

Joicy Ferreira de Queiroz

Secreção e sensibilidade periférica à insulina e
hormônios contra-regulatórios do morcego
hematófago *Desmodus rotundus*

Brasília

2008



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

Secreção e sensibilidade periférica à insulina e hormônios
contra-regulatórios do morcego hematófago
Desmodus rotundus

Joicy Ferreira de Queiroz

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliana de Cássia Pinheiro

Brasília
2008

QUEIROZ, Joicy Ferreira de.

SECREÇÃO E SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA E HORMÔNIOS CONTRA-REGULATÓRIOS DO MORCEGO HEMATÓFAGO *DESMODUS ROTUNDUS*.

ix + 60p.

1 – *Desmodus rotundus*

2 – Insulina

3 – Glucagon

4 - Cortisol

Agradeço sobretudo a Deus, pela sua presença constante em minha vida.

Também à Prof^a Dr^a Eliana de Cássia Pinheiro, por compartilhar seu conhecimento em uma orientação que servirá para toda a vida, porque, sobretudo ensinou a aprender.

À amiga Carolinne Isabella Dias Gomes pelo companheirismo, pelo seu constante otimismo e pela paciência e apoio, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves pela valiosa contribuição nas análises estatísticas e pelas críticas e sugestões durante a realização deste trabalho.

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, agradeço pela disposição em discutir os resultados e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

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 espeleólogo Edvard Guimarães, e em especial ao Sr. João Bruno da Costa, pelo auxílio técnico indispensável à coleta dos animais.

Ao veterinário Augusto Moscardini, pela disponibilização da Fazenda Água Limpa-FAL, possibilitando a coleta de sangue bovino, e aos alunos e estagiários, pelo apoio técnico.

A todos os funcionários do Matadouro Raça, em especial ao Sr. João, pela permissão para a coleta de sangue bovino destinado à alimentação dos animais.

A todos os proprietários das fazendas, por disponibilizarem suas propriedades para a coleta dos animais.

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

Ao Prof. Dr. Uieda, pelos valiosos esclarecimentos e pela disposição em ajudar nas coletas.

À Prof^a Dr^a Mariella Bontempo Duca de Freitas pelas sugestões essenciais à fase experimental deste estudo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Laboratório Sabin pelas dosagens de insulina e cortisol.

Aos colegas do Laboratório Integrado, Profs. Drs. Alzira Rosa e Silva, Roque Magno e Vanner Boere; também aos amigos Rosângela, Ingrid e em especial, Igor Nicolau, André Protzek e Caio Eduardo, e a todos que contribuíram para a fase experimental deste estudo.

À querida Dani do Dpt de Ciências Fisiológicas, pela simpatia e colaboração.

A todos os colegas do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP, que de alguma forma colaboraram para a realização dos experimentos, em especial à Letícia Roma, Nágela Angelini e Andressa Godoy por terem me acolhido com tanta presteza e pela colaboração nos experimentos, ao Alex Rafacho, pela colaboração nos experimentos e discussão dos resultados, à Eliane Filiputti, pela dosagem do glucagon e à Helena Barbosa, pela colaboração efetiva em todos os experimentos e pela discussão dos resultados e da metodologia.

.

Ao colega da pós-graduação Roberto Andrade Jr., pelo apoio nas coletas e manipulação dos animais.

Aos Profs. Drs. participantes da banca: Prof. Dr. José Eduardo Pandossio, Prof^a Dr^a Elizabeth Maria Talá de Souza e Prof^a Dr^a Luciana Naves pelas valiosas contribuições.

À Universidade de Brasília (UnB) e à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que possibilitaram a execução deste trabalho.

À instituição que financiou esta pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Às amigas Ana Carolina, Karenn e Núbia, pelo apoio e por compreenderem minha ausência ao longo desses anos.

Às irmãs que Deus me permitiu escolher na Terra Ana Paula e Bárbara, pela presença constante, pela paciência e apoio.

Ao querido Marcelo Westphalem, meu companheiro em todos os momentos, pela sua admirável paciência, pelo apoio ao longo desses anos, pelos momentos de lazer que tornaram essa jornada um pouco mais fácil e pela paz transmitida.

A toda a minha família pelas palavras de apoio e incentivo.

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

Muito obrigada!

Índice Geral

Índice de figuras.....	iv
Índice de tabelas.....	v
Lista de abreviações.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract	ix
1.0 Introdução.....	01
1.1 Controle hormonal do metabolismo no estado alimentado.....	01
1.1.1 Estímulos e mecanismo de secreção da insulina.....	02
1.1.2 Mecanismo de ação da insulina.....	03
1.1.3 Papel da Akt na sinalização da insulina.....	04
1.1.4 Papel das Erks na sinalização da insulina.....	06
1.1.5 Outros secretagogos da insulina.....	07
1.2 Controle hormonal do metabolismo no jejum	08
1.2.1 Estímulos e mecanismo de ação do glucagon	08
1.2.2 Estímulos e mecanismo de ação do cortisol.....	08
1.3 Influência da dieta na ativação das diferentes vias metabólicas.....	09
1.4 Justificativa.....	12
2.0 Objetivos Gerais.....	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3.0 Material e Métodos.....	14
3.1 Área de estudo.....	14
3.2 Animais.....	14
3.3 Procedimentos experimentais.....	16
3.3.1. Insulina e Cortisol Plasmáticos.....	16
3.3.2. Glucagon Plasmático.....	16
3.3.3. Secreção de insulina in vitro.....	17
3.3.4. Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT)	18
3.3.5. Teste de Tolerância à Insulina (ipITT)	19

3.3.6 Determinação do nível de fosforilação protéica de Akt1/2/3 e ERK1/2.....	19
3.4 Análise Estatística.....	20
3.4.1.Sobre o poder dos testes estatísticos e tamanho amostral	20
3.4.2.Estatística Inferencial.....	21
4.0 Resultados.....	22
4.1 Concentração de insulina plasmática.....	22
4.2 Secreção estática de insulina por fragmentos de pâncreas estimulados por seus principais secretagogos.....	23
4.3 Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT).....	24
4.4 Teste de Tolerância à Insulina (ipITT).....	26
4.5 Concentração dos hormônios hiperglicemiantes:	
4.5.1 Glucagon plasmático.....	28
4.5.2 Cortisol plasmático.....	29
4.6 A sinalização intracelular de insulina no músculo peitoral e no fígado:	
4.6.1 Akt 2 / pAkt 2.....	30
4.6.2 ERK2/pERK2	31
5.0 Discussão.....	32
6.0 Conclusões.....	43
7.0 Referências bibliográficas.....	46

Índice de Figuras

Figura A: Mecanismo de secreção de insulina pela célula â pancreática.....	3
Figura B: Resumo das vias de sinalização da insulina.....	4
Figura C: Resumo das ações da Akt em tecidos que respondem à insulina.....	6
Figura D: Modelo de secreção de insulina estimulada por leucina.....	7
Figura E: Determinação da glicemia a partir de veia da asa.....	19
Figura 1: Concentrações plasmáticas de insulina (mUI/L) em <i>D. rotundus</i> alimentados e jejuados por 24 h (ALM e J24)	24
Figura 2: Secreção estática de insulina.....	25
Figura 3: Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT).....	26
Figura 4: Teste de Tolerância à Insulina (ipITT).....	28
Figura 5: Concentrações plasmáticas de glucagon (pg/mL) em <i>D. rotundus</i> alimentados e jejuados por 24 horas (ALM e J24)	29
Figura 6: Concentrações plasmáticas de cortisol (µg/dL) em <i>D. rotundus</i> alimentados e jejuados por 24 horas (ALM e J24).....	30
Figura 7: Fosforilação da Akt ₂ hepática.....	31
Figura 8: Fosforilação da Erk ₂ muscular e hepática.....	32

Índice de Tabelas

Tabela 1: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de insulina (INSL, mUI/L).....	23
Tabela 2: ipGTT. Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) da concentração de glicose sanguínea (mg/dl).....	26
Tabela 3: ipGTT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc intra-grupo.....	27
Tabela 4: ipGTT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc entre-grupo.....	27
Tabela 5: ipITT. Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) da concentração de glicose sanguínea (mg/dl).....	27
Tabela 6: ipITT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc intra-grupo.....	28
Tabela 7: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de glucagon (GLCN, pg/mL).....	29
Tabela 8: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de cortisol (CRSL, µg/dL).....	30
Tabela 9: Resultados (valores de t e de p) do teste <i>t</i> , nas comparações entre morcegos alimentados e jejuados (ALM e J24), para cada hormônio.....	31

Lista de abreviações

AGL.....	Ácidos graxos livres
ALM.....	Alimentados
ANOVA.....	Análise de Variância
ATP.....	Adenosina tri-fosfato
EPM.....	Erro Padrão da Média
GLUT 2.....	transportador de glicose 2
GLUT4.....	transportador de glicose 4
h.....	horas
HC.....	Rica em carboidratos
HP.....	Rica em proteínas
J24.....	Jejuados por 24 horas
mg/100g.....	miligramas/ 100 gramas
mg/dL.....	miligramas/ decilitro
min.....	minuto
mL.....	mililitro
mmol/L.....	milimol/ litro
mUI/L	Mili unidades internacionais por Litro
p.c.	peso corporal
Rpm.....	rotações por minuto
U/kg.....	Unidades por quilograma
µg/dL	microgramas por decilitro

Resumo

A literatura tem mostrado que mamíferos alimentados com dietas ricas em proteína são, em geral, mais resistentes ao jejum. Entretanto, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, apesar de possuir uma dieta rica em proteína (sangue) é marcadamente susceptível à privação alimentar, apresentando hipoglicemia severa após 24h de jejum. Além disso, esta espécie possui pequenas reservas de glicogênio e lipídios, baixas concentrações de insulina plasmática e pancreática e um menor número de células α e β em suas Ilhotas de Langerhans.

Este trabalho teve como objetivos verificar em *D. rotundus*: a resposta ao Teste de Tolerância à Glicose intra-peritoneal, (ipGTT); a resposta ao Teste de Tolerância à Insulina intra-peritoneal (ipITT), a secreção de insulina *in vitro* estimulada por diversos secretagogos, a via tecidual de sinalização da insulina e as concentrações plasmáticas de insulina, glucagon e cortisol em animais alimentados e jejuados.

Os resultados do ipGTT mostraram que esses morcegos não conseguem lidar com uma sobrecarga de glicose, sugerindo intolerância à esse substrato. Os experimentos de ipITT mostraram que não houve alteração da glicemia após injeção de insulina, sugerindo que, além de baixas concentrações de insulina, *D. rotundus* apresenta resistência periférica a este hormônio. As concentrações de insulina e glucagon plasmáticos verificadas em *D. rotundus* alimentados e jejuados por 24h foram inferiores ao observado para a maioria dos mamíferos estudados até o momento (Bruttomesso et al. 1999; Lacroix et al., 2004; Lephart et al., 2004), inclusive humanos (Corrêa et al., 2007). Por outro lado, foram verificados altos níveis de cortisol plasmático nesta espécie, sugerindo que este hormônio não deve participar de forma importante na manutenção da homeostase glicêmica, pelo menos no jejum, como ocorre normalmente em mamíferos (Rafacho et al., 2007, 2008). O estudo da secreção estática de insulina por fragmentos de pâncreas estimulados por seus principais secretagogos mostrou que as células β de *D. rotundus* apresentam aumento na taxa de secreção de insulina em resposta a glicose e leucina, mas não reagem à adição de K^+ no meio de incubação. Finalmente, não houve alteração nos níveis de fosforilação da Akt,

proteína da via de sinalização tecidual da insulina, em resposta à estimulação por esse hormônio no fígado. Já a ERK, proteína da via MAPK da estimulação tecidual da insulina, responde normalmente a este hormônio. Embora tenha havido aumento da expressão tecidual da ERK em resposta à insulina, esta via não deve estar associada ao aumento da captação tecidual de glicose estimulada por insulina.

O padrão metabólico apresentado por *D. rotundus* poderia estar associado a uma estratégia adaptativa, que garantiria maiores níveis de glicose circulante pelo maior tempo possível, já que esta espécie lida com a possibilidade constante de insucesso no forrageamento. Embora apresente fragilidade ao jejum, *D. rotundus* possui grande densidade populacional, o que poderia ter sido facilitado, em grande parte, pela existência do comportamento de compartilhamento recíproco do alimento, observado por Wilkinson (1984), em que um animal que não conseguiu se alimentar por uma noite pode receber sangue de outros morcegos da mesma unidade social, através da regurgitação.

Abstract

In general, mammals fed on high protein diets (HP) are more resistant to starvation. However, the hematophagous bat *Desmodus rotundus*, although having a HP diet (blood), is markedly susceptible to the food deprivation, presenting severe hypoglycemia after 24h of starvation. Besides, this species has small stores of hepatic glycogen and adipose tissue lipid, low concentration of plasma and pancreatic insulin and a few numbers of α and β cells in its Islets of Langerhans.

This work aimed to study in *D. rotundus*: the response to Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT); Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ipITT); static insulin secretion stimulated by many secretagogues; insulin receptor signaling, and insulin glucagon and cortisol plasma levels in fed and fasted animals.

The results from ipGTT showed that these bats cannot handle with an overload of glucose, suggesting intolerance to this substrate. The results from ipITT showed that there are not changes in glycemia after insulin injection suggesting that, besides the low insulin concentration, *D. rotundus* seems to present resistance to this hormone. Plasma glucagon and insulin concentrations of fed and starved bats were lower than most mammals, including humans. On the other side, the high levels of plasma cortisol suggest that this hormone seem not to contribute to glycemic homeostasis maintenance, as normally happens in mammals.

The experiments with static insulin secretion showed that the β cells from *D. rotundus* presented a significant insulin secretion increase in response to glucose and leucina, but did not present to K^+ . Finally, we did not find changes in liver Akt phosphorylation levels in response to insulin stimulation. However, there was a significant increase in ERK expression in response to this hormone. Albeit we have found increase in ERK expression in response to insulin, this pathway should not be involved in glucose uptake stimulated by insulin.

The metabolic pattern presented by *D. rotundus* could be related to an adaptative strategy, which guarantee high circulating glucose levels considering that these species deals with great possibility of not attaining to food. Although its fragility to starvation, *D. rotundus* shows a huge population density. This is possibly related to the reciprocal sharing

food behavior (Wilkinson, 1984), where an animal that was not able to feed itself for one night receives blood from another bat by regurgitation.

1. Introdução

A manutenção da homeostase glicêmica em mamíferos, tanto no estado absorptivo, quanto no pós-absorptivo e jejum é fundamental para o sistema nervoso, medula renal e hemácias, que dependem quase que exclusivamente de glicose para seus requerimentos energéticos (Nordlie et al., 1999, Taylor e Hirsch, 2007; Yeo e Sawdon, 2007).

O fornecimento constante de glicose para a corrente sanguínea depende de um equilíbrio dinâmico envolvendo pâncreas, fígado, tecido adiposo, músculos e cérebro (Tirone e Brunicardi, 2001) e de múltiplas vias metabólicas responsáveis pela utilização da energia proveniente dos nutrientes contidos na dieta (carboidratos, proteínas e lipídios) ou da energia armazenada como combustível de reserva corporal (glicogênio, proteína e lipídio) (Genuth, 1998).

A ativação de determinada via metabólica depende do estado nutricional do indivíduo (Yeo e Sawdon, 2007). Por exemplo, a síntese de glicogênio no estado alimentado e a glicogenólise e a neoglicogênese no jejum são as principais vias metabólicas envolvidas no controle da homeostase glicêmica em mamíferos (Klover e Mooney, 2004; Beardsall et al., 2006). De qualquer forma, independente do estado nutricional, a glicose sanguínea é mantida entre 4 e 6 mmol/L, sendo que os valores glicêmicos de mamíferos raramente chegam a níveis inferiores a 3,5 mmol/L no jejum (Beardsall et al., 2006).

Além do estado nutricional, a manutenção da homeostase glicêmica depende, também, de um controle hormonal fino que modula tanto a captação de glicose quanto sua produção endógena (Beardsall et al., 2006).

1.1 Controle hormonal do metabolismo no estado alimentado

A insulina é o principal hormônio anabólico no controle do metabolismo energético, regulando o metabolismo da glicose, de proteínas e de lipídios. Seus efeitos glicorregulatórios dependem, principalmente, de suas ações no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Este hormônio, que possui efeitos anabólicos e anti-catabólicos, é secretado pelas células das Ilhotas de Langerhans pancreáticas e responde, principalmente

aos elevados níveis circulantes de glicose do período pós-prandial, embora seja também secretado em resposta a ácidos graxos e alguns aminoácidos (Carvalho et al., 2002; Lemos, 2006).

No fígado, a insulina promove a oxidação da glicose e o seu armazenamento como glicogênio (17%). Uma vez que os estoques de glicogênio estejam repletos, quantidades crescentes de glicose são convertidas a triacilgliceróis, liberados para a circulação na forma de VLDL (very low density lipoprotein). Ainda no fígado, a insulina promove a inibição da glicogenólise e da gliconeogênese, reduzindo a produção hepática de glicose (Beardsall et al., 2006; Lemos, 2006).

Na célula muscular e no adipócito, a insulina promove a captação e a oxidação de glicose, bem como a síntese de reservas, como o glicogênio no músculo e os triacilgliceróis no tecido adiposo. Para a captação de glicose nesses tecidos, a insulina promove a síntese e translocação do transportador de glicose GLUT4 para a superfície das células (Lemos et al., 2006). No tecido adiposo, a insulina promove, também, inibição da lipólise, reduzindo os níveis de ácidos graxos livres (AGL) no plasma (Beardsall et al., 2006; Lemos, 2006).

