



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SENSIBILIDADE DA MOLÉCULA DE INSULINA AO ESTADO  
PÓS-PRANDIAL**

Trabalho submetido por  
**Ragussina Tatiana António Inácio**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Jorge Caldeira**

**outubro de 2014**



**Dedicatória**

---

À minha Mãe



## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Jorge Caldeira pela simpatia e disponibilidade para o desenvolvimento deste trabalho final.

À Dra. Sofia Castro Rodrigues pelo apoio incondicional, disponibilidade, e ajuda neste trabalho.

A toda a equipa da Farmácia João Castro Rodrigues que humildemente me “adotou” e apoiou durante a minha passagem pela farmácia e pós-passagem.

A toda a equipa de farmacêuticos do Hospital Garcia de Orta, que contribuiu positivamente para a minha formação.

A toda minha família, em especial aos meus avós, embora noutro continente torceram sempre por mim.

À minha mãe pela persistência.

Ao meu irmão, o meu companheiro desta jornada, embora com 7 anos de diferença tinha sempre uma palavra, um apoio, um sorriso para a mana nos períodos menos bons.

Ao meu pai pelo carinho.

A todos os meus colegas e amigos que conheci e fizeram parte desta caminhada e permitiram que o tempo passasse de forma rápida, divertida e unida.

Ao ISCSEM e todos os meus Professores que direta ou indiretamente contribuíram para que hoje tenha esta dissertação em mãos.

A todos obrigada



## RESUMO

A regulação das fontes energéticas corporais é fundamental e é nesse sentido que a glicose surge como principal fonte de energia adquirida numa refeição. No estado pós-prandial a insulina aparece como hormona regulatória da homeostase da glicose. A ingestão de uma refeição desencadeia a libertação de insulina pelo pâncreas, com paralela ativação do sistema nervoso parassimpático hepático. A ativação do sistema parassimpático hepático conduz a uma cascata de eventos que culminam na libertação de um fator, a HISS que os investigadores denominam substância hepática sensibilizadora da insulina. A libertação da HISS é crucial para aumentar a sensibilidade da insulina pós-prandial, promovendo o aumento do armazenamento de glicogénio junto do tecido músculo-esquelético. A inibição deste fator sensibilizante pode conduzir a estados de resistência à insulina, HDIR nomeadamente a resistência à insulina dependente da HISS (HDIR), que poderá ser um fator chave na determinação dos estadios precoces de resistência à insulina. O entendimento dos mecanismos de ação fisiológica e fisiopatológica da insulina e da HISS são uma abordagem atualmente em desenvolvimento, com vista à criação de potenciais alvos terapêuticos, mais eficazes que os atuais, para o combater a resistência à insulina e a diabetes mellitus tipo 2.

Palavras-chave: insulina, sensibilidade à insulina, HISS, HDIR

## **ABSTRACT**

The regulation of the body energy sources is essential and that is how glucoses arises as the main source of energy that can be acquired from a meal. In the postprandial state insulin appears as the regulatory hormone of glucose homeostasis. The ingestion of a meal triggers the release of insulin by the pancreas with parallel activation of the parasympathetic nervous system. The activation of hepatic parasympathetic system leads to a cascade of events that results in the release of a factor, the HISS, researchers have named this as hepatic insulin sensitizing substance. The release of HISS is crucial to increase the sensitivity of postprandial insulin promoting increased glycogen storage within the skeletal muscle. The inhibition of this factor may lead to insulin resistance stages, like hiss dependent insulin resistance (HDIR), which may be a key factor in the diagnosis of early stages of insulin resistance. Understanding the mechanisms of physiological and pathophysiological action of insulin and HISS is an approach currently under development, with a view in creating potential therapeutic targets, more effective than current ones for fight insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.

**Key Words:** Insulin, Insulin Sensitivity, HISS, HDIR

## Índice Geral

<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>1. NOTA INTRODUTÓRIA .....</b>	<b>15</b>
<b>2. ENERGIA E METABOLISMO .....</b>	<b>17</b>
<b>3. METABOLISMO FISIOLÓGICO DA INSULINA E DA GLICOSE</b>	
3.1 A molécula de insulina .....	19
3.2 Biossíntese da Insulina .....	20
3.3 Secreção da insulina.....	21
3.4 Liberação pulsátil da insulina.....	22
3.5 Ação da molécula de insulina.....	24
3.6 O recetor de insulina.....	25
3.7 A homeostase da glucose.....	27
<b>4. O FÍGADO NA REGULAÇÃO DA INSULINA</b>	
4.1 Armazenamento de glicogénio no fígado .....	31
4.2 Produção de glucose pelo fígado .....	32
4.3 Hipótese HISS .....	32
4.4 O sistema parassimpático hepático na homeostase da glucose.....	33
4.5 A importância do óxido nítrico hepático.....	35
4.6 A importância da glutathione hepática.....	36
4.7 A ação do glucagon .....	37
4.8 A HISS pós-prandial .....	38
4.9 A sensibilidade da insulina induzida pela refeição.....	41
4.10 A importância da nutrição na homeostase da glucose .....	43
4.11 A distribuição da glucose pós-prandial.....	46
4.12 A ação da HISS no músculo-esquelético .....	48
4.13 Componente dependente e independente da HISS .....	49
4.14 Resistência à insulina dependente da HISS.....	51
<b>5. A HISS COMO ALVO TERAPÊUTICO .....</b>	<b>17</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>61</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1 Estrutura primária da Insulina. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 Recetor de insulina organização do supradomínio .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3 Representação esquemática do metabolismo da glicose.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4 A hipótese HISS.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5 A hipótese HISS.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 6: Mecanismo da HISS como potencial alvo terapêutico. ....</b>	<b>58</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACh:** acetilcolina

**ATP:** trifosfato de adenosina

**cAMP:** monofosfato de adenosina cíclico

**et al:** e outros (do latim, *et aliae*)

**IRS:** substrato do recetor da insulina

**GLUT:** péptido insulíntrópico dependente da glucose

**GSH:** glutatona reduzida

**HISS:** substância hepática sensibilizadora da insulina

**HDIR** resistência à insulina dependente da HISS (*hiss dependent insulin resistance*)

**MIS** sensibilidade à insulina induzida pela refeição (*meal-induced insulin sensitization*)

**NO:** óxido nítrico

**NAC:** N-acetilcisteína

**RIST** teste rápidos de sensibilidade à insulina (*rapid insulin sensitivity test*)

**RSNO:** s-nitrosotiol



## 1. NOTA INTRODUTÓRIA

A dinâmica do balanço energético do organismo é um fator chave para manter o organismo em equilíbrio. As fontes de energia contribuem para este equilíbrio, quer as fontes energéticas endógenas (gliconeogénese, produção de ATP) ou exógenas, a alimentação (Murray et al., 2009).

A partir da alimentação diária garantimos que toda uma cascata de eventos se possa desenrolar no nosso organismo. A glucose é uma peça fundamental neste processo, a sua regulação é desempenhada principalmente por duas hormonas no organismo, a insulina e o glucagon. Estas têm a capacidade de manter a homeostase da glucose. A desregulação destes processamentos metabólicos pode resultar em hiperglicemia crónica, resistência à insulina e em última instância conduz à diabetes tipo 2 (Lautt, 2003b)

O entendimento sobre a fisiologia e patogénese da insulina e, principalmente, na sua ação no estado pós-prandial é essencial para permitir o combate aos estados de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2. A identificação numa fase precoce permite avançar com prevenção e terapêutica adequadas, contribuindo para o decréscimo da diabetes mellitus, num universo que se projeta exceder 550 milhões de indivíduos afetados pela doença até 2030 (Newsholme, Cruzat, Arfuso, & Keane, 2014).

A presente dissertação explora os fatores metabólicos que regulam a biossíntese e libertação da insulina no estado pós-prandial e as consequências de uma ação atenuada da insulina nos tecidos.

O estudo da insulina e metabolismo inerente permite especular sobre potenciais alvos terapêuticos relevantes para combater a resistência à insulina e a diabetes mellitus. Até à data existem dois grupos de investigação, no Canadá (grupo Lautt) e em Portugal (grupo Macedo), dedicados a entender a temática da sensibilidade da insulina pós-prandial. Ambos desempenharam estudos de forma a perceber o que sensibilizava a atuação da insulina no estado pós-prandial.

Crê-se que existe um fator no fígado, que permite o aumento da ação da insulina no seguimento de uma refeição. Esse fator os investigadores denominaram *HISS* (hepatic

insulin sensitizing substance), em português *substância hepática sensibilizadora da insulina*. A atuação desta substância ou fator é considerada uma peça chave para aumentar a sensibilidade da insulina nos tecidos, no estado pós-prandial. O mecanismo base desta substância consiste na ingestão da refeição estimular os nervos parassimpáticos hepáticos, que vão libertar acetilcolina no fígado, com consequente libertação de óxido nítrico hepático e posterior ativação da HISS. A HISS será neste caso a responsável pelo aumento da captação de glucose, por exemplo, no músculo-esquelético (W. Wayne Lutt, 2005).

Por outro lado a ausência de HISS ou em concentrações mais baixas, é desencadeada a HDIR *HISS dependent insulin resistance*. Este processo ocorre essencialmente no estado de jejum, em que a sensibilidade da insulina é menor, no entanto, estados prolongados de HDIR podem estar relacionados com síndromes de resistência à insulina ou até estados pré diabéticos e diabéticos (Lutt, 2007).

Estes investigadores creem que a atuação nestes mecanismos, ou seja, a mimetização da fisiologia da HISS e HDIR, seria um contributo eficaz na terapêutica da resistência à insulina e diabetes tipo 2. Uma das formas de procedimento plausíveis consiste na administração de agonistas colinérgicos, que visam promover a libertação de acetilcolina, libertação de óxido nítrico e consequente ação da HISS. Alguns estudos em ratos demonstraram a existência dessa possibilidade e atualmente decorre investigação no sentido de tornar a HISS um novo e eficaz alvo terapêutico no combate à resistência da insulina e diabetes tipo 2 (Lutt, Ming, Macedo, & Legare, 2008)

## **2. ENERGIA E METABOLISMO**

A manutenção das funções importantes do organismo, como a síntese, o crescimento, e a integridade celulares ou termorregulação, requerem energia. As características individuais (sexo, idade, composição corporal e atividade física) determinam as necessidades metabólicas de cada indivíduo (Haller & Bines, 2013).

Para a produção de energia é necessária uma disponibilidade de combustível, que deve ser mantida tanto no estado de jejum como em estado pós-prandial. As fontes energéticas exógenas, designadamente os hidratos de carbono, os lípidos e as proteínas, provenientes da alimentação, conduzem, no estado prandial, à produção de reservas energéticas, no fígado e no músculo-esquelético, sob a forma de glicogénio e, no tecido adiposo, sob a forma de triglicéridos. O armazenamento desta energia permite a homeostase nos processos metabólicos, nas fases que decorrem entre a ingestão de alimentos (armazenamento de energia) e o período pós absorptivo/jejum (degradação das reservas energéticas) (Haller & Bines, 2013).

A gliconeogénese permite a manutenção das reservas de glicogénio através da produção de glicose em períodos de jejum prolongado (M. C. Moore, Connolly, & Cherrington, 1998). Os substratos para a gliconeogénese, como o lactato e os aminoácidos, são transportados do tecido adiposo e músculo-esquelético para o fígado e para o rim, local onde se inicia o processo. Em jejum prolongado, o principal órgão responsável pela produção da glicose corporal é o fígado (Rojas & Schwartz, 2014).

