

## Propriedades glicostáticas de eritrócitos de ratos tratados com dexametasona

*Glucostatic properties of erythrocytes from rats treated with dexamethasone*

Carlos Alberto da Silva<sup>1</sup>, Carolina Barbosa Ribeiro<sup>2</sup>, Eder João de Arruda<sup>2</sup>, Tamara Martins<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Professor do Programa de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP

<sup>2</sup> Mestrando em Fisioterapia da UNIMEP, Piracicaba, SP

<sup>3</sup> Fisioterapeuta. Coordenadora do Curso de Fisioterapia da Faculdade Anhanguera de Campinas 3 (FAC3), Campinas, SP

### RESUMO

**Objetivos:** analisar as propriedades glicostáticas *in vitro* e *in vivo* de eritrócitos de ratos submetidos ao tratamento com dexametasona.

**Métodos:** foram utilizados para o experimento 20 ratos machos Wistar, separados em dois grupos com 10 animais cada, sendo um grupo controle e um tratado com dexametasona (1 mg/kg/dia por via intraperitoneal, cinco dias). Após o tratamento, os ratos foram anestesiados para que fosse coletado sangue de diferentes locais do leito vascular arterial e venoso, no intuito de avaliar a glicemia e as reservas de glicogênio *in vivo*. Para o estudo *in vitro* o sangue foi coletado da veia renal, sendo que os eritrócitos foram isolados, incubados e examinados. Os dados foram analisados por meio da correlação de Spearman e teste t de Student. Considerou-se o nível de significância de *p* menor que 0,05.

**Resultados:** os eritrócitos normais apresentaram diferença glicêmica arteriovenosa significativa de até 56% no leito venoso, sendo que o glicogênio apresentou-se 44% maior na veia supra-hepática. Após a administração de dexametasona, a glicemia mostrou-se 34% maior no leito venoso e o glicogênio 42% menor na veia porta. No experimento *in vitro*, verificou-se que as propriedades glicostáticas não foram comprometidas na presença da dexametasona.

**Conclusões:** o tratamento com dexametasona modifica a glicemia mas não interfere nas funções glicostáticas eritrocitárias.

**DESCRIPTORIOS:** GLICEMIA; DEXAMETASONA; RATOS WISTAR; ERITRÓCITOS/efeitos de drogas; GLICOGÊNIO.

### ABSTRACT

**Aims:** To analyze *in vitro* and *in vivo* glucostatic properties of erythrocytes of rats subjected to treatment with dexamethasone.

**Methods:** Twenty male Wistar rats were used, divided into two groups of 10 animals, with one control group and one group treated with dexamethasone (1 mg/kg/day by intraperitoneal route, for five days). After treatment, the animals were anesthetized and blood samples were collected from arterial and venous vascular system in order to evaluate *in vivo* glucose levels and glycogen reserve. For the *in vitro* analysis, blood was collected from renal vein, and erythrocytes were isolated, incubated, and examined. Data were analyzed by Spearman correlation and Student t test. The *significance level* for *p*-value was 0.05.

**Results:** The normal erythrocytes showed significant arteriovenous blood glucose difference of 56% in the venous system, and glycogen was 44% higher in supra-hepatic vein. In the presence of dexamethasone, blood glucose were 34% higher in the venous system and glycogen 42% lower in the portal vein. The glucostatic properties of erythrocytes have not been compromised in the presence of dexamethasone in the *in vitro* study.

**Conclusions:** Treatment with dexamethasone affects blood glucose levels but does not interfere with glucostatic functions of erythrocytes.