1.1.1 Estímulos e mecanismo de secreção da insulina

A glicose proveniente da dieta é transportada, por difusão facilitada, para o interior das células, onde é metabolizada, o que resulta no aumento da concentração intracelular de ATP (ATP/ADP). Esse aumento bloqueia os canais de K^+ ATP-dependentes (Cook e Hales, 1984). O fechamento destes canais promove a despolarização da membrana da célula e conseqüente abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Boschero et al., 1988; Safayhi et al., 1997), com o resultante influxo deste íon para a célula. O aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Grapengiesser et al., 1989; Theler et al., 1992) desencadeia a fusão das vesículas de insulina com a membrana plasmática da célula (Lang, 1999; Rorsman et al., 2000), além de promover maior síntese de ATP em nível mitocondrial (Rutter et al., 1993), amplificando a sinalização da glicose (Kennedy et al., 1999; Maechler e Wollheim, 2000; Ainscow et al., 2001; Wollheim e Maechler, 2002) (Fig. A).

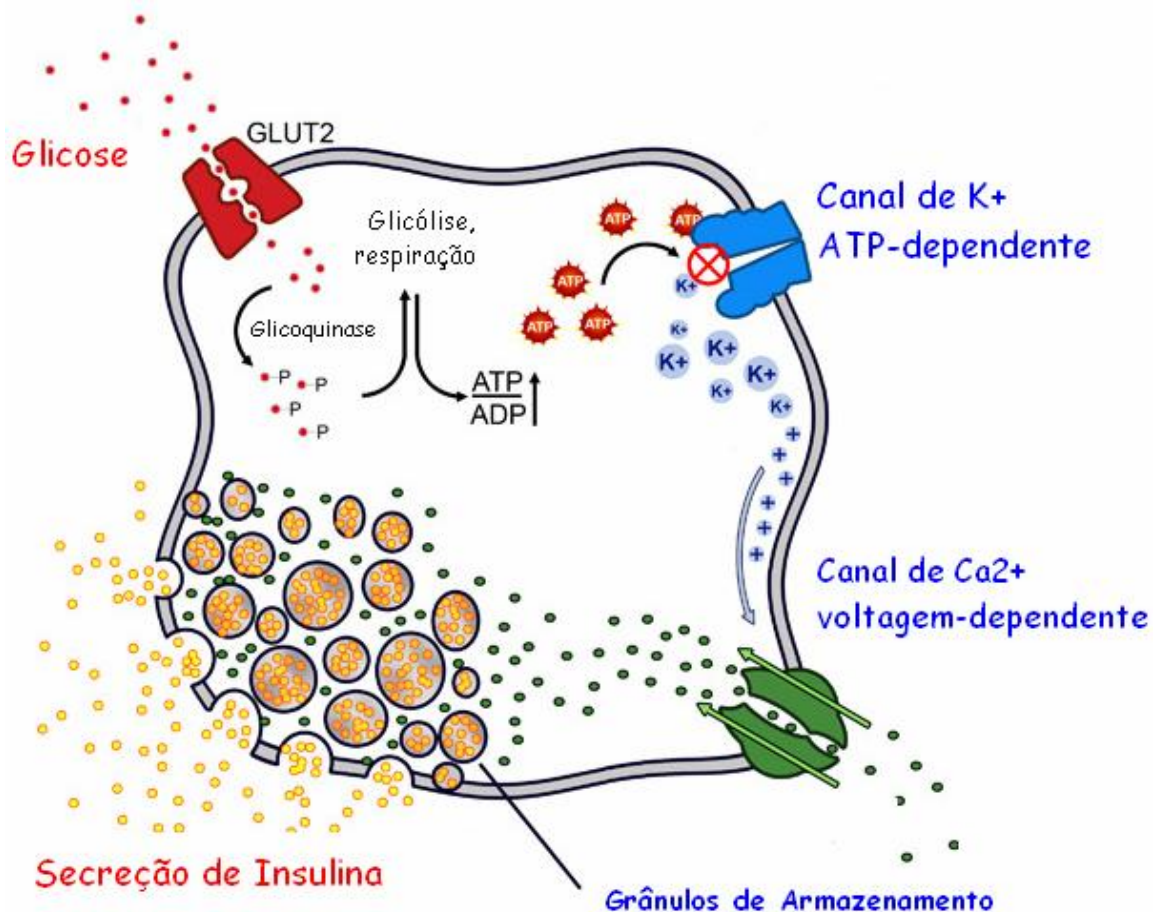


Fig A. Mecanismo de secreção de insulina pela célula β pancreática. (Adaptado de <http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>, site consultado em 01/07/08).

1.1.2 Mecanismos de ação da insulina

A transdução de sinal da insulina (Fig. B) começa com a ligação deste hormônio a um receptor de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas β . A subunidade β atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira a atividade quinase, levando à alteração conformacional e autofosforilação do receptor. Uma vez fosforilado, o

receptor tem sua atividade quinase ativada, atuando na fosforilação de vários substratos protéicos citosólicos em seu resíduo tirosina (Carvalho et al., 2002).

Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados, sendo quatro deles pertencentes à família dos Substratos do Receptor de Insulina, as proteínas IRS. Os principais substratos do receptor de insulina são o IRS-1 e o IRS-2, que fosforilados em tirosina, se ligam e ativam proteínas como a PI 3-quinase (fosfatidil inositol 3-quinase) e a MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). A ativação destas proteínas desencadeia a ativação de duas serinas-quinases: a Akt (também chamada de PKB) e as ERKs (quinasas reguladas por sinal extracelular) (Lemos, 2006).

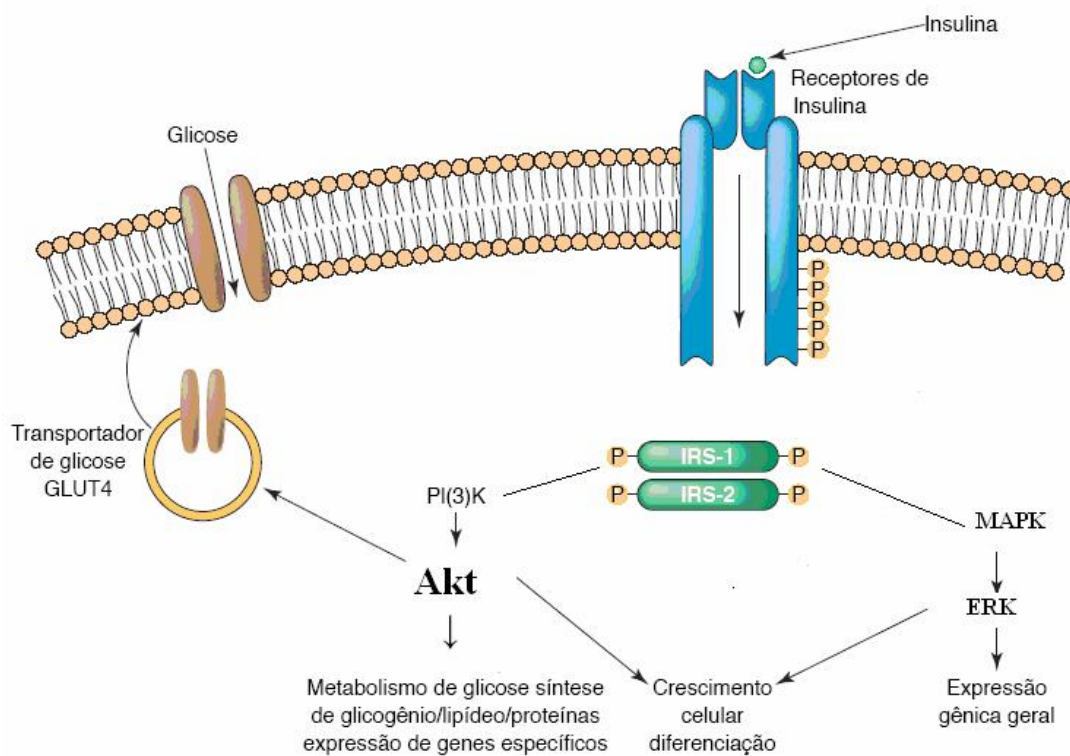


Fig B. Resumo das vias de sinalização da insulina. (Adaptado de Carvalho et al., 2002).

1.1.3 Papel da Akt na sinalização da insulina

A Akt é uma proteína extremamente conservada em um grande número de espécies e participa de inúmeras ações da insulina em vários tecidos (Whiteman et al., 2002). A descoberta de que a Akt poderia mediar algumas ações metabólicas da insulina deveu-se à observação de que esta enzima era ativada por substâncias que mimetizavam as ações da insulina, promovendo aumento da captação de glicose por translocação de GLUT4 em adipócitos, mesmo na ausência do hormônio (Kohn et al., 1996). Foi observado, ainda, que a insulina estimula a associação de Akt2 com vesículas de GLUT4 em adipócitos de ratos, o que resulta na fosforilação de diversas proteínas associadas a estas vesículas (Calera et al., 1998). Além disso, a inibição da atividade da Akt bloqueia parcialmente a translocação de GLUT4 estimulada pela insulina em células adiposas e musculares (Hill et al., 1999; Wang et al., 1999). Outras evidências indicando que mudanças na atividade da Akt relacionam-se com o transporte de glicose vêm de estudos usando a esfingomielina derivada de ceramida. Esta substância antagoniza o transporte de glicose ativado por insulina e a translocação de GLUT4 em adipócitos e miotubos, promovendo uma redução de 60% na atividade da Akt estimulada por insulina (Summers et al., 1998; Hajdich et al., 2001). Embora um estudo feito por Kitamura et al. (1998) tenha mostrado pequena correlação entre a Akt e transporte de glicose em células responsivas à insulina, Wang et al. (1999) sugerem que mesmo uma atividade residual da Akt é capaz de manter o transporte de glicose estimulado por insulina.

A Akt também está envolvida na síntese protéica e de glicogênio musculares, na ativação de lipogênese e inibição da lipólise no tecido adiposo e na síntese de glicogênio e supressão da glicogenólise no fígado, todos ativados pela insulina (Carvalho et al., 2002; Whiteman et al., 2002) (Fig. C). Estudos recentes demonstram que esta enzima está ainda envolvida na regulação do crescimento celular, também ativado pela insulina (Jetton et al., 2008). Além disso, a Akt pode favorecer o aumento do número de células pela inibição da sua apoptose (Maddika et al., 2007) e sua super-expressão em ratos causa aumento e proliferação da massa de células (Bernal-Mizrachi et al., 2001).

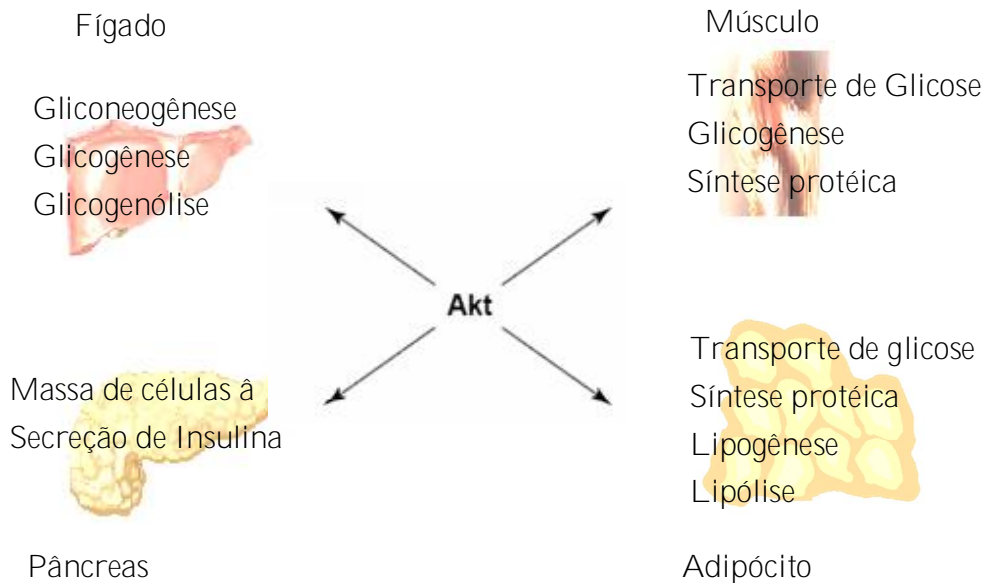


Fig C. Resumo das ações da Akt em tecidos que respondem à insulina. (Adaptado de Whiteman et al., 2002).

1.1.4 Papel das ERKs na sinalização da insulina

As Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares – ERKs constituem uma subfamília das proteínas ativadas por mitógeno – MAPKs, serinas-quinases ativadas nas etapas iniciais da ação insulínica (Pearson et al., 2001; Johnson e Lapadat, 2002). As ERKs representam um grande número de proteínas, de ampla distribuição pelos tecidos, ativadas por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento (Pearson et al., 2001; Roux e Blenis, 2004). Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias MAPKs e entre as mais estudadas estão as vias de sinalização das ERKs 1/2.

A cascata de sinalização das ERKs está associada à transcrição gênica, crescimento e diferenciação celulares (Lingohr et al., 2002). Através da ativação da cascata das ERKs, a insulina promove captação de glicose por células musculares e adipócitos; controla o crescimento e diferenciação celulares e a mitogênese em diversos tecidos (Tobe et al., 1992; Chuang et al., 2000; Avruch et al., 2001; Pearson et al., 2001; Lingohr et al., 2002; Viana et al., 2006). No músculo esquelético, por exemplo, esta via está associada à diferenciação de mioblastos (Chuang et al., 2000), e ao aumento da captação de glicose (Viana et al., 2006). No fígado, a ERK atua estimulando o catabolismo lipídico e inibindo neoglicogênese (Viana et al., 2006).

1.1.5 Outros secretagogos fisiológicos da insulina

Além da glicose, secretagogo mais importante da insulina, alguns aminoácidos como leucina, alanina e glutamina e o aumento na concentração intracelular de K^+ e Ca^{2+} participam do processo de secreção deste hormônio (Haber et al., 2001; Rutter, 2004; Beardsall et al., 2006).

A leucina promove a secreção de insulina por estimular o metabolismo mitocondrial, via ativação de GDH (glutamato desidrogenase); a produção de ATP; e a transaminação da leucina a α -cetoisocaproato, componente do ciclo do Ácido Cítrico (TCA) (Panten et al., 1972; Gylfe, 1976; Sener e Malaisse, 1980). Gao et al. (2003) sugerem ainda, que o α -cetoisocaproato pode estimular a secreção de insulina através de uma combinação de mecanismos, incluindo seu próprio catabolismo e transaminação da leucina com produção de α -cetogluturato (Newsholme et al., 2005). Sinais mitocondriais gerados pelo catabolismo da leucina também parecem ser importantes para a ativação da via de sinalização mitogênica mTOR nas células β , via esta que regula a síntese protéica através da ativação da proteína quinase p70S6K (Xu et al., 2001) (Fig. D).

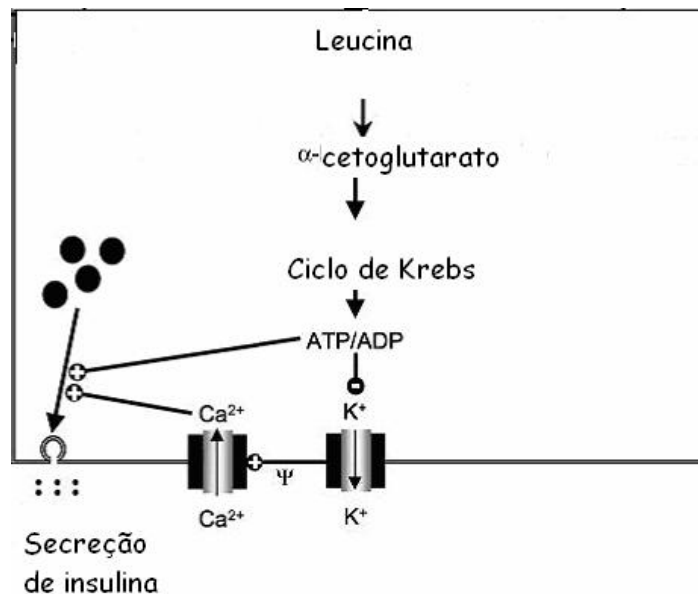


Fig. D. Modelo de secreção de insulina estimulada por leucina (Adaptado de Gao et al., 2003).

1.2 Controle hormonal do metabolismo no jejum

O controle das adaptações metabólicas na resposta ao jejum é exercido por hormônios hiperglicemiantes, dentre eles o glucagon e o cortisol, que estimulam a produção endógena de glicose (Corssmit et al., 2001; Beardsall et al., 2006).

1.2.1 Estímulos e mecanismo de ação do glucagon

O glucagon é secretado pelas células das Ilhotas de Langerhans pancreáticas quando os níveis de glicose circulante e insulina estão baixos. Em condições fisiológicas os níveis de insulina aumentam imediatamente após uma refeição rica em carboidratos, enquanto os níveis de glucagon diminuem (Jiang e Zhang, 2003), pois tanto a glicose quanto a insulina diminuem a síntese deste hormônio, reprimindo a transcrição do gene do glucagon. Dentre as ações do glucagon, as principais são: estimular a produção hepática de glicose via ativação da neoglicogênese; e estimular a glicogenólise hepática. A neoglicogênese é o principal mecanismo contra-regulatório das ações da insulina na manutenção da homeostase glicêmica *in vivo* (Jiang e Zhang, 2003). Outra importante ação hepática do glucagon é direcionar os AGL para a β -oxidação e inibir a síntese de triacilgliceróis, o que faz do glucagon um hormônio cetogênico, além de hiperglicemiante. Este hormônio estimula, ainda, a lipólise, pela ativação da lipase hormônio sensível no tecido adiposo (Jiang e Zhang, 2003), além de ter efeito proteolítico muscular. Portanto, o glucagon, além de aumentar os níveis circulantes de glicose por estimulação da glicogenólise e da neoglicogênese hepáticas (Jiang e Zhang, 2003; Merlen et al., 2006; Winzell et al., 2007), contribui para o fornecimento de substratos para esta última via. A inibição das ações do glucagon é, portanto, capaz de promover redução dos níveis plasmáticos de glicose, principalmente na resposta ao jejum (Jiang e Zhang, 2003).

