no fluxo de substratos, tanto no estado alimentado, quando a insulina é secretada, como no jejum, quando o glucagon é o hormônio mais atuante.

Pâncreas Endócrino

As Ilhotas de Langerhans representam de 1 a 2% da massa total do pâncreas em humanos e são essenciais para o metabolismo energético. Cada Ilhota é composta predominantemente por células β , que sintetizam e secretam insulina, e células α que sintetizam e secretam glucagon (Cabrera et al., 2006).

A insulina, um hormônio polipeptídico anabólico tem ação especial no tecido muscular, hepático e adiposo. É secretada, principalmente, em resposta à elevação da concentração plasmática de nutrientes, primordialmente a glicose. Desta forma, em um

organismo sadio a normoglicemia é orquestrada pelo ajuste entre a secreção e as ações da insulina, sendo a glicose plasmática o principal substrato regulador do processo secretório (Deeney et al., 2000; Rutter, 2001). Os efeitos metabólicos imediatos da insulina incluem: aumento da captação de glicose em tecido muscular e adiposo; aumento da oxidação de glicose; elevação da síntese de proteínas, de ácidos graxos e de glicogênio; inibição da lipólise, da proteólise, da neoglicogênese (via supressão da produção hepática de glicose) e da glicogenólise. A insulina, portanto, estimula a utilização e armazenamento do excedente de substratos energéticos. Outras ações da insulina, a médio e longo prazo, envolvem a expressão gênica, a proliferação e diferenciação celular, o aumento da produção de óxido nítrico no endotélio, a prevenção de apoptose ou morte celular e promoção da sobrevivência da célula (Beardsall et al., 2006; Beardsall et al., 2006; Bernal-Mizrachi et al., 2001; Cabrera et al., 2006; Yeo and Sawdon, 2007; Zecchin et al., 2004).

Mecanismo de Secreção de Insulina

A secreção de insulina é estimulada pela degradação de diversos substratos energéticos que podem ser metabolizados pela célula β , sendo a glicose seu principal secretagogo. O processo secretório é iniciado com o influxo de glicose para a célula β através de transportadores de membrana do tipo GLUT2. No interior da célula β , a glicose é fosforilada e convertida em glicose-6-fosfato (G-6-P) por meio das enzimas hexoquinase I e hexoquinase IV (glicoquinase). A glicoquinase atua na regulação do fluxo pela via glicolítica e, desta forma, na secreção de insulina, desempenhando papel de sensor de glicose na célula β (Boschero, 1996). A G-6-P é completamente oxidada, gerando, finalmente, ATP, promovendo elevação da razão ATP/ADP, o que leva ao fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}). Este evento promove a despolarização da membrana plasmática da célula β e a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, com conseqüente influxo deste íon e ativação da maquinaria secretora, com a migração dos grânulos contendo insulina para a membrana plasmática e posterior extrusão de seu conteúdo (Figura A). Embora a glicose seja o principal secretagogo da insulina, este processo pode ser modulado por outros substratos energéticos como aminoácidos e ácidos graxos livres, além de hormônios e neurotransmissores. A célula β secreta insulina em quantidade e tempo adequados, regulando finamente os níveis de substratos energéticos

presentes no sangue, frente a diferentes condições fisiológicas, como jejum, alimentado, gravidez, exercício e crescimento (Boschero, 1996).

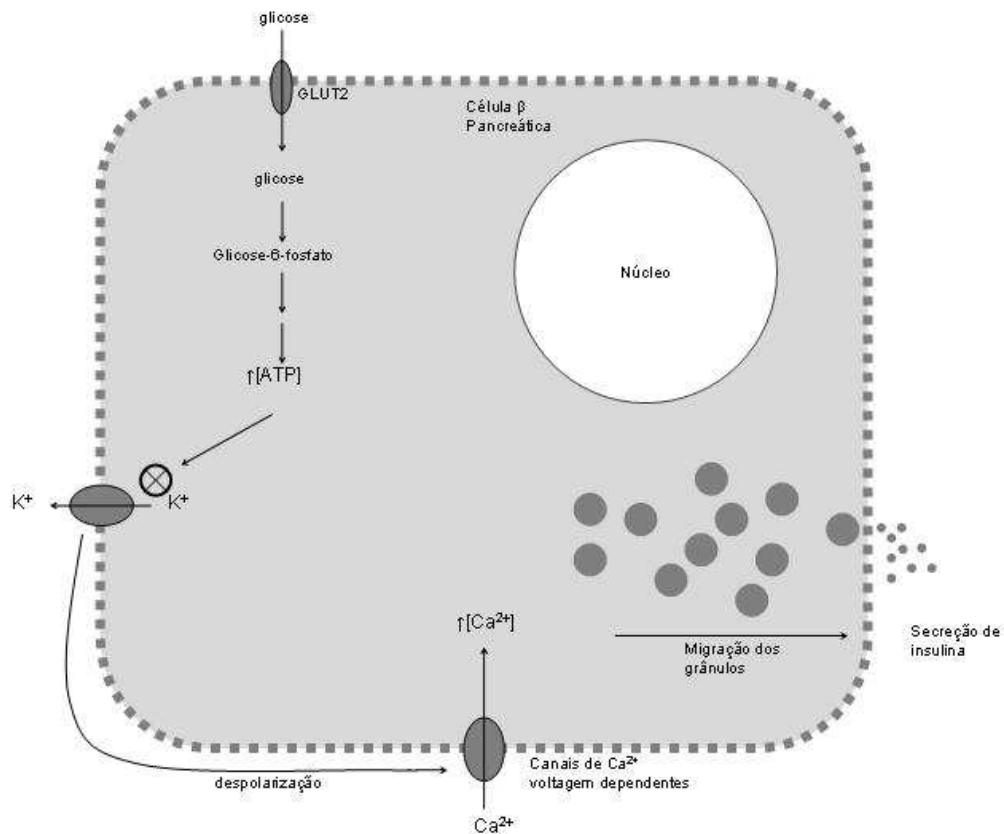


Figura A. Esquema simplificado do mecanismo de secreção de insulina: a entrada e metabolização da glicose na célula β induzem o fechamento dos canais de K^+ , a despolarização e abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes na membrana da célula e conseqüente secreção de insulina.

Receptor de insulina

A insulina desempenha seu papel fisiológico após o acoplamento com receptores de membrana presentes em quase todos os tecidos. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica composta por duas subunidades α , localizadas na porção extracelular, e duas subunidades β transmembrânicas ligadas por pontes dissulfeto e com atividade tirosina-quinase (Kahn, 1985). O receptor de insulina atua como uma enzima alostérica na qual as subunidades α apresentam o sítios de ligação para a insulina e possuem atividade inibitória sobre as subunidades β . O acoplamento da insulina com as subunidades α promove alteração conformacional e autofosforilação do receptor nas subunidades β em

diversos resíduos de tirosina (1158, 1162 e 1163) elevando sua atividade quinase (Patti and Kahn, 1998; White et al., 1984) (Figura B).

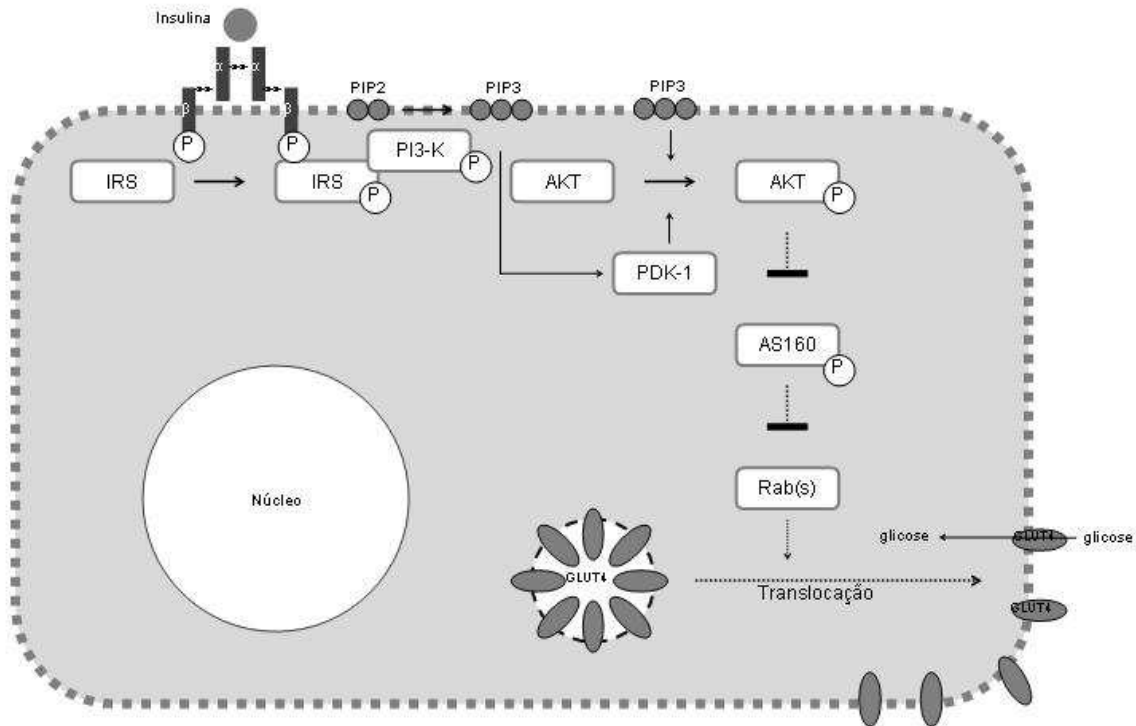


Figura B. Via de sinalização da insulina nas células. A insulina liga-se ao seu receptor específico, ativando a atividade tirosina quinase intrínseca do mesmo, o que resulta na fosforilação de substratos intracelulares como IRS (substrato receptor de insulina). Os IRS, por sua vez, interagem com várias moléculas sinalizadoras contendo domínios SH2 (homologia Src 2) como a PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase). A PI3K é mediadora das principais ações metabólicas da insulina via efetores “downstream” como a proteína Akt (proteína quinase B). A fosforilação de PIP2 (fosfatidilinositol 3,4-fosfato) produzindo PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato) induz a fosforilação da Akt, assim também como a ativação da PDK-1 (quinase 1 depende de fosfatidilinositol). A Akt inibe, via fosforilação, a proteína AS160 possibilitando que proteínas Rab (“GTPase activating protein”) atuem no tráfego de vesículas do transportador de glicose dependente de insulina GLUT4.

Substratos receptores de insulina

A autofosforilação das subunidades β do receptor de insulina promove uma cascata de fosforilação no resíduo tirosina de diversos substratos protéicos. Até o momento, já foram identificados dez substratos do receptor de insulina, sendo quatro destes pertencentes à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Quando fosforilados os

IRS ativam sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios SH2, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) (Zecchin et al., 2004). A PI3K é mediadora das principais ações metabólicas da insulina via efetores “downstream” como a proteína Akt (proteína quinase B).

PI3-quinase e proteína quinase B (PKB/Akt)

A PI3-quinase apresenta forte influência na modulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado por insulina (Zecchin et al., 2004) e é, em princípio, a única molécula intracelular considerada essencial para a captação de glicose (Czech and Corvera, 1999). A PI3-quinase é uma proteína dimérica, composta por uma subunidade regulatória (p85) e uma subunidade catalítica (p110) (Zecchin et al., 2004). A interação dos sítios fosforilados do IRS com o domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-quinase, ativa o domínio catalítico da subunidade p110 (Figura C). Ocorre então, a catalisação e fosforilação dos fosfoinositídeos na posição 3 do anel do inositol, produzindo fosfatidilinositol 3-fosfato, fosfatidilinositol 3,4-fosfato e fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato (Zecchin et al., 2004). Este último interage com domínios PH (“pleckstream homology”) de diversas moléculas sinalizadoras, modulando sua atividade e localização subcelular (Lietzke et al., 2000). Uma das enzimas reguladas por fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato é a PDK-1 (“phosphoinositide-dependent kinase 1”), uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase, a Akt ou PKB (Zecchin et al., 2004). Esta ativação ocorre devido a interação do domínio PH da Akt com o fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato, promovendo a migração da Akt para a membrana celular, assim como sua atividade catalítica.

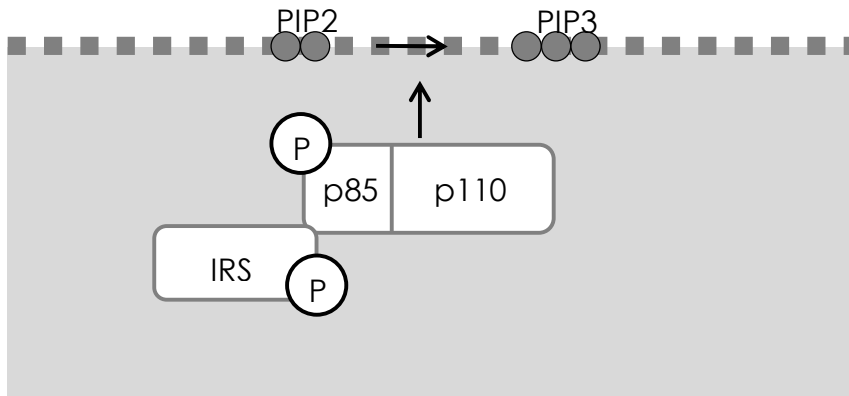


Figura C. A interação dos sítios fosforilados do IRS com o domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-quinase, ativa o domínio catalítico da subunidade p110. Ocorre então, a catalisação e fosforilação dos fosfatidilinositol 3,4-fosfato em fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato.

Em mamíferos, a Akt foi observada em três isoformas: Akt1 (PKBa), Akt2 (PKBb) e Akt3 (PKBg), que se distribuem diferentemente nos tecidos (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). A isoforma Akt1 encontra-se amplamente distribuída nos diversos tecidos, Akt2 apresenta expressão nos tecidos muscular, hepático e adiposo e a Akt3 é predominantemente expressada nos testículos e no cérebro (Zdychova and Komers, 2005). Quando ativada, a Akt catalisa reações de fosforilação de substratos de diversas vias metabólicas (Whiteman et al., 2002), como estimulação da captação de glicose (via GLUT4). Recentemente, uma proteína fosforilada pela Akt, a AS160 foi associada à translocação de GLUT4 em tecido muscular e adiposo. Essa proteína apresenta um domínio GAP (“GTPase activating protein”) específico para proteínas reguladoras do tráfego de vesículas, as proteínas Rab (“GTPase activating protein”) (Watson and Pessin, 2007). Assim, quando ativada pela Akt, a AS160 pode alterar sua localização celular e sofrer modificações conformacionais que inibem o domínio GAP, permitindo, assim, a conversão de Rabs em suas formas ativas (GTP-loaded), induzindo o tráfego e exocitose de vesículas de GLUT4 para a membrana plasmática. Desta forma o domínio GAP da AS160 é, em parte, responsável pela retenção intracelular das vesículas de GLUT4 (Figura 2), regulando negativamente uma ou mais isoformas de Rab na ausência da insulina (Watson and Pessin, 2007). Por outro lado, quando inibida, a Akt promove diminuição parcial do transporte de GLUT4 estimulado por insulina em células musculares e adiposas (Hill et al., 1999).