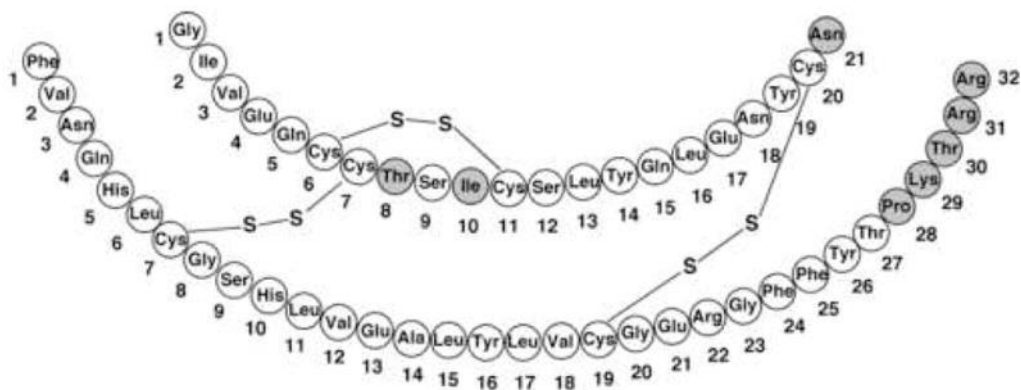
A insulina surge como a hormona responsável pela regulação do processo metabólico que ocorre após o estado pós-prandial (R. J. F. Manders et al., 2014). Como hormona chave, a insulina atua diretamente na captação de glicose e na formação de glicogénio, e indiretamente na libertação de substratos da periferia para o tecido hepático (Edgerton et al., 2006). A insulina também está envolvida na síntese proteica. O estado pós-prandial potencia a inibição da libertação de glicose pelo fígado, causada pelo aumento acentuado de insulina, e assim a glicose proveniente da digestão é utilizada como fonte energética pelos tecidos corporais. O fornecimento energético durante o jejum é garantido pela glicose gerada no fígado (Nordlie, Foster, & Lange, 1999)

A monitorização do balanço energético corporal é acionada pelos centros cerebrais que se localizam no hipotálamo. No estado prandial, o hipotálamo lateral regula a necessidade de ingestão de alimentos, enquanto a saciedade é determinada no núcleo do hipotálamo, que transmite a sensação de saciedade. O comportamento alimentar é definido pelas variações na ativação neuronal entre cada centro (Coll & Yeo, 2013; Haller & Bines, 2013).

### 3. METABOLISMO FISIOLÓGICO DA INSULINA E DA GLICOSE

#### 3.1 A molécula de insulina

A insulina é uma hormona polipeptídica, constituída por 51 aminoácidos, secretada nas células  $\beta$  pancreáticas dos ilhéus de Langerhans. As duas cadeias de aminoácidos estão ligadas entre si por pontes dissulfeto (A7-B7) e A20 e B19. A cadeia A é constituída por 21 resíduos de aminoácidos (A1-A21) e a cadeia B (B1-B30), mais longa, por resíduos de 30 aminoácidos. A cadeia A contém ainda uma ligação adicional de dissulfeto A6-A11. A síntese das cadeias dissulfeto ocorre quando a proteína precursora (proninsulina) é dobrada no retículo endoplasmático rugoso e antes de seguir para os grânulos secretórios (Chang, Choi, Jang, & Shin, 2003). A insulina humana tem peso molecular 5808 (Horwitz, Starr, Mako, Blackard, & Rubenstein, 1975). A maior parte da hormona é inativada através fígado, rins e se aplicar e na placenta. Na biossíntese de insulina a molécula de agrega-se para a formação de dímeros, na presença de iões de zinco, unem-se 3 dímeros de insulina para a formação de um monómero (Derewenda, Derewenda, Dodson, Hubbard, & Korber, 1989).



**Figura 1** Estrutura primária da Insulina. Fonte: Ye, Hill, Kauffman, Gryniewicz, & Han, 2013

### 3.2 Biossíntese da Insulina

A biossíntese da insulina ocorre nas células  $\beta$  do pâncreas através dos seus precursores préproinsulina e pró-insulina (Dunn, 2005). A préproinsulina é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) local que confere o meio indicado para a formação das pontes dissulfeto inter e intra cadeias, bem como a conformação proteica adequada. No RE as enzimas proteolíticas são responsáveis por clivar a préproinsulina, originando assim a pró-insulina. Esta é logo transportada para o complexo de golgi onde vai de encontro às vesículas secretoras e é agregada a uma estrutura com as espécies  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Chausmer, 1998).

A pró-insulina é formada igualmente por uma única cadeia, que incluem as cadeias A e B. As cadeias estão ligadas através do péptido-C que é secretado pelas células  $\beta$  em concentrações semelhantes à insulina (Polonsky & Rubenstein, 1984). A remoção do péptido-C ocorre a nível das vesículas secretórias com a intervenção da tripsina e das enzimas *carboxypeptidase-like*, estas convertem a pró-insulina  $[(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6]$  no seu hexâmero de insulina  $[(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{In})_6]$ . O hexâmero de insulina é armazenado na forma inativa e para desencadear uma resposta biológica o hexâmero deve ser convertido em monómero (Dunn, 2005).

O armazenamento da insulina na forma de hexâmero dentro das vesículas das células  $\beta$  pancreáticas confere estabilidade à hormona. As moléculas de insulina formam hexâmeros com os iões de zinco, o que lhe permite ser osmoticamente estável até à sua secreção (Chimienti et al., 2006). A cristalização da insulina sob a forma de hexâmeros confere proteção às cadeias recém-sintetizadas, o que fornece maior estabilidade química bem como física à hormona. O hexâmero da insulina mantém a sua estabilidade no longo termo, uma vez que a insulina per se é altamente reativa, desta forma a hormona esta disponível (Dunn, 2005).

### 3.3 Secreção da insulina

As células  $\beta$  pancreáticas têm como função principal a secreção de insulina, no momento apropriado e em quantidades adequadas, sob pena de alterações na homeostase da glicose, que podem conduzir a hipoglicemia - se a liberação de insulina for excessiva - e a hiperglicemia severa - se a liberação for diminuída (Henquin, 2009).

A secreção da insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas ocorre como resposta a diversos estímulos fisiológicos, como a glicose, a arginina e as sulfonilureias, no entanto fisiologicamente o maior determinante da sua secreção é a glicose (Permutt, 1981). Outros cofatores também estão envolvidos no processo de sinalização para desencadear a secreção de insulina por exemplo glúcidos, ácidos gordos, corpos cetônicos, neurotransmissores e hormonas, que causam a despolarização elétrica das células  $\beta$  e, através da variação nas concentrações de glicose plasmática, estimulam ou inibem a secreção de insulina (Eliasson et al., 2008).

Para a regulação da homeostase da glicose é importante a secreção de insulina ser precisa (Mourad, Nenquin, & Henquin, 2011). O mecanismo que o permite desenrola-se através de duas formas distintas, mas complementares, conhecidas por *via de ativação* e *via de amplificação metabólica*. Na primeira via, e principal, o aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  promove o seu influxo através dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente na membrana plasmática (Tarasov, Dusonchet, & Ashcroft, 2004). Esta ativação envolve canais potássio sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), dependentes de despolarização. Em concentrações inferiores ao limiar de ativação da glicose, os canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$  estão abertos e o efluxo de  $\text{K}^+$ , através dos mesmos, mantém o potencial de membrana negativo e os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes encerrados (Navarro-Tableros, Fiordeliso, Hernández-Cruz, & Hiriart, 2007).

No estado pós-prandial as concentrações de glicose plasmática aumentam, o que estimula o metabolismo das células  $\beta$ -pancreáticas e a captação da glicose pelos tecidos. Neste caso ocorre o encerramento dos canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , diminuindo o influxo de  $\text{K}^+$ , com consequente despolarização da membrana. Se esta despolarização for o suficiente, dá-se a abertura dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente, permitindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ocorrendo secreção de insulina, isto é, se os canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$  estiverem abertos é inibida a

secreção de insulina (Tarasov et al., 2004). Os canais  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  voltagem-dependentes são posteriormente ativados e a membrana é repolarizada (Mourad et al., 2011). Por outro lado, na via de amplificação metabólica, não há uma relação direta dos canais  $K_{ATP}$  e/ou algum aumento nas concentrações citosólicas da  $Ca^{2+}$ . Por esta via, os efeitos de  $Ca^{2+}$  são amplificados promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  e ativando a secreção de insulina (Mourad et al., 2011; Seino, Shibasaki, & Minami, 2011).

Modelos em estudo indicam que a libertação da insulina é bifásica (Prentki, Matschinsky, & Madiraju, 2013). Sob estímulo, a concentração de glicose aumenta e a insulina é libertada. Numa primeira fase, esta libertação é abrupta e a uma velocidade rápida, seguindo-se uma libertação mais lenta com estabilização ou aumento progressivo da taxa de insulina libertada, designada segunda fase (Henquin, 2009). De acordo com Seino, a primeira fase de secreção de insulina resulta na libertação pronta das vesículas de insulina ligadas à membrana plasmática, enquanto a segunda fase consiste na libertação das vesículas, que estão afastadas da membrana plasmática, e se ligam à mesma, com conseqüente libertação de insulina (Seino et al., 2011).

### **3.4 Libertação pulsátil da insulina**

A variação da concentração de insulina periférica deve-se a oscilações na secreção de insulina (Juhl et al., 2002). Esta variação depende das alterações que ocorrem ao nível hormonal, nervoso, metabólico e ainda da indução por fármacos (Juhl et al., 2002). A coordenação dos milhares de ilhéus espalhados pelo pâncreas é um fator decisivo para a libertação de insulina ao mesmo tempo e de forma pulsátil (Bergsten & Grapengiesser, 1994). Bertram R. et al concordam que à libertação de insulina em ilhéus isolados esteja subjacente um ritmo que é gerado endogenamente no interior das células  $\beta$  pancreáticas. A modulação deste processo também se deve a oscilações na glicólise (Bertram, Sherman, & Satin, 2007).

Nadal e os colaboradores indicam que as oscilações que estão subjacentes à alteração das concentrações de  $Ca^{2+}$  pode ser um motivo para a libertação pulsátil da insulina (Nadal, Quesada, & Soria, 1999). Por outro lado, os estudos de Hellman verificaram que a libertação da insulina em ratos é contínua, ao contrário dos humanos, o que poderá ser

indicativo da presença de fatores humorais no organismo que sincronizam a liberação de insulina (Hellman, Salehi, Grapengiesser, & Gylfe, 2012)

A existência destes fatores humorais pode contribuir para a sincronização de todos os ilhéus pancreáticos para a liberação pulsátil de insulina, esta sincronização só é possível se os presumidos fatores humorais colaborarem com os neurónios pancreáticos (Gylfe & Tenghlom, 2014). Também Weir et al após observação do pâncreas canino consideraram que os neurónios pancreáticos estão envolvidos na secreção pulsátil de insulina. O investigador e o seu grupo perceberam a necessidade de coordenação complexa da atividade secretória dos ilhéus (Stagner, Samols, & Weir, 1980).