1.2.3 Estímulos e mecanismo de ação do cortisol

O cortisol é um hormônio esteróide secretado pela zona fasciculata do córtex da adrenal, sob controle do eixo hipotálamo-hipófise, através do hormônio liberador de corticotropina (CRH) hipotalâmico e do ACTH adeno hipofisário (Christiansen et al., 2007). Fisiologicamente, a secreção de cortisol ocorre em resposta a situações de estresse,

como jejum e exercício (Christiansen et al., 2007). O cortisol mantém a disponibilidade de substratos energéticos através da mobilização de glicose, AGL e aminoácidos dos estoques endógenos, e o excesso deste hormônio pode promover o desenvolvimento de resistência à insulina (Santos et al., 2007; Rafacho et al., 2007; 2008). Entre as ações do cortisol destacam-se a proteólise muscular, com inibição de síntese protéica no jejum; e a facilitação das ações hepáticas do glucagon.

1.3 Influência da dieta na ativação das diferentes vias metabólicas

Além do estado nutricional, o tipo de dieta ingerida pode influenciar a ativação das diferentes vias metabólicas (Felig, 1979), sendo que diversos estudos têm mostrado que o padrão metabólico varia conforme o tipo de dieta, se ricas em carboidratos (HC) ou ricas em proteínas (HP) (Roselino, 1975; Kettelhut et al., 1980; Veiga et al., 1982; Opazo et al., 2004; Mustonen et al., 2005; Beardsall et al., 2006).

Em geral, animais que consomem dietas HC apresentam aumento da glicemia no período absorptivo, o que estimula a secreção de insulina que, por sua vez, promove a utilização de glicose como fonte energética pelo organismo e a formação de reservas de glicogênio, lipídios e proteínas (Unger, 1981; Roden e Bernroider, 2003; Klover e Mooney, 2004; Beardsall et al., 2006; Langin, 2006; Yeo e Sawdon, 2007).

Por outro lado, em animais alimentados com dietas HP, o controle hormonal no estado absorptivo é exercido inicialmente pelo glucagon, cuja secreção é estimulada pelo aumento na concentração plasmática de aminoácidos resultantes da dieta. O glucagon, por sua vez, promove a ativação neoglicogenética, gerando assim um aumento da produção hepática de glicose, a partir dos aminoácidos vindos da alimentação rica em proteínas. Essa ativação neoglicogenética promove, então, um aumento moderado da glicemia, o que estimula a liberação de insulina, porém, de maneira menos eficiente do que ocorre em animais com dietas HC (Eisestein e Strack, 1971; Felig, 1979; Kettelhut et al., 1980; Tallas e White, 1988; Krebs, 2005; Mustonen et al., 2005; Blouet et al., 2006). A insulina irá, finalmente, promover os efeitos anabólicos conhecidos.

Esse padrão hormonal de animais HP, no estado alimentado, resulta em níveis glicêmicos mais baixos, menor concentração de glicogênio hepático, lipogênese reduzida e

grande atividade neoglicogenética (Kettelhut et al., 1980; Krebs, 2005; Beardsall et al., 2006; Sethi e Vidal-Puig, 2007). Esse padrão metabólico foi observado em traíras (*Hoplias malacarius*) (Machado et al., 1989), percas européias (*Perca fluviatilis*) (Borrebaek e Christophersen, 2000), tartarugas (*Phrynops hilarii*) (Silva e Migliorini, 1990), urubus (Veiga et al., 1982), aves caturras (Koutsos et al. 2001), cães e gatos (Kettelhut et al., 1980; Washizu et al., 1999), além de ratos adaptados em laboratório a uma dieta HP (Kettelhut et al., 1980; Schmid et al., 1984; Blouet et al., 2006).

A resposta à privação alimentar é semelhante em animais HC e HP, com predomínio da ativação da glicogenólise e, da neoglicogênese (Beardsall et al., 2006). Porém, a glicemia de animais HC apresenta queda inicial nas primeiras horas de jejum, com posterior recuperação dos valores para os níveis do estado alimentado (Kettelhut et al., 1980; Cryer, 1991; Tirone e Brunicardi, 2001; Beardsall et al., 2006). Em animais HP, o jejum não provoca alteração significativa da glicemia, que permanece relativamente constante devido, especialmente, à grande atividade neoglicogenética, já presente no estado alimentado e que se mantém em altos níveis durante o período de privação alimentar, demonstrando uma maior resistência ao jejum (Eisestein e Strack, 1971; Felig, 1979; Kettelhut et al., 1980; Tallas e White, 1988; Krebs, 2005; Mustonen et al., 2005; Blouet et al., 2006). Em ambos os tipos de dieta, a neoglicogênese no jejum tem como substratos principais os aminoácidos das reservas protéicas corporais (Spargo et al., 1979; Gazola et al., 2007).

Portanto, como visto, animais que se alimentam com dietas HP deveriam ser mais resistentes ao jejum devido, principalmente, à maior atividade neoglicogenética já presente no estado alimentado e que se mantém em altos níveis durante o período de privação alimentar (Eisestein e Strack, 1971; Kettelhut et al., 1980; Krebs, 2005).

Entretanto, contrariando o esperado para animais de dieta HP, estudos feitos por Freitas et al. (2003; 2005) mostraram que o morcego vampiro-comum (*Desmodus rotundus*), apesar de possuir uma dieta predominantemente protéica (sangue) possui uma enorme fragilidade em resposta à restrição alimentar, apresentando valores de glicemia da ordem de 30 mg de glicose/100 mL de plasma (1,65 mmol/L) após 24 h de jejum (Freitas et al., 2003). Níveis glicêmicos menores que 50 mg/dL (3 mmol/L) de plasma são considera-

dos incompatíveis com a sobrevivência em mamíferos (Unger, 1981; Taylor e Hirsch, 2007). Essa vulnerabilidade ao jejum, apresentada por *D. rotundus* deve, provavelmente, estar associada às reservas de glicogênio e lipídios em animais alimentados, menores do que as observadas para mamíferos com dietas HC e HP, além de ausência de mobilização protéica e lipídica. Freitas et al. (2003) sugerem que, possivelmente, não deve estar ocorrendo ativação suficiente da neoglicogênese no jejum, processo esse que permitiria a manutenção da homeostase glicêmica desses animais (Freitas et al., 2003). Essa fragilidade ao jejum deve ser a responsável pela morte precoce destes animais após 2 ou 3 dias consecutivos de privação alimentar (Altrigham, 1996). Estudos posteriores, também realizados por Freitas (2005), mostraram que *D. rotundus* apresenta baixas concentrações plasmáticas e pancreáticas de insulina, mesmo no estado pós-prandial e que a glicose era incapaz de estimular a secreção deste hormônio por fragmentos de pâncreas isolados. Esses resultados foram corroborados por dados de morfometria e imunocitoquímica das ilhotas pancreáticas de *D. rotundus*, onde a autora pôde observar células com cerca de 10% do tamanho das de ratos e camundongos, e menor massa de células e contida em cada Ilhota, sugerindo menor capacidade de secreção de insulina e, também, de glucagon.

Os resultados de baixa concentração de insulina plasmática e pancreática encontrados em *D. rotundus* remetem a alguns estudos que mostraram que ratos alimentados com dieta HP apresentaram diminuição dos níveis de insulina (Lephart et al., 2004; Lacroix et al., 2004) e glicose plasmáticas (Lacroix et al., 2004) e, ainda, resistência periférica à insulina (Linn et al., 2000; Hammond e Janes, 1998). Esses trabalhos sugerem uma associação entre dietas ricas em proteínas e um menor desempenho pancreático na secreção de insulina e menor resposta tecidual a este hormônio.

Considerando-se que a fração sólida do sangue bovino possui 93,1% de proteína (Breidenstein, 1982) e que *D. rotundus* assimila 92% desse total durante a ingestão alimentar, existe a possibilidade de que esse tipo de dieta, rica em proteínas e com baixo teor de carboidratos, esteja associada ao padrão metabólico e às baixas concentrações de insulina detectadas nesses animais.

Das 1113 espécies de morcegos (Simmons, 2005), apenas três são hematófagas: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*. Apesar de não suportar privação alimentar por períodos maiores que 48 h, *D. rotundus* (Chiroptera, família Phyllostomidae, subfamília Desmodontinae) é o hematófago mais comum. Essa espécie ocorre desde o norte do México até o sul da Argentina e Chile. De modo geral, forma colônias de 20 a 100 indivíduos (Greenhall et al., 1983). Possui hábitos noturnos, deixando seus abrigos (cavernas, fendas em formações rochosas, ocos de árvores, celeiros, pontes ou construções abandonadas) logo após o escurecer, num vôo silencioso e baixo, geralmente a um metro do chão, à procura de presas, principalmente mamíferos domésticos como bois, cavalos, porcos e, eventualmente, humanos (Greenhall et al., 1983; Nowak, 1994).

1.4 Justificativa

Os resultados obtidos por Freitas (2000), Freitas et al. (2003) e Freitas (2005) evidenciam que *Desmodus rotundus* possui grande fragilidade frente à restrição alimentar, reservas energéticas corporais de carboidratos e lipídios no estado alimentado em pequenas concentrações, ausência de mobilização de proteínas e lipídios no jejum, além de baixas concentrações de insulina, cuja secreção não responde a uma sobrecarga de glicose, seu principal secretagogo.

Como o padrão apresentado por este hematófago difere do que tem sido descrito para todos os outros animais que consomem dietas ricas em proteínas, resolvemos investigar mais profundamente os principais mecanismos envolvidos nessa resposta metabólica de *D. rotundus* alimentados e jejuados.

2. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram determinar as concentrações plasmáticas dos principais hormônios envolvidos na manutenção da homeostase glicêmica; verificar as respostas corporais associadas a uma sobrecarga de glicose e insulina e estudar aspectos relacionados à sinalização intracelular da insulina no morcego *Desmodus rotundus*.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram verificar em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*:

1. A resposta ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT) em animais submetidos ao jejum de 12h;
2. A resposta ao Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em animais alimentados;
3. As variações das concentrações plasmáticas de insulina, glucagon e cortisol em animais alimentados e jejuados por 24h;
4. A secreção estática de insulina por fragmentos de pâncreas de animais alimentados estimulados por diversos secretagogos;
5. A atividade das ERKs(1/2) /pERKs (1/2) e Akts (1/2/3)/ pAKTs (1/2/3), enzimas da via de sinalização tecidual da insulina, em fígado e músculo de animais alimentados.

3. Material e Métodos

3.1 Área de Estudo

A área de estudo compreendeu o norte do Distrito Federal e o leste do Estado de Goiás, região centro-oeste do Brasil. As coletas foram feitas em quatro cavernas, escolhidas de acordo com suas quiropterofaunas (Bredt et al., 1999), a saber:

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

Gruta Fenda II (DF-016) - Brazlândia, Distrito Federal: Fazenda Palestina (15°30'S, 48°10'W; altitude 814 m).

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

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

Todas as coletas, bem como a escolha das cavernas, foram realizadas com o apoio do técnico da Gerência e Controle de Zoonoses, do Instituto de Saúde do Distrito Federal, Sr. João Bruno da Costa e/ou do espeleólogo Sr. Edvar Magalhães.

Este estudo foi autorizado pelo IBAMA (processo n. 02008.001058/2006) e pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB (processo nº. 66367/2007).

3.2 Animais

Morcegos hematófagos adultos (n=79), machos e fêmeas (não prenhes e não-lactantes), da espécie *Desmodus rotundus* (25-40g peso corporal) foram capturados com o uso de redes de neblina (7x3m) armadas nas entradas das cavernas, entre 19h e 24h. Todas as coletas foram realizadas entre outubro de 2006 e setembro de 2007.

Após cada coleta, os animais foram levados para o biotério do Laboratório Integrado (Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, UnB), onde foram mantidos no escuro, à temperatura ambiente, em gaiolas individuais (25x30x45cm) adaptadas à sua posição de repouso.

A alimentação no cativeiro foi baseada na dieta normal de *D. rotundus* que, em condições naturais alimenta-se, preferencialmente, do sangue de mamíferos domésticos, como bois e vacas (Greenhall et al., 1983). No cativeiro, os animais receberam sangue desfibrinado obtido de bois e vacas sadios sacrificados no matadouro Raça, Planaltina-DF. A desfibrinação do sangue, que evita sua coagulação, foi realizada no próprio matadouro, através de agitação manual (10 min.) em frascos contendo pérolas de vidro (300 pérolas / 500 mL sangue). Posteriormente, o sangue foi armazenado em frascos fechados, mantidos a 8° C por até uma semana. Nenhum anti-coagulante químico foi adicionado ao sangue.

Para a adaptação ao cativeiro, os morcegos receberam sangue desfibrinado *ad libitum* (30-40 mL de sangue/morcego) em bebedouros normalmente utilizados para alimentar aves. O sangue foi oferecido entre 19h e 7h da manhã seguinte, durante três noites consecutivas. A água foi oferecida *ad libitum* durante todo o período de adaptação e experimental. Após a terceira noite de adaptação, os animais foram divididos em grupo Alimentado (ALM), onde os animais recebiam sangue por mais uma noite, e grupo Jejuado por 12 ou 24h (J24), onde os animais recebiam somente água *ad libitum*.

Como algumas determinações foram realizadas no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Campinas-UNICAMP, os animais foram transportados por via aérea e novamente adaptados ao cativeiro por três dias antes dos experimentos. O transporte dos animais foi feito com autorização do IBAMA (processo nº. 02008.001058/2006).

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 a vacinação anti-rábica e anti-tetânica prévia de todos os pesquisadores e pessoal técnico envolvido. Após a vacinação anti-rábica, foi realizada a titulação para determinação da quantidade de anticorpos para o vírus da raiva, e somente membros da equipe imunizados puderam participar do projeto.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Insulina e Cortisol Plasmáticos

Para a determinação da insulina e do cortisol no plasma, animais alimentados (n=11) e jejuados por 24h (n=11) foram sacrificados por deslocamento cervical, sucedido por decapitação. Em seguida, tiveram o sangue coletado (por punção cardíaca e a partir 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 ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente de duas voltas (IMMULITE 2000). A sensibilidade analítica do método é de 2µIU/mL. A determinação do cortisol foi feita por imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas químico-luminosas (IMMULITE 2000). A sensibilidade analítica do método é de 0,20 µg/dL (5,5nmol/L).

As determinações de insulina e cortisol plasmáticos foram feitas em colaboração com a Fundação de Apoio a Pesquisa do Laboratório Sabin, coordenada pela Prof^a. Dr^a. Luciana Naves.

3.3.2 Glucagon Plasmático

Para determinação do glucagon no plasma, morcegos alimentados (n=7) e em jejum de 24h (n=7) foram sacrificados por deslocamento cervical, sucedido por decapitação, e tiveram o sangue coletado (por punção cardíaca e a partir do tronco) em tubos de ensaio heparinizados e centrifugado (14000rpm/10min) para separação do plasma (centrífuga 5804R Eppendorf). O plasma foi armazenado a -80°C e, posteriormente, utilizado para a determinação da concentração de glucagon por radioimunoensaio (Kit da Linco Research, St Charles, MO, USA). A determinação do glucagon plasmático foi feita no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo do Depto. de Fisiologia e Biofísica, IB, da Universidade de Campinas - Unicamp, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, e com o auxílio da pós-doutoranda Eliane Filiputi, orientanda do Prof. Dr. Everardo Magalhães.

3.3.3. Secreção de insulina *in vitro*

A secreção estática de insulina foi avaliada em fragmentos de pâncreas obtidos de morcegos alimentados (n=8). 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 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 cinco 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 e os seguintes agentes estimuladores:

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

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

Grupo 3: 1 mL de glicose 22,4 mM;

Grupo 4: 1 mL de glicose 2,8 mM + K⁺ 30 mM

Grupo 5: 1 mL de glicose 2,8 mM + Leucina 20mM

Durante as incubações, os fragmentos foram colocados em meio contendo 2% de trasylol, para evitar a degradação enzimática das proteínas. Após a incubação, procedeu-se ao radioimunoensaio, onde alíquotas do meio de incubação foram diluídas 10 e 20x. Do volume final obtido de cada diluição foi retirado 1mL, ao qual foram adicionados 200 µL de insulina marcada (¹²⁵Iodo a 10 COM/µL) e 100 µL de anticorpo anti-insulina, a uma concentração de 8 µL/100mL, na 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 contida nos fragmentos de pâncreas em pg/mL.

Os experimentos de secreção de insulina *in vitro* foram realizados no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, sob coordenação do Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, e com o auxílio da doutoranda Helena Barbosa.

3.3.4 Teste de Tolerância à Glicose intra peritoneal (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 (Fig. 5).



Fig E. Determinação da glicemia a partir de sangue obtido da veia da asa, procedimento utilizado nos Testes de Tolerância à Glicose (ipGTT) e à Insulina (ipITT). (Foto de André Protzek).

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 (2g/kg peso) em veículo (solução salina 0,9%). Após 60, 120, 180 e 240 minutos (T60, T120, T180 e T240) da injeção de glicose, foram coletadas amostras de sangue dos animais (n=13) para determinação da curva de decaimento da glicose circulante. O grupo controle (n=13) recebeu injeção i.p. (0,5 mL) exclusivamente de solução veículo (salina 0,9%) e foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo experimental.