A Tabela 1 apresenta uma síntese das ações da Akt em tecidos sensíveis à insulina (Cho et al., 2001; Downward, 1998; Whiteman et al., 2002; Zecchin et al., 2004).

Tabela 1. Resumo das ações da Akt em tecidos insulino-sensíveis (adaptado de Whiteman et al., 2002).

Pâncreas	Fígado	Músculo	Adipócito
↑ Massa de células B	↓ Gliconeogênese	↑ Captação de glicose	↑ Captação de glicose
↑ Secreção de insulina	↑ Glicogenogênese	↑ Glicogênese	↑ Síntese protéica
↓ Apoptose celular	↓ Glicogenólise	↑ Síntese protéica	↑ Lipogênese
		↑ Lipogênese	↓ Lipólise

Influência de macronutrientes ou substratos da dieta na secreção hormonal e ativação de vias metabólicas

Os macronutrientes presentes na alimentação podem induzir a secreção de hormônios que modulam a atividade das vias metabólicas.

O consumo de uma dieta rica em carboidratos promove a elevação inicial da glicemia, o que estimula a secreção de insulina, que promove a captação de glicose, sua utilização como fonte energética e a síntese de glicogênio, proteínas e lipídios (Yeo and Sawdon, 2007).

Por outro lado, o consumo de uma dieta rica em proteínas promove a elevação da concentração plasmática de aminoácidos que, inicialmente, estimulam a secreção de glucagon, cujas ações serão potencializadas pela menor concentração de insulina e de glicose plasmáticas. O glucagon promove, principalmente, a ativação da neoglicogênese hepática, aumentando a produção de glicose a partir dos aminoácidos provenientes da dieta. A ativação desta via resulta, posteriormente, em elevação na glicemia, o que, por sua vez, promove modesta secreção de insulina, se comparada a animais com dietas ricas em carboidrato (Kettelhut et al., 1980).

Quando submetidos ao jejum, tanto animais com dietas ricas em carboidrato quanto dietas ricas em proteína, apresentam ativação da glicogenólise e da neoglicogênese, em resposta à secreção de glucagon e outros hiperglicemiantes, resultando na manutenção da glicemia (Beadrsall et al., 2006; Kettelhut et al., 1980). Ressalte-se que a maior parte dos animais com dietas ricas em proteína são mais resistentes à privação alimentar, devido à maior atividade neoglicogenética, já presente no período absorptivo, e que se mantém alta

durante o jejum (Kettelhut et al., 1980). De qualquer forma, independentemente do tipo de dieta ingerida, a neoglicogênese a partir dos aminoácidos, agora provenientes das proteínas corporais, é uma via fundamental para a manutenção da glicemia durante o jejum (Gazola et al., 2007).

Diferentemente do esperado para a maior parte dos animais que se alimentam com dietas ricas em proteína, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* apresenta pouca resistência ao jejum (Freitas et al., 2003), morrendo após 2 ou 3 dias consecutivos de privação alimentar (Altrigham, 1996). Esta susceptibilidade à privação alimentar parece, em parte, estar associada às pequenas reservas corporais de glicogênio e lipídios observadas neste morcego (Freitas et al., 2003).

Por outro lado, o morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, que possui uma dieta muito rica em carboidratos, apresenta maior resistência ao jejum que o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Pinheiro et al., 2006). Esse fato deve-se, possivelmente, às grandes reservas de glicogênio hepático e à ativação da neoglicogênese hepática, associadas à mobilização dos elevados estoques de gordura da carcaça (Pinheiro, 1995). Assim, quando *A. lituratus* é submetido ao jejum de até 6 dias ocorre uma queda de cerca de 40-50% na glicemia, porém, esta se mantém dentro dos limites compatíveis com a vida para mamíferos (aproximadamente 50 mg/dL) (Pinheiro et al., 2006).

O morcego frugívoro *A. lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae, subfamília Stenodermatinae, apresenta um amplo espectro de distribuição, sendo encontrado do México até o Norte da Argentina, Bolívia, Pequenas Antilhas, Ilhas Três Marias e em todas as regiões do Brasil (Simmons et al., 2005). É uma das espécies mais conhecidas no Brasil devido à sua abundância, com presença destacada em ambientes urbanos (Reis et al., 2007). Embora a alimentação seja predominantemente frugívora, essa espécie também se alimenta de insetos, folhas, flores, pólen e néctar. Um estudo conduzido na região Sul do Brasil demonstrou que a dieta frugívora de *A. lituratus* representa 80-88% do total de itens alimentares, demonstrando a importância dos frutos para esta espécie (Passos e Graciolli, 2004). A preferência por frutos, associada ao comportamento de retirá-los da planta mãe e levá-los a um abrigo para consumi-los torna este morcego um excelente dispersor de semente de diversas espécies de plantas na região Neotropical, efetuando papel importante na recuperação de florestas (Reis et al., 2007).

Outra característica interessante de morcegos frugívoros é a elevada ingestão de frutas a cada noite, consumindo o equivalente à sua própria massa corporal (Morrison, 1978; Van Der Westhuizen, 1976). Esse padrão alimentar poderia resultar em dois problemas para esse animal: um aumento da carga, na forma de bolo alimentar, que precisaria ser transportada e comprometeria o desempenho do animal durante o vôo; e uma sobrecarga de glicose no plasma, que pode afetar negativamente tecidos independentes de insulina.

Para evitar o sobrepeso durante o vôo, mostrou-se que morcegos frugívoros são capazes de digerir e absorver refeições ricas em carboidratos de forma rápida e eficiente (Craik and Markovich, 2000; Keegan, 1977), capacidade associada a adaptações especiais na estrutura de seu trato-gastrointestinal (Keegan, 1977; Van Der Westhuizen, 1976). É sabido que a maioria dos vertebrados possui transportadores intestinais de glicose do tipo SGLT1, na membrana apical, e do tipo GLUT2, na membrana basolateral do enterócito (Karasov and Diamond, 1988; Karasov and Hume, 1997). Recentemente, foi observado que o morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus* era capaz de absorver a 3-O-metil-D-glicose, um análogo da D-glicose, de forma extremamente rápida e que 55% da captação total de glicose ocorria por via paracelular (Tracy et al., 2007). Recentemente, foi encontrado *A. lituratus* um mecanismo semelhante de absorção de glicose, que contribui com cerca de 70% do transporte total de glicose. Esses achados sugerem que a absorção paracelular possa ser um padrão geral entre morcegos frugívoros (Caviedes-Vidal et al., 2008; Caviedes-Vidal et al., 2007).

No que se refere a morcegos frugívoros terem que lidar com uma sobrecarga de glicose no plasma, proveniente da rápida absorção intestinal da mesma, sem apresentarem grandes flutuações na glicemia, estudo feito por Michelmore et al., (1998) mostrou que o morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus* apresenta uma porcentagem de Ilhotas/Volume total do pâncreas de 9,1%, o que é muito superior ao observado para outras espécies de mamíferos (1-2%). Assim, em termos gerais, esses animais parecem possuir, também, uma maior quantidade de células β e α . Desta forma, as altas porcentagens de Ilhotas de Langerhans e de células β e um possível aumento na capacidade de secreção de insulina, façam parte das adaptações morfo-fisiológicas fundamentais para o controle da homeostase glicêmica em morcegos frugívoros.

Justificativa

Desde 1995 o Laboratório de Metabolismo Energético de Vertebrados, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade de Brasília tem se dedicado a deslindar o padrão metabólico de diversas espécies de morcegos e seu comportamento frente à restrição alimentar. Estes mamíferos têm se mostrado um modelo experimental bastante interessante para o estudo do metabolismo energético por diversas razões, entre elas a proximidade evolutiva em relação aos primatas, incluindo o homem, além da grande diversidade de hábitos alimentares apresentada por esses animais, fazendo deles uma ferramenta muito valiosa no estudo das adaptações metabólicas aos vários tipos de dieta e suas respostas à privação alimentar.

Uma das espécies estudadas nesse Laboratório foi o morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, que possui uma dieta muito rica em carboidratos e precisa lidar, a cada refeição, com uma sobrecarga de glicose, que deve ser rapidamente absorvida e estocada, para que não haja grandes flutuações na glicemia.

Sabendo-se que, em dietas ricas em carboidratos, a insulina é o principal hormônio secretado no estado alimentado, decidimos investigar se *A. lituratus* também apresenta um pâncreas endócrino adaptado à grande sobrecarga de glicose e uma maior sensibilidade tecidual à insulina. Os resultados obtidos por Pinheiro et al. (2006) de que *A. lituratus* possui grandes estoques de glicogênio e lipídios, apontam fortemente para uma grande atuação da insulina nesses animais.

Nossa hipótese é a de que *Artibeus lituratus* seja capaz de lidar com uma sobrecarga de glicose por apresentar elevada quantidade de células β , elevada secreção de insulina e grande sensibilidade a este hormônio em tecidos periféricos.

Objetivos

Gerais

Avaliar em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* a resposta à uma sobrecarga de glicose e insulina; a secreção e sensibilidade periférica à insulina; a morfologia das ilhotas pancreáticas e a distribuição da célula β ; e a secreção *in vitro* de insulina.

Específicos

- Avaliar em animais jejuados o comportamento da glicemia aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de uma sobrecarga de glicose durante um Teste de Tolerância à Glicose (*ipGTT*);

- Avaliar em animais alimentados o comportamento da glicemia aos 15, 30 45 e 60 minutos após a injeção de insulina durante um Teste de Tolerância à Insulina (*ipITT*);

- Avaliar a secreção de insulina *in vitro* por fragmentos de pâncreas estimulados por glicose;

- Determinar a distribuição das células β nas Ilhotas de Langerhans;

- Determinar a sensibilidade periférica à insulina através de medida da quantidade total e do índice de fosforilação da enzima Akt/pAkt em tecido muscular e hepático.

Material e Métodos

Área de estudo

A área de estudo compreendeu a área urbana do Distrito Federal, região centro-oeste do Brasil. As coletas foram realizadas no Plano Piloto do Distrito Federal, Brasília (15°46'47" S, 47°55'47" W), visto que diversos abrigos da espécie *Artibeus lituratus* são encontrados em áreas urbanas (Reis et al., 2007), mais especificamente estruturas de concreto, habitando mais freqüentemente telhados, vãos e juntas de dilatação de edifícios. Todas as coletas foram realizadas com autorização do IBAMA (Licença nº 14867-2) e pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (processo nº 8151/2008).

Animais

Morcegos frugívoros adultos machos (n=40) e fêmeas (n=31) (não prenhes e não lactantes), da espécie *Artibeus lituratus* (Figura D), com 50-90 g de massa corporal foram capturados com redes de neblina (7x3m) armadas próximas a árvores frutíferas, entre 19h00min e 04h00min. Todas as coletas foram realizadas entre Janeiro de 2008 e Fevereiro de 2009.



Figura D. Um espécime de *Artibeus lituratus* macho (foto de André Protzek).

Após as coletas, os animais foram mantidos em biotério (Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, UnB), em gaiolas individuais (25x30x45cm) adaptadas à sua posição de repouso, no escuro e à temperatura ambiente.

Para adaptação dos morcegos ao cativeiro, foram oferecidas aos animais frutas (banana, mamão e maçã) entre 1900h e 0700h e água *ad libitum* em bebedouros durante cinco noites antes da realização de experimentos. A alimentação em cativeiro foi baseada na dieta natural de *A. lituratus* e seguiu a metodologia utilizada por Pinheiro (1995).

Nos experimentos com 24h de jejum, os morcegos foram mantidos apenas com água *ad libitum*. Os experimentos tinham início sempre às 08h00min. Quando necessária, a eutanásia foi realizado por deslocamento cervical seguido de guilhotinagem.

Para as dosagens plasmáticas, o sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados, posteriormente centrifugados (2500rpm /4 min - Combate, Celm) e o plasma obtido foi congelado a -20 ° C para determinações posteriores. Para as determinações teciduais, amostras foram rapidamente retiradas após decapitação e mantidas em gelo para processamento imediatamente posterior.

Para as determinações realizadas no Laboratório do Pâncreas Endócrino, do Departamento de Biologia, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho (UNESP – Bauru) e no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade de Campinas (Unicamp), os animais foram transportados via terrestre e novamente adaptados ao cativeiro por antes dos experimentos.

A manipulação dos animais, bem como dos tecidos e do sangue dos mesmos foi feita de acordo com todas as normas de higiene e segurança, incluindo as vacinações antitetânica e anti-rábica prévias dos pesquisadores envolvidos. Após a vacinação anti-rábica, foi realizada a titulação para determinação da quantidade de anticorpos para o vírus da raiva e somente membros da equipe imunizados (após confirmação do teste sorológico) puderam participar dos experimentos.

Procedimentos experimentais

Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT)

As determinações das glicemias, tanto para o *ipGTT*, quanto para o *ipITT* foram realizadas com a utilização de glicosímetro portátil Accu Chek Active (Roche®) ($r=0,997$), a partir de amostras de sangue obtidas da veia da asa (Figura E).

Para a realização do *ipGTT*, morcegos jejuados por 12h tiveram a glicemia determinada no tempo zero (T0) e, em seguida, receberam injeção intraperitoneal (0,5 mL) de glicose nas concentrações de 2g/kg ou 3g/Kg de massa corporal (GLU2 e GLU3, respectivamente) ou salina (0,9%) (SAL). Após 30, 60, 90 e 120 minutos (T30, T60, T90 e T120, respectivamente) da injeção de glicose foram coletadas amostras de sangue dos animais (n=17) para determinação da curva de decaimento da glicose circulante. O grupo SAL (n=14) recebeu injeção intraperitoneal (0,5 mL) exclusivamente de solução veículo (salina 0,9%) e foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo que recebeu glicose.



Fig E. Obtenção de sangue após punção da veia da asa, procedimento utilizado nos Testes de Tolerância à Glicose (*ipGTT*) e à Insulina (*ipITT*). (Foto de André Protzek).

Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (ipITT)

Após a realização do *ipGTT*, os animais foram realimentados por três noites consecutivas e, na manhã posterior à terceira noite de alimentação foram submetidos ao *ipITT*.