De acordo com Piston, esta coordenação não se verifica quando existe uma dispersão das células  $\beta$  pancreáticas. A observação dos ilhéus isoladamente permitiu verificar que estes têm atividade elétrica dessincronizada, semelhante à verificada nas células dispersas, com conseqüente decréscimo na secreção de insulina (Benninger & Piston, 2014).

A investigação que Bergsten desenvolveu-se no sentido de perceber relação entre as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  e a secreção de insulina permitiram confirmar o conceito. Os autores consideram que a oscilação do  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta ao aumento da glicose, que se pode observar em células  $\beta$  pancreáticas individuais como nos ilhéus pancreáticos, é determinante para a liberação pulsátil de insulina (Bergsten & Grapengiesser, 1994)

O fenómeno da pulsabilidade da secreção da insulina é importante no controlo da homeostase da glicose. A secreção de insulina pulsátil permite a inibição da produção de glicose hepática; Mirbolooki e o seu grupo também indicam que a administração de pulsos de insulina terapêuticos, em vez de continuamente, melhoraram a resposta do tratamento da diabetes mellitus (Mirbolooki et al., 2009). Hellman considera que a exposição periódica do organismo à insulina é vantajosa para a prevenção da regulação negativa dos recetores de insulina (Hellman, 2009).

### 3.5 Ação da molécula de insulina

A ação da insulina envolve respostas complexas que em última instância medeiam o metabolismo das proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Os efeitos da insulina podem ser definidos em categorias principais que incluem a ação metabólica e por outro lado a promoção do crescimento (Kahn & Crettaz, 1985). Sobre a rapidez da ação da hormona podem ser definidos dois grupos principais: a *ação aguda* da insulina, que é a resposta mais rápida, e leva ao decréscimo da produção de glicose (Clausen et al., 1996), e a *ação crónica*, sem efeito imediato, que envolve a regulação da expressão genética de determinadas enzimas, através dos mecanismos bioquímicos que determinam a produção de glicose. No processo de ação aguda da insulina podem ainda ser identificados três componentes fundamentais do seu papel: os efeitos diretos no fígado, que comportam a inibição da glicogenólise (Fisher & Kahn, 2003); os efeitos indiretos da insulina mediados pela sua ação periférica, como por exemplo o controlo da lipólise os efeitos indiretos, mediados pela sinalização hipotalâmica da insulina (Guo et al., 2012).

Em baixas concentrações de insulina em circulação é possível observar os efeitos metabólicos, que ocorrem logo após a exposição das células à hormona; já a concentrações mais elevadas da hormona se verificam os efeitos de crescimento, que podem levar desde horas até dias a serem manifestados. O efeito de crescimento inclui, por exemplo, a organogénese fetal, a reparação e regeneração de tecidos (Kahn & Crettaz, 1985). A ação crónica, com efeito a longo prazo, não sendo devidamente regulada afeta as respostas agudas aumentando os níveis plasmáticos de insulina (Fisher & Kahn, 2003).

Outras respostas celulares da insulina também foram identificadas como a estimulação da captação de iões e aminoácidos, a regulação de enzimas celulares e rearranjos do citoesqueleto (Ganti, Nammi, & Lodagala, 1999).

A regulação do metabolismo lipídico também é comportado pela insulina, através do processo de inibição da lipólise e estímulo da síntese de ácidos gordos, a síntese proteica, através de várias vias metabólicas, como o transporte de aminoácidos e o início da translação. O crescimento e a diferenciação de células e tecidos específicos também fazem parte das funções desta molécula (Ogawa, Matozaki, & Kasuga, 1998)

A principal função da insulina, além das enumeradas, consiste na regulação da homeostase da glicose, em que a modulação da produção de glicose pela insulina envolve a sua sinalização pelos hepatócitos (Thorens & Mueckler, 2010) ou a ativação da insulina em locais diferentes do fígado, que por sua vez vão induzir ou inibir a produção de glicose através de modeladores neuronais, estes aspetos serão discutidos no capítulo 4. Estes mecanismos são importantes, pois podem ser indicadores de processos em desenvolvimento de resistência à insulina ou instalação de diabetes mellitus.

### **3.6 O recetor de insulina**

A molécula de insulina, à semelhança de outras hormonas, tem que se ligar a recetores específicos na membrana plasmática das células para desencadear a cascata de eventos biológicos característicos da sua ação (Kahn & Crettaz, 1985). O recetor tem duas funções fundamentais. A primeira consiste no reconhecimento da molécula de insulina entre outras moléculas presentes na circulação, processo este que é determinado pela elevada especificidade e afinidade do recetor de insulina. O segundo propósito prende-se com a transmissão do sinal que vai desencadear a ativação de determinadas vias metabólicas (Kahn & Crettaz, 1985).

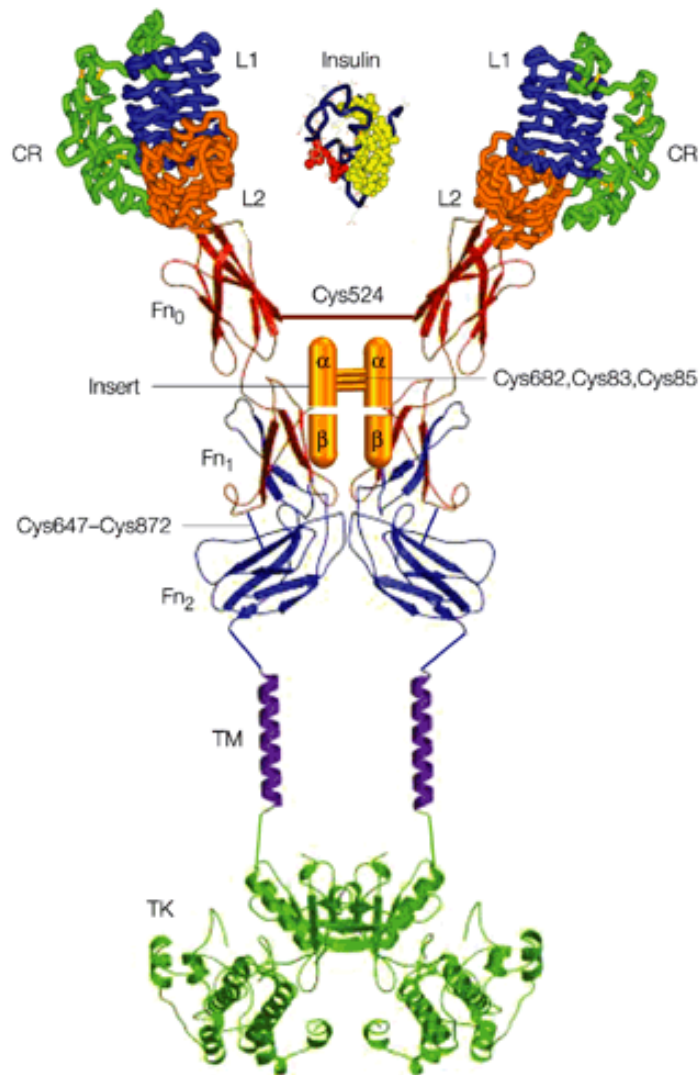
O recetor de insulina consiste numa proteína heterotetramera, constituído por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  transmembranares ligadas entre si por pontes dissulfito e com atividade tirosina cinase (Belfiore, Frasca, Pandini, Sciacca, & Vigneri, 2009). Quando a insulina se liga às subunidades  $\alpha$  tem início a cascata de fosforilação dos resíduos tirosina cinase, presentes nas subunidades  $\beta$ , que vai desencadear uma alteração conformacional estimulando a proteína cinase intrínseca do recetor (Ganti et al., 1999). Os recetores tirosina cinase são proteínas transmembranares constituídas por duas zonas: um local de ligação hormonal, extracelular, e uma zona intracelular constituída por uma sequência de aminoácidos que codificam o domínio catalítico da tirosina cinase. A ativação desta envolve a dimerização induzida pelo ligando, com conseqüente fosforilação dos recetores em diversos resíduos tirosina cinase e vice-versa, num processo conhecido por autofosforilação (Ganti et al., 1999).

Os recetores tirosina cinase requerem fatores acessórios para o desempenho das funções de sinalização, sendo o principal o substrato do recetor de insulina (IRS) (Chiu & Cline,

2010). O IRS (recetor do substrato 1 de insulina) é uma fosfoproteína e é o principal recetor para a insulina bem como para o recetor da IGF-1 (Pauli et al., 2008). A IRS-1 contém 21 locais de fosforilação dependentes da tirosina e é responsável pela maior parte das respostas biológicas da insulina (White & Kahn, 1994).

A função dos recetores de insulina não se limita aos tecidos alvo da insulina. Estudos sugerem que a insulina esteja ligada funcionalmente a diversos sistemas. O recetor da insulina encontra-se expresso no tecido ósseo, nomeadamente nos osteoblastos, estando ativamente envolvido nos processos fisiológicos de síntese de osteoblastos e de colagénio. A relação da insulina no mecanismo da osteocalcina também é revelante, pois esta é responsável pelo aumento do transporte de glicose para os adipócitos; Fulzele observou que a perfusão de osteocalcina melhorou a sensibilidade à insulina (Fulzele et al., 2010). A presença dos recetores de insulina a nível do sistema nervoso central também está descrita, Zhao indica que o recetor de insulina é expresso nos locais pré e pós-sinapse e desempenha um papel neuro modulatório das catecolaminas (Zhao & Alkon, 2001). A existência de duas variantes isoformas do recetor de insulina, em que a isoforma *B* apenas reconhece a insulina e a isoforma *A* é expressão em tumores, indicia a ação vasta da insulina. A sua expressão nestes locais poderá estar envolvida nos mecanismos de resistência a terapias cancerígenas (Pollak, 2012).

Ainda que os principais alvos da insulina sejam o tecido músculo-esquelético, hepático e adiposo, os recetores de insulina também se encontram no coração, no cérebro, no rim e em células do sistema imunitário (Belfiore et al., 2009).



**Figura 2** Recetor de insulina organização do supradomínio do recetor de insulina. Legenda: A cor de laranja está representada a superfície de ligação. Fonte: Whittaker & Meyts (2002)

### 3.7 A homeostase da glicose

A homeostase da glicose é mantida através do glucagon, que é a hormona responsável pelo controlo hepático da sua libertação (Delaere et al., 2012). A libertação do glucagon é estimulada pela hipoglicémia (Girard, 2006). A taxa de glicose que entra e sai da circulação sanguínea define as suas concentrações no plasma. Para manter este fluxo equilibrado, por exemplo, após a ingestão de uma refeição, em que os níveis de glicose plasmática aumentam, é necessária a remoção da mesma do plasma. Por outro lado, quando existe uma utilização elevada de glicose, por exemplo, na prática de atividade

física, ocorre o decréscimo da glicose no plasma e assim há que promover o seu fornecimento em circulação (Shrayyef & Gerich, 2010).

A regulação da glicose é sustentada também por diferentes hormonas, essencialmente a insulina (Bertram et al., 2007), o glucagon, a hormona de crescimento, catecolaminas (Rizza, Cryer, & Gerich, 1979), o cortisol (Dunning & Gerich, 2007) e os ácidos gordos livres (Tarasov et al., 2004). (Ver tabela 1).