3.3.5 Teste de Tolerância à Insulina intra-peritoneal (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 i.p. (0,5 mL) de insulina regular Humulin® (0,75 U/kg p.c.) em veículo (salina a 0,9%). Após 15, 30, 45 e 60 minutos (T15, T30, T45 e T60) da injeção de insulina, foram coletadas amostras de sangue dos animais (n=13) para determinação da curva de decaimento da glicose circulante, similar ao descrito para o ipGTT. O grupo controle (n=13) recebeu injeção i.p. (0,5 mL) exclusivamente de salina a 0,9% e foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo experimental.

3.3.6 Determinação do nível de fosforilação protéica de Akt1/2/3 e ERK1/2

Para a determinação dos níveis de fosforilação das proteínas Akt1/2/3 e ERK1/2, morcegos alimentados receberam injeção i.p. (0,5 mL) de salina a 0,9% ou insulina (1U/kg p.c.). Os animais foram, então, sacrificados por deslocamento cervical após cinco minutos da injeção de salina (grupo controle) (n=3) ou após cinco (n=3) ou 15 minutos (n=3) da injeção de insulina (grupos experimentais). A expressão das proteínas foi avaliada pela técnica de “Western blot” em amostras de fígado e músculo, divididas em fragmentos de aproximadamente 200 mg cada e homogeneizadas (Politron PTA 20S, Brinkmann Instrumental model PT 10/35) por 30s em tampão de lise celular (coquetel antiproteases)

em gelo (solução de Hanks). As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm/45 min a 4 °C (centrífuga 5804R Eppendorf) para remoção do material insolúvel. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para precipitação por anticorpos para as diferentes proteínas estudadas. Após quantificação de proteínas pelo método de Bradford, amostras foram incubadas 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 concentrações protéicas semelhantes fossem aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean- BioRad), em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi incubada por 2 h em solução bloqueadora (solução de albumina bovina sérica a 5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-AKT (Ser473), anti-ERK (Tyr-204) (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 2 µg/ml, por 4 horas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma) por 2 horas. Após lavagem com solução basal (cloreto de sódio 150mM, Trisma Base 10mM, Tween 20 a 0,02%), as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e expostas a filmes radiográficos (Kodak) para obtenção das bandas. A densitometria destas foi obtida com o programa Scion Image (Scion Corporation).

3.4 Análise Estatística

3.4.1 Sobre o poder dos testes estatísticos e o tamanho amostral

Para avaliar este ponto, foram selecionados arbitrariamente dois casos, um dos dois testes de tolerância (no caso, o ipGTT) e um dos três hormônios (no caso, a Insulina).

No caso do ipGTT, os cálculos foram feitos quando os dados ainda eram parciais, com um N=10. Nessas condições, o programa Statistica 6.0 foi alimentado com as seguintes informações: média e desvio-padrão dos vários tempos (T0 a T240), $\alpha=0,05$; poder desejado para o teste (90%); número de grupos (=5) e o RMSS (root mean square standardized effect) que foi igual a 86,9. O N necessário estimado para atender às exigências deste estudo foi inferior a 7. Isso significa que, com o N=13 atingido ao final deste estudo, as chances de o teste ANOVA detectar alguma diferença ficam aumentadas.

Para o caso da insulina, o programa foi alimentado com os seguintes dados: média de ALM, média de J24, número de ALM (=11), número de J24 (=11), $\alpha=0,05$ e o Desvio Padrão da população, igual a 10. O resultado foi um poder estimado de teste igual a 94%, valor que sugere que são grandes as chances de serem encontradas diferenças nas comparações.

3.4.2 Estatística Inferencial

Inicialmente, todos os dados foram testados quanto aos perfis das distribuições das médias e das variâncias. Para verificar se as médias seguiam uma normal, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov; para checar a homogeneidade das variâncias (homocedasticidade), o teste de Brown-Forsythe. Caso as médias não seguissem uma normal e houvesse uma violação importante da homocedasticidade ($p<0,01$), testes não-paramétricos seriam eleitos para a continuação da análise dos dados (Glass e Hopkins 1996). Como resultado, para GTT foram selecionados os testes paramétricos de ANOVA, seguidos, segundo o caso, do teste post-hoc de Dunnett (indicado para comparações com um grupo de referência e, por isso, utilizado nas comparações entre variáveis dependentes - medidas repetidas em um mesmo grupo de indivíduos) ou do teste post-hoc LSD (indicado para comparações múltiplas entre variáveis independentes).

Para ITT, que não apresentou distribuição normal em todos os tempos ($p<0,05$), foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman ANOVA associado ao Wilcoxon.

Na análise dos hormônios insulina (INSL), cortisol (CRSL) e glucagon (GLCN) foi empregado o teste t de Student (não pareado).

4. Resultados

4.1 Concentração de Insulina plasmática

A insulina plasmática foi determinada em morcegos alimentados e jejuados por 24 horas, como mostram a Tabela 1 e a Fig 1.

A concentração de insulina plasmática em morcegos alimentados teve média de 17,72 mUI/L. Após o jejum de 24 h, a concentração de insulina no plasma dos morcegos ficou abaixo do nível de detecção do método, ou seja, abaixo de 2 mUI/L, valor significativamente menor ($p = 0,00722$), resultante da comparação entre os grupos pelo teste t, do que os valores encontrados em morcegos alimentados.

Não foi possível obter os valores exatos da concentração plasmática de insulina em indivíduos jejuados por 24 horas, pois em todas as análises realizadas a concentração de insulina plasmática encontrada foi menor do que o nível de detecção do método utilizado, que é de 2 mUI/L. Para efeito de discussão, consideramos o maior valor possível, ou seja, o maior valor imediatamente abaixo do nível de detecção do método como sendo a média dos valores. O nível de insulina plasmática considerado para morcegos jejuados (1,9 mUI/L), ainda assim, é significativamente menor do que o valor encontrado em morcegos alimentados.

Tabela 1: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de insulina (INSL, mUI/L) em *D. rotundus* alimentados (ALM) e jejuados por 24 h (J24); N=11.

INSL - ALM			INSL - J24		
m	DP	EP	m	DP	EP
17,72	17,65	5,32	1,9	0,0	0,0

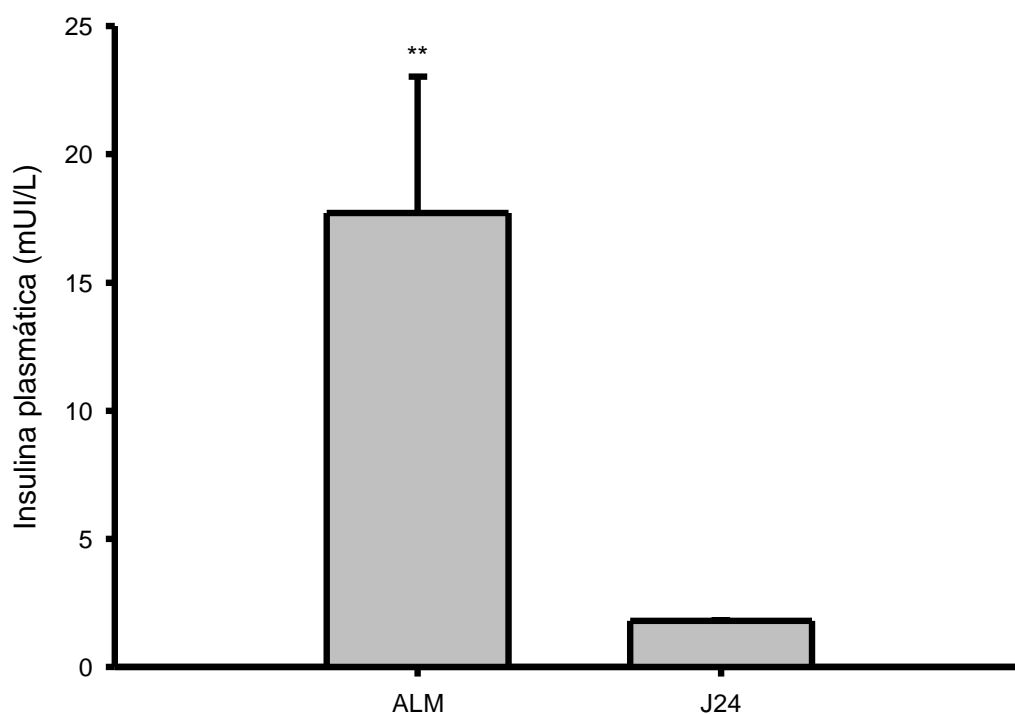


Fig 1. Concentrações plasmáticas de insulina em *D. rotundus* alimentados e jejuados por 24 h (ALM e J24, respectivamente). As colunas e as barras verticais representam a Média \pm EP. N=11 por grupo; ** indica diferença altamente significativa ($p = 0,00722$), resultante da comparação entre os grupos pelo teste *t*.

4.2 Secreção estática de insulina por fragmentos de pâncreas estimulados por seus principais secretagogos

Nossos resultados mostraram que em *D. rotundus*, os fragmentos de pâncreas estimulados por médias (5,6mM) e altas (22,4mM) concentrações de glicose apresentaram um aumento de 1,78 e 1,98 vezes, respectivamente, na secreção estática de insulina em relação aos fragmentos estimulados por baixas concentrações (2,8 mM) deste substrato. Portanto, médias e altas concentrações de glicose apresentam o mesmo efeito na estimulação da secreção de insulina em *D. rotundus*.

O meio contendo glicose + K^+ não provocou alteração significativa na secreção de insulina quando comparado ao meio contendo baixa concentração de glicose (2,8mM).

A adição de glicose + Leucina provocou aumento de 14,27 vezes na secreção de insulina em relação à secreção em meio contendo baixa concentração de glicose (2,8mM), como mostra a fig. 2.

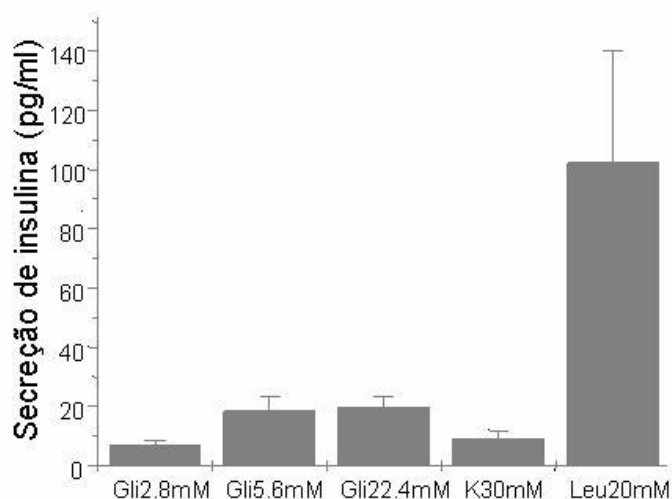


Fig 2. Descrição dos resultados da secreção estática de insulina por fragmentos isolados de pâncreas em meios contendo glicose 2,8mM (Gli 2.8), glicose 5,6mM (Gli 5,6), glicose 22,4mM (Gli 22,4), glicose 2,8 mM + K⁺ (K30mM) e glicose 2,8 mM + leucina (Leu 20mM). As colunas e as barras verticais representam a Média e EP. N = 8.

4.3 Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT)

Os dados obtidos a partir dos experimentos de ipGTT mostraram que após 60 min. da injeção de glicose a glicemia dos animais jejuados por 12 h (77,9 mg/dL) aumentou para 308,8 ± 14,8 mg/dL, mantendo níveis elevados e constantes após 120 (259,0 ± 26,2 mg/dL), 180 (229,4 ± 34,2 mg/dL) e 240 min. (205,2 ± 37,0 mg/dL), como mostram a tabela 2 e a figura 3.

Tabela 2: ipGTT. Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) da concentração de glicose sanguínea (mg/dl) de *D. rotundus* jejuados por 12h, medida antes (T0) e de 60 a 240 minutos (T60, T120, T180 e T240) após a administração de salina (CTRL) ou glicose (TEST). N=13 por grupo.

	TO			T60			T120			T180			T240		
	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP
CTRL	79,3	21,2	5,9	95,9	36,4	10,1	91,4	30,9	8,6	82,0	25,2	7,0	67,7	14,1	3,9
TEST	76,5	21,7	6,0	308,8	53,4	14,8	259,0	94,4	26,2	229,4	123,4	34,2	205,2	133,6	37,0

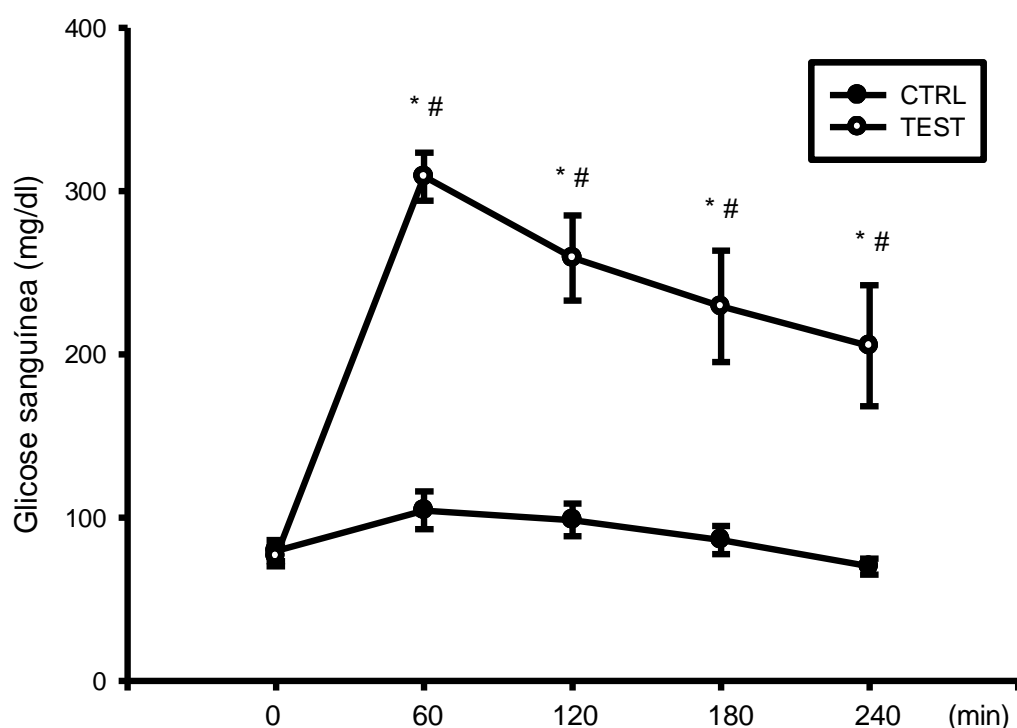


Fig 3. Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT) em *D. rotundus* jejuados por 12h. Os valores dos Grupos CTRL e TEST estão representados pela média \pm EPM. N = 13; * indica $p < 0,01$ nas comparações entre variáveis dependentes pelo teste de Dunnett; # indica $p < 0,01$ nas comparações entre variáveis independentes pelo teste LSD.

Tabela 3: ipGTT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc entre variáveis dependentes, em relação a T0, pelo teste de Dunnett (N=13 por grupo).

Grupo CTRL (GTT)			
T60	T120	T180	T240
0,952973	0,993697	1,000000	0,995205

Grupo TEST (GTT)			
T60	T120	T180	T240
0,000011	0,000011	0,000011	0,000011

Tabela 4: ipGTT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc entre variáveis independentes, pelo teste LSD (N=13 por grupo).

CTRL x TEST (GTT)				
T0	T60	T120	T180	T240
0,953401	0,000183	0,001947	0,005406	0,008764

4.4 Teste de Tolerância à Insulina (ipITT)

Os dados obtidos a partir dos experimentos de ipITT mostraram que, mesmo após a injeção de insulina (0,75 U/kg peso), a glicemia dos animais alimentados (83,45 mg/dL) não diminuiu, permanecendo constante após 15 ($115,0 \pm 13,4$ mg/dL), 30 ($105,8 \pm 22,4$ mg/dL), 45 ($115,3 \pm 21,4$ mg/dL) e 60 ($123,6 \pm 21,8$ mg/dL) min, como mostram a tabela 5 e a figura 4.

Tabela 5: ipITT. Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) da concentração de glicose sanguínea (mg/dl) de *D. rotundus* alimentados, medida antes (T0) e de 15 a 60 minutos (T15, T30, T45 e T60) após a administração de salina (CTRL) ou insulina (TEST). N=13 por grupo.

	T0			T15			T30			T45			T60		
	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP	m	DP	EP
CTRL	80,3	19,3	5,4	112,2	38,2	10,6	124,2	42,9	11,9	123,5	40,8	11,3	121,8	32,2	8,9
TEST	86,6	33,7	9,3	115,0	48,5	13,4	105,8	80,9	22,4	115,3	77,1	21,4	123,6	78,8	21,8

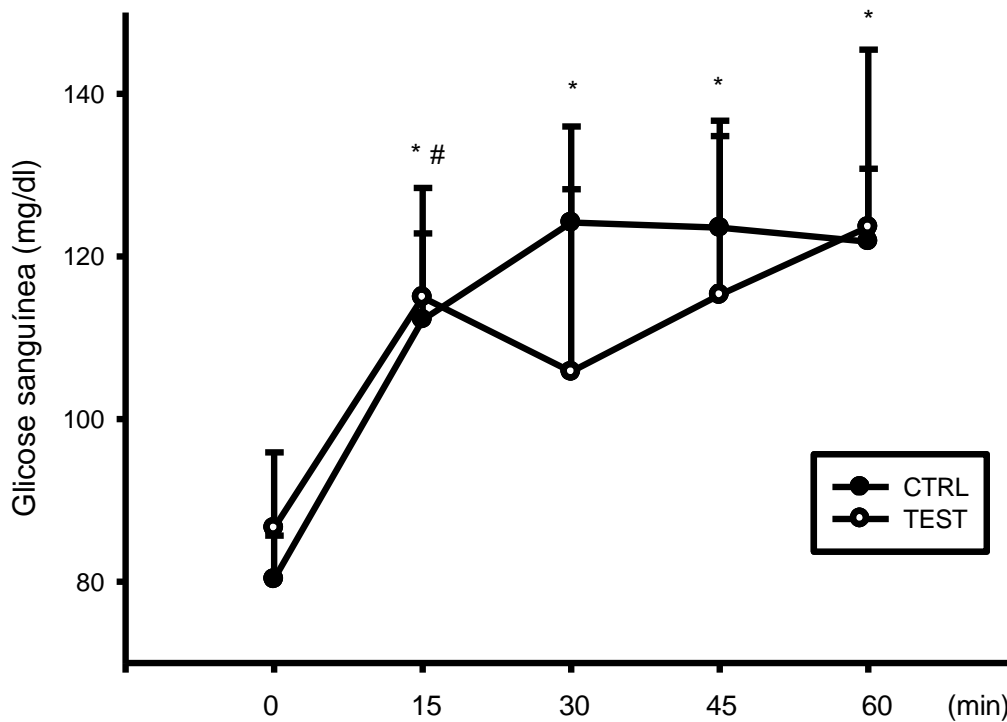


Fig 4. Teste de Tolerância à Insulina (ipITT) em *D. rotundus* alimentados. Os valores dos Grupos CTRL e TEST estão representados pela média \pm EP (representado apenas na metade superior). N = 13; * indica $p < 0,01$ nas comparações entre variáveis dependentes no grupo CTRL; # indica $p < 0,05$ nas comparações entre variáveis dependentes no grupo TEST, pelo teste post-hoc de Wilcoxon.