Para a realização do *ipITT*, morcegos alimentados tiveram a glicemia determinada no tempo zero (T0) e, em seguida, receberam injeção intraperitoneal (0,5 mL) de insulina (INS) regular Humulin® (0,56 U/kg massa corporal) ou salina (0,9%) (SAL). Após 15, 30, 45 e 60 minutos (T15, T30, T45 e T60, respectivamente) da injeção de insulina foram coletadas amostras de sangue dos animais (n=17) para determinação da curva de decaimento da glicose circulante, similar ao descrito para o *ipGTT*. O grupo SAL (n=17) recebeu injeção intraperitoneal (0,5 mL) de salina (0,9%) e foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo que recebeu glicose.

Insulina plasmática

Para a determinação da insulina plasmática, animais alimentados (ALM) (n=5) e jejuados por 24h (J24) (n=9) foram sacrificados por deslocamento cervical, sucedido por decapitação. Em seguida, o sangue foi coletado, a partir de punção cardíaca e do tronco, em tubos de ensaio, posteriormente centrifugados (2500rpm/4 min) para a separação do plasma (centrífuga Combate, Celm). A insulina plasmática foi determinada por radioimunoensaio, onde alíquotas do plasma foram diluídas 10, 20 e 40x. Do volume final obtido de cada diluição foi retirado 1mL, aos quais foram adicionados 200 μ L de insulina marcada (125 Iodo a 10 COM/ μ L) e 100 μ L de anticorpo anti-insulina (8 μ L/100mL) em solução de tampão radioativo (Novo Nordisk Biolabs). As amostras foram incubadas por 48 horas a 4°C. Após esse período, receberam uma solução de carvão Norit A, sendo centrifugadas (2600rpm/20 min) na mesma temperatura. Após aspiração do sobrenadante, foi feita a leitura da radioatividade (125 Iodo) em contador gama (Contador Gamma 5500, Beckman Instruments INC). Os resultados foram expressos ng/ mL.

As determinações de insulina plasmática foram feitas no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, da Universidade de Campinas - Unicamp, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero.

Secreção in vitro de insulina

A secreção *in vitro* de insulina foi avaliada em fragmentos de pâncreas obtidos de morcegos alimentados (n=9). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, a seguir, tiveram o pâncreas rapidamente removido e colocado em becker contendo tampão Hanks gelado, pH 7.4, previamente gaseado com uma mistura de CO₂/O₂ (5/95%). O pâncreas foi, então, picotado em fragmentos de, aproximadamente, 10 mg cada, que foram distribuídos igualmente em 36 poços e pré-incubados com 0,8 mL de glicose 5,6 mM a 37°C por 30 min. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e os poços contendo os fragmentos de pâncreas foram, então, subdivididos em três grupos experimentais, com seis poços cada um. Cada grupo experimental foi incubado a 37°C por 60 min, com meio contendo tampão Hanks e concentrações variáveis de glicose, a saber:

Grupo 1: 1 mL de glicose 2,8 mM;

Grupo 2: 1 mL de glicose 5,6 mM;

Grupo 3: 1 mL de glicose 8,3 mM;

Durante as incubações, os fragmentos foram colocados em meio contendo 2% de trasyolol, para evitar a degradação enzimática das proteínas. Após a incubação, procedeu-se ao radioimunoensaio, onde alíquotas do meio de incubação foram diluídas 10, 20 e 40x. Do volume final obtido de cada diluição foi retirado 1mL, ao qual foram adicionados 200 μ L de insulina marcada (¹²⁵Iodo a 10 COM/ μ L) e 100 μ L de anticorpo anti-insulina (8 μ L/100mL, em solução de tampão radioativo (Novo Nordisk Biolabs). As amostras foram, novamente, incubadas por 48 horas a 4°C. Após esse período, receberam uma solução de carvão Norit A, e foram centrifugadas (2600rpm/20 min) na mesma temperatura. O sobrenadante foi aspirado e a leitura da radioatividade (¹²⁵Iodo) foi realizada em contador gama (Contador Gamma 5500, Beckman Instruments INC). Os resultados foram expressos pela proporção de insulina secretada/insulina total contida nos fragmentos de pâncreas.

Os experimentos de secreção de insulina *in vitro* foram realizados nos laboratórios de Pâncreas Endócrino do Departamento de Biologia, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - UNESP-Bauru sob orientação dos Professores José Roberto Bosqueiro e Alex Rafacho, e de Pâncreas Endócrino e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, sob coordenação do Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero.

Imunocitoquímica para células β

Para o estudo de aspectos morfológicos e a massa das células β , os pâncreas de três morcegos alimentados foram coletados e fixados por imersão em Bouin por 4 h, desidratados e embebidos em parafina. Em intervalos de 250 μm , três secções em série (5 μm) foram obtidas em micrótomo rotativo e aderidas em lâminas silanizadas individuais. A primeira secção de cada série foi corada com Tricrômico de Gömori (Bancroft and Stevens, 1990) para realização de análise morfológica e estereológica. A segunda e terceira secção foi corada pelo método de imunoperoxidase para insulina para observação da distribuição das células β .

Quantificação e fosforilação da Akt por “Western Blot”

Para a quantificação e verificação da fosforilação da proteína Akt, morcegos alimentados receberam injeção intraperitoneal (0,5 mL) de salina (0,9%) ou insulina (0,56 U/kg massa corporal). Os animais foram, então, sacrificados por deslocamento cervical após cinco minutos da injeção de salina (SAL) (n=3) ou após cinco (n=3) ou 15 minutos (n=3) da injeção de insulina (INS5 e INS15, respectivamente). A expressão das proteínas foi avaliada pela técnica de “Western blot” em fragmentos de fígado e músculo de aproximadamente 200 mg, homogeneizados (Politron PTA 20S, Brinkmann Instrumental model PT 10/35) por 30s em solução Hanks. Os extratos obtidos foram centrifugados a 15.000 rpm/45 min a 4 °C em centrífuga refrigerada (5804R Eppendorf) para remoção do material insolúvel. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a medida da concentração protéica, utilizando a metodologia de Bradford. As amostras foram, então, tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM e aquecidas em água fervente por 5 min. O volume das amostras foi ajustado (Multiskan EX-Labsystems) para que alíquotas com 150 μg de proteína fossem aplicadas em gel de SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean- BioRad), em paralelo com marcadores com pesos moleculares conhecidos. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi incubada por 2h em solução bloqueadora (solução de albumina bovina a 5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Akt (Serina 473) (Santa Cruz

Biotechnology) na diluição 1:1000, por 4 horas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma), na diluição 1:500, por 2h. Após lavagem com solução basal (NaCl 150mM, Trisma Base 10mM, Tween 20 a 0,02%), as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade e quantificação das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

Os experimentos de quantificação e fosforilação protéica foram realizados no laboratório de Pâncreas Endócrino, do Departamento de Biologia, da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - UNESP-Bauru, sob orientação dos Professores José Roberto Bosqueiro e Alex Rafacho.

Análise Estatística

Inicialmente, todos os dados foram testados quanto aos perfis das distribuições das médias e das variâncias. Para verificar se as médias seguiam uma distribuição normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov; para checar a homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) foi utilizado os teste de Brown-Forsythe. Caso as médias não seguissem uma distribuição normal e houvesse uma violação importante da homocedasticidade ($p < 0,01$), testes não-paramétricos foram eleitos para a continuação da análise dos dados. Para GTT, ITT e secreção *in vitro* de insulina foi utilizado o teste paramétrico de ANOVA de medidas repetidas, seguido, segundo o caso, do teste post-hoc de Bonferroni. Na análise da insulina plasmática e da proteína (Akt e pAkt) foi utilizado o teste *t* de Student não paramétrico. Para todos os testes foi utilizado um α (índice de significância) de 5%.

Resultados

Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT)

Não foram observadas diferenças significativas comparando-se o T0 dos diferentes tratamentos (GLU3, GLU2 e SAL) (figura 1A). De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre T0, T30, T60, T90 e T120 nos grupos SAL e GLU2 (Figura 1A). Também não foi observada diferença comparando-se cada um dos tempos dos grupos SAL e GLU2 (Figura 1A). Entretanto, para o grupo GLU3 houve aumento significativo da glicemia em T30, que se manteve até T60 e voltou para valores próximos a T0 em T90 (figura 1A). Os valores da Área Abaixo da Curva (AAC) durante o ipGTT indicam diferença significativa comparando a AAC do grupo SAL com os grupos GLU2 e GLU3 (figura 1B).

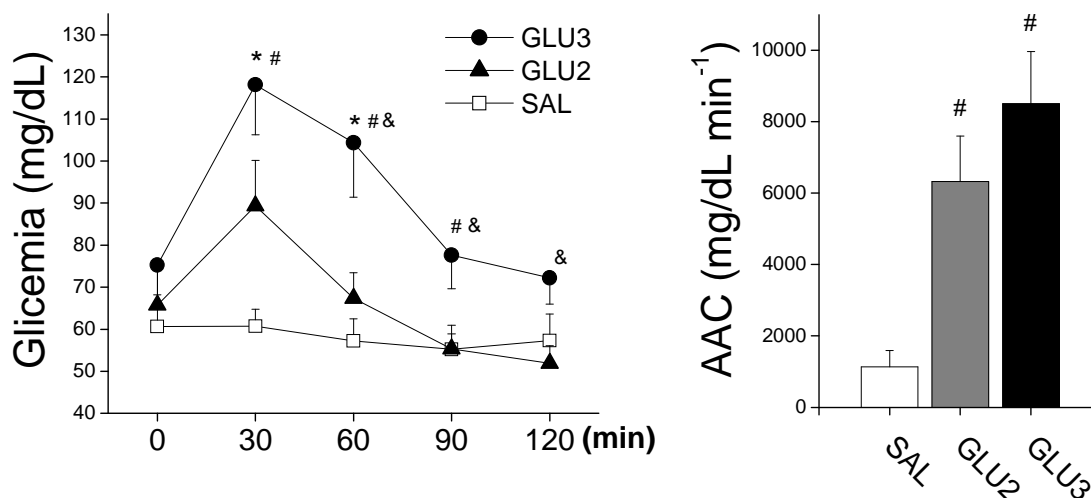


Figura 1. (A) Glicose circulante de *A. Lituratus* jejuados por 12h submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT). A glicemia foi determinada nos tempos zero (T0) antes da injeção de glicose 2 (GLU2) ou 3 (GLU3) mg/Kg de massa corporal ou salina (0.9%) e após 30, 60, 90 e 120 min (T30, T60, T90 e T120, respectivamente) da injeção (0,5 mL). (B) Área Abaixo da Curva durante ipGTT. Os valores dos grupos SAL (n=14), GLU2 (n=17) e GLU3 (n=17) representam a Média \pm EPM. * indica $p < 0,05$ comparado a T0; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; & indica $p < 0,05$ comparado ao grupo GLU2.

Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (ipITT)

Não foram observadas diferenças significativas comparando-se T0 para os grupos INS e SAL (Figura 2). De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre T0, T15, T30, T45 e T60 no grupo SAL (figura 2). Entretanto, o grupo INS apresentou redução rápida e acentuada da glicemia no em T15 comparado a T0, sendo que tal redução se manteve em T30, T45 e T60, que foram diferentes, também, comparados aos mesmos tempos no grupo SAL (Figura 2).

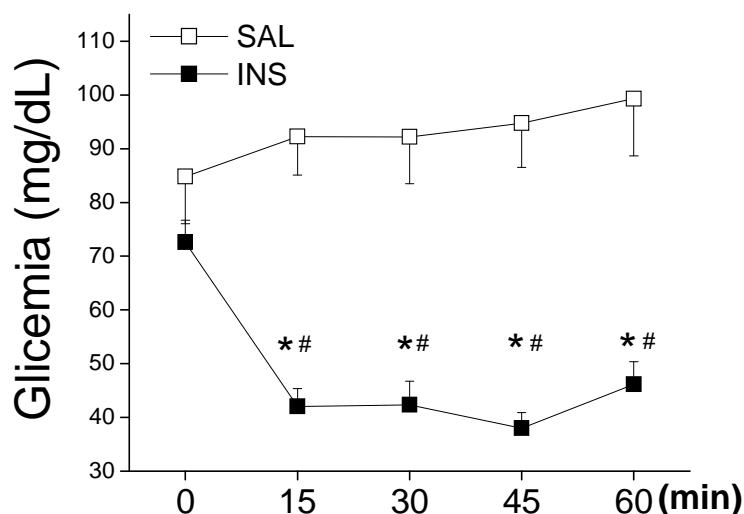


Figura 2. Glicose circulante de *A. Lituratus* alimentados submetidos ao Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (*ipITT*). A glicemia foi determinada nos tempos zero (T0) antes da injeção de insulina (0,56 U/kg massa corporal) ou salina (0,9%) e após 15, 30, 45 e 60 min (T15, T30, T45 e T60, respectivamente) da injeção (0,5 mL). Os valores dos grupos SAL (n=17) e INS (n=17) representam a Média \pm EPM. * indica $p < 0,05$ comparado a T0. # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

Insulinemia e glicemia

Embora a glicemia de animais jejuados (J24) tenha sido significativamente menor quando comparada a animais alimentados (ALM) (Tabela 2), não foi observada diferença significativa na insulinemia entre os grupos ALM e J24 (figura 3).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de insulina e glicose em *A. lituratus* alimentados (n=9) e jejuados (n=5) por 24 h (ALM e J24, respectivamente). Os valores representam a Média \pm EPM. * indica $p < 0,05$ comparando-se ao grupo alimentado (ALM).

	ALM	J24
Glicemia (mg/dL)	124 \pm 9	72 \pm 15 *
Insulinemia (ng/mL)	1,64 \pm 0,5	1,26 \pm 0,07

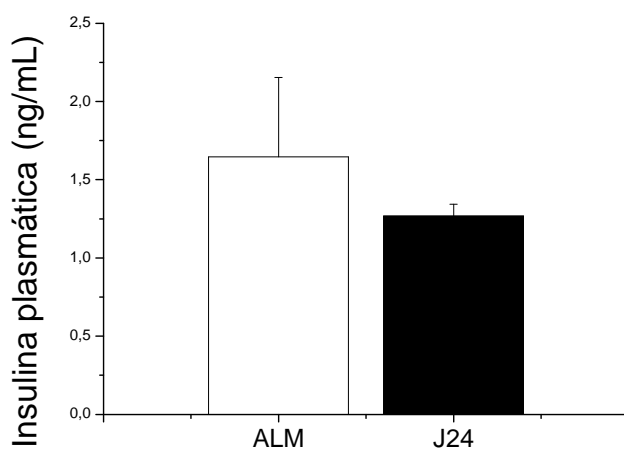


Fig 3. Concentrações plasmáticas de insulina em *A. lituratus* alimentados (n=9) e jejuados (n=5) por 24 h (ALM e J24, respectivamente). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a Média \pm EPM.