Tabela 1 Hormonas regulatórias da glicose e efeito metabólico Fonte: adaptado Shrayyef & Gerich, 2010

	Síntese da glicose	Utilização da glicose	Lipólise
<b>Insulina</b>	-	+	-
<b>Glucagon</b>	+	0	0
<b>Epinefrina</b>	+	-	+
<b>Cortisol</b>	+	-	+
<b>Hormona de crescimento</b>	+	-	+
<b>Ácidos gordos livres</b>	+	-	0

#### Legenda

■ Inibição + Estimulação 0 Sem efeito descrito

O glucagon é secretado pelas células  $\alpha$  do pâncreas endócrino, sendo a sua secreção inibida pela hiperglicemia e estimulada pela hipoglicémia (Girard, 2006). Como hormona antagonista da insulina, o glucagon promove também a gliconeogénese, através da intervenção de aminoácidos e lactato, e a glicogenólise, contribuindo deste modo para o efeito hiperglicémico (Nordlie et al., 1999; Sherwin, Hendler, DeFronzo, Wahren, & Felic, 1977).

Os efeitos do glucagon são essenciais na indução hepática da gliconeogénese e glicogenólise. Embora a hormona tenha um impacto acentuado nos processos de glucogénese e glicogenólise, o glucagon per se não tem capacidade para aumentar os percursos glicogénicos, através da afeção da gordura ou do músculo, podendo este fato limitar a influência do glucagon na gliconeogénese (Rizza et al., 1979).

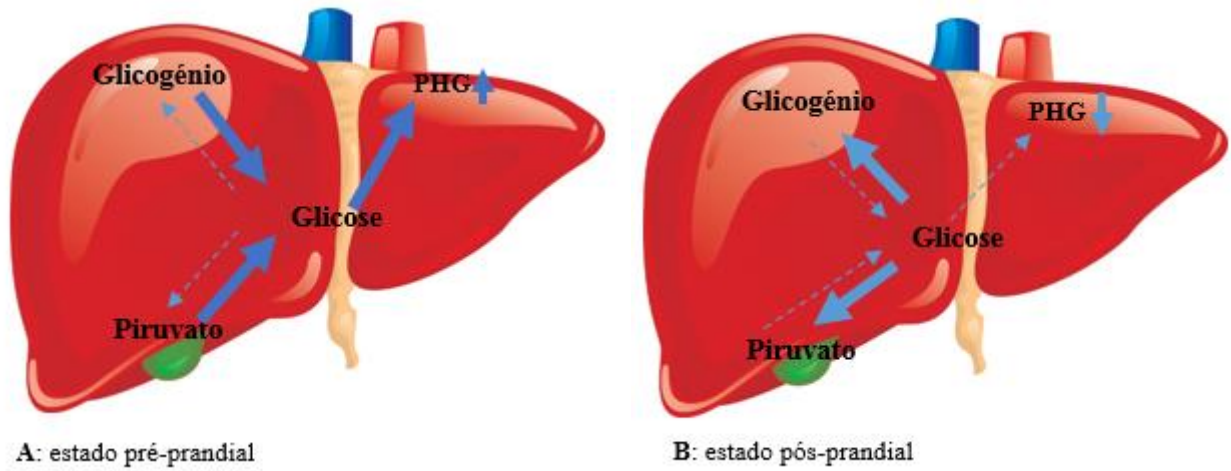
Com atuação exclusiva no fígado, o glucagon liga-se aos seus recetores e ativa a adenilato-ciclase, aumentando os níveis de cAMP que, em resultado da estimulação da fosforilase, promove a glicogenólise (Rizza et al., 1979).

Em jejum, ocorre a libertação de glicose pelo fígado, através dos processos de glicólise e gliconeogénese, sendo que esta é a principal fonte hepática para a produção de glicose endógena. Em jejum, há promoção da lipólise do tecido adiposo, com a consequente libertação de ácidos gordos, que são convertidos em corpos cetónicos no fígado, através dos processos da  $\beta$ -oxidação e da cetogénese, que decorrem nas mitocôndrias (Rui, 2014).

Em estado pós-prandial, e em resposta ao aumento da glicose periférica, as células  $\beta$ -pancreáticas libertam insulina, que é responsável também pela expressão da glucocinase. Esta vai aumentar a captação de glicose pelo fígado através da fosforilação da glicose e posterior formação de glicose-6-fosfato (G6P) (Guo et al., 2012). Por sua vez, a G6P estimula a síntese de glicogénio e inibe a glicogenólise (Guo et al., 2012). Em períodos prolongados sem alimento, a insulina é regulada negativamente, pelo que há inibição da sua secreção, com consequente diminuição do glicogénio sintase e ativação do glicogénio fosforilase (Shrayyef & Gerich, 2010).

A regulação da libertação de glicose durante os estados pré e pós-prandial é mantida essencialmente pelo fígado (Girard, 2006; Lin, Handschin, & Spiegelman, 2005). Nos períodos curtos de jejum, a libertação de glicose dá-se através da glicogenólise hepática. Por outro lado, se forem esgotadas as reservas de glicogénio, então ocorre a síntese de glicose através da gliconeogénese pelos hepatócitos (Lin et al., 2005). Este processo envolve o consumo de lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol (Avogaro et al., 1996).

A insulina é responsável pelo aumento do transporte de glicose no tecido muscular e no tecido adiposo. Este processo ocorre através do recrutamento dos transportadores de glicose de um reservatório intracelular. Os transportadores de glicose são fundamentais para manter o fluxo da glicose intra e extracelular balanceado. Assim, quando os níveis de glicose dentro da célula aumentam, os transportadores de glicose promovem a sua passagem através da membrana, em direção à zona extracelular, atingindo-se um novo equilíbrio (Bertram et al., 2007; Gylfe & Tengholm, 2014).



**Figura 3:** Representação esquemática do metabolismo da glicose no estado pré-prandial (A) e pós-prandial (B). Em A observa-se que, em jejum, ocorre um aumento da gliconeogênese e a redução da glicogenólise. Em B verifica-se, no estado pós-prandial, a taxa de glicólise e glicogênese aumentam e taxa de glicogênese aumenta, enquanto a gliconeogênese e a gliconeogênese e a glicogenólise estão diminuídas. Fonte: adaptado Guo et al., 2012

#### **4. O FÍGADO NA REGULAÇÃO DA INSULINA**

O conceito da regulação hepática da glicémia no organismo, embora largamente estudado e referenciado, é relutantemente aceite. O reconhecimento do papel que o fígado assume na regulação da homeostase da glicose resultou da identificação da sua capacidade de captação e produção de glicose, e também do seu envolvimento na determinação da sensibilidade da insulina periférica ótima durante o estado pós-prandial, e na regulação dos seus níveis plasmáticos. Estes processos ocorrem através da intervenção da sinalização hormonal e do sistema nervoso parassimpático. A localização anatómica do fígado é adequada para a sua ação como tampão para a glicose no sangue, e também como centro de coordenação e gestão da energia (Macedo et al., 2014).

A elevação da concentração de glicose no sangue promove a produção da insulina nas células  $\beta$  do pâncreas (McCall, Wiesenthal, Shi, Polonsky, & Giacca, 1998). No meio intracelular dá-se a glicólise, em que a glicose é fosforilada pela glucocinase a glicose-6-fosfato, que mantém a glicose dentro da célula. O aumento de ATP proveniente da glicólise bloqueia os canais  $K^+$  dependentes, que se encontram na membrana celular das células  $\beta$  (Mourad et al., 2011), resultando assim na despolarização da célula e na entrada de  $Ca^{2+}$ , com consequente exocitose da insulina contida nas vesículas (Eliasson et al., 2008). Após exocitose, a insulina destina-se a inclusão em diversos processos catabólicos e anabólicos no organismo (Eliasson et al., 2008).

##### **4.1 Armazenamento de glicogénio no fígado**

A GLUT4 destaca-se como transportador da glicose, entre diversos tecidos alvo, como principal transportador a nível do tecido muscular e tecido adiposo (Guo et al., 2012). A translocação dos transportadores GLUT 4, das vesículas de insulina com destino à membrana plasmática, ocorre quando a insulina se liga aos seus recetores na superfície celular (Olson & Pessin, 1996). Se as concentrações de glicose diminuírem então a quantidade de insulina plasmática também decresce, permitindo que os transportadores GLUT4 retomem a sua posição nas vesículas, onde aguardam por futura sinalização da molécula de insulina (Alonso et al., 2005)

## **4.2 Produção de glicose pelo fígado**

A complexidade da síntese da glicose pelo fígado está relacionada com fatores como a disponibilidade de precursores, as reservas de glicogénio, o estado nutricional do individuo bem como com fatores hormonais. A insulina inibe a glicogenólise em baixas concentrações (M. C. Moore et al., 1998), diminuindo ainda acentuadamente a secreção de glucagon pelas células  $\alpha$  pancreáticas. A inibição da secreção do glucagon diminui a ativação da glicogenólise bem como da gliconeogénese (Rui, 2014).

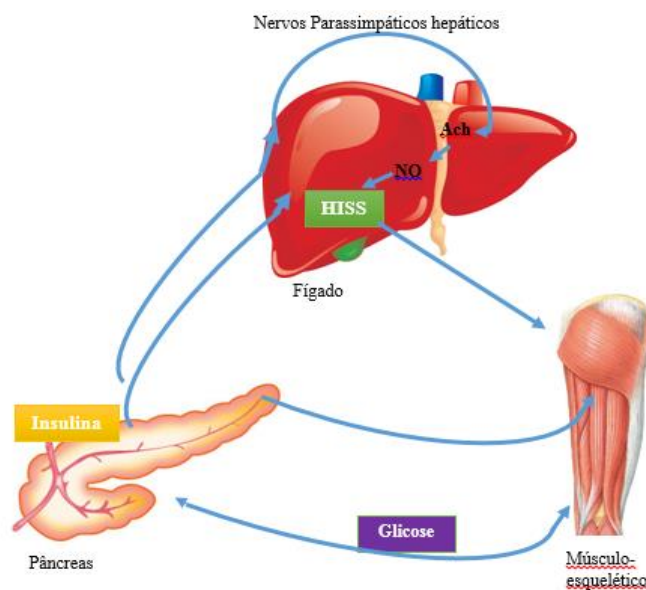
## **4.3 Hipótese HISS**

Existem diversas evidências sobre a importância do sistema hepático na determinação da concentração de insulina plasmática e a sua ação nos tecidos periféricos é clara. O estado pós-prandial é essencial para a atuação da insulina. Verificou-se que a ação da insulina induzida por este estado pode ser suprimida sem a necessária alteração das concentrações de insulina periférica. Assim surgiu o novo conceito do fígado como efetor chave na modulação da insulina periférica. Esta hipótese indicia a existência de um fator no fígado, que relaciona o sistema parassimpático hepático com a sensibilidade à insulina periférica, principalmente a nível do músculo-esquelético. A HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina) coopera na sensibilidade da ação da insulina pós-prandial (Lautt et al., 2001)

No estado pós-prandial, a resposta da insulina à glicose atinge o dobro da sua capacidade (Lautt, 2007); por outro lado, em jejum, a libertação de insulina é baixa, resultando da libertação de um pulso de HISS pelo fígado. A HISS é libertada em resposta a uma refeição através de um primeiro sinal, mediado pelo sistema nervoso parassimpático, e um segundo sinal que é resposta ao aumento dos níveis de glutatona hepática (GSH) (Lautt et al., 2001). A atividade da HISS afeta a captação e o armazenamento de glicose sob a forma de glicogénio no músculo-esquelético (Guarino, Afonso, Raimundo, Raposo, & Macedo, 2003)

Em estado pós-prandial, a sensibilidade da insulina é maior, tendo este fenómeno - sensibilidade da insulina induzida pela refeição, a MIS (sensibilidade à insulina induzida por refeição) tendo, sido recentemente quantificado. Este será detalhado em 4.9.