**KEY WORDS:** BLOOD GLUCOSE; DEXAMETHASONE; RATS, WISTAR; ERYTHROCYTES/drug effects; GLYCOGEN.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

CARLOS ALBERTO DA SILVA  
Faculdade de Ciências da Saúde – PPG-FT  
Rodovia do Açúcar, Km 156 – Campus Taquaral  
CEP 13400-901 – Piracicaba/SP  
E-mail: Casilva@unimep.br

## INTRODUÇÃO

A manutenção da homeostasia energética depende da integridade funcional dos principais reservatórios de substratos metabolizáveis, bem como de um suprimento adequado de acordo com as necessidades de cada organismo.<sup>1</sup> No que tange ao metabolismo dos carboidratos e processos que participam do controle glicêmico, demonstrou-se que os eritrócitos absorvem e incorporam glicose aos reservatórios de glicogênio quando a glicemia está elevada, liberando a glicose quando diminui a glicemia. Cabe ressaltar que as reservas eritrocitárias de glicogênio superam as necessidades metabólicas dessas células, sugerindo-se que contribuam de maneira importante para o controle glicêmico.<sup>2</sup>

Utilizando técnicas de incorporação de glicose radioativa ao reservatório de glicogênio, foi avaliado o metabolismo de glicogênio em eritrócitos normais, demonstrando-se a síntese de  $0,04 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$  de hemoglobina por hora. Dessa forma, sob normoglicemia, os eritrócitos humanos utilizam 1 a 2  $\mu\text{mol}$  de glicose/mL por célula por hora, equivalendo a 12 mil vezes mais do que o requerido para a manutenção da atividade metabólica.<sup>3</sup>

Guarner e Alvarez-Buylla,<sup>2</sup> estudando funções glicostáticas eritrocitárias em diferentes setores do leito vascular, observaram diferença arteriovenosa no conteúdo de glicogênio e sugeriram que as hemácias fazem parte de um sistema refinado de distribuição de glicose aos tecidos e podem participar efetivamente da regulação glicêmica. Outros estudos *in vivo* e *in vitro* reiteraram esses achados em diferentes avaliações das funções glicostáticas dos eritrócitos, constatando a participação das hemácias como distribuidoras de glicose em diferentes condições fisiológicas ou patológicas, tais como estresse, atividade física e diabetes mellitus.<sup>3-6</sup>

A resistência periférica à insulina é uma resposta desenvolvida frente a diferentes condições, como obesidade, diabetes mellitus ou, ainda, terapias que utilizam glicocorticóides.<sup>7</sup> Dentre os glicocorticóides, destaca-se a dexametasona, fármaco com atividade antiinflamatória, que possui capacidade de promover, em curto prazo, aumento da secreção de insulina, redução da eficiência na transdução do sinal insulínico e diminuição da utilização e do transporte periférico de glicose, o que compromete a disponibilização de glicose aos tecidos. Estudos mostram que a dexametasona promove alterações na sensibilidade à insulina, sendo essa condição representada por resistência, associada ao comprometimento na formação das reservas de substratos metabolizáveis em tecidos alvo da insulina, como, por exemplo, o tecido hepático.<sup>8,9</sup>

Saad et al.<sup>9</sup> avaliaram o efeito da dexametasona sobre a atividade de receptores de insulina presentes nos adipócitos e nos eritrócitos, constatando que, dependendo do tempo, pode haver profunda redução na população dos receptores insulínicos dos hepatócitos, além de modificação significativa nos receptores dos eritrócitos. Essa hipótese foi recentemente reiterada no estudo *in vitro* realizado por Santos et al.,<sup>10</sup> que avaliaram a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos tratados com dexametasona, observando aumento na secreção induzida pela glicose. Neste contexto, o presente trabalho propõe-se a investigar, utilizando um modelo animal, se as propriedades glicostáticas dos eritrócitos são afetadas pela dexametasona.

## MÉTODOS

Utilizaram-se para o experimento 20 ratos machos da linhagem Wistar, com idade variando de três a quatro meses, divididos em dois grupos com 10 animais cada, sendo um grupo controle e o outro tratado com dexametasona (1 mg/kg/dia por via intraperitoneal, por cinco dias). Todos os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante de aproximadamente  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de São Carlos, sob o Protocolo nº 011/2006.