Secreção in vitro de insulina por fragmentos de pâncreas estimulados glicose

Fragmento de pâncreas incubados em meio contendo concentração basal de glicose (2,8 mMol) secretaram, aproximadamente, 16% do conteúdo total de insulina presente nos fragmentos (Figura 4). Quando incubados em meio contendo 5,6 mMol de glicose os fragmentos secretaram 29% do conteúdo total (1,8 vezes), valor significativamente superior ao observado com 2,8 mMol (Figura 4). A estimulação com 8,3 mMol de glicose provocou aumento da secreção de insulina de 100%, valor significativamente superior quando comparado aos resultados obtidos com 2,8 mMol de glicose (Figura 4).

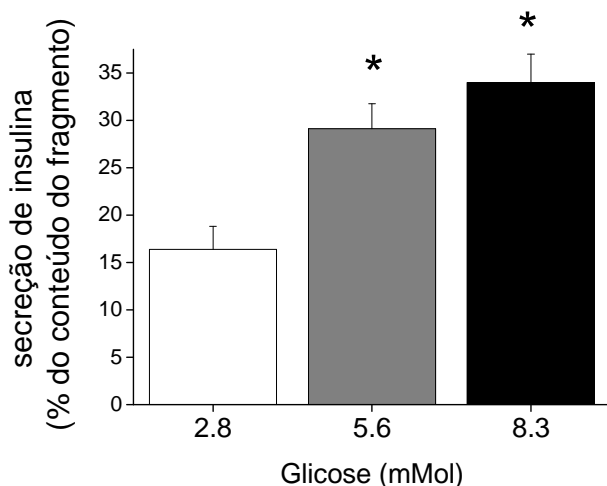


Figura 4. Secreção *in vitro* de insulina por fragmentos de pâncreas de *A. lituratus* estimulados com 2,8 (n=3), 5,6 (n=3) e 8,3 mMol (n=3) de glicose. As colunas e as barras verticais representam a Média±EPM. * Indica $p < 0,05$ comparando-se com a concentração 2,8 mM.

Distribuição das células β pancreáticas em pâncreas de A. lituratus

Com a finalidade de identificar e descrever a distribuição de células β pancreáticas foi realizada a imunocoloração para insulina em secções do pâncreas de *A. lituratus*. A Figura 8A mostra uma visão panorâmica da secção histológica do pâncreas. Podemos observar que o tecido endócrino é bem distribuído através da secção, havendo uma pronunciada densidade de Ilhotas de Langerhans (número de ilhotas) por todo o pâncreas (Figura 8A e B). Na amplificação de $40 \times$ podemos observar a forma genérica das ilhotas pancreáticas (Figura 8C). Geralmente, as maiores ilhotas apresentaram diferentes formas (redonda, oval e outras irregulares) e parece que as células β não se localizam exclusivamente no centro da ilhota (Figura 8C, setas longas). Pelo contrário, é comum observar uma distribuição preferencial na periferia das ilhotas (Figuras 5D-5G). Finalmente, grupo de células β , possivelmente representando Ilhotas, foram observadas ao longo de todo o pâncreas (Figura 8C – setas curtas).

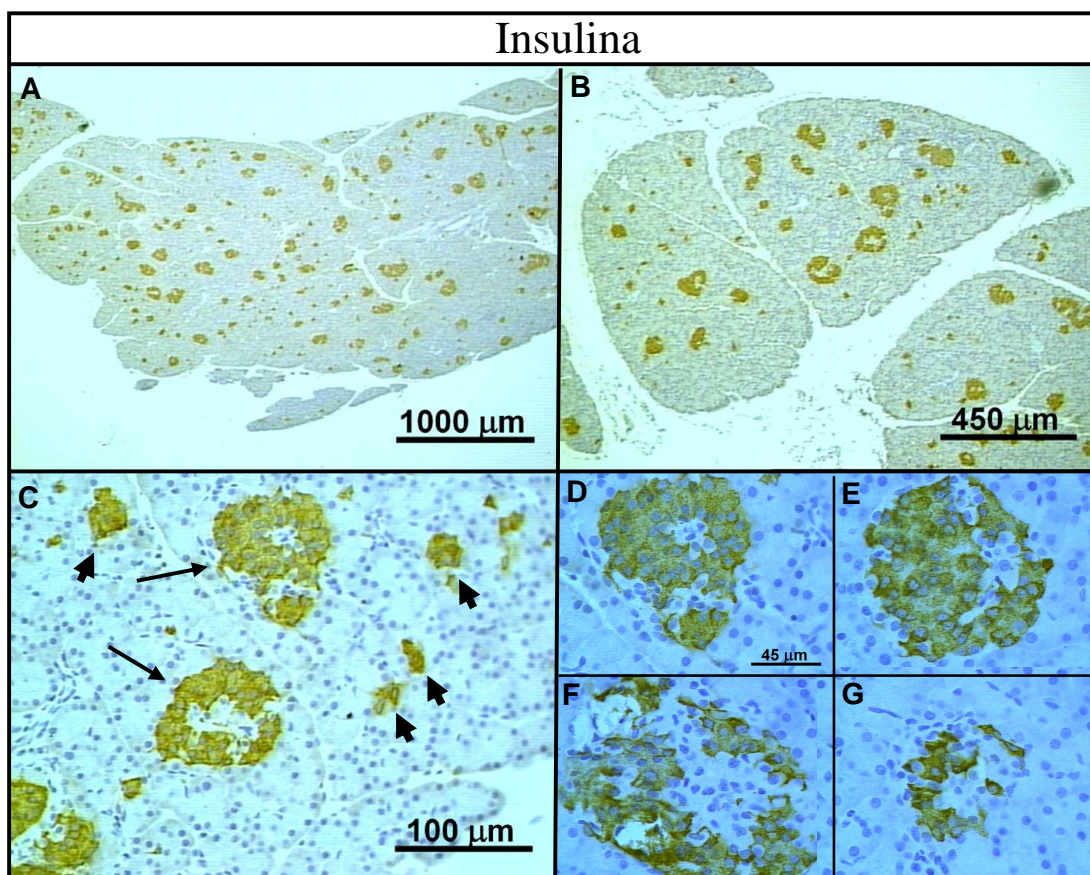


Figura 5. Fotomicrografia do pâncreas de *A. lituratus* com imunocitoquímica para células β , produtoras de insulina. (A) vista panorâmica, (B) distribuição dos aglomerados de células β (ilhotas), (C) sugestão de formatos e tamanhos diversificados das ilhotas (D, E, F e G) e localização das células β nas ilhotas.

A sinalização intracelular de insulina no fígado e músculo peitoral

Não houve alterações significativas no conteúdo total da proteína Akt no fígado ou músculo peitoral dos grupos SAL, INS5 ou INS15 (Figura 6). Entretanto, a fosforilação da proteína Akt em tecido muscular foi significativamente superior nos grupos INS5 e INS15 comparados ao grupo SAL (Figura 6A). Em relação ao fígado, o grupo INS5 não apresentou elevação da fosforilação da Akt comparado ao grupo SAL, enquanto que o grupo INS15 apresentou aumento da fosforilação comparado ao grupo SAL (Figura 6B).

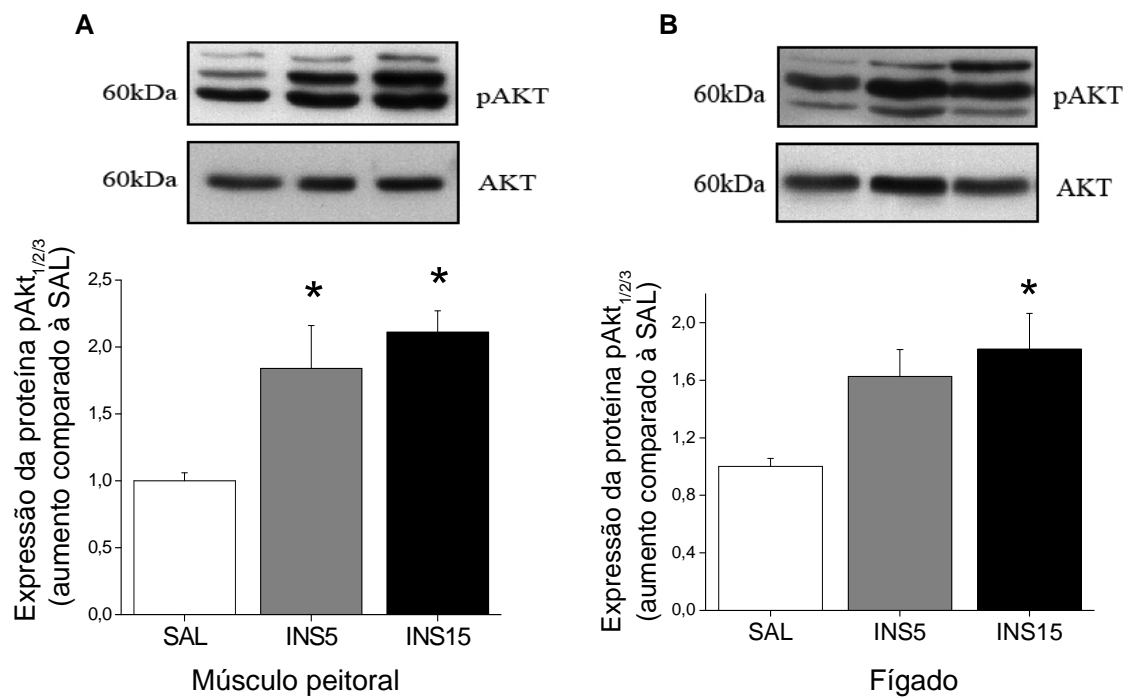


Fig 6. Immunoblotting para quantificação da proteína Akt e Akt fosforilada (pAkt) em tecido hepático e músculo peitoral após 5 minutos da injeção de salina (SAL) e insulina (INS5) ou 15 minutos da injeção de insulina (INS15). n=3 por grupo. * Indica $p < 0,05$ na comparação com o grupo SAL.

Discussão e Conclusões

O morcego frugívoro *Artibeus lituratus* no estado alimentado possui glicemia similar ao encontrado para todos os mamíferos na mesma condição alimentar. Além disso, é capaz de manter a normoglicemia, mesmo após seis dias de jejum, possivelmente devido ao elevado conteúdo de glicogênio hepático e à ativação da neoglicogênese hepática (Pinheiro et al., 2006).

Morcegos frugívoros são conhecidos pela capacidade de absorver uma grande quantidade de carboidratos provenientes da dieta de forma rápida e eficiente. Essa capacidade está ligada a adaptações especiais em seu aparelho digestivo, entre elas destaca-se uma elevada absorção paracelular de glicose no trato gastro-intestinal, observada tanto em *Rousettus aegyptiacus* como em *Artibeus lituratus*.

Outro aspecto interessante de morcegos frugívoros é a sua capacidade de lidar com um grande influxo de carboidratos provenientes da dieta, sem apresentar grandes alterações na sua glicemia. Essa capacidade está, possivelmente, associada ao elevado número de Ilhotas de Langerhans observadas em *Rousettus aegyptiacus* (Caviedes-Vidal et al., 2008; Caviedes-Vidal et al., 2007; Tracy et al., 2007).

Essa relativa facilidade em lidar com uma sobrecarga de glicose no plasma também pode ser verificada em nosso trabalho com o morcego frugívoro *Artibeus lituratus*. Em nosso estudo pudemos observar que, durante o *ip*GTT, somente a administração de 3 g/kg de glicose foi capaz de provocar um aumento significativo das concentrações de glicose plasmática. Estes resultados sugerem que *A. lituratus* apresenta uma captação eficiente de glicose, notadamente pelos tecidos insulino-sensíveis, o que poderia ser resultado de um rápido aumento na secreção de insulina e eficiência nas suas ações. O rápido restabelecimento dos níveis de glicose sanguínea observado durante o *ip*GTT reforça a hipótese de uma elevada tolerância à glicose de *A. lituratus*, reforçando uma elevada capacidade de manter o controle glicêmico, mesmo após uma refeição rica em carboidratos. Esses resultados, ainda, corroboram os elevados estoques de glicogênio hepático encontrados nesta espécie (Pinheiro et al., 2006).

Nossa hipótese de que este morcego teria grande sensibilidade à insulina foi reforçada pelos resultados obtidos durante o *ip*ITT, onde a administração de uma

quantidade reduzida de insulina (0,56 U/kg), comparado com a dosagem utilizada em camundongos (1 U/Kg) (Fujiwara et al., 2007) e ratos (2 U/Kg) (Rafacho et al., 2007), provocou acentuada diminuição dos níveis de glicose no sangue. Esta grande sensibilidade à insulina foi raramente observada, destacando-se um estudo feito com camundongos com ausência de receptor de vasopressina V1b, que apresentavam hipersensibilidade à insulina (Fujiwara et al., 2007).

Nossos resultados de insulinemia mostraram que apenas camundongos (Fujiwara et al., 2007) e seres humanos obesos idosos (Yassine et al., 2009) apresentaram concentrações circulantes de insulina durante o jejum, menores do que nosso modelo animal. Mais marcante, no entanto, é o fato de que não observamos diferença significativa nos níveis séricos de insulina entre animais jejuados e alimentados, sugerindo que a quantidade de insulina presente no jejum poderia já ser suficiente para lidar com uma quantidade de glicose presente em uma refeição regular. Outra possibilidade é a de que uma refeição regular não promoveria um aumento de glicose circulante suficiente para estimular a secreção de insulina e, conseqüentemente, elevar os níveis plasmáticos deste hormônio. Os resultados do *ip*GTT mostrando que apenas quantidades elevadas de glicose são capazes de provocar um aumento significativo na glicemia, reforça essa possibilidade. Não podemos, no entanto, descartar a possibilidade de que um aumento na secreção de insulina já tivesse ocorrido no período imediatamente posterior à ingestão da refeição rapidamente absorvida. Desta forma, a impossibilidade de se detectar um aumento na insulinemia em nossos experimentos pode ser devido ao intervalo de tempo entre a ingestão e coleta de sangue, local de coleta ou, ainda, maior inativação de insulina durante sua primeira passagem pelo fígado.