Tabela 6: ipITT. Resultados (valor de p) das comparações post-hoc entre variáveis dependentes, em relação a T0, pelos testes de Friedman ANOVA e Wilcoxon (N=13 por grupo).

Grupo CTRL (ITT)			
T15	T30	T45	T60
0,003729	0,002655	0,002977	0,002366
Grupo TEST (ITT)			
T15	T30	T45	T60
0,010747	0,382353	0,107974	0,054625

4.5 Concentração dos hormônios hiperglicemiantes

4.5.1 Glucagon plasmático

O glucagon plasmático foi determinado em morcegos alimentados e jejuados por 24 horas, como mostram a Figura 5 e a tabela 7.

A concentração de glucagon plasmático em morcegos alimentados teve média de 59,14 \pm 6,90 pg/mL. Após o jejum de 24 h, a concentração média de glucagon no plasma dos morcegos continuou constante (46,29 \pm 3,36 pg/mL).

Tabela 7: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de glucagon (GLCN, pg/mL) em morcegos alimentados (ALM) e jejuados por 24 horas (J24); N=7.

GLCN - ALM			GLCN - J24		
m	DP	EP	m	DP	EP
59,14	18,26	6,90	46,29	8,90	3,36

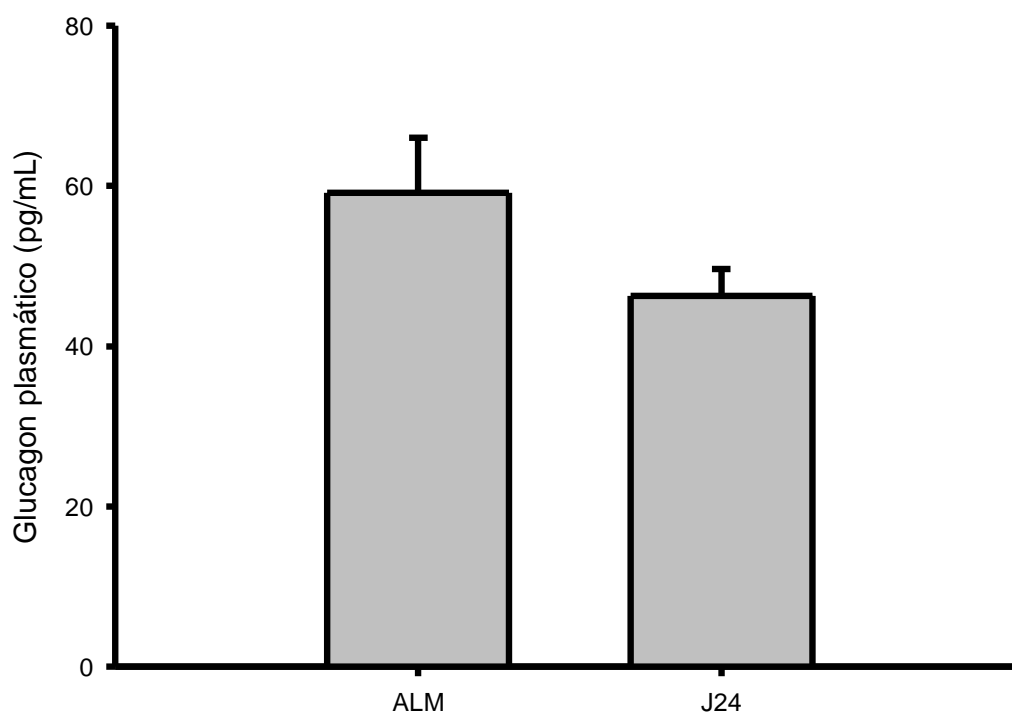


Fig 5. Concentrações plasmáticas de glucagon em *D. rotundus* alimentados e jejuados por 24 horas (ALM e J24, respectivamente). As colunas e as barras verticais representam a Média \pm EP. N=7 por grupo. P= 0,11989 resultante da comparação entre os grupos pelo teste *t*.

4.5.2 Cortisol plasmático

O cortisol plasmático foi determinado em morcegos alimentados e jejuados por 24 h, como mostram a figura 6 e a tabela 8.

A concentração de cortisol plasmático em morcegos alimentados foi $644,5 \pm 52,6$ $\mu\text{g/dL}$. Após o jejum de 24 h a concentração média de cortisol no plasma dos morcegos foi de $319,63 \pm 46,9$ $\mu\text{g/dL}$, valor significativamente menor ($p = 0,00017$), resultante da comparação entre os grupos pelo teste t , do que os valores encontrados em morcegos alimentados.

Tabela 8: Média, Desvio-padrão e Erro-padrão (m, DP e EP) das concentrações plasmáticas de cortisol (CRSL, $\mu\text{g/dL}$) em *D. rotundus* alimentados (ALM) e jejuados por 24 horas (J24); N=11.

CRSL - ALM			CRSL - J24		
m	DP	EP	m	DP	EP
644,5	174,5	52,6	319,6	155,6	46,9

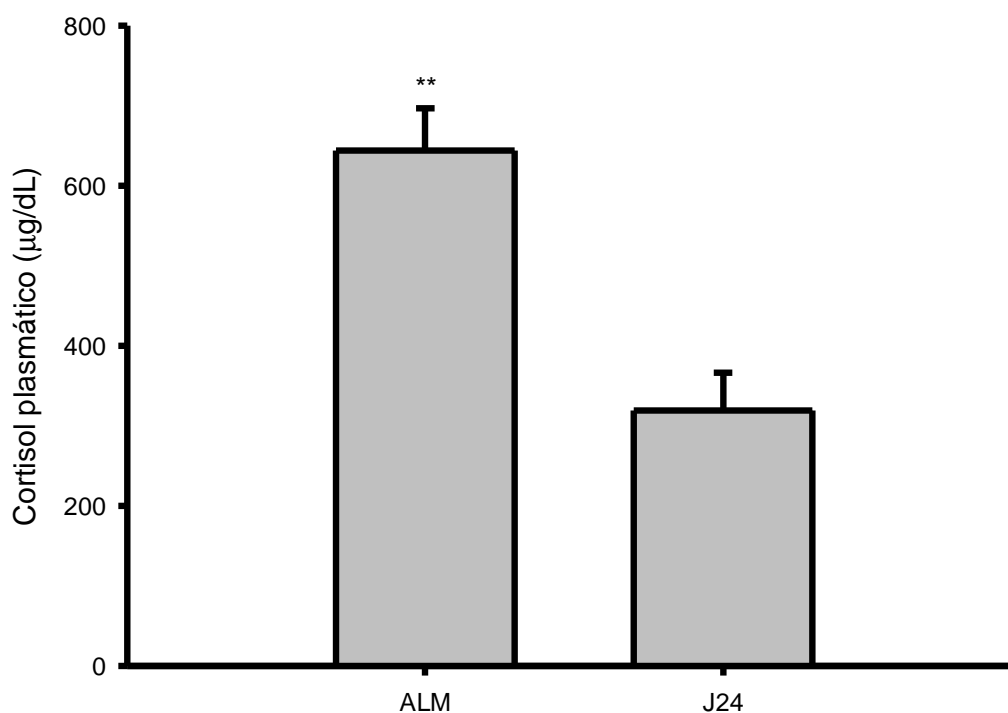


Fig 6. Concentrações plasmáticas de cortisol em *D. rotundus* alimentados e jejuados por 24 horas (ALM e J24, respectivamente). As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a Média \pm EP. N=11 por grupo; ** indica diferença altamente significativa ($p = 0,00017$), resultante da comparação entre os grupos pelo teste t .

Tabela 9: Resultados (valores de t e de p) do teste *t*, nas comparações entre *D. rotundus* alimentados e jejuados (ALM e J24), para cada hormônio.

Insulina (N=11)		Cortisol (N=11)		Glucagon (N=7)	
valor de t	valor de p	valor de t	valor de p	valor de t	valor de p
2,99	0,00722	4,61	0,00017	1,67	0,11989

4.6 A sinalização intracelular de insulina no músculo peitoral e no fígado (ERK e Akt):

4.6.1 Akt2 pAkt2

A Akt hepática não apresentou níveis de fosforilação significativamente diferentes em resposta à insulina, cinco (I 5') ou quinze minutos (I 15') após a administração intraperitoneal deste hormônio, em relação à salina (S), como mostra a figura 7.

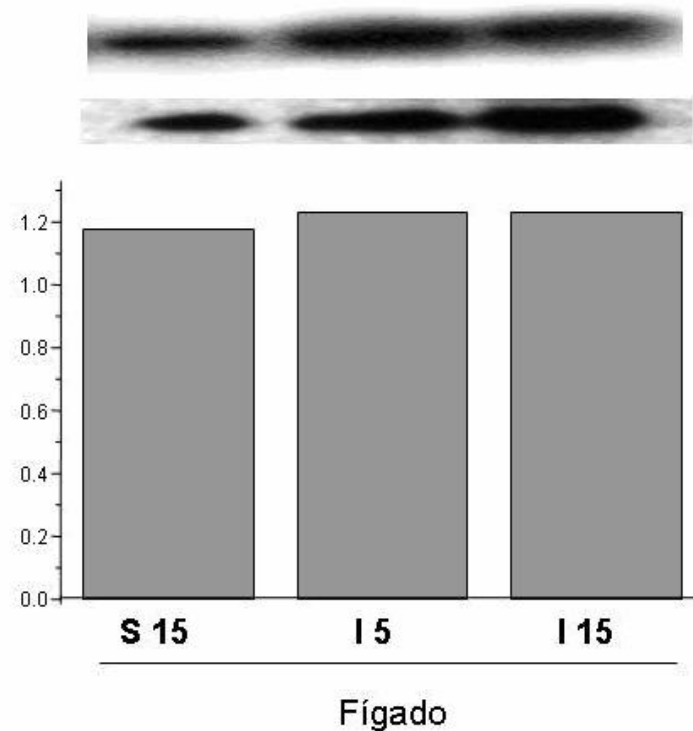


Fig 7. Descrição dos Resultados de fosforilação da AKT hepática cinco minutos após a injeção de salina (S) e após cinco (I 5') ou quinze minutos (I 15') a injeção de insulina. N= 9.

4.6.2 ERK₂/pERK₂

A ERK₂ apresentou resposta de fosforilação significativa à administração de insulina em relação à administração de salina, sendo que os níveis de fosforilação em resposta à insulina foram maiores em cinco minutos, se comparados com os níveis verificados aos quinze minutos, tanto no fígado quanto no músculo.

No músculo, o nível de fosforilação da ERK₂ cinco minutos após a administração de insulina foi 140% maior do que o nível verificado sem insulina (salina quinze minutos), e o nível verificado aos quinze minutos após injeção do hormônio não foi diferente do controle. No fígado, o nível de fosforilação aos cinco minutos após injeção de insulina aumentou 86% em relação ao controle, e o nível medido aos quinze minutos após a injeção do hormônio também não se mostrou diferente do controle.

Em *D. rotundus* os níveis dessa proteína são aparentemente maiores no músculo do que no fígado, como mostra a figura 8.

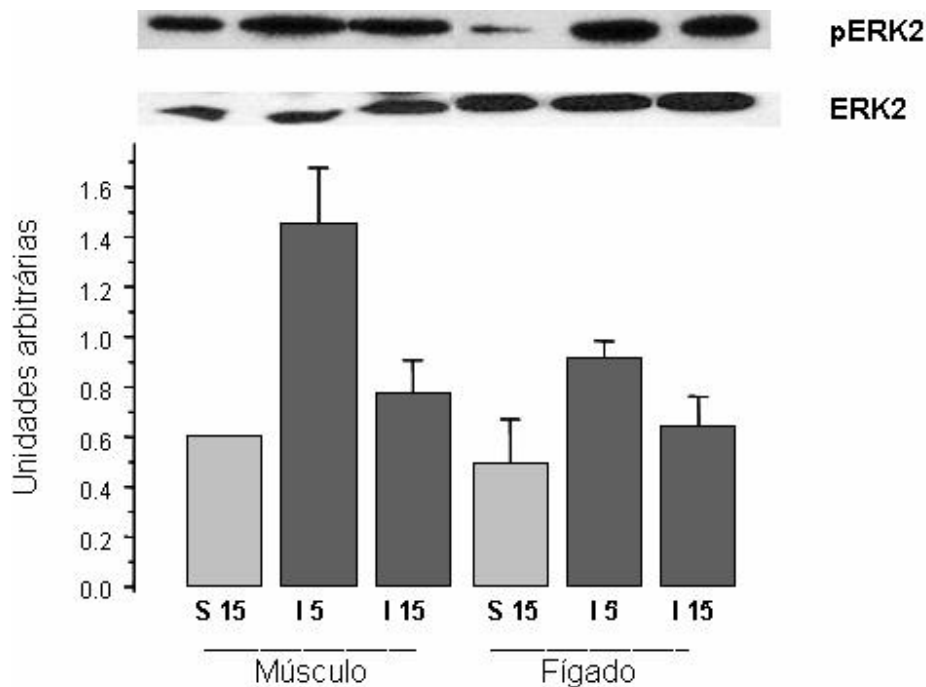


Fig 8. Descrição dos Resultados de fosforilação da ERK₂ muscular e hepática cinco minutos após a injeção de salina (S) e após cinco (I 5') ou quinze minutos (I 15') a injeção de insulina. N= 9.

5. Discussão

A concentração de insulina de morcegos alimentados (17,72 mUI/L) apresentou queda significativa após o jejum de 24 h (2 mUI/L), menos de 11% do apresentado por animais alimentados, sugerindo que a célula β pancreática de *D. rotundus* responde a uma queda da glicose circulante, como o normalmente visto em mamíferos (Amaral et al., 2004; Del Zotto, 2004; Giozetti et al., 2008; Rafacho et al., 2007; 2008). Porém, os níveis de insulina de *D. rotundus* tanto no estado alimentado quanto no jejum são inferiores aos observados na maioria dos mamíferos estudados até o momento (Bruttomesso et al., 1999; Lacroix et al., 2004; Lephart et al., 2004), inclusive humanos (Corrêa et al., 2007). A concentração plasmática de insulina em ratos alimentados por seis meses com uma dieta HP foi de $90,3 \pm 3,5$ mUI/L (Lacroix et al., 2004), ou seja, cinco vezes maior do que os níveis verificados em *D. rotundus*. Em humanos, os valores de referência para a insulina plasmática no jejum variam entre 5 e 15 mUI/L (Tavares et al., 2002), portanto, entre duas e sete vezes maiores do que os valores encontrados em *D. rotundus*.

As baixas concentrações de insulina plasmática verificadas pelos nossos experimentos e por Freitas (2005), que também verificou baixos níveis de insulina no pâncreas desta espécie, são corroboradas pelos resultados de morfometria e imunocitoquímica das ilhotas pancreáticas obtidos por essa autora (Freitas, 2005), que mostraram que as células β de *D. rotundus* são menores do que as de ratos e camundongos e que, possivelmente, possuem menor capacidade de secreção de insulina. Além disso, a autora (Freitas, 2005) mostrou que a área média das ilhotas de *D. rotundus* é de 4 a 5 vezes menor que a de roedores com peso corporal similar (Arantes et al., 2002). Mesmo em relação a camundongos sub-adultos desnutridos, que apresentam uma notável redução do peso corporal, da área média das ilhotas e da secreção de insulina (Arantes et al., 2002), as ilhotas de *D. rotundus* ainda apresentam uma área média três vezes menor (Freitas, 2005). Além disso, em condições normais, humanos e roedores apresentam o dobro de células β no interior das ilhotas proporcionalmente à área da ilhota amostrada, se comparados à *D. rotundus* (Freitas, 2005).