Para avaliação da concentração de glicogênio nos eritrócitos *in vivo*, empregou-se o seguinte procedimento: após 10 minutos de anestesia (pentobarbital sódico, 40 mg/kg, intraperitoneal), foram coletadas amostras de sangue da artéria femoral, veia femoral, veia porta hepática e veia supra-hepática do animal. Centrifugou-se o sangue em centrífuga refrigerada, a 2500 rotações por minuto, durante 10 minutos, transferindo-se o plasma para a determinação da glicemia, feita por um glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnóstica Brasil, São Paulo, SP). A seguir, os eritrócitos foram lavados duas vezes com solução salina a 0,9%, de acordo com os métodos usados para preparar eritrócitos para estudos metabólicos.<sup>11</sup>

Uma alíquota de 20  $\mu\text{l}$  dos eritrócitos destinou-se à avaliação da hemoglobina, e 200  $\mu\text{l}$  foram direcionados para avaliação do conteúdo glicogênico. Para a avaliação *in vitro*, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado da veia renal, sendo acondicionado em um recipiente em gelo, formando um *pool* de células. O próximo passo foi transferir o sangue coletado para um tubo de ensaio, onde foi centrifugado durante 10 minutos a 2500 rotações por minuto. Após a centrifugação, foi desprezada a camada superficial,

onde se concentram os leucócitos. Da parte do fundo, mais densa, onde se detinham os eritrócitos, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL, distribuídas em tubos de ensaio colocados em grades parcialmente submersas em banho-maria por 15 minutos a 37°C, na presença de diferentes concentrações de glicose.

No procedimento utilizado para extração e determinação do glicogênio dos eritrócitos, empregou-se o método proposto por Farquarson et al.,<sup>12</sup> o qual expressa o conteúdo em valores de µg/g de hemoglobina, visto que a precisão do método é de 0,1 µg de glicogênio. Para análise estatística das diferenças arteriovenosa e entre as veias porta e supra-hepática, foram utilizados correlação de Spearman e teste t de Student, considerando-se significativo um  $p < 0,05$ . As relações entre o conteúdo eritrocitário de glicogênio e as variações da glicemia foram calculadas por meio da correlação.

Na investigação *in vitro*, o conteúdo de glicogênio nos eritrócitos foi examinado em razão da variação na concentração de glicose. Determinaram-se a correlação e a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados na forma  $Y = a + b \cdot X$ , onde Y é a concentração de glicogênio, X é a concentração de glicose, a é a interseção com a ordenada e b é a inclinação da curva.

## RESULTADOS

Inicialmente foi avaliada a concentração de glicogênio em eritrócitos e a correlação com a glicemia em quatro setores do leito vascular – artéria e veia femorais e veias porta e supra-hepática. A glicemia medida nas femorais revelou uma diferença arteriovenosa de 17%, sendo maiores os valores obtidos no ramo arterial. Considerou-se essa diferença como correspondendo à utilização de glicose no membro posterior do rato. Também, como esperado, houve diferença entre as glicemias da veia porta e da supra-hepática, sendo 56% maior a concentração nesta última, em virtude da liberação de glicose pelo fígado.

Para avaliar se os eritrócitos participam na homeostasia da glicose, como armazenadores e transportadores de glicose, o conteúdo de glicogênio foi quantificado no sangue coletado nos quatro setores do leito vascular. As reservas eritrocitárias de glicogênio variaram conforme a região de coleta, registrando-se diferença de 35% tanto entre a artéria e a veia femoral quanto entre a veia porta e supra-hepática. Considera-se que a diferença arteriovenosa observada esteja relacionada à mobilização do glicogênio dos eritrócitos. Uma diferença de 44% foi observada na avaliação realizada na interface entre a veia porta e a supra-hepática, sendo verificada maior concentração plasmática de glicose no ramo vascular que sai do fígado (Tabela 1).

No grupo tratado com dexametasona, observou-se diferença na glicemia de 28% entre as femorais (sendo maior na artéria femoral) e de 34% no circuito hepático (sendo maior na supra-hepática). Foi avaliado o conteúdo de glicogênio nas femorais, observando-se valores 42% menores na veia femoral e veia porta (Tabela 1).