O aumento abrupto da glicose pós-prandial promove a libertação da HISS que, por sua vez, induz a MIS. O conceito de MIS deriva da observação da resposta da insulina logo após uma refeição. Observou-se que 100 minutos após administração de uma refeição, em ratinhos (Sadri et al., 2006) e em humanos (Patarrão et al., 2008) a resposta da insulina duplica. A ausência de MIS promove o desenvolvimento de estados crónicos de hiperglicemia, hiperinsulinismo e hiperlipidemia (Seredycz, Ming, & Lutt, 2006) e aumento do *stress* oxidativo, associado ao risco cardiovascular (W Wayne Lutt, 2007).



**Figura 4** A hipótese HISS. A libertação de insulina pelo pâncreas vai estimular os nervos parassimpáticos hepáticos, que libertam acetilcolina e de seguida óxido nítrico, ativando assim a HISS. Por sua vez a HISS atua no músculo-esquelético aumentando a sensibilidade da insulina e a captação de glicose adaptado (W Wayne Lutt, 1999)

#### 4.4 O sistema parassimpático hepático na homeostase da glucose

Lutt et al descreveram pela primeira vez o envolvimento dos nervos hepáticos parassimpáticos na ação da insulina. Experiências elaboradas por Lutt e o seu grupo de

investigadores revelaram que a ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos induzia uma resistência à insulina, e que a reversão desta resistência era possível com a administração direta de fármacos parassimpaticomiméticos no fígado tais como NO ou Ach (W.Wayne Lutt, 1980).

O estado pós-prandial conta com a regulação do sistema parassimpático hepático, através do controlo vagal da *clearance* e o efeito em determinados órgãos, embora estabelecido, continua por esclarecer. A hipótese revela que é no estado pós-prandial que os nervos parassimpáticos hepáticos promovem a *clearance* de uma quantidade elevada de glicose extra-hepática (Fernandes, Patarrão, Videira, & Macedo, 2011).

Xie e Lutt também propõem que os nervos hepáticos parassimpáticos regulam a libertação de um fator no fígado que controla seletivamente a ação da insulina no músculo-esquelético (Xie & Lutt, 1995, 1996). Moore e o seu grupo realizaram experiências com cães, que revelaram que a desnervação hepática crónica afetava a insulina periférica, com conseqüente diminuição da captação da glicose pelos membros. Estes dados vêm reforçar a noção de que a ativação dos nervos parassimpáticos hepáticos libertam a HISS que sensibiliza o músculo-esquelético para a insulina ou atua também como substância *insuline-like* (Fernandes et al., 2011). Os resultados destes grupos concluíram que a desnervação hepática culminou num estado de insulinoresistência pós-prandial, mas a secreção da hormona não se revelou afetada e a incorporação da glicose pelo fígado e a produção pelo pâncreas também não foram se afetadas, mas outros órgãos (coração, músculo-esquelético e rim) diminuíram a *clearance* de glicose após a dos nervos hepáticos. Estes estudos revelaram a magnitude do papel do sistema parassimpático hepático na manutenção da homeostase da glicose pós-prandial em diversos órgãos, demonstrando pela primeira vez (Fernandes et al., 2011) que a *clearance* da glicose pós-prandial no coração, no tecido músculo-esquelético e no rim é dependente da integridade dos nervos parassimpáticos hepáticos. Com efeito, o equilíbrio metabólico do nosso organismo depende essencialmente do fígado, órgão este que, consoante o fornecimento nutricional, altera a captação, o armazenamento e a libertação de glicose (Püschel, 2004).

Os estudos realizados por Püschel também reforçam o conceito do controlo parassimpático na homeostase da glicose. De acordo com as suas experiências, a ativação dos nervos parassimpáticos ocorre se existir um gradiente positivo de glicose

na artéria-portal, se for detetada hiperglicemia cerebral ou se existir glicose no intestino (Püschel, 2004). Matsuhisa e o seu grupo subscrevem o conceito nos seus estudos em ratos que foram sujeitos a vagotomia hepática, e revelaram que a produção/libertação da glicose basal estava significativamente aumentada e a supressão do glucagon hepático teria diminuído (Matsuhisa et al., 2000).

A situação de hipoglicemia é bastante ameaçadora para os mamíferos, sendo que a reação do seu organismo é a contra regulação do sistema nervoso simpático, o que vai promover o aumento das concentrações das hormonas circulantes (glucagon, adrenalina e cortisol) (Rizza et al., 1979), que por sua vez vão mobilizar a glicose principalmente ao nível do fígado. O fígado parece também contribuir para a libertação induzida, no entanto a contribuição dos nervos simpáticos no controlo da euglicemia parece pouco relevante. Os nervos parassimpáticos aferentes e eferentes são os moduladores cruciais do controlo da euglicemia hormonal (Püschel, 2004).

#### **4.5 A importância do óxido nítrico hepático**

Os nervos parassimpáticos hepáticos, tal como descrito anteriormente, são de grande relevância no mecanismo de regulação hepática da homeostase da glicose. A *clearance* da glicose pós-prandial envolve uma cascata de eventos que incluem a libertação de acetilcolina e a posterior ativação dos recetores muscarínicos, que vão induzir a produção de óxido nítrico (NO) (Macedo et al., 2014). Diversos grupos demonstraram a importância do NO na ação da insulina periférica, através da aplicação de diversas estratégias, nomeadamente o bloqueio da atividade da NO sintase e a administração de um antagonista do NO, dos quais resultaram fenómenos de resistência à insulina (Macedo et al., 2014).

Roy & Perreault demonstraram, em estudos com ratinhos, que a NO sintase influenciava a distribuição de glicose nos tecidos periféricos mediados pela insulina. Os seus resultados suportam a hipótese de que a ação da insulina, ao aumentar a captação da glicose no músculo-esquelético e outros tecidos periféricos sensíveis à insulina, é dependente do NO sintase (Perreault & Roy, 1998).

O grupo de Lutt também observou que a ablação hepática, o bloqueio dos recetores hepáticos muscarínicos ou do NO sintase promoviam uma resistência à insulina (Guarino, Correia, Lutt, & Macedo, 2004) indiciando a importância da NOS no mecanismo que medeia a sensibilidade da insulina periférica. Lutt et al testaram a hipótese do NO hepático estar envolvido na libertação da HISS, sendo sintetizado em resposta à ligação da acetilcolina aos recetores muscarínicos do fígado. O grupo entendeu que a administração de acetilcolina ou dadores de NO não melhora a captação de glicose periférica per se (Guarino et al., 2004). Guarino e Macedo verificaram, mais tarde, que a NO sintase não atua sozinha. Na sua experiência, observou-se que a depleção da GSH hepática também promovia a resistência à insulina que, aparentemente, era parcialmente inibida pelo bloqueio hepático da NO sintase (Guarino & Macedo, 2006a).

A existência de NO a nível local é essencial para a perfusão microvascular. Deste envolvimento do NO na regulação da captação da glicose num estado de hiperinsulinismo fisiológico resulta, então, que a sua ausência ou prejuízo pode contribuir para a resistência à insulina (Bradley, Richards, Keske, & Rattigan, 2013). A ação da insulina permite, no endotélio vascular, a manutenção da integridade e tonicidade do tónus vascular. As células endoteliais produzem NO em resposta à insulina, ação que conduz à “entrega” de produtos como hormonas, nutrientes e oxigénio, em diversos tecidos (Liu, 2007).

#### **4.6 A importância da glutathiona hepática**

A regulação da sensibilidade da insulina pós-prandial é modulada essencialmente pelo fígado. Este mecanismo requer a ativação dos nervos parassimpáticos hepáticos, o NO e a GSH hepática (Ricardo A Afonso, Ribeiro, Fernandes, Patarra, & Macedo, 2007). Macedo e os colaboradores testaram a hipótese da coadministração de NO e glutathiona hepática (GSH) aumentar a sensibilidade da insulina dependente da GSH e NO (Guarino & Macedo, 2006b); estes investigadores propõem que GSH e o NO mimetizam a síntese da HISS. A observação realizada por Guarino 2003, também indicia a necessidade da GSH para a ação da insulina, uma vez que a diminuição dos

níveis de GSH culmina em prejuízo da resposta da insulina dependente da HISS no músculo-esquelético (Guarino et al., 2003).

O grupo de Macedo percebeu que a diminuição da sensibilidade da insulina se deve à depleção da GSH. A sensibilidade da insulina pós-prandial periférica é potenciada pela GSH, cuja atividade é descrita pelos investigadores na presença de dois sinais permissivos induzidos pelos nervos parassimpáticos hepáticos e a GSH, que funcionam como indicadores da presença de alimento no organismo (Guarino & Macedo, 2006a; Schafer, Legare, & Lutt, 2010) em ratos no estado de jejum (Guarino & Macedo, 2006). Verificou-se nestes ratos, em jejum por 24h, um aumento da insulina pós-prandial quando administrado NO e GSH diretamente no fígado (Guarino & Macedo, 2006). Os resultados revelaram que a administração apenas de NO exógeno não era suficiente para induzir a ação da insulina, sugerindo que, para existir ação da hormona, de acordo com Macedo, ambas as substâncias - NO e GSH - devem estar presentes no fígado (Guarino & Macedo, 2006a).

#### **4.7 A ação do glucagon**

O aumento da concentração de glicose no sangue, em situações fisiológicas, é característico do estado pós-prandial. Aqui a secreção de insulina é aumentada e os níveis de glucagon mantêm-se constantes. Como resultado deste equilíbrio surge um aumento da captação de glicose pelos tecidos e um aumento das reservas de glicogénio e síntese de triglicéridos e gordura (Voshol et al., 2003).

A insulina surge, assim, como a hormona da abundância, pois promove o armazenamento de glicose nos tecidos corporais, enquanto o glucagon age como a hormona da necessidade de glicose. A sua atuação consiste na libertação hepática de glicose, mantendo e fornecendo glicose em estados de hipoglicemia ou jejum prolongado. O glucagon tem ação máxima na ausência de fontes energéticas exógenas, por exemplo em jejum, que é suportada pelo seu feedback positivo (Sherwin et al., 1977).

Lu e os seus colegas observaram que os efeitos do glucagon mediados pela cAMP promoviam o decréscimo dos níveis de GSH devido à inibição da GSH sintase. Deste

modo, em jejum, quando os níveis de glucagon e cAMP estão elevados, a GSH decresce (Lu, Kuhlenkamp, Garcia-Ruiz, & Kaplowitz, 1991). Por outro lado, o estado pós-prandial induz a baixa recepção de glucagon pelo fígado, permitindo o aumento da GSH à medida que a cAMP diminui (Lu et al., 1991).

Lautt e os seus colaboradores também verificaram que a indução de uma dose de glucagon no fígado, no estado pós-prandial, não promove a libertação de glicose, ocorrendo ainda uma diminuição dos níveis da GSH, com conseqüente resistência à insulina periférica (Afonso, Lautt, Ribeiro, Legare, & Macedo, 2007).