Quando analisamos a capacidade da glicose em estimular a secreção de insulina em fragmentos de pâncreas de *A. lituratus*, observamos que, em concentrações basais de glicose (2,8 mM), a quantidade de insulina secretada para o meio de incubação foi de cerca de 16% do conteúdo total presente no fragmentos. Estes valores foram significativamente superiores aos encontrados em humanos (Karam et al., 1974), ratos (Rafacho et al., 2009), e camundongos (Ullrich et al., 2005), os quais, nas mesmas condições experimentais secretam em torno de 1-2% do conteúdo total de insulina. Esses resultados reforçam nossa

hipótese de que o pâncreas de *A. lituratus* possuiria grande capacidade para produção e secreção de insulina em resposta à glicose.

Ressaltando-se, inicialmente, que não há na literatura descrição prévia da distribuição de células β pancreáticas em *A. lituratus*, nossos experimentos de immunoblotting sugerem que o pâncreas desse morcego possui elevado número de Ilhotas de Langerhans com formatos irregulares, um padrão muito semelhante ao observado no morcego frugívoro *R. aegyptiacus* (Michelmores et al., 1998). Por outro lado, o padrão de distribuição das células β nas ilhotas do *A. lituratus* parece diferir do encontrado em outros mamíferos. Em nosso modelo animal, as células β parecem não estar localizadas preferencialmente na região central da ilhota, um padrão diferente do observado em *R. aegyptiacus* (Michelmores et al., 1998), roedores (Bani Sacchi & Bani, 1985; Cabrera et al., 2006), humanos, primatas e porcos (Cabrera et al., 2006), onde as células β estão localizados especialmente no centro da ilhota. A variação topográfica das células pancreáticas entre as espécies pode refletir adaptações evolutivas de diferentes hábitos alimentares ou outros condicionamentos ambientais (Cabrera et al., 2006).

Nossos experimentos de immunoblotting indicam que em *A. lituratus* a sinalização da insulina no músculo esquelético parece ser mais eficaz do que no tecido hepático, a julgar pela maior fosforilação da Akt após a administração de insulina. A serina/treonina quinase Akt é uma proteína chave da via da insulina, com implicações importantes na homeostase da glicose, crescimento celular, diferenciação e sobrevivência celular (Cho et al., 2001; Downward, 1998; Schenck et al., 2008). A Akt quando fosforilada induz à translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (Watson and Pessin, 2007), aumentando o influxo de glicose no tecido muscular e adiposo (Kido et al., 2001; Saltiel and Kahn, 2001). Nossos resultados sugerem que o tecido muscular de *A. lituratus* não somente responde à insulina, como sua via de sinalização é semelhante ao observado em muitos vertebrados, como humanos (Holness et al., 2000), ratos (Rafacho et al., 2007), camundongos (Hult et al., 2009) e peixes (Moon, 2001). Em relação à Akt hepática, também observamos um aumento na sua fosforilação após a administração de insulina, o que está de acordo com a capacidade da insulina em aumentar a fosforilação da Akt hepática em outras espécies (Ropelle et al., 2009) e também com a capacidade do fígado deste morcego em armazenar grandes estoques de glicogênio (Pinheiro et al., 2006).

Em conclusão, do ponto de vista evolutivo, a alta sensibilidade à glicose e à insulina e a grande população de células β observadas em morcegos frugívoros representam adaptações que garantem o controle apropriado da homeostase glicêmica em *Artibeus lituratus*, espécie constantemente submetida ao alto influxo de glicose proveniente de sua dieta rica em carboidratos.

Referências

ALTRIGHAM, J. D. **Bats: biology and behavior**. New York: Oxford University Press, 1996.

BANI SACCHI, T.; BANI, D. New views on the identification of the various cell types in the pancreatic islets of the rat. An ultrastructural and morphometrical study. **Acta Anat (Basel)**, v. 122, n. 1, p. 1-17, 1985.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Curr. Paediatr.**, v. 56, p. 127-156, 2006.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Curr. Paediatr.**, v. 56, p. 127-156, 2006.

BERNAL-MIZRACHI, E.; WEN, W.; STAHLHUT, S.; WELLING, C. M.; PERMUTT, M. A. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1631-8, Dec 2001.

BOSCHERO, A. C. Acoplamento excitação-secreção nas células beta pancreáticas (revisão). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 40, p. 149-155, 1996.

CABRERA, O.; BERMAN, D. M.; KENYON, N. S.; RICORDI, C.; BERGGREN, P. O.; CAICEDO, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2334-9, Feb 14 2006.

CAVIEDES-VIDAL, E.; KARASOV, W. H.; CHEDIACK, J. G.; FASULO, V.; CRUZ-NETO, A. P.; OTANI, L. Paracellular absorption: a bat breaks the mammal paradigm. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1425, 2008.

CAVIEDES-VIDAL, E.; MCWHORTER, T. J.; LAVIN, S. R.; CHEDIACK, J. G.; TRACY, C. R.; KARASOV, W. H. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 48, p. 19132-7, Nov 27 2007.

CHO, H.; THORVALDSEN, J. L.; CHU, Q.; FENG, F.; BIRNBAUM, M. J. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. **J Biol Chem**, v. 276, n. 42, p. 38349-52, Oct 19 2001.

CRAIK, J. D.; MARKOVICH, D. Rapid GLUT-1 mediated glucose transport in erythrocytes from the grey-headed fruit bat (*Pteropus poliocephalus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 126, n. 1, p. 45-55, May 2000.

CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem**, v. 274, n. 4, p. 1865-8, Jan 22 1999.

DEENEY, J. T.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Metabolic control of beta-cell function. **Semin Cell Dev Biol**, v. 11, n. 4, p. 267-75, Aug 2000.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 262-7, Apr 1998.

FELIG, P. **Starvation**. New York: Grune and Stratton: 1979.

FREITAS, M. B.; WELKER, A. F.; MILLAN, S. F.; PINHEIRO, E. C. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. **J Comp Physiol B**, v. 173, n. 8, p. 703-7, Nov 2003.

FUJIWARA, Y.; HIROYAMA, M.; SANBE, A.; AOYAGI, T.; BIRUMACHI, J.; YAMAUCHI, J.; TSUJIMOTO, G.; TANOUE, A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 1, p. 235-44, Oct 1 2007.

GAZOLA, V. A.; GARCIA, R. F.; HARTMANN, E. M.; BARRENA, H. C.; ALBUQUERQUE, G. G.; SOUZA, H. M.; BAZOTTE, R. B. Glycemia recovery with oral amino acid administration during experimental short-term insulin-induced hypoglycemia. **J Diabetes Complications**, v. 21, n. 5, p. 320-5, Sep-Oct 2007.

GRACIOLLI G.; PASSOS F. Observação da dieta de *Artibeus lituratus* em duas áreas do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 21 v. 3, 2004.

HILL, M. M.; CLARK, S. F.; TUCKER, D. F.; BIRNBAUM, M. J.; JAMES, D. E.; MACAULAY, S. L. A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 7771-81, Nov 1999.

HOLNESS, M. J.; LANGDOWN, M. L.; SUGDEN, M. C. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. **Biochem J**, v. 349 Pt 3, p. 657-65, Aug 1 2000.

HULT, M.; ORTSATER, H.; SCHUSTER, G.; GRAEDLER, F.; BECKERS, J.; ADAMSKI, J.; PLONER, A.; JORNVALL, H.; BERGSTEN, P.; OPPERMAN, U. Short-term glucocorticoid treatment increases insulin secretion in islets derived from lean mice through multiple pathways and mechanisms. **Mol Cell Endocrinol**, v. 301, n. 1-2, p. 109-16, Mar 25 2009.

KAHN, C. R. The molecular mechanism of insulin action. **Annu Rev Med**, v. 36, p. 429-51, 1985.

KARAM, J. H.; GRODSKY, G. M.; CHING, K. N.; SCHMID, F.; BURRILL, K.; FORSHAM, P. H. "Staircase" glucose stimulation of insulin secretion in obesity. Measure of beta-cell sensitivity and capacity. **Diabetes**, v. 23, n. 9, p. 763-70, Sep 1974.

KARASOV, W. H.; DIAMOND, J. M. Interplay between physiology and ecology in digestion. **Bioscience**, v. 36, p. 602-611, 1988.

KARASOV, W. H.; HUME, I. D. **Vertebrate gastrointestinal system. Handbook of Comparative Physiology** W. Dantzler, 1997. 409-480

KEEGAN, D. J. Aspects of the assimilation of sugar by *Rousettus aegyptiacus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 58a, p. 349-352, 1977.

KETTELHUT, I. C.; FOSS, M. C.; MIGLIORINI, R. H. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. **Am J Physiol**, v. 239, n. 5, p. R437-44, Nov 1980.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 972-9, Mar 2001.

KLOVER, P. J.; MOONEY, R. A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 5, p. 753-8, May 2004.

LIETZKE, S. E.; BOSE, S.; CRONIN, T.; KLARLUND, J.; CHAWLA, A.; CZECH, M. P.; LAMBRIGHT, D. G. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Mol Cell**, v. 6, n. 2, p. 385-94, Aug 2000.

MICHELMORE, A. J.; KEEGAN, D. J.; KRAMER, B. Immunocytochemical identification of endocrine cells in the pancreas of the fruit bat, *Rousettus aegyptiacus*. **Gen Comp Endocrinol**, v. 110, n. 3, p. 319-25, Jun 1998.

MOON, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 129, n. 2-3, p. 243-9, Jun 2001.

MORRISON, W. Foraging Ecology and Energetics of the Frugivorous Bat *Artibeus*. **Ecological Society of America**, v. 59, n. 4, p. 716-723, 1978.

NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 379-406, 1999.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PINHEIRO, E. C. **Metabolismo Intermediário de morcegos frugívoros** 1995. (Tese de Doutorado). Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

PINHEIRO, E. C.; TADDEI, V. A.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Effect of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 143, n. 3, p. 279-84, Mar 2006.

RAFACHO, A.; CESTARI, T. M.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E681-9, Apr 2009.

RAFACHO, A.; ROMA, L. P.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 5, p. 536-45, May 2007.

REIS N.R.; PERACCHI A. L.; PEDRO W. A.; LIMA I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina. 2007.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; FREDERICO, M. J.; DE PINHO, R. A.; VELLOSO, L. A.; DE SOUZA, C. T. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 9, p. 2069-76, May 1 2009.

RUTTER, G. A. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. **Mol Aspects Med**, v. 22, n. 6, p. 247-84, Dec 2001.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 13 2001.

SCHENCK, A.; GOTO-SILVA, L.; COLLINET, C.; RHINN, M.; GINER, A.; HABERMANN, B.; BRAND, M.; ZERIAL, M. The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 486-97, May 2 2008.

SIMMONS N. B .Order chiroptera. In Wilson De Reeder. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3 ed. v1. Baltimore. Johns hopkins university press, 2005.

SPARGO, E.; PRATT, O. E.; DANIEL, P. M. Metabolic functions of skeletal muscles of man, mammals, birds and fishes: a review. **J R Soc Med**, v. 72, n. 12, p. 921-5, Dec 1979.

TIRONE, T. A.; BRUNICARDI, F. C. Overview of glucose regulation. **World J Surg**, v. 25, n. 4, p. 461-7, Apr 2001.

TRACY, C. R.; MCWHORTER, T. J.; KORINE, C.; WOJCIECHOWSKI, M. S.; PINSHOW, B.; KARASOV, W. H. Absorption of sugars in the Egyptian fruit bat

(*Rousettus aegyptiacus*): a paradox explained. **J Exp Biol**, v. 210, n. Pt 10, p. 1726-34, May 2007.

ULLRICH, S.; BERCHTOLD, S.; RANTA, F.; SEEBOHM, G.; HENKE, G.; LUPESCU, A.; MACK, A. F.; CHAO, C. M.; SU, J.; NITSCHKE, R.; ALEXANDER, D.; FRIEDRICH, B.; WULFF, P.; KUHL, D.; LANG, F. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 1090-9, Apr 2005.

VAN DER WESTHUIZEN, J. The feeding pattern of the fruit bat *Rousettus aegyptiacus*. **S. Afr. J. Med. Sci.**, v. 41, p. 271-278, 1976.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J**, v. 346 Pt 3, p. 561-76, Mar 15 2000.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. GLUT4 translocation: the last 200 nanometers. **Cell Signal**, v. 19, n. 11, p. 2209-17, Nov 2007.

WHITE, M. F.; HARING, H. U.; KASUGA, M.; KAHN, C. R. Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. **J Biol Chem**, v. 259, n. 1, p. 255-64, Jan 10 1984.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 10, p. 444-51, Dec 2002.

YASSINE, H. N.; MARCHETTI, C. M.; KRISHNAN, R. K.; VROBEL, T. R.; GONZALEZ, F.; KIRWAN, J. P. Effects of exercise and caloric restriction on insulin resistance and cardiometabolic risk factors in older obese adults--a randomized clinical trial. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 64, n. 1, p. 90-5, Jan 2009.

YEO, R.; SAWDON, M. Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anesth. Intens. Care. Med**, v. 8, n. 7, p. 295-298, 2007.

ZDYCHOVA, J.; KOMERS, R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. **Physiol Res**, v. 54, n. 1, p. 1-16, 2005.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 14, p. 574-589, 2004.



andre protzek <andreprotzek@gmail.com>

JEXBIO/2010/042507 Acknowledgemnt of Manuscript Submission

1 mensagem

jeb@biologists.com <jeb@biologists.com>

15 de janeiro de 2010 19:26

Para: André Protzek <andreprotzek@gmail.com>

MS ID#: JEXBIO/2010/042507

MS TITLE: Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of fruit bat <i>Artibeus lituratus</i>

AUTHORS: André Protzek, Alex Rafacho, Bruno Viscelli, José Bosqueiro, Ana Cappelli, Flávia Paula, Antônio Boschero, and Eliana Pinheiro

Dear Dr. Protzek

This is an automatic message acknowledging your online submission to The Journal of Experimental Biology.

Thank you for your submission. We will be in touch again shortly.

Best wishes,

Editorial Staff

The Journal of Experimental Biology
The Company of Biologists Ltd
Bidder Building
140 Cowley Road
Cambridge, CB4 0DL
Phone:44 (0)1223 425525
Fax:44 (0)1223 423520
jeb@biologists.com

Registered office: The Company of Biologists Ltd, Bidder Building, 140 Cowley Road, Cambridge, CB4 0DL, UK. Registered in England and Wales. Company Limited by Guarantee No. 514735. Registered Charity No. 277992

The information contained in this message and any attachment is confidential, legally privileged and is intended for the addressee only. Any dissemination, distribution, copying, disclosure or use of this message/attachment or its contents is strictly prohibited and may be unlawful. No contract is intended or implied unless confirmed by hard copy.

If you have received this message in error, please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage mechanism.