No estudo *in vitro*, verificou-se que os eritrócitos aumentaram suas reservas glicogênicas de maneira diretamente proporcional ao estímulo. Demonstrando que os eritrócitos liberavam glicose à medida que a concentração da hexose no meio se reduzia, eritrócitos inicialmente incubados na presença de 240 mg/dL<sup>-1</sup> de glicose acumularam glicogênio e, posteriormente, reduziram o seu conteúdo, ao serem novamente incubados em concentrações mais baixas de glicose (Tabela 2).

**Tabela 1.** Concentração eritrocitária de glicogênio e glicose plasmática em diferentes setores do leito vascular de 10 ratos controle e 10 tratados com dexametasona. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média.

	Glicogênio (µg/g Hb)	Glicemia (mg/dL)
Grupo controle		
Veia femoral	34,46 ± 1,0*	100,12 ± 1,6*
Artéria femoral	52,78 ± 0,02	120,51 ± 1,4
Veia porta	30,51 ± 0,05†	82,10 ± 1,2†
Veia supra-hepática	54,13 ± 1,3	125,11 ± 1,2
Grupo dexametasona		
Veia femoral	22,68 ± 0,4*	90,18 ± 1,1*
Artéria femoral	39,24 ± 0,1	125,46 ± 2,2
Veia porta	23,15 ± 0,2†	85,19 ± 2,0†
Veia supra-hepática	40,09 ± 0,2	129,14 ± 2,1

Hb = hemoglobina.

\*  $p < 0,05$  na comparação entre a artéria e veia femoral;

†  $p < 0,05$  na comparação entre a veia porta e a supra-hepática;

**Tabela 2.** Efeito da concentração de glicose sobre a concentração de glicogênio em eritrócitos de ratos *in vitro*. O conteúdo de glicogênio foi determinado nos eritrócitos após incubação durante 15 min a 37°C. No grupo descarga, os eritrócitos foram inicialmente incubados na presença de 240 mg/dL<sup>-1</sup> de glicose e, em seguida, reincubados em soluções com outras concentrações de glicose. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média.

Carga		Descarga	
Glicose (mg/dL)	Glicogênio (µg/g Hb)	Glicose (mg/dL)	Glicogênio (µg/g Hb)
NIHIL	0,50 ± 0,05	240	39,72 ± 0,9*
40	9,01 ± 1,5*	200	30,60 ± 0,5*
80	11,92 ± 0,7*	160	24,79 ± 0,6*
120	22,14 ± 0,3*	120	18,10 ± 0,8*
160	26,75 ± 0,4*	80	9,39 ± 0,2*
200	37,61 ± 0,2*	40	8,91 ± 0,1*
240	44,67 ± 0,8*	NIHIL	0,55 ± 0,2

Hb = hemoglobina; NIHIL = ausência de glicose;

\*  $p < 0,05$  comparado à ausência de glicose.

As propriedades glicostáticas dos eritrócitos de ratos tratados com dexametasona também foram testadas *in vitro*, não se observando diferença quando comparadas às do grupo não tratado (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito *in vitro* da concentração de glicose sobre a concentração de glicogênio de eritrócitos de ratos tratados com dexametasona. Inicialmente não se tem glicose (NIHIL). O conteúdo de glicogênio foi determinado nos eritrócitos após incubação durante 15 min a 37°C. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.

Glicose (mg/dL)	Glicogênio ( $\mu\text{g/g Hb}$ )
nihil	0,32 $\pm$ 0,02
40	11,22 $\pm$ 0,03 *
80	13,09 $\pm$ 0,02 *
120	41,11 $\pm$ 0,01 *
160	34,98 $\pm$ 0,01 *
200	48,34 $\pm$ 0,04 *
240	51,66 $\pm$ 0,02 *

NIHIL = ausência de glicose;

Hb = hemoglobina;

\*  $p < 0,05$  comparado à ausência de glicose.