O mecanismo de regulação dos níveis de glicose pelo glucagon permite controlar a homeostase da glicose em períodos de ingestão excessiva de hidratos de carbono, e o seu excesso é armazenado como glicogénio ou ácidos gordos, para utilização nos períodos de jejum (Haller & Bines, 2013).

#### **4.8 A HISS pós-prandial**

Em 1980, Lautt propôs que os nervos parassimpáticos atuavam em sinergia com a insulina, e que existia um fator gastrointestinal responsável pelo reflexo neural nos nervos parassimpáticos hepáticos, que respondia à presença de glicose no intestino (Lautt, 1980). O investigador percebeu que existia uma resposta secundária que envolvia a insulina e os nervos parassimpáticos hepáticos, e esta resposta estava dependente da ativação das vias colinérgicas nos nervos parassimpáticos hepáticos, em animais sujeitos a injeção de insulina nas artérias carótidas (Lautt, 1980).

Para Lautt, a diabetes e as alterações metabólicas associadas a esta patologia, estavam intimamente relacionadas com a neuropatia do sistema autónomo. Esta conclusão surgiu após observar a necessidade do fígado para a libertação de insulina, que por sua vez estimulava a captação de glicose, após teste de carga oral de glicose (W. Wayne Lautt, 1980).

Estudos realizados por Xie et al revelaram que a ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos conduzia a uma situação de hiperglicemia, ou seja, a ação hipoglicemiante da insulina era reduzida acentuadamente (Xie & Lautt, 1993). A administração de atropina, um antagonista colinérgico muscarínico, também induzia o mesmo efeito que a

desnervação hepática, isto é, a redução do efeito hipoglicemiante da insulina (Xie & Lutt, 1993). Em todo o caso, a administração de acetilcolina restaurara a condição fisiológica da insulina (Xie & Lutt, 1993). É de salientar que a administração de acetilcolina reverte os efeitos da redução da sensibilidade da insulina apenas se administrada por via intraportal (veia porta), pois a perfusão intravenosa de acetilcolina, não demonstrou qualquer efeito (Xie & Lutt, 1996). Embora as observações evidenciassem a relação entre a desnervação hepática e o seu prejuízo na captação de glicose, Lutt et al entenderam que podiam estar relacionadas com a resistência à insulina global. Assim, surge a hipótese da existência de uma hormona libertada pelo fígado, após estimulação pela acetilcolina, que percorre a corrente sanguínea e age seletivamente no músculo-esquelético, a HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina) (Lutt, 1999).

No seguimento das investigações Lutt e o seu grupo estudaram também a importância do NO no metabolismo hepático. Paralelamente a estudos anteriores, a resistência à insulina também se desenvolveu quando administrado um inibidor do NO sintetase, tendo o mesmo ocorrido com a desnervação hepática ou a administração de atropina (W Wayne Lutt, 1999; Xie & Lutt, 1995). A resistência à insulina podia ser revertida com a administração de um dador de NO, via intraportal, uma vez que a perfusão intravenosa não surtia efeito (W. Wayne Lutt, Wang, Sadri, Legare, & Macedo, 1998; W Wayne Lutt, 1999). Este efeito tinha sido observado em estudos prévios com a administração de acetilcolina. Guarino et al notaram que a administração intraportal de acetilcolina não revertia a resistência à insulina causada pela inibição do NO sintase, no entanto, a administração intraportal de um dador de NO teria a capacidade de melhorar o bloqueio parassimpático após bloqueio pela atropina (Guarino et al., 2004). Deste modo, a libertação de acetilcolina pelos nervos parassimpáticos hepáticos conduziria à formação de NO e posterior ativação da HISS (R. Ribeiro, 2010).

A relação da HISS com o estado prandial foi identificada quando Lutt e os colegas observaram que nos ratos em jejum a insulina não era libertada, ou a sua sensibilidade seria praticamente indetetável, pelo que o efeito da insulina seria nulo. Observou-se que em ratos anestesiados, a libertação da HISS era máxima no estado pós-prandial, 2h após uma refeição, decrescendo a sua ação progressivamente à medida que o organismo avança para o estado de jejum. Outros estudos, realizados em cães (Moore et al., 1998; Sherwin et al., 1977) e em gatos (Xie & Lutt, 1995), revelaram que a ação da insulina

na distribuição da glicose é de sensivelmente 25-35%, e em 24h de jejum em ratos reduzem em 45% a ação da insulina (Latour & Lutt, 2002).

A dependência acentuada da HISS no estado pós-prandial foi demonstrada em animais, que foram testados após a ingestão de uma refeição (2h pós-prandial). Observou-se uma resposta elevada da insulina no estado pós-prandial, enquanto a resposta da insulina diminuía nos períodos de jejum. Esta ocorrência é explicada pela diminuição do componente dependente da HISS (Lutt et al., 2001).

A via HISS, para estar adequadamente funcional, necessita da sinalização da presença de alimento no trato gastrointestinal, sob pena de comprometer a ação da insulina dependente da HISS.

Diversos fatores integram a via HISS e o seu estudo permite descodificar seus mecanismos de atuação e regulação. A GSH está envolvida nas vias hepáticas de regulação da glicose pós-prandial, uma vez que os seus níveis se verificam aumentados após a refeição. Pacientes diabéticos demonstraram um decréscimo nos níveis de GSH hepática, o que contribuiu para o *stress* oxidativo e posteriores anomalias na ação e secreção da insulina. Guarino e os seus colegas mostraram a importância da GSH hepática na otimização da função da HISS (Guarino et al., 2003). A investigação realizada por Guarino permitiu examinar ratos com depleção crónica da GSH hepática: nestes ratos, concluiu, a sensibilidade da insulina pós-prandial era inferior (Guarino et al., 2003).

Macedo e Guarino tentaram compreender a ação da GSH hepática e do NO quando administrados no fígado. Observaram que a administração dos fatores referidos em ratos em jejum (24h) aumentava a sensibilidade da insulina pós-prandial, concluindo assim que a presença de NO e GSH seria crucial para mimetizar a ação da HISS (Guarino & Macedo, 2006a). Os estudos vêm confirmar a hipótese da HISS pós-prandial.

Aproximadamente 50% da distribuição da glicose após uma refeição requer a ação da HISS. Para tal, são necessários dois sinais de *feeding*, que são ativados na presença de alimento no trato gastrointestinal superior e causam a libertação da HISS pelo fígado. O primeiro sinal atua no fígado através da via parassimpática e nos recetores muscarínicos com conseqüente ativação do NO sintase. A mediação do segundo sinal envolve um aumento de aproximadamente 40% da GSH hepática; para uma refeição resultar na HISS, ambos os sinais devem estar presentes e funcionais (Schafer et al., 2010). O

aumento substancial da ação da insulina em resposta a uma refeição e a posterior libertação da HISS é denominado sensibilidade da insulina induzida por refeição (Lautt et al., 2001). Ming e Lautt perceberam que, na presença dos dois sinais mencionados, a resposta metabólica da insulina em ratos duplica e em humanos triplica (Ming & Lautt, 2011).

O estado pós-prandial é uma peça chave para a ação da HISS, no entanto esta substância não revelou (até agora) ter algum efeito no estado de jejum, o que indicia o papel regulatório permissivo dos nervos parassimpáticos hepáticos na libertação da HISS (Patarrão et al., 2008).

Em jejum, existe a produção de HDIR (*hepatic dependent insulin resistance*), que surge de forma a combater o efeito hipoglicémico da insulina na ausência da ingestão de glicose (W. Lautt et al., 2001; R. J. F. Manders et al., 2003). A HDIR também pode ser induzida através de ablação hepática, bloqueio dos recetores colinérgicos com atropina ou bloqueio da NO sintase hepática (W. Lautt et al., 2001); a reversão deste efeito, em ratos em jejum, é obtida com a administração de uma refeição, que resulta numa restituição parcial da HDIR induzida pelo jejum (W. Lautt et al., 2001).

Na ausência ou bloqueio da libertação da HISS, a MIS não atua podendo causar a progressão de disfunções metabólicas (Chowdhury, Legare, & Lautt, 2013) e também contribuir para o desenvolvimento de uma hiperglicemia pós-prandial, hiperinsulinismo e hiperlipidemia, com riscos cardiometabólicos associados (Schafer et al., 2010). O conjunto de alterações metabólicas com prejuízo crónico da ação da HISS é referenciado como síndrome AMIS (Chowdhury et al., 2013).

#### **4.9 A sensibilidade da insulina induzida pela refeição**

A sensibilidade da insulina induzida pela refeição (MIS) está descrita por Lautt (1999), Sadri (2006) e Patarrão (2008). Após uma refeição a distribuição da glicose aumenta acentuadamente em resposta à insulina, este fenómeno é caracterizado pela MIS. Sadri e Patarrão descrevem que a MIS ocorre pelo menos 100 minutos após administração de uma refeição mista, e a resposta da insulina dobra tanto em ratos (Sadri et al., 2006),

como em humanos (Patarrão et al., 2008) .Os investigadores atingiram este conceito após observação da resposta dinâmica da insulina determinada depois de 24h de jejum.

Os nervos parassimpáticos hepáticos medeiam a ocorrência da MIS, para tal acontecer é necessário um sinal de *feeding* permissivo através dos nervos parassimpáticos hepáticos, que conta com a ativação dos recetores muscarínicos colinérgicos e posterior libertação de NO.

A quantificação da MIS pode ser realizada através da comparação da sensibilidade da insulina no estado de jejum e no estado prandial. Também pode ser determinada com a observação das suas funções antes e depois da eliminação do sinal parassimpático hepático, este é obtido através de desnervação hepática ou bloqueio colinérgico (W Wayne Lutt, 2003a; W. Wayne Lutt, 2003b; Sadri & Lutt, 1999).

Sadri e o seu grupo testaram a indução da MIS em ratos conscientes e em ratos anestesiados. A sua investigação consistiu na indução da MIS através da administração de uma refeição mista líquida. Após desnervação hepática verificou-se que a indução da MIS pela refeição mista líquida tinha sido inibida. A administração de D-glicose e sacarose em baixa dosagem também não surtiram efeito na indução da MIS. Por outro lado, observou-se que a MIS foi potenciada quando administrada uma elevada dose de sacarose, embora neste caso a indução da MIS tenha sido em extensão menor que na administração da refeição mista (Sadri et al., 2006).

Patarrão et al também estudaram a possibilidade da refeição resultar na MIS em humanos saudáveis e a sua inibição por um antagonista colinérgico (Patarrão et al., 2008) A sua investigação confirmou a dependência, já descrita da MIS dos mecanismos colinérgicos (Guarino et al., 2004; Sadri & Lutt, 1999; Sadri et al., 2006). Os dados permitiram concluir a possibilidade de reverter com uma refeição a resistência fisiológica à insulina, observada no jejum e supressão da MIS com administração de atropina. Assim ficou sublinhada, a necessidade do sinal parassimpático hepático de *feeding* para existir a libertação da HISS (Patarrão et al., 2008).

A libertação da MIS esta intimamente relacionada com a nutrição e a constituição das refeições. Sadri considera mais vantajosas as refeições com capacidade para produção da MIS, enquanto as refeições que não conseguem produzir MIS desencadeiam o processamento dos nutrientes como gordura (Sadri et al., 2006). A presença de glicose e sacarose numa refeição são pouco efetivas a determinar o sinal de *feeding* necessário

para a ativação da HISS/MIS. Igualmente a resistência à insulina dependente da HISS pode ser desencadeada pelas dietas com teor elevado de sacarose, pois não têm capacidade para ativar a MIS (Sadri et al., 2006).