The Company of Biologists Limited cannot accept liability for any statements made which are clearly the senders' own and not expressly made on behalf of the Company of Biologists Limited or one of their agents.

Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of fruit bat *Artibeus lituratus*

Running title: Endocrine pancreas in *A. lituratus*

Protzek AOP¹, Rafacho, A^{2,3}, Viscelli BA², Bosqueiro JR², Cappelli AP³, de Paula FMM³, Boschero AC³, Pinheiro EC¹

¹Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

²Department of Physical Education, School of Sciences, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Bauru, SP, Brazil

³Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology, UNICAMP - State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Abstract

The fruit bat *Artibeus lituratus* absorbs large amounts of glucose in short periods of time and maintains normoglycemia even after a prolonged starvation period. Based on these data, we aimed to investigate various aspects related with glucose homeostasis analyzing: blood glucose and insulin levels, intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (*ip*GTT and *ip*ITT), glucose-stimulated insulin secretion (2.8, 5.6 or 8.3 mM glucose) in pancreas fragments, cellular distribution of β cells, and the amount of pAkt/Akt in the pectoral muscle and liver. Blood glucose levels were higher in fed bats than fasted bats, whereas insulin levels were similar in both conditions. The values of the area-under-curve obtained from *ip*GTT were significantly higher when bats received 2 or 3 g/ kg *b.w* compared with control (saline). These bats also exhibited a significant decrease of blood glucose values after insulin administration during the *ip*ITT. Insulin secretion from fragments of pancreas under physiological concentrations of glucose (5.6 or 8.3 mM) was similar but higher than in 2.8 mM glucose. These bats showed a marked islet distribution along the pancreas, and the pancreatic β cells are not exclusively located at the central part of the islet. The insulin-induced Akt phosphorylation was more pronounced in the pectoral muscle, compared to liver. The high sensitivity to glucose and insulin, the proper insulin response to glucose, and the large β -cell population could represent benefits for the management of high influx of glucose from a carbohydrate-rich meal, which permits appropriate glucose utilization.

Keywords: *Artibeus lituratus*; Fruit bat; Insulin action; Insulin and glucose sensitivity; Islets and β -cell distribution

Introduction

Fruit-eating bats are known to digest carbohydrate-rich meals rapidly (Keegan, 1977) and efficiently (Craik and Markovich, 2000). These properties are probably associated with adaptations of structures in their gastrointestinal tract (Keegan, 1977; Van Der Westhuizen, 1976).

Similar to most vertebrates, the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* possesses intestinal sugar transporters such as the Na⁺-coupled glucose transporter (SGLT1) in the apical membrane and GLUT2 in the basolateral membrane (Karasov and Hume, 1997). *Rousettus aegyptiacus*, another fruit-eating bat, also shows high paracellular absorption of an analog of D-glucose, the 3-O-Methyl-D-glucose in its intestine that contributes at least 55% of total glucose uptake (Tracy et al., 2007). A similar mechanism was found in *A. lituratus* that accounts for approximately 70% of total glucose transport, suggesting that high paracellular absorption of carbohydrates may be a general pattern among frugivorous bats (Caviedes-Vidal et al., 2008; Caviedes-Vidal et al., 2007). This mechanism must have an important role considering that these bats have shorter intestinal tracts than similarly sized non-flying mammals (Keegan and Modinger, 1979).

Besides the high intestinal absorptive capacity, some authors pointed to a specialization of the endocrine pancreas of *R. aegyptiacus* as an additive mechanism to deal with high glucose uptake (Keegan and Van Der Westhuizen, 1976). Although the percentage of insulin (β), glucagon (α) and somatostatin (δ) cells was similar to others species, it is interesting that in *R. aegyptiacus* the endocrine pancreas represents 9.1% of the total pancreas volume, far more than some other mammals (Michelmore et al., 1998). Thus, it is conceivable to presume that the high absorptive capacity of carbohydrates, associated to a high percentage of endocrine pancreas, are among the main morpho-physiological adaptations to control glucose disposal in fruit-eating bats.

The aim of the present study was to investigate morpho-physiological aspects related to the control of glucose homeostasis in the *A. lituratus*. We observed that these bats have high glucose and insulin sensitivity, exhibit an adequate insulin secretion to post-prandial glucose concentrations, a high number of islets, and higher insulin-induced Akt phosphorylation in pectoral muscle than in liver. These physiological aspects account for an appropriate glucose utilization in a carbohydrate-rich meal fed bat.

Materials e Methods

Materials

Human recombinant insulin (Biohulin® N) was acquired from Biobrás (Montes Claros, MG, Brazil). The reagents used in the insulin secretion protocol and RIA were from Mallinckrodt Baker, Inc. (Paris, Kentucky, France) and from Sigma (St. Louis, MO, USA). The ¹²⁵I-labeled insulin (human recombinant) for radioimmunoassay (RIA) was purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). SDS-PAGE and immunoblotting were performed using Bio-Rad systems (Hercules, CA, USA) and all chemicals used were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) and from Sigma (St. Louis, MO, USA). Anti insulin (rabbit polyclonal), anti serine-threonine kinase (AKT) (rabbit polyclonal), and anti phosphorylated AKT (Ser473) (pAKT) (rabbit polyclonal) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Animals and study area

Adult *A. lituratus* (40 male e 31 female), weighing 50-90 g, were captured in urban areas of Brasilia, DF, Brazil (15°46'47" S, 47°55'47" W). Bats were housed in cages in groups of two, and maintained in the dark at room temperature. All bats were fed by fruits (papaya, apple and banana) during five nights following the capture. Water was available ad libitum and fruits were offered at 19:00 h and removed at 07:00 h the next morning. In the experiments with 12 or 24h-fasted bats, the animals were only given water. Measurements started at 08:00 h. When it was necessary, euthanasia was done by cervical dislocation followed by guillotining. The free flowing blood was collected in saline-washed tubes, centrifugated (10 min at 1500 rpm – 5810R Eppendorf) and serum was frozen at -20°C for posterior determination of insulinemia. In addition, tissue samples were rapidly removed and kept on ice for posterior analyses.

Intraperitoneal glucose (ipGTT) and insulin tolerance test (ipITT)

The ipGTT 12h-fasted bats (F12) had blood samples collected from wing vein at the following times: zero (T0) before i.p. glucose administration (2g/ Kg or 3g/ Kg b.w., 0.5 mL) and after 30, 60, 90 and 120 min (T30, T60, T90 and T120) of glucose load. The ipITT

fed bats had blood samples collected at the following times: zero (T0) before i.p. regular human recombinant insulin administration (0.56 units/ Kg b.w., 0.5 mL) and after 15, 30, 45 and 60 min (T15, T30, T45 and T60) of insulin load. The control group received i.p. saline administration (0.9%, 0.5 mL) and was submitted to the same procedures as *ipGTT* and *ipITT*. In all groups blood glucose were determined with Accu Chek Active, Roche (error < 1%).

Serum insulin levels

Serum insulin levels were determined in fed and 24h-fasted bats by RIA, using a Guinea-Pig anti-rat insulin antibody and rat insulin as standard (Scott *et al.*, 1981).

Cumulative static insulin secretion and pancreas insulin content

Cumulative static insulin secretion was done according to a previous publication (Rafacho *et al.*, 2008a) with modifications. Briefly, small pancreas fragments (~2-3 mm \varnothing) were first incubated for 1 hour at 37°C in 1 mL Krebs-bicarbonate buffer solution of the following composition (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl, 1 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 15 *N*-2-*hidroxyethylpiperazine-N*-2-ethanesulfonic acid and 5.6 glucose, supplemented with 0.5% of bovine serum albumin and equilibrated with a mixture of 95% O₂: 5% carbon dioxide, pH 7.4. The medium was then replaced with 1 mL fresh buffer containing the solutions, 2.8, 5.6 or 8.3 mM glucose, and further incubated for 1 hour. At the end of the incubation, the samples were stored at -20°C for subsequent measurement of insulin content by RIA. During pre and incubation periods the medium also contained a mixture of anti-proteases (Traizylol, 2%) to avoid insulin degradation by the exocrine enzymes. The insulin content in the pancreas fragment of each well was also measured. For this purpose, the fragments were transferred to an eppendorf, washed in Krebs-bicarbonate buffer solution with 2.8 mM glucose, and the medium replaced with extraction solution (12 mM HCl in 70% ethanol). Then, the fragments were sonicated for 15 seconds, maintained overnight at 4°C, centrifuged for 10 minutes at 3000 \times g, and the supernatant was frozen at -20°C for posterior analysis of insulin content by RIA.

Protein extraction and immunoblotting for pAkt and Akt

Protein extraction and immunoblotting were carried out as previously reported (Rafacho et al., 2009; Rafacho et al., 2008b) with modifications. Briefly, fed bats were killed after 5 or 15 min of insulin (0.56 units/ Kg b.w., 0.5 mL) or saline (0.9% , 0.5 mL) administration. Fragments of pectoral muscle or liver were obtained from the same anatomical area of each bat and first homogenized in ice-cold cell lysis buffer (Cell Signaling) using a Polytron PT 1200C homogenizer (Brinkmann Instruments, NY, USA) (2 pulses of 15 s at the maximal speed) and subsequently sonicated in a cell homogenizer (Fisher Scientific, Suwanee, GA, USA) for 2 pulses of 15 s in the intermediate speed. Protein concentration from total cell lysate was measured by the Bradford method, according to the manufacturer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For each experiment, 150 µg of protein obtained from muscle and hepatic tissue was used. Immunoblotting experiments were performed at least three times using different samples (each sample consisting of tissue obtained from one bat). After 2 h of blocking at room temperature (RT), membranes containing tissues lysates were washed in Tris buffer salt Tween (TBST) and incubated overnight with the appropriate primary antibodies. After washing in TBST, membranes were incubated with the appropriate secondary antibody. Antibody binding was detected by enhanced SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA), as described by the manufacturer.

Immunostaining for β cells

Three pancreases obtained from male adult bats *A. Lituratus*, were fixed in Bouin's fixative for 3 hours, dehydrated, and embedded in paraffin wax. The tissue was sectioned at 5 µm along the longitudinal axis of each pancreas. Cellular distribution of insulin was analysed using a standard indirect immunoperoxidase method according to previous description (Rafacho et al., 2008b).

Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SEM of the indicated number (n) of experiments. Analysis of variance (ANOVA two-way) was carried out for *ip*GTT and *ip*ITT with the use of Bonferroni post-hoc procedure for multiple comparisons. Immunoblotting and static insulin secretion was analyzed by ANOVA one-way with the

use of Bonferroni post-hoc procedure for multiple comparisons. Serum insulin levels were analyzed by unpaired Student's *t* Test. The significant level adopted was $P < 0.05$.

Results

Serum insulin and peripheral sensitivity to glucose and insulin

Blood glucose values were 72 ± 15 mg/dL at the 24-h-fasted state and 124 ± 9 mg/dL at fed state. Serum insulin levels in 24h-fasted and fed bats were similar. The values were 1.26 ± 0.07 and 1.64 ± 0.5 ng/mL for fasted and fed bats, respectively. To analyze the glucose tolerance, two doses of glucose [2g (GLU2) or 3g/ kg *b.w.* (GLU3)] were administered intraperitoneally, using saline solution as control (SAL). The glycemic values at T0 were similar among SAL, GLU2 and GLU3 groups. Although a modest increment of blood glucose was noticed at T30 in GLU2 vs. SAL, no statistical difference was found at this or the other times (T60 and T90) between these groups (Fig. 1A). However, GLU3 bats showed increased blood glucose levels in T30 (118.1 mg /dL ± 11.8) and T60 (104.3 mg /dL ± 12.9) returning to basal levels at T90 (77.6 mg /dL ± 7.9), when compared to SAL bats at the same intervals ($P < 0.05$; Fig. 1A). The are-under-the-glucose-curve (AUC) revealed higher AUC values in GLU2 and GLU3 compared to SAL bats (Fig. 1B). We next accessed the peripheral insulin sensitivity through an *ip*ITT. At T0, blood glucose was similar in both saline- (SAL) and insulin-receiving bats (INS). However, a marked reduction in blood glucose levels were observed at T15, (42.0 mg /dL ± 3.3), T30 (42.3 mg /dL ± 4.3), T45 (38.0 mg /dL ± 2.9), and T60 (46.1 mg /dL ± 4.1) compared to T0 (72.5 mg /dL ± 4.0) and also to SAL at the same intervals ($P < 0.05$; Fig. 1C). The data obtained in the *ip*GTT and *ip*ITT demonstrated a good sensitivity to glucose and insulin by these bats.

Insulin secretion in pancreas fragments

To test whether this good response to glucose at periphery is associated with an appropriate insulin release, we investigated the insulin secretion in pancreas fragments, submitted to different glucose concentrations. At low glucose (2.8 mM), the insulin secretion represented 16% of the total insulin content in the fragments. When fragments were

exposed to 5.6 mM glucose, an increment of 1.8 times in insulin secretion, compared to 2.8 mM glucose, was observed ($P < 0.05$, Fig. 2A and *insert*). At 8.3 mM glucose the insulin secretion was also significantly higher than 2.8 mM glucose, but this increment in insulin secretion was similar to that observed at 5.6 mM (Fig. 2A and *insert*).

*Distribution of β cells in the pancreas of *Artibeus lituratus**

To the best of our knowledge, there is no previous description of the β cells distribution in *A. lituratus* pancreas. Thus, we performed an immunostaining for insulin in pancreas sections to observe the distribution of pancreatic β cells in this specie. Figure 3A shows a panoramic view of a histological section of pancreas from *A. lituratus* immunostained for insulin. The exocrine tissue is well distributed along the pancreas and, noteworthy is the marked islet density (islet number) that were observed in the whole pancreas (Figs. 3A,B). Figure 3C shows the general shape of pancreatic islets. In general, the big islets exhibited different shapes (round, oval and other irregular shapes) and the pancreatic β cells did not preferentially localize at the center of the islets (Fig. 3C, arrows). Rather, it is common to observe the presence of β cells at the periphery of the islets (Figs. 3D-G). Finally, small islets or group of β cells were commonly observed along the pancreas section (Fig. 3C – arrowheads).

Total and phosphorylated levels of Akt in pectoral muscle and liver

The serine-threonine kinase Akt plays an important role in insulin-responsive cells and is one of the central kinases of the insulin pathway. Good glucose tolerance with modest glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was observed. We next analyzed the responsiveness of this kinase to insulin stimulation *in vivo*, in both pectoral muscle as well as hepatic tissue. The phosphorylated Akt levels increased significantly after 5 (1.62-fold) and 15 (1.81-fold) min of *ip.* insulin (0.56 units/ Kg) administration in pectoral muscle, compared to the T0 (Fig. 4A). As expected, no changes were observed in total Akt content among the 3 periods. For the liver, there was an increase of insulin-induced Akt phosphorylation only significant after 15 min of insulin stimulation (Fig. 4B). No significant change in the total Akt content among the 3 periods was observed in the liver (Fig. 4B).