## DISCUSSÃO

Os primeiros estudos sobre armazenamento de glicogênio, realizados em eritrócitos de ratos, não quantificaram corretamente as concentrações devido a uma inadequação da técnica, que impedia a extração total do glicogênio da amostra.<sup>13</sup> Este estudo utiliza uma técnica enzimática especificamente destinada à extração e quantificação do glicogênio eritrocitário, com sensibilidade para detectar 0,1  $\mu\text{g}$  de glicogênio.<sup>12</sup>

A manutenção da glicemia depende da integração entre os sistemas nervoso e endócrino, os quais regulam a dinâmica de mobilização e armazenamento das reservas glicogênicas.<sup>3</sup> Na década de 1970 demonstrou-se a presença nos eritrócitos das enzimas glicogênio sintetase, amiloglicosidase e fosforilase, que são enzimas chave no processo de formação e mobilização dos reservatórios de glicogênio.<sup>14</sup>

O interesse pela compreensão dos mecanismos que colaboram na manutenção de níveis normoglicêmicos instigou a investigação da participação dos eritrócitos, considerando que os reservatórios de glicogênio dessas células poderiam desempenhar importante função na distribuição da glicose.<sup>2,3</sup> Essa função dos eritrócitos tem sido relegada a um plano secundário, em virtude do grande reservatório de glicogênio do fígado e da rapidez com que ele é mobilizado e reconstituído em indivíduos normais. No entanto, os eritrócitos são um reservatório de glicogênio de fácil acesso, permitindo

várias amostragens em estudos de longa duração, sem provocar grande estresse na coleta.<sup>4,15,16</sup>

Na avaliação das reservas eritrocitárias de glicogênio, realizadas nos ratos normais, constataram-se diferenças entre os diversos setores do leito vascular, fato este que corrobora com o estudo de Guarner e Alvarez-Buylla,<sup>3</sup> visto que as reservas glicogênicas mostraram-se modificadas de acordo com as mudanças na concentração plasmática de glicose, confirmando o que já havia sido demonstrado por Silva.<sup>4</sup> A dinâmica de captação de glicose pelos eritrócitos decorre da grande quantidade de proteínas transportadoras de glicose do tipo GLUT 1, presentes na membrana. Estima-se que existam  $3 \times 10^5$  moléculas transportadoras por célula, o que representa 3,5% das proteínas da membrana.<sup>17,18</sup> Assim, a diferença arteriovenosa constatada neste estudo está em concordância com a proposta de envolvimento dos eritrócitos na distribuição de glicose, tendo em vista a responsividade à variação glicêmica. Um fato adicional a ser considerado refere-se à atividade metabólica da hexose nos eritrócitos, que na normoglicemia é de 1 a 2  $\mu\text{mol}$  de glicose/ $\text{mL}^{-1}$  células/h nas hemácias de humanos, superando expressivamente as necessidades energéticas das células.<sup>4,13,14</sup>

Diferentemente do tecido hepático, os eritrócitos possuem somente um tipo de enzima glicogênio sintetase, denominada de forma b e dependente da glicose-6-fosfato, sendo que a regulação da síntese de glicogênio depende em maior intensidade das mudanças nas concentrações de glicose-6-fosfato e de pH, que ocorrem devido à diferença no teor de oxigênio na interface arteriovenosa.<sup>14,19</sup> Recentemente, dois estudos relacionados à indução de resistência periférica à insulina com dexametasona destacaram-se por demonstrar alterações metabólicas precoces no tecido muscular e hepático. Nessa mesma linha, demonstrou-se que a resistência à insulina foi parcialmente revertida na presença de sensibilizadores de insulina, como a metformina e a troglitazona.<sup>9,20</sup>

A análise das propriedades glicostáticas realizada em eritrócitos coletados de diferentes setores do leito vascular de ratos tratados com dexametasona não mostrou diferença da observada nos eritrócitos de ratos normais que não receberam dexametasona. Nesse aspecto, caber ressaltar que os eritrócitos estão constantemente em contato com a insulina sérica, fato primordial para que haja redução na população de receptores insulínicos residentes na membrana.<sup>21</sup>

Houve diferença nos níveis glicêmicos a depender do local a ser coleta a amostra, sendo que o leito venoso hepático apresentou maiores concentrações. No entanto, a avaliação das propriedades glicostáticas *in vitro*

não expressaram diferenças entre eritrócitos de ratos controles ou tratados com dexametasona, indicando que esse glicocorticoide não interfere na manutenção do equilíbrio funcional ou em propriedades ligadas à distribuição de glicose pelos eritrócitos.