Estudos recentes feitos por McCurdy & Friedman (2006) e por Reusens & Remacle

(2006) mostraram que alterações na dieta materna seriam capazes de alterar o padrão de secreção de hormônios e da morfologia do pâncreas do feto. Estes autores observaram que um ambiente uterino pobre em glicose poderia acarretar diminuição do número de células β , diminuição da produção de insulina, resistência a este hormônio e intolerância à glicose. Como *D. rotundus* possui uma dieta muito pobre em glicose e muito rica em proteínas (a massa seca do sangue de bovinos possui 1% de glicose e 93,1% de proteínas) (Breidenstein, 1982), é possível que as pequenas concentrações de insulina verificadas no morcego-vampiro possam estar associadas ao tipo de dieta desta espécie, que propiciaria um ambiente intra-uterino pobre energeticamente. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o consumo de uma dieta rica em proteínas por ratos adultos também acarretaria diminuição das concentrações de insulina plasmática, da massa de ilhotas e resistência a este hormônio (Hammond e Janes, 1998; Linn et al., 2000; Lacroix et al., 2004; Lephart et al., 2004). Portanto, há fortes indícios de que o tipo de dieta consumida por *D. rotundus*, rica em proteínas e com baixo teor de carboidratos, poderia estar contribuindo para as baixas concentrações de insulina pancreática e plasmática, detectadas nos indivíduos dessa espécie.

Os altos níveis de AGL plasmáticos apresentados por *D. rotundus* alimentados (1,2 mmol/L) (Freitas et al., 2003), se comparados a outros mamíferos tanto com dietas HC, como ratos (0,5 mmol/L) (Almeida e Mello, 2004), humanos (0,4 mmol/L) (Issekutz et al., 1967) e morcegos frugívoros (0,7 mmol/L) (Pinheiro, 1995), quanto animais com dietas HP, como gatos (0,4 mmol/L) (Kettelhut, 1981), também poderiam exercer algum efeito sobre a secreção de insulina. Estudos demonstraram que a exposição prolongada das células β a altas concentrações de AGL plasmático poderia diminuir a secreção de insulina induzida por glicose, além de induzir resistência periférica e hepática a este hormônio (Mason et al., 1999; Grill e Qvigstad, 2000). Outro estudo feito por Gremlich et al. (1997) demonstrou que ilhotas pancreáticas de ratos submetidos a altas concentrações de AGL apresentaram redução de 70% no mRNA da insulina e na proteína PDX-1, fator de transcrição responsável pela diferenciação das células das ilhotas pancreáticas e pela transcrição do gene da insulina (Arantes et al., 2002).

Além disso, fatores genéticos também podem contribuir para esse padrão de baixa síntese e secreção de insulina. Terauchi et al. (2000) investigaram camundongos que apresentavam uma mutação no gene da glicoquinase, e observaram que esses animais nasciam com susceptibilidade a desenvolver resistência à insulina. Guillam et al. (1997) avaliaram camundongos com mutação no gene do GLUT-2 (transportador de glicose isoforma 2) e concluíram que esses animais perdiam a primeira fase de secreção de insulina (Arantes et al., 2002). É importante considerar que esses genes, que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de resistência à insulina, proporcionariam uma vantagem seletiva em um ambiente de escassez de alimento, como é o caso de *D. rotundus*, uma vez que essa condição fisiológica poderia auxiliar na manutenção da glicose na circulação por mais tempo.

Os níveis plasmáticos de insulina muito baixos, se comparados a outros mamíferos, nos levaram à verificação da secreção estática deste hormônio por fragmentos de pâncreas estimulados por seus principais secretagogos. Este experimento permitiu investigar se o mecanismo de secreção de insulina estaria preservado nestes morcegos, além de verificar se a ação de secretagogos considerados ideais para estimular a secreção de insulina em outros mamíferos seria capaz de promover a secreção deste hormônio por células pancreáticas de *D. rotundus*.

A glicose é o principal estímulo para a secreção de insulina em mamíferos, independente do tipo de dieta (Arantes et al., 2002; Wollheim e Maechler, 2002; Cardoso et al., 2007). Em ilhotas isoladas de ratos e camundongos, a secreção de insulina induzida por altas concentrações de glicose (16,5 mM) é, em média, de 600 a 1000% maior em relação a secreção verificada em ilhotas incubadas em meios contendo baixas concentrações (3,3 mM) desse substrato (Coore e Randle, 1964).

Além da glicose, alguns aminoácidos como leucina, arginina e alanina, além de AGL, cetoácidos e hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal podem, também, estimular a secreção de insulina (Coore e Randle, 1964; Amaral et al., 2002; Gao et al., 2003; Del Zotto et al., 2004; Hinault et al., 2006). Assim, esperava-se que, no estado alimentado, alguns aminoácidos provindos da dieta de *D. rotundus* fossem capazes de esti-

mular a secreção de insulina nesses animais (Carvalho et al., 2002; Watson e Pessin, 2006).

Os experimentos de secreção estática de insulina em ratos e camundongos são feitos, normalmente, utilizando-se ilhotas de Langerhans isoladas (Coore e Randle, 1964). Porém, em nosso trabalho, utilizamos fragmentos isolados de pâncreas pela dificuldade no reconhecimento e separação destas pequenas ilhotas em relação ao pâncreas exócrino do morcego vampiro, o que já havia sido verificado em estudos realizados por Freitas (2005). Experimentos de secreção de insulina utilizando-se fragmentos de pâncreas poderiam acarretar uma perda de cerca de 10 a 30% da liberação de insulina no meio pela ação de enzimas digestivas liberadas pelo pâncreas exócrino. Para evitar essa perda, os fragmentos de pâncreas foram incubados em meio contendo 2% de trasyolol, um importante inibidor de proteólise (Frey et al., 1950) evitando, assim, degradação enzimática das proteínas.

Nossos resultados mostraram que o pâncreas de *D. rotundus* apresentou aumento na taxa de secreção de insulina na presença de 5,6mM de glicose em relação à concentração basal desse substrato (2,8 mM). Porém, concentrações ainda maiores desse carboidrato (22,4 mM) não provocaram alteração na taxa de secreção de insulina em relação a secreção verificada após incubação com 5,6mM de glicose. O pâncreas também apresentou resposta secretória após incubação com o aminoácido leucina, presente em grande quantidade na dieta desse morcego, mas não respondeu à presença do íon K^+ . Estes resultados sugerem que a via de sinalização para a secreção de insulina, nesses animais, poderia ser diferente, pelo menos em parte, da conhecida para outros mamíferos, ou que poderia existir alguma falha nos mecanismos de transdução do sinal na célula β , o que impediria a secreção hormonal, ou levaria à pequena produção de insulina.

Miki et al. (1998) e Seghers et al. (2000) mostraram que ratos *knockout* para uma das subunidades do canal de potássio ATP-dependente (K_{ATP}) apresentam marcada redução da secreção de insulina estimulada por glicose (Wollheim e Maechler, 2002). Além disso, estudos feitos por Pende et al. (2000) mostraram que ratos com deficiência de S6 quinase 1 (S6K1), uma proteína da via de sinalização da insulina, apresentam diminuição do tamanho das células β , hipoinsulinemia e intolerância à glicose, semelhante ao que foi observado para *D. rotundus*.

Como a leucina é um regulador chave da via de sinalização mTOR, proteína que regula o crescimento celular em mamíferos, através de uma via de sinalização que envolve exatamente a proteína S6K1 e que pode desempenhar um importante papel na manutenção da massa de células beta *in vivo* (Xu et al., 2001), utilizamos esse aminoácido para estimular a secreção de insulina *in vitro*. Observamos que a leucina, assim como a glicose, apesar de estimular a secreção de insulina em *D. rotundus*, provocou a secreção de baixos níveis desse hormônio, o que poderia sugerir alguma deficiência na via de sinalização que envolve a proteína S6K1, próximo ao que foi observado por Pende et al. (2000) em ratos.

O K^+ não foi capaz de estimular a secreção de insulina. Os níveis de insulina verificados após a estimulação com 30mM de K^+ + 2,8mM de glicose foram tão baixos quanto os níveis verificados frente à estimulação com apenas 2,8mM de glicose, o que sugere que as ilhotas pancreáticas de *D. rotundus* parecem não responder ao aumento na concentração de K^+ . Esse resultado sugere que o mecanismo de secreção de insulina em *D. rotundus* deve ser diferente do observado para os outros mamíferos.

As baixas concentrações plasmáticas de insulina e a pequena resposta *in vitro* a estimulação por glicose, mesmo em altas concentrações, observadas em *D. rotundus* nos levou a testar se esses animais responderiam a uma sobrecarga de glicose *in vivo*, através de um Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT).

Os resultados obtidos a partir dos experimentos com o Teste de Tolerância à Glicose mostraram que 60 min após a injeção da mesma, a glicemia de animais jejuados por 12h (78 mg/dL) aumentou cerca de 400%, chegando a níveis acima de 300 mg/dL. E após 120, 180 e 240 min da injeção da solução de glicose, a glicemia não diminuiu significativamente, o que difere do observado em ratos e camundongos, os quais têm o retorno da glicemia para valores basais já aos 120 min após a injeção de glicose (Lian et al., 2007; Rafacho et al., 2007; Giozetti et al., 2008). Porém, corroboram os resultados obtidos neste trabalho e por Freitas (2005), que demonstram que *D. rotundus* possui baixa concentração plasmática de insulina, o que poderia impedir a captação eficiente de uma sobrecarga de glicose. Assim, os resultados do ipGTT apontam para uma intolerância à glicose nestes animais, o que poderia ser consequência das baixas concentrações de insulina observadas.

A diminuição da secreção de insulina poderia, por sua vez, ter sido provocada por diminuição da população de células β ou por perda de resposta secretória por parte dessas células (Rafacho et al., 2008). Os resultados descritos anteriormente, como a pequena concentração de insulina plasmática e ausência de resposta secretória das ilhotas, parecem justificar a intolerância à glicose observada nesses morcegos.

Este padrão metabólico caracterizado por baixas concentrações de insulina e intolerância à glicose poderia estar associado a uma estratégia adaptativa, que garantiria maiores níveis de glicose circulantes disponíveis para o Sistema Nervoso pelo maior tempo possível, já que a imprevisibilidade da próxima alimentação é inerente.

Com a finalidade de se verificar se, além dos baixos níveis de insulina circulantes, também haveria resistência periférica a este hormônio, o que ocorre quando há diminuição da sinalização deste hormônio nos tecidos-alvo (Rafacho et al., 2008), procedemos, inicialmente, ao Teste de Tolerância à Insulina (ipITT).

Os dados obtidos a partir do ipITT mostraram que após a injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg peso), a glicemia dos animais alimentados (aproximadamente 88 mg/dL) não diminuiu, permanecendo constante após 15, 30, 45 e 60 min da injeção deste hormônio. Esses resultados contrastam com o observado em ratos e camundongos, os quais apresentam uma queda imediata da glicemia, atingindo valores abaixo de 60mg/dL, após injeção de insulina na mesma concentração (Lian et al., 2007). Esses dados sugerem que *D. rotundus* parece não responder adequadamente a este hormônio, apresentando, portanto, um quadro fisiológico de resistência à insulina. Vale ressaltar que, apesar dos múltiplos efeitos metabólicos deste hormônio, o termo “resistência à insulina“ usualmente se refere a sua ação sobre a homeostase glicêmica (Saad, 1994; Ferrannini et al., 1999). A causa desta aparente resistência à insulina poderia, também, estar associada ao consumo por longo prazo de uma dieta rica em proteínas (Hammond e Janes, 1998; Linn et al., 2000; Lacroix et al., 2004; Lephart et al., 2004), como citado anteriormente. Lacroix et al. (2004) já haviam demonstrado que ratos alimentados com uma dieta HP, por seis meses, apresentavam resistência a este hormônio. Além disso, o morcego vampiro apresenta níveis elevados de ácidos graxos plasmáticos (Freitas et al., 2003), o que poderia alterar o padrão de secreção de insulina e estar envolvido na indução de resistência periférica a este hormô-

nio (Gremlich et al., 1997; Mason et al., 1999; Grill e Qvigstad, 2000). Como o ipITT sugeria que *D. rotundus* poderia apresentar resistência periférica à insulina, resolvemos investigar duas das proteínas envolvidas na sinalização intracelular desse hormônio em seus tecidos alvo, sendo elas a Akt e a ERK.

A Akt ativada fosforila substratos que controlam vários processos biológicos ativados pela insulina, incluindo captação de glicose, síntese de proteína, síntese de glicogênio, além de proliferação e sobrevivência celular (Brunet et al., 1999). Existem três isoformas desta enzima em mamíferos: Akt1 (PKBa), Akt2 (PKBb) e Akt3 (PKBg) que apresentam uma ampla distribuição pelos tecidos (Vanhaesebroeck e Alessi, 2000). Akt1 é a mais amplamente distribuída, Akt2 é expressa principalmente em tecidos sensíveis a insulina e Akt3 é expressa predominantemente em testículos e no cérebro (Zdychova e Komers, 2005).

O anticorpo utilizado em nossos experimentos de ‘western blot’ seria capaz de detectar a presença de qualquer uma das três isoformas, no entanto, pela análise do peso molecular e de acordo com a distribuição característica de cada isoforma concluímos que, em nossos experimentos, foi verificada apenas a presença da Akt2 nas amostras de fígado analisadas.

Em nossos experimentos com tecido hepático, a Akt não apresentou nenhuma diferença de fosforilação em resposta à estimulação por insulina. Como a Akt atua, principalmente, via PI-3 quinase que, por sua vez, é ativada pelos substratos responsivos à insulina (IRSs) e, uma vez que *D. rotundus* parece apresentar resistência periférica à insulina, é possível que a sinalização deste hormônio, representada por toda ativação de mensageiros decorrente da ligação da insulina ao seu receptor esteja diminuída, o que poderia resultar em perda da eficiência desta sinalização. Cusi et al. (2000) já haviam observado que a resistência à insulina, em humanos, afeta a via de sinalização deste hormônio, que ocorre pela ativação de PI-3k. Este resultado parece corroborar a resistência periférica à insulina sugerida pelo ipITT.

Como visto na literatura, é esperado um aumento da fosforilação da Akt e da ERK em resposta à insulina, visto que estas enzimas funcionam como mensageiros desse hormônio (Howe et al., 2002; Sakamoto e Goodyear, 2002; Roux e Blenis, 2004). No caso

específico da Akt, a ausência de variação nos níveis de fosforilação parece reforçar o quadro de resistência periférica à insulina sugerido para *D. rotundus*.

Por outro lado, a ERK, proteína da via MAPK da sinalização da insulina, respondeu normalmente a este hormônio, apresentando maior fosforilação em resposta à insulina aos 5 min, tanto no músculo quanto no fígado. A fosforilação da ERK pareceu ser maior no tecido muscular do que no fígado, o que é, no entanto, uma informação relativa, já que esta via ocorre em tecidos variados com funções específicas em cada um deles podendo, portanto, apresentar níveis de fosforilação diferentes em cada tecido (Jonhson e Lapadat, 2002; Roux e Blenis, 2004). A via de sinalização das ERKs 1/2 está envolvida principalmente na proliferação celular (Roux e Blenis, 2004) mas, também, está associada à transcrição gênica, crescimento e diferenciação celular (Lingohr et al., 2002), promoção da diferenciação de mioblastos no músculo esquelético (Chuang et al., 2000), e aumento da captação de glicose (Viana et al., 2006). No fígado, a ERK atua estimulando o catabolismo lipídico e inibindo neoglicogênese (Viana et al., 2006). Como verificamos fosforilação da ERK em resposta à insulina, é provável que os efeitos decorrentes da ativação desta enzima, tanto no fígado quanto no músculo, estejam preservados em *D. rotundus*.

Uma possível explicação para a resposta da ERK à insulina em *D. rotundus*, animais que apresentam resistência periférica a este hormônio (como sugerido no ipITT), é que esta resistência poderia não afetar esta via de sinalização *in vivo*, semelhante ao que ocorre em humanos (Cusi, 2000). Já a ausência de resposta da Akt à presença de insulina, como dito anteriormente, poderia decorrer do fato de que a via da PI 3-quinase, da qual esta enzima participa, é afetada pela resistência à insulina (Cusi et al., 2000).

Embora com menor concentração de insulina plasmática e pancreática e aparente resistência a este hormônio, *D. rotundus* não apresentou hiperglicemia no estado alimentado ou em resposta ao jejum. Aliás, *D. rotundus* apresentou hipoglicemia severa no jejum de 24h (Freitas et al., 2003), o oposto ao esperado para esse padrão hormonal. A hipoglicemia de jejum observada por Freitas et al. (2003) sugere que *D. rotundus* parece, também, apresentar alguma falha na resposta contra-regulatória e/ou na secreção dos hormônios hiperglicemiantes, como glucagon e cortisol, normalmente mais ativos em situa-

ções de baixa secreção ou ausência de insulina. Para verificar se a hipoglicemia de jejum era capaz de estimular a secreção de hormônios hiperglicemiantes, determinamos as concentrações de glucagon e cortisol no plasma de *D. rotundus* alimentados e jejuados.

Os níveis de glucagon plasmático apresentados por *D. rotundus* alimentados (59,14 pg/mL) foram menores do que os observados na maioria dos outros mamíferos (Usami et al., 1982; Wasserman et al., 1989), incluindo humanos (Muller et al., 1990). Usami et al. (1982) verificaram que os níveis de glucagon no jejum apresentados tanto por ratos de dieta HC quanto HP foram de 120 ± 7 pg/ml e 123 ± 7 pg/ml, respectivamente. O glucagon basal de humanos é em torno de 92 ± 15 pg/mL (Muller et al., 1990) e o de cães de 67 ± 6 pg/ml (Wasserman et al., 1989). A baixa concentração de glucagon encontrada no plasma destes animais no estado alimentado corrobora os resultados de menor área média das ilhotas e do reduzido número de células β observado no pâncreas de *D. rotundus* por Freitas (2005), que mostrou que o morcego vampiro apresenta, em média, 33,8% da ilhota composta por células β e 8,7% composta por células α . Humanos, camundongos e ratos apresentam uma porcentagem de células α e β quase duas vezes maior do que a observada em *D. rotundus* (Freitas, 2005).