#### **4.10 A importância da nutrição na homeostase da glicose**

A alimentação e os seus constituintes são importantes moduladores no metabolismo do balanço energético corporal, nomeadamente nas funções relacionadas com a regulação da glicose e da sensibilidade da insulina. A dieta ocidental é baseada no consumo elevado de proteína e aminoácidos, que embora tenham um efeito positivo na homeostase energética, através da indução da saciedade e do aumento do gasto energético, têm efeitos prejudiciais na homeostase da glicose, podendo conduzir a estados de resistência à insulina, com eventual evolução para estados patológicos (Tremblay, Lavigne, Jacques, & Marette, 2007).

A modulação da resistência à insulina é possível através da variação na dieta, sendo necessário diversificar a qualidade dos nutrientes, essencialmente proteínas consumidas. Sabe-se, por exemplo, que as proteínas derivadas do peixe têm um efeito desejável na sensibilidade da insulina (Tremblay et al., 2007).

O papel dos aminoácidos na homeostase da glicose é suportado por estudos *in vitro* e *in vivo* (Newsholme et al., 2014), indicando que modulam a atividade da insulina no músculo-esquelético, no transporte de glicose, na secreção de insulina e glucagon bem como na expressão genética proteica de diversos tecidos (Patti, Brambilla, Luzi, Landaker, & Kahn, 1998).

A investigação realizada por Patti et al demonstrou que a perfusão de uma mistura equilibrada de aminoácidos em ratos caracterizados, em condições de euglicemia e inibição da secreção da insulina endógena e glucagon, resultava na estimulação da p70Kinase, um intermediador chave da sinalização da síntese proteica. Este estudo permitiu avaliar os efeitos dos aminoácidos na modulação da ação da insulina em cultura e isolamento de células de hepatoma (Patti et al., 1998). Verificou-se que os aminoácidos estimulam diretamente a iniciação da síntese proteica em sinergia com a insulina, enquanto inibem passos da ação da insulina que são críticos para o transporte de glicose e a inibição da gliconeogénese. Estes dados sustentam a hipótese da ação

direta dos aminoácidos nas vias de transdução de sinal bem como enquanto modificadores da ação da insulina em diversos níveis (Patti et al., 1998). Os estudos desenvolvidos em humanos saudáveis revelaram que o aumento da ingestão de aminoácidos, em condições de euglicemia e hiperinsulinismo, conduzia à diminuição na distribuição da glicose. A captação de glicose é alterada pelos aminoácidos, num estado de resistência a insulina. A regulação da captação de glicose pelo músculo-esquelético revelou ser acentuadamente influenciada pelos aminoácidos (Tremblay et al., 2007). O estado nutricional do organismo afeta a captação da glicose dependente da insulina. A composição nutricional da alimentação influencia a ação da insulina pós-prandial e a consequente captação de glicose. No entanto, substâncias como a glicose ou sacarose não têm capacidade para aumentar a ação da insulina em jejum. Por outro lado, as proteínas e aminoácidos são extensivamente estudadas pela sua capacidade de estimular a libertação endógena de insulina em indivíduos saudáveis como em indivíduos que sofrem de diabetes tipo 2 (Manders et al., 2014).

Uma das estratégias dietéticas com o fim de melhorar o controlo glicémico, principalmente em pacientes com diabetes tipo 2, consiste na ingestão de aminoácidos e proteína. Estes elementos quando co- ingeridos com hidratos de carbono revelam propriedades insulínótropicas, que são de especial interesse clínico (Newsholme, Brennan, Rubi, & Maechler, 2005).

Manders e o seu grupo de investigadores perceberam que a co ingestão de proteínas e/ou aminoácidos com hidratos de carbono, podem aumentar fortemente a libertação da insulina pós-prandial (R. Manders, 2005). Deste modo, é ampliada a distribuição da glicose e há consequente redução da subida de glicose pós-prandial em circulação (R. Manders, 2005; Sluijsmans et al., 2006; van Loon et al., 2003).

Manders e o seu grupo pretendiam demonstrar que a co ingestão de proteína hidrolisadas intactas aumentava substancialmente a resposta à insulina, após a ingestão de hidratos de carbono, por pacientes com diabetes tipo 2 (Sluijsmans et al., 2006). A ingestão de uma refeição rica em hidratos de carbono é geralmente acompanhada por uma hiperglicemia pós-prandial e fraca resposta da insulina face ao aumento glicémico (van Loon et al., 2003). Esta resposta atenuada da insulina não se deve à capacidade secretória da hormona, pois verificou-se que nestes pacientes a libertação de insulina

pode ser aumentada com a administração de aminoácidos (Gannon & Nuttall, 2003; R. Manders, 2005; van Loon et al., 2003).

No estudo de Manders observou-se que a resposta da insulina pós-prandial era duas vezes superior após a ingestão de 28g de proteína e 65g de hidratos de carbono (R. J. F. Manders et al., 2014). Neste caso a subida das concentrações de glicose pós-prandial foi atenuada, reduziu em 23% a resposta da glicose (Manders et al., 2014). O estudo indicia que a ingestão de aminoácidos é uma estratégia terapêutica/dietética para melhorar a glicose pós-prandial (Manders et al., 2014). As diferenças existentes na composição dos alimentos, essencialmente a presença de proteínas e aminoácidos, a sua digestão e cinética de absorção, possuem diferentes propriedades insulínótropicas (Claessens, Calame, Siemensma, van Baak, & Saris, 2009).

Macedo et al também sugerem que a refeição é necessária por conter fatores que desencadeiam a ação da insulina pós-prandial, uma vez que, entre outros elementos, contêm aminoácidos e glicose que influem na ação da hormona (Macedo et al., 2014). Macedo e os seus colaboradores entenderam que, após uma refeição se observa o aumento da sensibilidade à insulina, através da administração intestinal de glicose e aminoácidos (fatores cruciais para a ação da GSH hepática). No entanto, este efeito era inibido em caso de dano dos nervos parassimpáticos hepáticos (Afonso e Macedo, dados não publicados).

Os mesmos investigadores creem que alguns aminoácidos e a GSH hepática têm capacidade de regulação da sensibilidade da insulina (Guarino et al., 2003; Macedo et al., 2014). Um dos aminoácidos estudados por Macedo et al é a cisteína. Este aminoácido é a principal fonte para formação da GSH, que, em conjunto com a glicose, aumenta a sensibilidade da insulina periférica. A experiência envolveu a administração direta no intestino de N-acetilcisteína (NAC) e glicose, e observou-se o aumento dramático dos níveis de insulina no plasma (W Wayne Lutt, Schafer, Macedo, & Legare, 2011). A administração de NAC na presença de betanecol, num modelo animal, com o objetivo de mimetizar a ativação dos nervos parassimpáticos hepáticos, definiu os sinais de *feeding*, que são essenciais para a ação da insulina pós-prandial (W. Lutt et al., 2001; Macedo et al., 2014).

Macedo considera que existem dois mecanismos que contribuem ativamente para o aumento da ação da insulina pós-prandial, passando pela ação dos aminoácidos. A

hipótese clássica baseia-se no papel precursor dos aminoácidos na síntese e ativação das vias metabólicas (Macedo et al., 2014). A GSH, largamente distribuída no fígado, surge como um dos fatores chave na regulação da insulina pós-prandial, uma vez que a sua presença é aumentada após a refeição. Os aminoácidos glicina, glutamato e cisteína são os aminoácidos precursores da GSH, sendo que a cisteína é obtida diretamente pela via alimentar ou indiretamente através da metionina. Assim, a ativação parassimpática, em conjunto com a GSH (Lee et al., 2012) cujo substrato são os aminoácidos referidos, são essenciais para uma ação máxima da insulina no estado pós-prandial (Macedo et al., 2014).

Por outro lado, a segunda hipótese relaciona os aminoácidos absorvidos no intestino, que induzem a ativação das vias parassimpáticas aferentes dependentes da serotonina, produzindo reflexos vagais que controlam diversas funções gastrointestinais. Macedo e os colaboradores creem que embora esta segunda hipótese tenha sido apresentada separada da primeira, a literatura não indica que os dois mecanismos não possam ocorrer em simultâneo (Macedo et al., 2014).

#### **4.11 A distribuição da glicose pós-prandial**

A distribuição da glicose após uma refeição varia consoante o tecido a que se destina, considerando-se que a maior percentagem é captada pelo fígado e músculo-esquelético. O fígado desempenha uma função relevante na distribuição da glicose, uma vez que é o primeiro ponto de passagem da maioria da glicose proveniente da refeição. A localização anatómica do fígado permite a sua ação como “tampão” da glicose na circulação sanguínea, sendo que parte da distribuição da glicose pós-prandial ocorre na primeira passagem pelo fígado (Selz, Theintz, Tappy, & Schneiter, 2003). Este efeito de primeira passagem permite assim diminuir a hiperglicemia a que os tecidos estão expostos, diminuindo a glicémia pós-prandial

A manutenção da homeostase da glicose, no estado de jejum, é executada essencialmente pelo fígado, que em conjunto com os rins, tem a capacidade de libertação de quantidades substanciais de glicose, ajudando na regulação das variações da mesma (Moore et al., 1998). No estado pós-prandial, a reposição das reservas de glicogénio hepáticas é prioritária (Moore et al., 1998).

O posicionamento anatômico do fígado, a seguir ao pâncreas, em termos circulatórios, é de salientar, uma vez que esta disposição anatômica permite ao fígado modular a quantidade de insulina a ser distribuída sistemicamente (Lautt, 1980, 1983). Isto permite também condicionar a captação da glicose periférica, permitindo que as reservas de glicose hepática sejam reestabelecidas em primeiro lugar.

A regulação da insulina pós-prandial é essencial para a manutenção da homeostase da glicose. Os nutrientes provenientes da refeição, por exemplo, hidratos de carbono e lípidos, devem ser adequadamente metabolizados; um atraso na secreção da insulina pode conduzir a situações de desequilíbrio metabólico, como variações na glicémia pós-prandial e redução da inibição da lipólise. Situações como esta são patentes na diabetes tipo 2, ou estádios tardios da intolerância à glicose (Pauli et al., 2008).

A região da veia porta está envolvida no controlo do *feeding* e da homeostase da glicose; é uma região rica em sensores da glicose que é ativada pelo gradiente porto-arterial, que consiste na circulação de glicose entre a circulação arterial e a veia porta. O sensor hépato-portal de glicose é ativado pelo gradiente não negativo, que induz um sinal nervoso aferente através dos nervos espinais e vago, que resulta em aumento da secreção de insulina, diminuição da ingestão de alimento e utilização da glicose pelos vários tecidos (Delaere et al., 2012). Se existir uma alteração ligeira na glicose, como o seu aumento, ocorre logo uma resposta no sentido de captar a glicose (Capaldo et al., 1999). Este sensor também contribui para a deteção da hipoglicemia induzida lentamente.