## REFERÊNCIAS

1. Curi R, Procópio JAF. Fisiologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
2. Guarner V, Alvarez-Buylla R. Erythrocyte and glucose homeostasis in rats. *Diabetes*. 1989; 38:410-5.
3. Guarner V, Alvarez-Buylla R. Compensation by fetal erythrocyte of plasma glucose changes in rats. *Diabetes*. 1990;39:1197-9.
4. Silva CA. Estudo sobre a participação dos eritrócitos na regulação da glicemia e suas relações com o metabolismo hepático de carboidratos [tese]. Campinas (SP): IB-UNICAMP; 1997.
5. Beuter E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med*. 1976;88: 328-33.
6. Silva CA, Guirro RRJ, Cancelliero KM, et al. Participação dos eritrócitos no controle glicêmico no exercício. *Saúde em Revista* [Internet]. 2005;7(17):31-9. [citado 2010 6 out]. Disponível em: <http://www.unimep.br/phpg/editora/mostrasumario.php>
7. Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:941-57.
8. Koricanac G, Isenovic E, Stojanovic-Susulic V, et al. Time dependent effects of dexamethasone on serum insulin level and insulin receptors in rat liver and erythrocytes. *Gen Physiol Biophys*. 2006;25:11-24.
9. Saad MJA, Folli F, Khan CR. Insulin and dexamethasone regulate insulin receptors, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. *Endocrinology*. 2005;136:1579-88.
10. Santos CL, Rafacho A, Bosqueiro JR. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulina e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. *Biosci J* [Internet]. 2007 jul/set [citado 2010 out 7];23(3):101-10. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6681>
11. Jacquez JA. Red blood cell as glucose carrier: significance for placental and cerebral glucose transfer. *Am J Physiol*. 1984;246:289-98.
12. Farquarson EJ, Jamieson C, Mcphee GB, et al. A new sensitive microassay for the measurement of erythrocyte glycogen. *Clin Chim Acta*. 1990;187:89-94.
13. Harvey J W, Kaneko JJ. Glucose metabolism of mammalian erythrocyte. *J Cell Biol*. 1976; 89:219-24.
14. Moses SW, Bashan N, Gutman A. Glycogen metabolism in the normal red blood cell. *Blood*. 1972;40:836-43.
15. Silva CA, Guirro RRJ, Suprimento de glicose no músculo esquelético desnervado. *Saúde em Revista* [Internet]. 2004;6(14):13-8. [citado 2010 6 out]. Disponível em: <http://www.unimep.br/phpg/editora/mostrasumario.php>
16. Ferrannini E, Bjorkam O. Role of red blood cells in the regulation of blood glucose levels in man. *Diabetes*. 1986;35:39-43.
17. Carter-Su C, Pillion DJ, Czech P. Reconstituted D-glucose transport from the adipocyte plasma membrane: chromatographic resolution of transport activity from membrane glycoproteins using immobilized concanavalin A. *Biochemistry*. 1980;19(11):2374-85.
18. Epanand RF, Epanand RM, Jung CY. Ligand-modulation of the stability of the glucose transporter GLUT1. *Protein Sci*. 2001;10:1363-9.
19. Silva CA, Gonçalves AA. Partial recovery of erythrocyte glycogen stores and glycaemia in diabetic rats treated by phenobarbital. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:657-61.
20. Pardi ACR, Gonçalves TM, Severi MTM, et al. Sensibilizadores da insulina alteram a ação muscular da dexametasona: perfil metabólico. *Lat Am J Pharmacy*. 2009; 28:490-4. [citado 2010 out 6]. Disponível em: [http://www.latamjpharm.org/resumenes/28/4/LAJOP\\_28\\_4\\_1\\_2.pdf](http://www.latamjpharm.org/resumenes/28/4/LAJOP_28_4_1_2.pdf)
21. Baldini P, Incerpi S, Pascale E, et al. Insulin effects on human red blood cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1986;46: 93-102.