Normalmente, mamíferos apresentam um aumento da secreção de glucagon em resposta a diminuição dos níveis de insulina plasmática (Jiang e Zhang, 2003). Em *D. rotundus*, os níveis de glucagon plasmático mantiveram-se constantes na resposta ao jejum, apesar da redução de quase 90% dos níveis de insulina em relação ao estado alimentado (Fig 5). Portanto, a redução na concentração plasmática de insulina ou a hipoglicemia em *D. rotundus* não foram capazes de influenciar a secreção do glucagon.

Por outro lado, os altos níveis de cortisol plasmáticos verificados em *D. rotundus* alimentados colocam essa espécie entre os mamíferos com os maiores níveis de hormônios glicocorticóides conhecidos. A maioria dos mamíferos tem níveis de cortisol mais baixos do que os apresentados por *D. rotundus* tanto alimentados (644,5 μ g/dL) quanto em jejum de 24h (319,6 μ g/dL), como por exemplo: cavalo (1,30 μ g/dL); carneiro (2,24 μ g/dL); cabra (2,35 μ g/dL); porco (2,97 μ g/dL) (Kaneko et al., 1997) e vaca (3,29 μ g/dL) (Vasquez e Herrera, 2003).

Apenas em alguns macacos provenientes do continente americano, e em duas espécies de morcegos frugívoros (Widmaier e Kunz, 1993) foram encontrados níveis de glicocorticóides comparáveis aos encontrados nesses morcegos (Saltzman et al., 1994; Boere et al., 2005). Os níveis de cortisol plasmático em *Callithrix jacchus* e outros macacos da América são de cinco a dez vezes maiores do que os encontrados em primatas da Europa, Ásia, África, e também humanos. As concentrações basais de cortisol plasmático em fêmeas de *Callithrix jacchus*, locadas em pares heterossexuais, ficaram em torno de $214 \pm 21,5$ µg/dl, podendo chegar a até $422,7 \pm 38,5$ µg/dl na fase reprodutiva (Saltzman et al., 1994). Em *Callithrix penicillata* jovens, o cortisol ficou em torno de $92,27 \pm 18,11$ µg/dL e, em adultos, por volta de $117,09 \pm 15,59$ µg/dL (Boere et al., 2005). Como esses animais não apresentam a maioria dos efeitos esperados pelo aumento da concentração de glicocorticóides, tanto *Callithrix jacchus* quanto *Callithrix penicillata* são considerados resistentes a glicocorticóides (Chrousos et al., 1982) por mecanismos ainda não esclarecidos. Os estudos feitos por Widmaier e Kunz (1993) sugerem que os morcegos também poderiam ser resistentes ao efeito dos glicocorticóides, assim como alguns primatas. Os níveis de cortisol basal de duas espécies de morcegos frugívoros mantidas em cativeiro, *Pteropus vampyrus* e *Pteropus hypomelanus* apresentaram valores de $59,6 \pm 6,7$ µg/dL e $126,9 \pm 20,7$ µg/dL, respectivamente. No entanto, os autores sugeriram que, embora os níveis de cortisol fossem altos nas duas espécies, seria necessária uma quantificação da proporção de cortisol ligado/cortisol livre no plasma, para se verificar a real concentração e atividade desse hormônio na circulação. Isso se deve ao fato de que os hormônios esteróides no estado ligado não teriam efeitos teciduais imediatos, pois seriam tamponados por suas ligações com as proteínas plasmáticas. Assim, embora essas espécies de morcegos, assim como *D. rotundus*, tenham níveis de cortisol no plasma mais altos, sua possível ligação com globulinas plasmáticas poderia manter níveis normais de hormônio livre (ativo). Não se pode descartar, no entanto, a possibilidade de que este hormônio poderia estar em sua forma livre nesses animais, porém, com baixa eficiência em suas ações.

Não se deve, também, desconsiderar que outros fatores como a manipulação, o transporte e a manutenção em cativeiro desses animais poderiam ter influenciado os níveis

de cortisol circulante, pois todos esses eventos são muito estressantes e poderiam estimular a secreção de glicocorticóides (Christiansen et al., 2007). Widmaier e Kunz (1993) verificaram em *P. vampyrus* e *P. hypomelanus* os níveis de cortisol basal, imediatamente após a captura dos animais, encontrando níveis elevados, porém 50% mais baixos quando comparados aos valores encontrados quando nenhum esforço foi feito para minimizar o estresse causado pela manipulação dos animais antes das dosagens hormonais. Nesse estudo, os pesquisadores demonstram que a manipulação dos animais por apenas 15 minutos já estaria associada à elevação dos níveis plasmáticos de cortisol.

Em nosso estudo, para minimizar o estresse no cativeiro, os animais foram mantidos no escuro, em gaiolas individuais (25x30x45cm) adaptadas à sua posição de repouso, à temperatura ambiente.

Normalmente, mamíferos terrestres submetidos ao estresse e a extensos períodos de restrição alimentar apresentam um aumento na concentração plasmática de glicocorticóides (Santos et al., 2007). Nossos resultados, porém, demonstraram que o jejum de 24h provocou uma diminuição significativa dos níveis de cortisol plasmáticos (319,6 µg/dL). Isto sugere que, nesta espécie, o cortisol não deve participar da manutenção da homeostase glicêmica durante o jejum, como ocorre normalmente em mamíferos (Rafacho et al., 2007; 2008).

Os altos níveis de glicocorticóides verificados em *D. rotundus* poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina verificada nesta espécie (Andrews e Walker, 1999; Rafacho et al., 2007; 2008), pois já foi observado que o excesso de glicocorticóides causa resistência à insulina em músculo esquelético de ratos, pela inibição direta da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (Dimitriadis et al., 1997; Santos et al., 2007).

6. Conclusões

A concentração de insulina plasmática verificada em *D. rotundus*, alimentados e em jejum de 24 horas, foi inferior à observada na maioria dos mamíferos estudados até o momento (Bruttomesso et al. 1999; Lephart et al., 2004; Lacroix et al., 2004), inclusive humanos (Corrêa et al., 2007). Aspectos da morfologia das ilhotas e o tipo de dieta apresentada por essa espécie poderiam estar diretamente relacionados às baixas concentrações de insulina encontradas. Outros fatores, como os altos níveis de AGL plasmáticos apresentados pelo morcego vampiro alimentado (Freitas et al., 2003) e fatores genéticos também poderiam ter contribuído para esse padrão diferenciado de baixa síntese e secreção de insulina de *D. rotundus*.

Os resultados do ipITT sugerem que, além de baixas concentrações de insulina, *Desmodus rotundus* apresentaria resistência periférica a este hormônio. As causas desta aparente resistência à insulina poderiam estar associadas: ao ambiente intra-uterino energeticamente pobre; ao consumo por longo prazo de dieta rica em proteínas (Hammond e Janes, 1998; Linn et al., 2000; Lephart et al., 2004; Lacroix et al., 2004); e/ou aos níveis elevados de ácidos graxos plasmáticos (Freitas et al., 2003) verificados nesta espécie. Os resultados obtidos a partir do ipGTT sugerem, ainda, que esses morcegos apresentam intolerância à glicose.

Além dos baixos níveis de insulina plasmática, a verificação da secreção estática deste hormônio por fragmentos de pâncreas estimulados por seus principais secretagogos mostrou que as células β de *D. rotundus* apresentam aumento na taxa de secreção de insulina em resposta à glicose e ao aminoácido leucina, mas não respondem ao íon K^+ . Esses resultados sugerem que a via de estimulação da secreção de insulina, nesses animais, poderia ser, pelo menos em alguns pontos, diferente da observada em outros mamíferos ou que poderia haver alguma falha no mecanismo de transdução do sinal na célula β .

O fato de *D. rotundus* não apresentar hiperglicemia no estado alimentado ou durante o jejum (Freitas, 2005), característico em animais que possuem baixa concentração de insulina plasmática e pancreática, e de apresentar uma possível resistência periférica a este hormônio, poderia estar associado aos resultados encontrados a partir das determinações de

glucagon e cortisol plasmáticos e da verificação das enzimas da via de sinalização da insulina. As baixas concentrações de glucagon plasmático, verificadas em *D. rotundus* alimentados e em jejum de 24 h, poderiam explicar a ausência da resposta contra-regulatória na ausência de insulina e a hipoglicemia observadas nesses animais no jejum. Além disso, embora esses animais apresentem altos níveis de cortisol plasmáticos, a queda das concentrações desse hormônio no jejum sugere que o mesmo deva ter importância menor na manutenção da homeostase glicêmica, ao contrário do normalmente visto em mamíferos (Rafacho et al., 2007, 2008). Mesmo assim, as altas concentrações de cortisol presentes no plasma desses animais poderiam estar colaborando com a possível resistência periférica à insulina, também observada neste trabalho.

Embora grande parte de nossos resultados sugira que *D. rotundus* deva possuir deficiência na sinalização da insulina em tecidos-alvo, o aumento da expressão da ERK em resposta à estimulação por esse hormônio parece indicar que algumas vias de sinalização desse hormônio poderiam estar presentes nesses animais. Assim, o aumento da expressão da ERK poderia estar associado a outros eventos intracelulares que não a resistência periférica a este hormônio, o que já foi visto em humanos (Cusi et al., 2000). Já a ausência de expressão da Akt em resposta à estimulação tecidual pela insulina poderia decorrer do fato de que a via da PI 3-quinase, da qual esta enzima participa, é uma das envolvidas na resistência periférica à insulina (Cusi et al., 2000).

O padrão metabólico visto para *D. rotundus*, de baixas concentrações de insulina e intolerância à glicose, se comparado ao observado para a maior parte dos mamíferos, seria considerado “ineficiente” para a manutenção da homeostase glicêmica. Porém, este padrão poderia fazer parte de uma adaptação fisiológica específica, constituindo uma estratégia para garantir maiores níveis de glicose circulante pelo maior tempo possível, já que esta espécie lida com a possibilidade constante de insucesso no forrageamento.

Finalmente, embora *D. rotundus* enfrente, freqüentemente, a possibilidade de falha no forrageamento e conseqüente morte por hipoglicemia, observa-se uma grande densidade demográfica dessa espécie. Esta aparente contradição pode ser explicada pela existência do comportamento denominado compartilhamento recíproco do alimento, comportamento solidário observado inicialmente por Wilkinson (1984), onde um animal que não conseguiu

se alimentar por uma noite pode receber sangue de outros morcegos da mesma unidade social, através da regurgitação. Esse padrão comportamental, aliado à grande massa de presas (principalmente bovinos) e, possivelmente, a menor captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina, poderia compensar as diferenças metabólicas observadas entre esses animais e a maior parte dos mamíferos.

7. Referências Bibliográficas

- AINSCOW E.K.; RUTTER G.A. Mitochondrial priming modifies Ca^{2+} oscillations and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochem. J.* 353:175–180, 2001.
- ALMEIDA, P. B. L.; MELLO, M. A. R. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.*, 18 (1): 17-30, 2004.
- ALTRIGHAM, J. D. *Bats: biology and behaviour*. Oxford University Press. Inc. New York, 1996, 262 p.
- AMARAL, M.E.; CUNHA, D.A.; ANHE, G.F.; CARNEIRO, E.M.; VELLOSO, L.A.; BORDIN, S.; BOSCHERO, A.C. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J. Endocrinol.*, 183(3): 469-476, 2004.
- ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical Science*, 96: 513-523, 1999.
- ARANTES, V.C.; TEIXEIRA, V.P.; REIS, M.A.; LATORRACA, M.Q.; LEITE, A.R.; CARNEIRO, E.M.; YAMADA, A.T.; BOSCHERO, A.C. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J.Nutr.*132 (10): 3030-3045, 2002.
- AVRUCH, J.; KHOKHLATCHEV, A.; KYRIAKIS, J.M.; LUO, Z.; TZIVION, G.; VAVVAS, D. e ZHANG, X-F. Ras activation of the raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.*, 56: 127 – 156, 2001.
- BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. *Curr. Paediatr.*, 16: 434-438, 2006.
- BERNAL-MIZRACHI E, WEN W., STAHLHUT S, WELLING CM, PERMUTT MA. Islet β -cell expression of constitutively active Akt1/PKB induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* 108:1631-1638, 2001.

- BLOUET, C.; MARIOTTI, F.; AZZOUT-MARNICHE, D.; BOS, C.; MATHÉ, V.; TOMÉ D.; HUNEAU, J. F. The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J. Nutr.*, 136: 1849-1854, 2006.
- BOERE, V.; PINHEIRO, E.C.; DE OLIVEIRA E SILVA, I.; PALUDO, G.R.; CANALE, G.; PIANTA, T.; WELKER, A. E ROCHA-DE-MOURA, R.C. Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). *J. Med Primatol.*, 34: 156-162, 2005.
- BORREBAEK, B.; CHISTOPHERSEN, B. Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comp. Biochem. Mol. Biol.* 125(3): 387-393, 2000.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and 86Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. *FEBS Lett*, 236:375–379, 1988.
- BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Rev. Bras. Zool.*, 16 (3): 731-770, 1999.
- BREIDENSTEIN, C. P. Digestion and assimilation of bovine blood by a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J. Mamm.*, 63 (3): 482-484, 1982.
- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M.J.; LIN, M.Z.; JUO, P.; HU, L.S.; ANDERSON, M.J.; ARDEN, K.C.; BLENIS, J.; GREENBERG., M.E. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96: 857–868, 1999.
- BRUTTOMESSO, D.; PIANTA, A.; MARI, A.; VALERIO, A; MARESCOTTI, M-C.; AVOGARO, A.; TIENGO, A.; PRATO, S. Restoration of early rise in plasma insulin levels improves the glucose tolerance of type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 48: 99-105, 1999.

- CALERA, M.R.; MARTINEZ, C.; LIU, H.; JACK, A.K.E.; BIRNBAUM, M.J.; PILCH, P.F. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4 containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 273: 7201–72043, 1998.
- CARDOSO D. E.; FRANÇA, L.P.; CHINEN, E.; MORAES, A.A.F.S.; FERREIRA, A.T.; FRANÇA, J.P. Avaliação morfológica e dos mecanismos de mobilização de Ca²⁺ pela glicose e acetilcolina em células pancreáticas humanas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 51(3): 431-436, 2007.
- CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 46 (4): 419-425, 2002.
- CHRISTIANSEN, J.J.; DJURHUUS, C.B.; GRAVHOLT, C.H.; IVERSEN, P.; CHRISTIANSEN, J.S.; SCHMITZ, O.; WEEKE, J.; JØRGENSEN, J.O.L.; MØLLER, N. Effects of cortisol on carbohydrate, lipid, and protein metabolism: studies of acute cortisol withdrawal in adrenocortical failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(9):3553–3559, 2007.
- CHROUSOS, G.P.; RENQUIST, D.; BRANDON, D.; EIL, C.; PUGHEAT, M.; VIGERSKY, R.; CUTLER JR, G.B.; LORIAUX, D.L.; LIPSETT, M.B. Glicocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediate mechanisms. *Proc Nat Acad Sci USA*, 79: 2036-2040, 1982.
- CHUANG, S-M.; WANG, I-C.; YANG, J-L. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases. *Carcinogenesis*, 21 (7) 1423-1432, 2000.
- COOK D.L.; HALES C.N. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311:271–273, 1984.
- COORE, H.G.; RANDLE, P.J. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated *in vitro*. *Biochem. J.*, 93(1): 66-78, 1964.
- CORRÊA, F.H.; NOGUEIRA, V.G.; BEVILÁQUA M.F.; GOMES, M.B. Avaliação da secreção e resistência insulínica em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose- do metabolismo normal ao Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 51(9): 1498-1505, 2007.

- CORSSMIT, E. P.; ROMIJN, J. A.; SAUERWEIN, H. P. Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism*, 50 (7): 742-755, 2001.
- CRYER, P. E. Regulation of glucose metabolism in man. *J. Intern. Med.*, 229: 31-39, 1991.
- CUSI, K.; MAEZONO, K.; OSMAN, A.; PENDERGRASS, M.; PATTI, M.E.; PRATIPANAWATR, T.; DEFRONZO, R.A.; KAHN, C.R.; MANDARINO, L.J. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.*, 105(3): 311-320, 2000.
- DEL ZOTTO, H.; BORELLI, M.I.; FLORES, L.; GARCIA, M.E.; GOMEZ DUMM, C.L.; CHICCO, A.; LOMBARDO, Y.B.; GAGLIARDINO, J.J. Islet neogenesis: an apparent key component of long-term pancreas adaptation to increased insulin demand. *J. Endocrinol.*, 183(2): 321-330, 2004.
- DIMITRIADIS, G.; LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; SASSON, S.; YOUNG, M.; KRAUSE, U.; BEVAN, S.; PIVA, T.; WEGENER, G.; NEWSHOLME, E.A. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, 321: 707-712, 1997.
- EISENSTEIN, A. B.; STRACK, I. Effect of high protein feeding on gluconeogenesis in rat liver. *Diabetes*, 20 (9): 577-585, 1971.
- FELIG, P. Starvation. *Endocrinol.* (ed. L. J. DeGroot), pp. 1927-1940. New York: Grune and Stratton, 1979.
- FERRANNINI E, GALVAN AQ, GASTALDELLI A, CAMASTRA S, SIRONI AM, TOSCHI E, BALDI, S.; FRASCERRA, S.; MONZANI, F.; ANTONELLI, A.; NANNIPIERI, M.; MARI, A.; SEGHERI, G.; NATALI, A. Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur J Clin Inv.*, 29(10): 842-852, 1999.
- FREITAS, M. B. 2000. Metabolismo energético do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Dissertação (Mestrado em biologia animal), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2000.