Discussion

It was previously demonstrated that the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is able to maintain normoglycemia even after 6 days of starvation, possibly because of its high hepatic glycogen stores and increased gluconeogenesis (Pinheiro et al., 2006). Frugivorous bats also absorb high amounts of carbohydrates from their diet in a fast and efficient manner, which points to the adaptations of their absorptive apparatus and also of the endocrine pancreas. These statements are supported by the presence of a high paracellular glucose absorption in the intestinal tract of *Rousettus aegyptiacus* and *A. lituratus* as well as a high number of pancreatic islets in *R. aegyptiacus* (Caviedes-Vidal et al., 2008; Caviedes-Vidal et al., 2007; Tracy et al., 2007).

Results from *ip*GTT demonstrated that only the administration of 3g/ Kg of glucose elicited a significant increase in blood glucose levels in fasted bats, after 30 min. These results suggest an efficient uptake of glucose by insulin-responsive tissues and could reflect a well coupled circulating insulin level and its action. The rapid restoration of blood glucose levels strengthens the high glucose tolerance in *A. lituratus*, emphasizing its ability to maintain the glycemic control even after a carbohydrate-rich meal, which is in line with the higher hepatic glycogen stores found in this specie (Pinheiro et al., 2006).

The hypothesis that this bat has a high insulin sensitivity was supported by the results obtained during the *ip*ITT, where the administration of a reduced amount of insulin (0.56 units/ Kg), compared with that used in mice and rats (Fujiwara et al., 2007), provoked a sharp decrease in blood glucose levels. This response was unique and observed in only a few cases, such as in the insulin hypersensitive mice lacking the V1b vasopressin receptor (Fujiwara et al., 2007).

Despite the difficulties to make adequate comparisons of our results on insulinemia with other species, mice (Fujiwara et al., 2007) and older obese humans (Yassine et al., 2009) exhibit lower fasting serum insulin levels than our animal model. More important is the fact that we did not observe a significant difference in serum insulin levels between fasted and fed states. This unexpected observation could mean that the considerable amount of circulating insulin during fasting state is quite enough to deal with the glucose absorbed after a regular meal, or that a regular meal did not induce an increase in blood glucose enough to stimulate a sufficient amount of insulin secretion able to

increase the circulating insulin levels. We cannot rule out the possibility that an increase in insulin secretion occurs immediately after meal ingestion. However, the inability to detect this increase may be due to the delay between ingestion and blood collection, place of collection and, a higher inactivation of insulin during its first passage through the liver. In addition, the ipGTT results with 3g/ Kg (Fig. 1B) indicate that only high amounts of glucose are necessary to provoke a significant increase in glycemia after 30 min.

In the next series of experiments, we analyzed the ability of glucose to stimulate insulin secretion in fragments of pancreas of the *A. lituratus*. We observed that at basal glucose concentrations (2.8 mM), the amount of insulin released to the incubation medium was close to 16% of the total insulin content in the pancreas fragments. These values are significantly higher than those found in humans (Karam et al., 1974), rats (Rafacho et al., 2009), and mice islets (Ullrich et al., 2005), in the same experimental conditions, around 1-2% of the total insulin islet content.

There is no previous description of the β -cells distribution in *A. lituratus* pancreas. We found a great number of irregular shaped islets, similar to another fruit-eating bat *R. aegyptiacus* (Michelmore et al., 1998). The pattern of islet cell distribution in the *A. lituratus* differs from that found in other mammals. In our animal model, the β cells seem to be located, preferentially, at the periphery of the islets, a pattern not observed in the other fruit-bat, the *R. aegyptiacus* (Michelmore et al., 1998), rodents (Bani Sacchi and Bani, 1985; Cabrera et al., 2006), humans and primates, and pig (Cabrera et al., 2006), where the β cells are located throughout the islets, especially at the core. The variety of islet cells topography among interspecies might reflect evolutionary adaptations to different dietary habits or other environmental constraints (Cabrera et al., 2006).

Immunoblotting experiments indicate that the insulin signaling in the skeletal muscle is more effective than in hepatic tissue (Fig. 4A, B), as judged by the higher Akt phosphorylation after insulin administration. The serine/threonine kinase Akt is a key protein of the insulin pathway with important implications in glucose homeostasis, cell growth, differentiation, and survival (Cho et al., 2001; Downward, 1998; Schenck et al., 2008). Phosphorylated Akt participates in GLUT4 translocation to plasma membrane (Watson and Pessin, 2007), increasing the glucose influx in muscle and adipose tissues (Kido et al., 2001; Saltiel and Kahn, 2001). These findings suggest that *A. lituratus* pectoral

muscles not only respond to insulin, but its signaling pathway is similar to that observed in many vertebrates, such as humans (Holness et al., 2000), rats (Rafacho et al., 2007), mice (Hult et al., 2009) and fish (Moon, 2001). Concerning the Akt response in the liver, we also observed an increase in its phosphorylation after insulin administration. This observation is in agreement with the increased capacity of insulin to phosphorylate Akt in livers of other animal species (Ropelle et al., 2009) and also with the ability of the bat liver in glycogen storage (Pinheiro et al., 2006).

In conclusion, and from an evolutionary point of view, the high sensitivity to glucose and insulin and the large β -cell population observed in fruit-eating bats represents adequate adaptations that guarantee the proper control of glucose homeostasis in this species, constantly submitted to high influx of glucose due to its carbohydrate-rich diet.

References

- Bani Sacchi, T. and Bani, D.** (1985). New views on the identification of the various cell types in the pancreatic islets of the rat. An ultrastructural and morphometrical study. *Acta Anat (Basel)* **122**, 1-17.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O. and Caicedo, A.** (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2334-9.
- Caviedes-Vidal, E., Karasov, W. H., Chediack, J. G., Fasulo, V., Cruz-Neto, A. P. and Otani, L.** (2008). Paracellular absorption: a bat breaks the mammal paradigm. *PLoS One* **3**, e1425.
- Caviedes-Vidal, E., McWhorter, T. J., Lavin, S. R., Chediack, J. G., Tracy, C. R. and Karasov, W. H.** (2007). The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19132-7.
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F. and Birnbaum, M. J.** (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**, 38349-52.

Craik, J. D. and Markovich, D. (2000). Rapid GLUT-1 mediated glucose transport in erythrocytes from the grey-headed fruit bat (*Pteropus poliocephalus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **126**, 45-55.

Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 262-7.

Fujiwara, Y., Hiroyama, M., Sanbe, A., Aoyagi, T., Birumachi, J., Yamauchi, J., Tsujimoto, G. and Tanoue, A. (2007). Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *J Physiol* **584**, 235-44.

Holness, M. J., Langdown, M. L. and Sugden, M. C. (2000). Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochem J* **349 Pt 3**, 657-65.

Hult, M., Ortsater, H., Schuster, G., Graedler, F., Beckers, J., Adamski, J., Ploner, A., Jornvall, H., Bergsten, P. and Oppermann, U. (2009). Short-term glucocorticoid treatment increases insulin secretion in islets derived from lean mice through multiple pathways and mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* **301**, 109-16.

Karam, J. H., Grodsky, G. M., Ching, K. N., Schmid, F., Burrill, K. and Forsham, P. H. (1974). "Staircase" glucose stimulation of insulin secretion in obesity. Measure of beta-cell sensitivity and capacity. *Diabetes* **23**, 763-70.

Karasov, W. H. and Hume, I. D. (1997). Vertebrate gastrointestinal system. In *Handbook of Comparative Physiology* (ed. W. Dantzler), pp. 409-480. Bethesda, MD: American Physiology Society.

Keegan, D. J. (1977). Aspects of the assimilation of sugar by *Rousettus aegyptiacus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **58a**, 349-352.

Keegan, D. J. and Modinger, R. (1979). Microvilli of the intestinal mucosal cells of *Rousettus aegyptiacus*. *S. Afr. J. Zool* **14**, 223-220.

Keegan, D. J. and Van Der Westhuizen, J. (1976). Pancreas of *Rousettus aegyptiacus*. *S. Afr. J. Med. Sci.* **41**, 62.

Kido, Y., Nakae, J. and Accili, D. (2001). Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 972-9.

Michelmore, A. J., Keegan, D. J. and Kramer, B. (1998). Immunocytochemical identification of endocrine cells in the pancreas of the fruit bat, *Rousettus aegyptiacus*. *Gen Comp Endocrinol* **110**, 319-25.

Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**, 243-9.

Pinheiro, E. C., Taddei, V. A., Migliorini, R. H. and Kettelhut, I. C. (2006). Effect of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **143**, 279-84.

Rafacho, A., Cestari, T. M., Taboga, S. R., Boschero, A. C. and Bosqueiro, J. R. (2009). High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E681-9.

Rafacho, A., Giozzet, V. A., Boschero, A. C. and Bosqueiro, J. R. (2008a). Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas* **36**, 284-93.

Rafacho, A., Ribeiro, D. L., Boschero, A. C., Taboga, S. R. and Bosqueiro, J. R. (2008b). Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. *Int J Exp Pathol* **89**, 264-75.

Rafacho, A., Roma, L. P., Taboga, S. R., Boschero, A. C. and Bosqueiro, J. R. (2007). Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* **85**, 536-45.

Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Cintra, D. E., Frederico, M. J., de Pinho, R. A., Velloso, L. A. and De Souza, C. T. (2009). Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol* **587**, 2069-76.

Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M. and Zerial, M. (2008). The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell* **133**, 486-97.

Scott, A. M., Atwater, I. and Rojas, E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470-5.

Tracy, C. R., McWhorter, T. J., Korine, C., Wojciechowski, M. S., Pinshow, B. and Karasov, W. H. (2007). Absorption of sugars in the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*): a paradox explained. *J Exp Biol* **210**, 1726-34.

Ullrich, S., Berchtold, S., Ranta, F., Seebohm, G., Henke, G., Lupescu, A., Mack, A. F., Chao, C. M., Su, J., Nitschke, R. et al. (2005). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes* **54**, 1090-9.

Van Der Westhuizen, J. (1976). The feeding pattern of the fruit bat *Rousettus aegyptiacus*. *S. Afr. J. Med. Sci.* **41**, 271-278.

Watson, R. T. and Pessin, J. E. (2007). GLUT4 translocation: the last 200 nanometers. *Cell Signal* **19**, 2209-17.

Yassine, H. N., Marchetti, C. M., Krishnan, R. K., Vrobel, T. R., Gonzalez, F. and Kirwan, J. P. (2009). Effects of exercise and caloric restriction on insulin resistance and cardiometabolic risk factors in older obese adults--a randomized clinical trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**, 90-5.

Figure Legends

Figure 1 *Peripheral sensitivity to glucose and insulin.* Glycemic values under intraperitoneal glucose tolerance test (*ip*GTT) in 12h-fasted (F12) *A. lituratus* after 2 (GLU2) or 3g/ Kg *b.w.* (GLU3), or saline (SAL) administration (**A**). Area-under-the-curve (AUC) for *ip*GTT (**B**). Blood glucose values during intraperitoneal insulin tolerance test (*ip*ITT) in fed bats after insulin (0.56 units / Kg, *b.w.*) (INS) or SAL administration (**C**). Values represent the mean \pm SEM. $n = 14$ for SAL and GLU2 in A and B, 15 for GLU3 in A and B and 17 for SAL and INS in C. #significantly different vs. SAL, & vs. GLU2 and *vs. T0. $P < 0.05$.

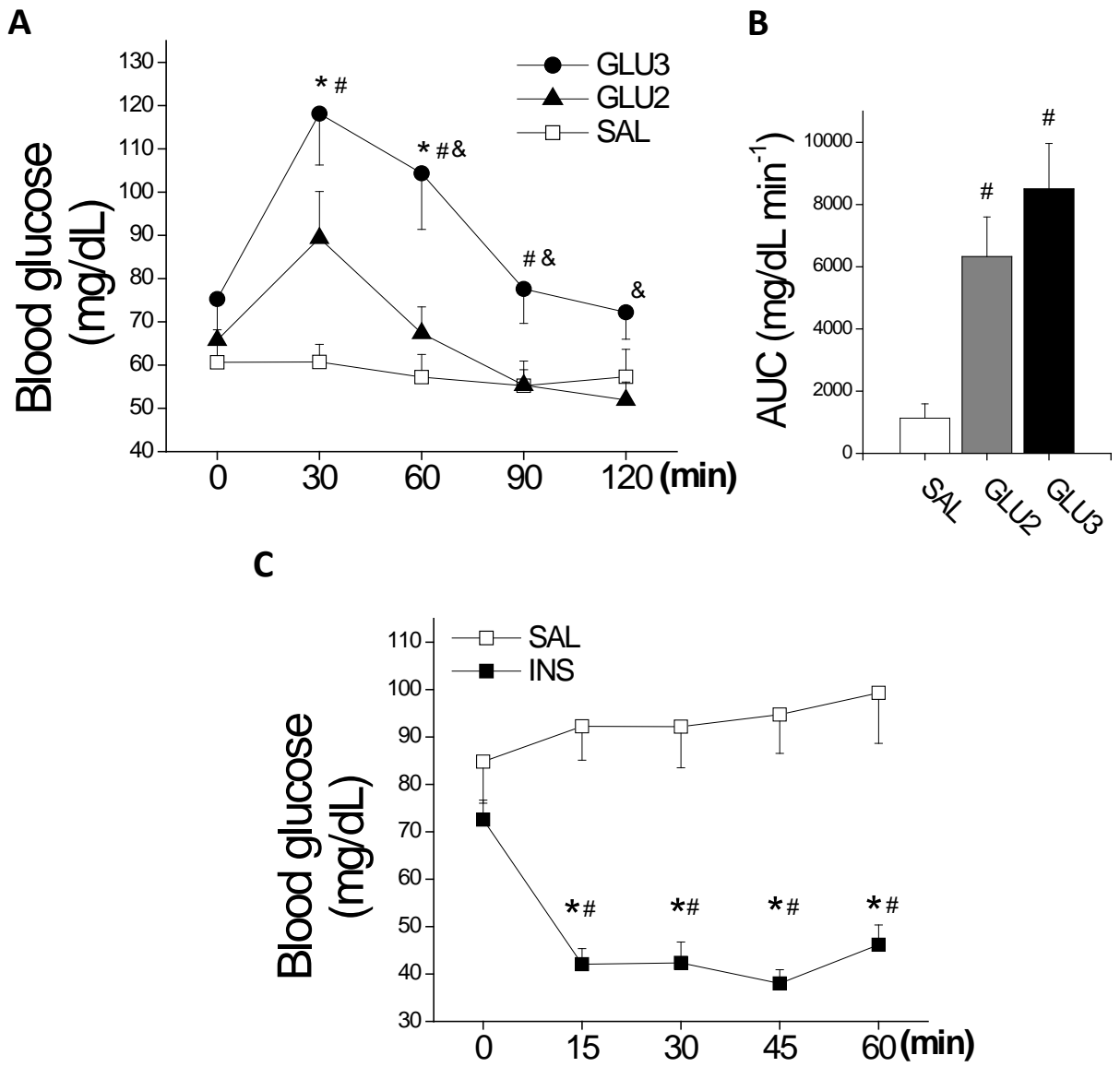
Figure 2 *Insulin secretion in pancreas fragments from A. lituratus.* Insulin response to low glucose (2.8mM), 5.6mM glucose and stimulatory 8.3 mM glucose in pancreas fragments. Increment values from 2.8 to 5.6 or 8.3 mM glucose (*insert*). Values represent the mean \pm SEM. $n = 6$ fragments from two independent experiments. *Significantly different vs. 2.8mM. $P < 0.05$.