- 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*, 173: 703-707, 2003.
- FREITAS, M. B. 2005. Respostas Metabólicas e Hormonais induzidas pelo Jejum em *Desmodus rotundus*: Implicações Relativas à Susceptibilidade da Espécie. Tese (Doutorado em biologia animal), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2005.
- FREY, E. K.; KRAUT, H.; WERLE, E. Kallikrein-Padutin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Alemanha, 1950.
- GAO, Z.; YOUNG, R.A.; LI, G.; NAJAFI, H.; BUETTGER, C.; SUKUMVANICH, S.S.; WONG, R.K.; WOLF, B.A.; MATSCHINSKY, F.M. Distinguishing features of leucine and α -ketoisocaproate sensing in pancreatic β -cells. *Endocrinology*, 144 (5): 1949–1957, 2003.
- GAZOLA, V. A. F. G.; 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*, 21: 320-325, 2007.
- GENUTH, S. For aggressive preventive management of type 2 Diabetes. What is the evidence and is it enough? *J. Farm. Pract.*, 47 (5): S23-26, 1998.
- GIOZZET, V.A.G; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSQUEIRO, J.R. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabolism*, 57 (2008) 617–624, 2008.
- GLASS, G.V.; HOPKINS, K.D. Statistical methods in psychology and education, 3° ed., Boston: Allyn & Bacon, 1996.
- GRAPENGIESSER, E.; GYLFE, E.; HELLMAN, B. Glucose effects on cytoplasmic Ca^{2+} of individual pancreatic β cells recorded by two procedures for dual-wavelength fluorometry. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 93:321–327, 1989.
- GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U.; SEIDEL, M. R. *Desmodus rotundus*. *Mamm. Species*, 202: 1-6, 1983.

- GREMLICH, S., BONNY, C., WAEBER, G.; THORENS B. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J. Biol. Chem.*, 272: 30261–30269, 1997.
- GRILL, V.; QVIGSTAD, E. Fatty acids and insulin secretion. *Br. J. Nutr.* 83(1): S79–S84, 2000.
- GUILLAM, M.T.; HUMMLER, E.; SCHAEERER, E.; YEH, J.I.; BIRBNBAUM, M.J.; BEERMANN, F.; SCHMIDT, A.; DERIAZ, N.; THORENS, B.; WU, J.Y. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat. Genet.*, 17: 327-330, 1997.
- GYLFE, E. Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol. Lat.* 13: 20–24, 1976.
- HABER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 45 (3): 219-227, 2001.
- HAJDUCH, E.; BALENDRAN, A.; BATTY, I.H.; LITHERLAND, G. J.; BLAIR, A.S.; DOWNES, C.P.; HUNDAL, H. S. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetol.*, 44: 173–183, 2001.
- HAMMOND, K.A.; JANES, D.N. The effects of increased protein intake on kidney size and function. *J. Exp. Biol.*, 201(13): 2081-2090, 1998.
- HILL, M.M.; CLARK, S.F.; TUCKER, D.F.; BIRNBAUM, M.J.; JAMES, D.E.; MACAULAY, S.L. A role for protein kinase B/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7771–7781, 1999.
- HINAULT, C.; OBBERGHEN, E.V.; MOTHE-SATNEY, I. Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.*, 17: 374– 378, 2006.
- HOWE, A.K.; APLIN, A.E.; JULIANO, R.L. Anchorage-dependent ERK signaling – mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12: 30-35, 2002.

- ISSEKUTZ Jr., B.; BORTZ, W. M.; MILLER, H. I.; PAUL, P. Turnover rate of plasma FFA in humans and in dogs. *Metabolism*, 16 (11): 1001-1009, 1967.
- JETTON, T.L.; EVERILL, B.; LAUSIER, J.; ROSKENS, V.; HABIBOVIC, A.; LAROCK, K.; GOKIN, A.; PESHAVARIA, M.; LEAHY, J.L. Enhanced beta cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (in press), 2008.
- JIANG, G.; ZHANG, B.B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284: E671–E678, 2003.
- JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinases. *Science*, 298:1911-1912, 2002.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W. E BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals, 5^a ed., Academic Press, San Diego (USA), 1997.
- KENNEDY H.J.; POULI A.E.; JOUAVILLE L.S.; RIZZUTO R.; RUTTER G.A. Glucose-induced ATP microdomains in single islet beta-cells. *J. Biol. Chem.*, 274:13281–13291, 1999.
- 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.*, 239: R437-R444, 1980.
- KETTELHUT, I. C. 1981. Efeito da composição da dieta sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios em mamífero carnívoro (gato) e onívoro (rato). Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP, 1981.
- KITAMURA, T.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; KURODA, S.; TAKATA, M.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, T.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U. e KASUGA, M. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B α) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3708–3717, 1998.
- KLOVER, P. K.; MOONEY, R. A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36: 753-758, 2004.

- KOHN, A.D.; SUMMERS, S.A.; BIRNBAUM, M.J.; ROTH, R.A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 271: 31372–31378, 1996.
- KOUTSOS, E.A.; SMITH, J.; WOODS, L.W.; KLASING, K.C. Adult cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) metabolically adapt to high protein diets. *J. Nutr.*, 131(7): 2014-2020, 2001.
- KREBS, M. Amino acid-dependent modulation of glucose metabolism in humans. *Eur. J. Clin. Invest.*, 35: 351-354, 2005.
- LACROIX, M.; GAUDICHON, C.; MARTIN, A.; MORENS, C.; MATHE, V.; TOME, D.; HUNEAU, J.F. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287(4): R934-942, 2004.
- LANG, J.C. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem.*, 259:3–17, 1999.
- LANGIN, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biologies*, 329: 598-607, 2006.
- LEMONS, C.M. (2006). Efeito do pd 153035, um inibidor tirosina quinase, na sinalização da insulina e metabolismo da glicose. *Dissertação (Mestrado em clínica médica)*, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- LEPHART, E.D.; PORTER, J.P.; LUND, T.D.; BU, L.; SETCHELL, K.D.; RAMOZ, G.; CROWLEY, W.R. Dietary isoflavonas alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine functions in Long-Evans male rats. *Nutr. Metabol.* 1: 16, 2004.
- LIAN, J-H.; XIANG, Y-Q.; GUO, L.; HU, W-R.; JI, W.; GONG, B-Q. The use of High-Fat/Carbohydrate Diet-Fed and Streptozotocin-Treated Mice as a Suitable Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 34(1): 21-29, 2007.

- LINGOHR, M.K., DICKSON, L.M., MCCUAIG, J.F., HUGL, S.R., TWARDZIK, D.R., RHODES, C.J. Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- α or EGF, augments pancreatic α -cell proliferation. *Diabetes*, 51: 966–976, 2002.
- LINN, T.; SANTOSA, B.; GRONEMEYER, D.; AYGEN, S.; SCHOLZ, N.; BUSCH, M.; BRETZEL, R.G. Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia*, 43(10): 1257-1265, 2000.
- MACHADO, C.R.; GAROFALO, M. A.; ROSELINO, J. E.; KETTELHUT, I. C. e MIGLIORINI, R. H. Effect of fasting on glucose turnover in a carnivorous fish (*Hoplias* sp). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 256: 612-615, 1989.
- MADDIKA, S.; ANDEA, S.R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDAD, K.D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 10: 13-29, 2007.
- MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. *J. Physiol.*, 529: 49-56, 2000.
- MASON, T.M.; GOH, T.; TCHIPASHVILI, V.; SANDHU, H.; GUPTA, N.; LEWIS, G.F.; GIACCA, A. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes*, 48: 524–530, 1999.
- McCURDY, C. E.; FRIEDMAN, J. E. Early foetal programming of hepatic gluconeogenesis: glucocorticoids strike back. *Diabetol.*, 49: 1138-1141, 2006.
- MERLEN, C.; FABREGA, S.; DESBUQUOIS, B.; UNSON, C.G.; AUTHIER, F. Glucagon-mediated internalization of serine-phosphorylated glucagon receptor and Gs α in rat liver. *FEBS Letters*, 580 (24): 5697–5704, 2006.
- MIKI, T.; NAGASHIMA, K.; TASHIRO, F.; KOTAKE, K.; YOSHITOMI, H.; TAMAMOTO, A.; GONOI, T.; IWANAGA, T.; MIYAZAKI, J.; SEINO, S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, 95:10402–10406, 1998.

- MULLER, M. J.; ACHESON, K. J.; JEQUIER, E.; BURGER, A. G. Thyroid hormone action on lipid metabolism in humans: a role for endogenous insulin. *Metabolism*, 39(5): 480-485, 1990.
- MUSTONEN, A.; PUUKKA, M.; PYYKÖNEN, T.; NIEMINEN, P. Adaptations to fasting in the American mink (*Mustela vison*): nitrogen metabolism. *J. Comp. Physiol.*, 175: 357-363, 2005.
- NEWSHOLME P.; BRENNAN L.; RUBI B.; MAECHLER P. New insights into amino acid metabolism, α -cell function and diabetes. *Clinical Science*, 108 (3): 185-194, 2005.
- NORDLIE, R. C; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.*, 19: 379-406, 1999.
- NOWAK, R. Walker's bats of the world. The John Hopkins University Press, Baltimore and London-UK, 1994.
- OPAZO, J. C.; SOTO-GAMBOA, M.; BOZINOVIC, F. Blood glucose concentration in caviomorph rodents. *Comp. Biochem. Physiol.*, 137A: 57-64, 2004.
- PANTEN, U., KRIEGSTEIN, E., POSER, W., SCHONBORN, J.; HASSELBLATT, A. Effects of l-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett.* 20: 225-228, 1972.
- PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B-E; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2): 153-183, 2001.
- PENDE, M.; KOZMA, S.C.; JAQUET, M.; OORSCHOT, V.; BURCELIN, R.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; KLUMPERMAN, J.; THORENS, B.; THOMAS, G. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished α -cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*, 408(6815): 994-997, 2000.
- PINHEIRO, E. C. 1995. Metabolismo intermediário de morcegos frugívoros. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP, 1995.

- 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.*, 85: 1-9, 2007.
- RAFACHO, A.; RIBEIRO, D.L.; BOSCHERO, A.C.; TABOGA, S.R.; BOSQUEIRO, J.R.
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. Path. (No prelo)*, 2008.
- REUSENS, B.; REMACLES, C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 38: 913-922, 2006.
- RODEN, M.; BERNROIDER, E. Hepatic glucose metabolism in humans: its role in health and disease. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17 (3): 365-383, 2003.
- RORSMAN, P.; ELIASSON, L.; RENSTROM, E.; GROMADA, J.; BARG, S.; GOPEL, S.
The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol. Sci.*, 15: 72-77, 2000.
- ROSELINO, J. E. S. 1975. Aspectos do metabolismo intermediário em aves granívoras e carnívoras. Tese (Doutorado em ciências (Fisiologia Geral)), Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1975.
- ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2): 320-344, 2004.
- RUTTER, G.A.; THELER, J-M.; MURTA, M.; WOLLHEIM, C.B.; POZZAN, T.; RIZZUTO, R. Stimulated Ca²⁺ influx raises mitochondrial free Ca²⁺ to supramicromolar levels in a pancreatic beta-cell line: possible role in glucose and agonist-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 268:22385-22390, 1993.
- RUTTER, G. A. Visualising insulin secretion. The Minkowski Lecture 2004. *Diabetol.*, 47:1861-1872, 2004.
- SAAD, M.J.A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 941-957, 1994.

- SAFAYHI, H.; HAASE, H.; KRAMER, U.; BIHLMAYER, A.; ROENFELDT, M.; AMMON, H.P.T.; FROSCHMAYR, M.; CASSIDY, T.N.; MORANO, I.; AHLIJANIAN, M.K.; STRIESSNIG, J. L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol. Endocrinol.*, 11:619–629, 1997.
- SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L.J. Exercise effects on muscle insulin signaling and action invited review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 93: 369-383, 2002.
- SALTZMAN, W.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; SCHEFFLER, G.; WEGNER, F.H.; ABBOTT, D.H. Social and reproductive influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. *Physiology & Behavior*, 4: 801-810, 1994.
- SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. *Biosci. J.*, 23 (3): 101-110, 2007.
- SCHMID, H.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Reduced lipogenesis in rats fed a high-protein carbohydrate-free diet. *Metabolism*, 33 (3): 219-223, 1984.
- SEGHERS, V.; NAKAZAKI, M.; DEMAYO, F.; AGUILAR-BRYAN L.; BRYAN, J. SUR1 knockout mice: a model for K⁺ (ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 275: 9270–9277, 2000.
- SENER, A.; MALAISSE, W. J. 1-Leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature*, 288: 187–189, 1980.
- SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid. Res.*, 48: 1253-1262, 2007.
- SILVA, R.S.M., MIGLIORINI, R.H. Effects of starvation and refeeding on energy-linked metabolic process in the turtle (*Phrynops hilarii*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 96: 415-419, 1990.
- SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. *In* “Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference” (D. E. Wilson e D. M. Reeder, Eds.), pp. 312-529. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 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.*, 72: 921-925, 1979.
- SUMMERS, S.A.; GARZA, L.A.; ZHOU, H.; BIRNBAUM, M.J. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 5457-5464, 1998.
- TALLAS, P. G.; WHITE, R. G. Glucose turnover and defense of blood glucose levels in arctic fox (*Alopex lagopus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A (3): 493-498, 1988.
- TAVARES, E.F.; VIEIRA-FILHO, J. P.B.; ANDRIOLO, A.; FRANCO, L. J. Relação da Homocisteinemia com a Sensibilidade à Insulina e com Fatores de Risco Cardiovascular em Um Grupo Indígena Brasileiro. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 46(3): 260-268, 2002.
- TAYLOR, C.; HIRSCH, N. Applied cerebral physiology. *Anaesth. Intens. Care. Med.*, 8: 407-412, 2007.
- TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; TAMEMOTO, H.; SAKURA, H.; NAGAI, R.; AKANUMA, Y.; KIMURA, S.; KADOWAKI, T. Insulin effect during embryogenesis determines fetal growth: A possible molecular link between birth weight and susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes*, 49: 82-86, 2000.
- THELER, J-M.; MOLLARD, P.; GUÉRINEAU, N.; VACHER, P.; PRALONG, W.F.; SCHLEGEL, W.; WOLLHEIM, C.B. Video imaging of cytosolic Ca²⁺ in pancreatic beta-cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. *J. Biol. Chem.*, 267:18110-18117, 1992.
- TIRONE, T. A.; BRUNICARDI, F.C. Overview of glucose regulation. *World J. Surg.*, 25: 461-467, 2001.
- TOBE, K.; KADOWAKI, T.; HARA, K.; GOTOH, Y.; KOSAKO, H.; MATSUDA, S.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; AKANUMA, Y.; NISHIDA, E. Sequential Activation of MAP Kinase Activator, MAP Kinases, and S6 Peptide Kinase in Intact Rat Liver following Insulin Injection. *J. Biol. Chem.*, 267 (29): 21089-21097, 1992.
- UNGER, R. H. The millieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetol.*, 20: 1-11, 1981.

- USAMI, M.; SEINO, Y.; SEINO, S.; TAKEMURA, J.; NAKAHARA, H.; IKEDA, M.; IMURA, H. Effects of high protein diet on insulin and glucagon secretion in normal rats. *J. Nutr.*, 112: 681-685, 1982.
- VANHAESEBROECK B.; ALESSI, D.R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.*, 346: 561-576, 2000.
- VÁSQUEZ, E.F.A.; HERRERA, A. P. N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio. *Cienc. Rural*, 33(4):743-747, 2003.
- VEIGA, J.A.S.; ROSELINO, E.S.; LINDER, C.; MIGLIORINI, R.H. Effects of fasting and adrenalectomy on the kinetics of glucose metabolism in granivorous and carnivorous bird. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 15: 175-180, 1982.
- VIANA, A.Y.I.; SAKODA, H.; ANAI, M.; FUJISHIRO, M.; ONO, H.; KUSHIYAMA, A.; FUKUSHIMA, Y.; SATO, Y.; OSHIDA, H.; UCHIJIMA, Y.; B, HIROKI, K.; ASANO, T. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. *Diab. Res. Clin. Pract.*, 73: 135-142, 2006.
- WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P.J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J.R.; KLIP, A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 4008-4018, 1999.
- WASHIZU, T.; TANAKA, A.; SAKO, T.; WASHIZU, M.; ARAI, T. Comparison of the activities of enzymes related to glycolysis and gluconeogenesis in the liver of dogs and cats. *Res. Vet. Sci.* 67(2):205-206, 1999.
- WASSERMAN, D.H.; SPALDING, J.A.; LACY, D.B.; COLBURN, C.A.; GOLDSTEIN, R.E. E CHERRINGTON, A.D. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 257: E108-117, 1989.
- WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.*, 31(4): 215-222, 2006.

- WHITEMAN, E.L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M.J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol. Metabolism.*, 13 (10): 444-451, 2002.
- WIDMAIER, E. P.; KUNZ, T. H. Basal, diurnal, and stress-induced levels of glucose and glucocorticoids in captive bats. *J. Exp. Zool.*, 265: 533-540, 1993.
- WILKINSON, G. S. Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature*, 309: 181-184, 1984.
- WINZELL , M.S.; BRAND, C. L.; WIERUP, N.; SIDELMANN, U. G.; SUNDLER, F.; NISHIMURA, E.; AHRÉN, B. Glucagon receptor antagonism improves islet function in mice with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Diabetol.*, 50: 1453–1462, 2007.
- WOLLHEIM, C.B.; MAECHLER, P. β -Cell Mitochondria and Insulin Secretion Messenger Role of Nucleotides and Metabolites. *Diabetes*, 51(1): S37-S42, 2002.
- YEO, R.; SAWDON, M. Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesth. Intens. Care. Med.*, 8 (7): 295-298, 2007.
- XU, G., KWON, G., CRUZ, W. S., MARSHALL, C. A.; MCDANIEL, M. L. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic β -cells. *Diabetes*, 50: 353–360, 2001.
- ZDYCHOVA, J.; KOMERS, R. Emerging role of Akt Kinase/Protein Kinase B signalling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol. Res.*, 54: 1-16, 2005.