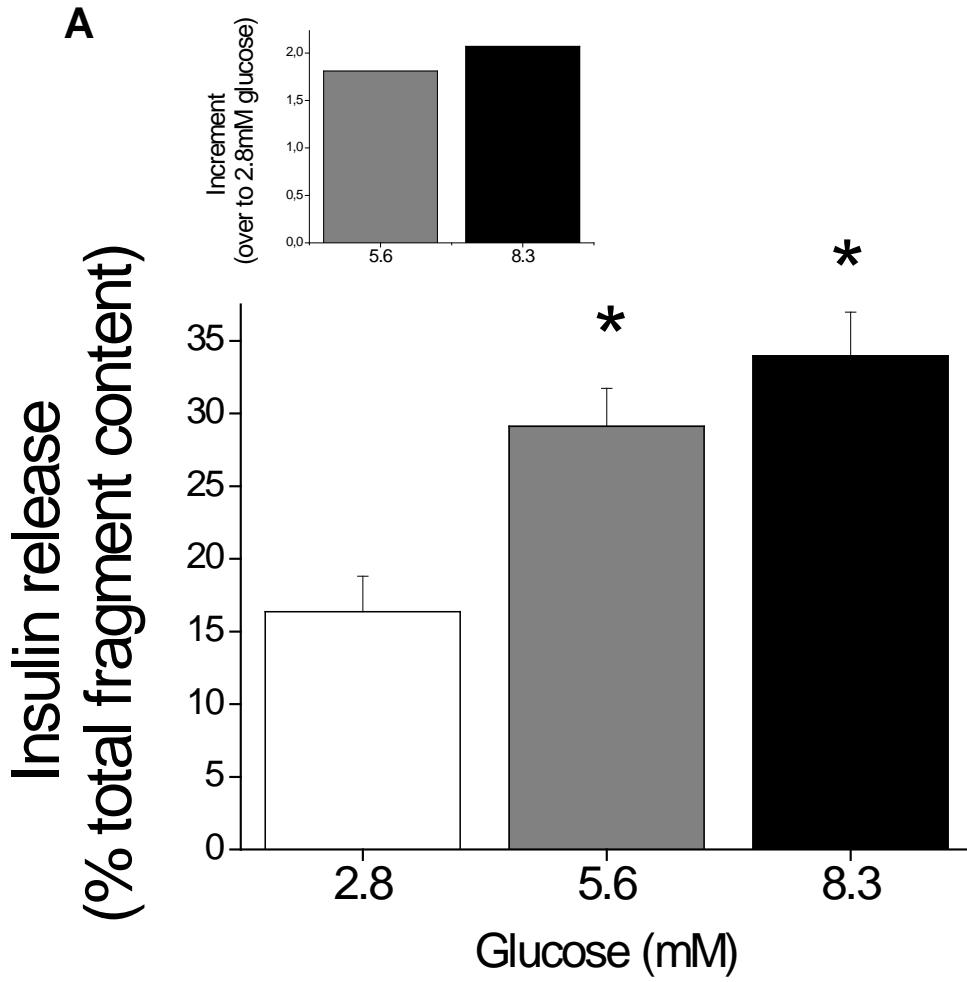
Fig. 3 *Cellular distribution of β cells in pancreas from A. lituratus.* Panoramic view of a histological section immunostained for insulin (**A,B**). Morphological aspect of pancreatic islets (**C**). Note that there are different shapes (round, oval and other irregular shapes) and that the pancreatic β cells localize, preferentially, at the periphery of the islet (**C, arrows**). Small islets or group of β cells were commonly observed along pancreas section (**C – arrowheads**). Observe the peripheral localization of the β cells in islets (**D-G**). Magnification $\times 40$ in A, $\times 100$ in B, $\times 400$ in C and $\times 1000$ in D-G.

Figure 4 *Protein content of total Akt and phosphorylated Akt in muscle and hepatic tissues.* Total and phosphorylated levels of Akt in pectoral muscle (**A**) or hepatic tissue (**B**) from fed *A. lituratus* after 5 (INS5) or 15 min (INS15) insulin administration (0.56 unites /Kg). Values represent the mean \pm SEM of 4 independent bats. *significantly different vs. saline (SAL). $P < 0.05$. (AOU) = optical arbitrary units.

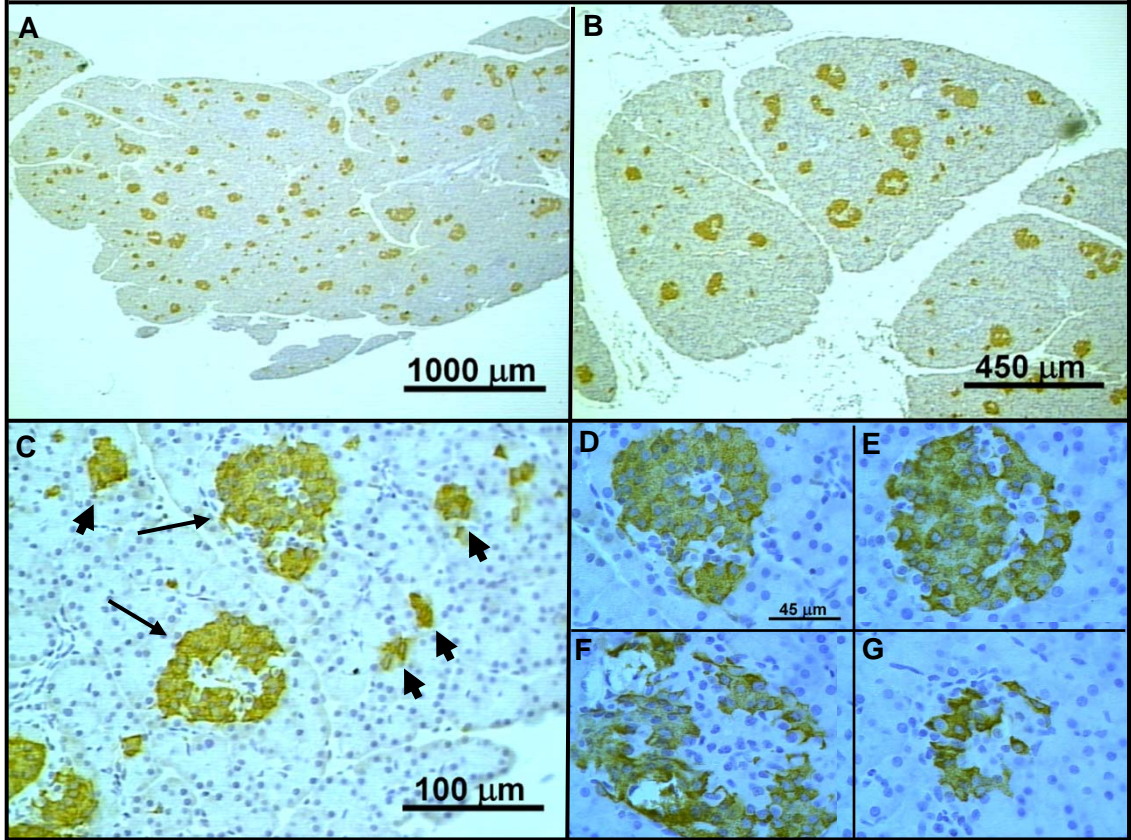
List of symbols and abbreviations:

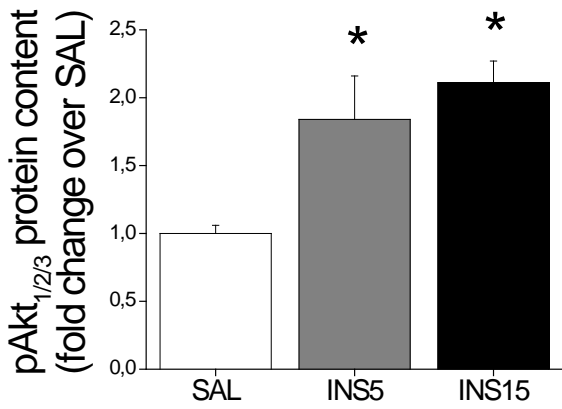
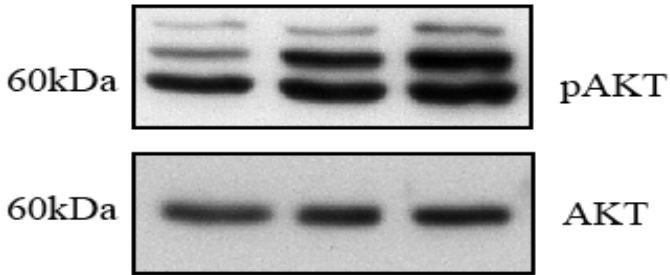
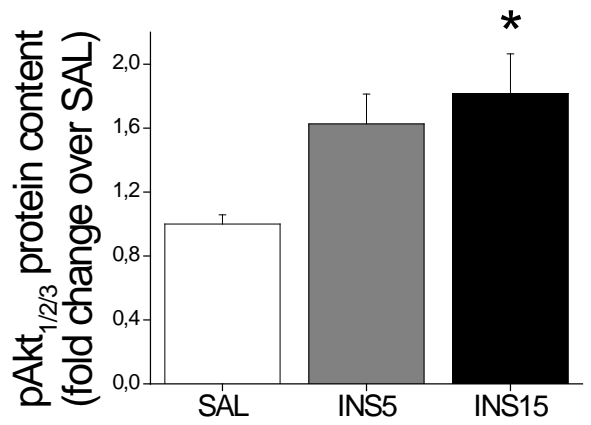
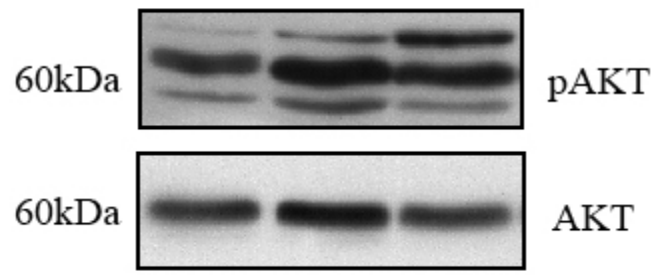
Akt; protein kinase B, ANOVA; analysis of variance, AOU; arbitrary optical arbitrary units, AUC; are under the glucose curve, GSIS; glucose-stimulated insulin secretion, ipGTT; intraperitoneal glucose tolerance test, ipITT; intraperitoneal insulin tolerance tests, SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SGLT1; Na⁺-coupled glucose transporter, TBST; Tris buffer salt Tween

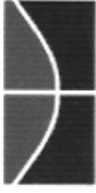




Insulin



A**Pectoral muscle****B****Liver**



Brasília, 25 de março de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE *ÁTIBEUS LITURATUS*”, UNBDOC nº 8151/2008, sob responsabilidade da Profa. Eliana de Cássia Pinheiro, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14867-3	Data da Emissão: 04/03/2009 14:54	Data de Validade: 04/03/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2488143	Nome: André Otavio Peres Protzek	CPF: 009.969.171-01
Título do Projeto: RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE <i>Artibeus lituratus</i>		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Observações, ressalvas e condicionantes

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 passa da, 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	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	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.
6	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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	Só está permitida a coleta de no máximo 10 (dez) indivíduos por localidade (local de captura com distância mínima de 5km), a cada seis meses. Não está permitida a coleta de fêmeas grávidas ou lactantes, assim como de animais marcados (anilhados). Na manutenção em cativeiro, cada gaiola só poderá abrigar um espécime de cada vez e por um período máximo de 10 (dez) dias.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRASILIA	DF	Area urbana do Distrito Federal	Fora de UC
2	BRASILIA	DF	SHCGN 714 bl S	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Artibeus lituratus</i> (*Qtde: 48)
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Artibeus lituratus</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina
---	---	-----------------

Destino do material biológico coletado

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55329319



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14867-3	Data da Emissão: 04/03/2009 14:54	Data de Validade: 04/03/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2488143	Nome: André Otavio Peres Protzek	CPF: 009.969.171-01
Título do Projeto: RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE <i>Artibeus lituratus</i>		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	Todos os indivíduos a serem sacrificados terão todos os tecidos corporais aproveitados integralmente

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55329319



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14867-3	Data da Emissão: 04/03/2009 14:54	Data de Validade: 04/03/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2488143	Nome: André Otavio Peres Protzek	CPF: 009.969.171-01
Título do Projeto: RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE <i>Artibeus lituratus</i>		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, 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).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55329319



Página 3/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14867-1	Data da Emissão: 13/02/2008 15:18	Data de Validade: 12/02/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2488143	Nome: André Otavio Peres Protzek	CPF: 009.969.171-01
Título do Projeto: RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE <i>Artibeus lituratus</i>		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	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.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRASILIA	DF	Área urbana do Distrito Federal	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Artibeus lituratus</i> (*Qtde: 10)
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Artibeus lituratus</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina
---	---	-----------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	Todos os indivíduos a serem sacrificados terão todos os tecidos corporais aproveitados integralmente

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12368871



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14867-1	Data da Emissão: 13/02/2008 15:18	Data de Validade: 12/02/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2488143	Nome: André Otavio Peres Protzek	CPF: 009.969.171-01
Título do Projeto: RESPOSTA AO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E AO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT), SECREÇÃO E AÇÕES METABÓLICAS DA INSULINA E DO CORTISOL EM MORCEGOS FRUGÍVOROS DA ESPÉCIE <i>Artibeus lituratus</i>		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007. , 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 ser comunicada ao Ibama 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, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12368871



Página 2/2