Quando existem refeições ricas em hidratos de carbono, a função do fígado é ainda mais relevante, pois existe a necessidade de lidar com maiores quantidades de glicose provenientes da alimentação (Rabøl, Petersen, Dufour, Flannery, & Shulman, 2011). Por exemplo, os hidratos de carbono, tais como o amido, atrasam o esvaziamento gástrico e prolongam a absorção de glicose, e implicam que a distribuição atinja os 40% da glicose ingerida (Capaldo et al., 1999). Nestes casos, em que o balanço positivo é exacerbado entre o consumo e a capacidade do fígado acomodar as reservas energéticas, pode existir sobrecarga do fígado. Em situações limite, ocorre a acumulação de triglicéridos no fígado, adipócitos e músculo-esquelético (Rabøl et al., 2011).

A distribuição da glicose pelos tecidos é essencial, mas também é necessário perceber os efeitos metabólicos que sofre após a sua distribuição. Aproximadamente 40% da

glicose distribuída é oxidada, sendo que metade desta se destina a captação pelo cérebro (Féry, Plat, & Balasse, 1998). O músculo-esquelético envolve 35% da oxidação da glicose, 2% para o coração e o restante processo de oxidação reflete-se nos outros tecidos. Por outro lado, cerca de 60% da glicose ingerida é distribuída por vias não oxidativa, em que a maioria é depositada no fígado (Fery, Plat, & Balasse, 1999; Féry et al., 1998).

A homeostase da glicose pós-prandial está dependente de vários fatores, já referenciados. Estes incluem a alteração da gordura para a oxidação da glicose e o armazenamento no músculo-esquelético e no fígado. A utilização da glicose pós-prandial no músculo-esquelético está sujeita à flexibilidade metabólica na alternância entre o uso da glicose e o catabolismo dos ácidos gordos (Wales et al., 1996).

A captação da glicose pode ser um indicador das questões relacionadas com o metabolismo da glicose pós-prandial. A insulina estimula a captação da glicose pelo fígado, mesmo quando está presente alguma alteração na inibição da libertação de glicose hepática. Em casos de alterações fisiológicas da homeostase, como na diabetes, a absorção intestinal de glicose observa-se normal (Schiavon et al., 2013).

#### **4.12 A ação da HISS no músculo-esquelético**

De acordo com Lutt, a libertação da HISS é máxima no período que se sucede ao estágio pós-prandial, e a sua ação é minimizada com o decorrer do jejum (Lutt et al., 2001) A sinalização de uma refeição no trato gastrointestinal é responsável por ativar a inervação hepática no fígado; desta forma, a insulina ao alcançar o fígado promove a libertação da HISS pós-prandial pulsátil (Xie & Lutt, 1996). O fígado liberta então a HISS imediatamente a seguir a uma refeição, provocando a estimulação acentuada do armazenamento de glicose no músculo-esquelético, devido ao efeito da insulina. Na ausência de HISS, verifica-se a ocorrência de uma resistência à insulina, condição normalmente referida como *resistência à insulina dependente da HISS* (Lutt, 2005).

Estudos foram realizados no sentido de compreender quais seriam os órgãos alvo da HISS. Xie e o seu grupo determinaram as concentrações de glicose arteriovenosas após a desnervação hepática e ou administração de atropina. Os tecidos revelaram diferentes respostas ao sucedido. A resposta dos intestinos à resistência induzida da insulina não

sofreu alteração, da mesma forma que a resposta hepática à insulina também não sofreu qualquer alteração. Por outro lado, a captação de glicose na região pélvica demonstrou-se prejudicada, devido à interrupção do reflexo nos nervos parassimpáticos hepáticos. De acordo com Xie, embora o fígado seja o local de síntese de insulina, a resistência à insulina é refletida em todos os tecidos periféricos (Xie & Lutt, 1996).

A fim de determinar se o fígado ou os tecidos periféricos eram resistentes, foi comparado o gradiente de glicose em gatos, nos membros posteriores e no intestino, e comparados gatos com libertação normal de HISS e depois da libertação de HISS que foi bloqueada pela desnervação ou atropina. A resposta hepática à insulina não sofreu alterações, o que mostra que o fígado embora sensível à insulina não respondia à HISS. O intestino também não respondeu à insulina ou à HISS. Por outro lado, detetou-se um prejuízo na captação da glicose pelos membros posteriores (Manders et al., 2003).

Moore e o seu grupo aplicaram um protocolo idêntico em cães que revelou igualmente que a resistência à insulina produzida pela desnervação crónica do fígado era restrita ao músculo-esquelético e não ocorria no tecido adiposo ou hepático. A função do músculo-esquelético era restabelecida com a posterior administração de acetilcolina intraportal (M. Moore & Satake, 2002).

Fernandes e o seu grupo de colaboradores desenvolveram outro estudo com a necessidade de perceber o local de ação da HISS. Para tal foram observadas as alterações que ocorriam a nível da distribuição da glicose nos tecidos, após ablação hepática. O grupo concluiu que a o bloqueio da via da HISS promove uma diminuição acentuada da ação da insulina. A incorporação de [H3] 2DG nos tecidos individuais permitiu concluir sobre os tecidos que foram afetados pela alteração da HISS. As observações do grupo indiciam que o compromisso dos nervos parassimpáticos hepáticos a captação da glicose apenas diminui no músculo-esquelético e nos cardiomiocitos (Fernandes et al., 2009)

#### **4.13 Componente dependente e independente da HISS**

A ação da insulina periférica pode ser delimitada em dois componentes: um componente dependente da estimulação parassimpática hepática e da produção de NO no fígado (consiste em aproximadamente 50% do efeito da insulina na disponibilidade da glicose),

e outro que é independente da via hepática, ou seja, a ação da insulina per se (Ricardo Afonso et al., 2007).

A ingestão de uma refeição é responsável pela ativação parassimpática, com consequente decréscimo no estado de jejum. No estado pós-prandial ocorre a estimulação de acetilcolina dos nervos parassimpáticos hepáticos o que ativa os recetores muscarínicos, com consequente produção de NO pelo fígado e posterior libertação do fator HISS. O NO é fundamental para a ação da HISS dependente da via hepática (Afonso et al., 2007).

Lautt considera que 50-60% da distribuição é refletida pela ação da HISS, sendo que este efeito é reconhecido como ação da insulina dependente da HISS (HDIA). A falta deste componente resulta em resistência à insulina dependente da HISS (HDIR), que representa em parte a resistência à insulina observada frequentemente na diabetes mellitus tipo 2 (Lautt, 2003b).

Lautt observou em ratos a HISS dependente da ação da insulina imediatamente a após a refeição e o seu decréscimo com o avanço do estado de jejum (24h), com aproximadamente metade do decréscimo a ocorrer 6h após jejum. Lautt considera que como a maior parte dos estudos são produzidos no estado de jejum, então a HDIA não é detetada prontamente, podendo influenciar a determinação da contribuição da insulina para a distribuição da glicose, indiciando que esta é menor. (Lautt, 2003b).

A quantificação da HISS independente da ação da insulina pode ser realizada a partir dos testes RIST<sup>1</sup> ou ITT. A administração de atropina, desnervação hepática ou bloqueio do NO sintase não alteram a componente independente da HISS, como se verificou pela adição de um antagonista do NO sintase, atropina ou desnervação hepática que induzem resistência à insulina dependente da HISS. Lautt percebeu que se é certo que o estado de jejum não altera a componente da HISS independente da insulina, no entanto causa resistência à insulina dependente da HISS. Embora não se perceba que tecidos estão relacionados com a componente da HISS independente da

---

<sup>1</sup> **RIST (Rapid Insulin Sensitivity Test)** o procedimento da RIST em ratos envolve a determinação de um patamar de glucose arterial estável que define o nível de euglicemia ideal a ser mantido após uma perfusão de insulina durante 5 min. O índice de RIST é a quantidade de glucose necessária na perfusão para manter a euglicemia durante o período de testes. O índice de RIST permite determinar a sensibilidade da insulina (W. Wayne Lautt et al., 1998)

insulina, a ação deste fator não é regulada pelo mecanismo que regula a libertação da HISS (Manders et al., 2003).

Ribeiro et al também tentaram perceber em modelos de ratos obesos Zucker a hipótese da via hepática dependente estar diminuída, resultando em resistência à insulina. Os resultados revelaram que a resistência à insulina observada nos ratos obesos Zucker era devida ao prejuízo dos dois componentes. Os defeitos metabólicos verificados são responsáveis pela resistência à insulina severa nestes modelos, desde a estimulação parassimpática hepática ao NO hepático. Na obesidade, a deficiência na ação da leptina resulta numa produção diminuída de NO, que poderia explicar o prejuízo causado na sensibilidade da insulina hépato-dependente (R. T. Ribeiro, Duarte-ramos, & Macedo, 2001). A informação obtida com o estudo permitiu confirmar a hipótese de que o fígado é responsável pela produção da HISS, regulando a respostas dos tecidos periféricos para a ação da insulina; o decréscimo em um ou ambos os componentes HISS-dependente e independente da insulina resultam em resistência à insulina. Ribeiro e os colaboradores observaram que nos ratos Zucker houve o compromisso da HISS-dependente mas também da componente independente, levando a crer que a resistência à insulina que se verifica na obesidade se pode dever à diminuição da ação da HISS, assim como da ação da HISS independente da insulina (Ribeiro et al., 2001).

#### **4.14 Resistência à insulina dependente da HISS**

A resistência à insulina dependente da HISS (HDIR) é uma condição fisiológica particularmente útil, em situações de jejum, gravidez ou trauma. No entanto o seu efeito é prejudicial quando o processo HDIR é desencadeado em estado prandial/pós-prandial (Lautt, 2003a). Esta alteração pode conduzir a disfunções metabólicas maiores, como estados de resistência à insulina ou diabetes tipo 2. Lautt considera que a reversibilidade da HDIR em modelos animais sugere um novo alvo terapêutico para diagnosticar e tratar a resistência à insulina (Lautt, 2003a).

No estado pós-prandial, a HISS, sob estimulação da insulina, é essencial para desencadear o processamento da glicose, sendo responsável pela distribuição de metade da glicose ingerida. Na ausência da HISS, torna-se necessário o aumento da secreção de insulina de forma a compensar o aumento de glicose que se verifica depois de uma

refeição. O efeito direto da insulina (ação da HISS independente da insulina) é responsável pelo armazenamento dos nutrientes no tecido adiposo e no fígado. Perante a ausência da HISS, o fígado vê a sua capacidade de armazenamento de glicogénio limitada, o que desencadeia o aumento da transferência da energia dos nutrientes para a síntese dos triglicéridos hepáticos. Em estados de hiperlipidemia, hiperglicemia e hiperinsulinismo pós-prandial, é de especial interesse o papel da HDIR.

O armazenamento de nutrientes que resultam de uma refeição é assegurado pela libertação da HISS, em condições fisiológicas. A HISS dependente da insulina pós-prandial resulta na produção de glicogénio no músculo-esquelético. No entanto, esta produção está inibida em diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas (W Wayne Lutt, 2003a). Em condições de *stress*, a HDIR poderia ser uma resposta fisiológica válida, a fim de suprimir a HISS independente da insulina a nível do sistema nervoso central. A gestação também poderia justificar a HDIR, uma vez que a captação de glicose é aumentada pelo feto. Crê-se, assim, que a capacidade de inibir a ação da insulina na libertação da HISS poderia ser benéfica nos casos referidos, mas seria prejudicial em situações que envolvam a incapacidade crónica de libertar a HISS em resposta à insulina no estado pós-prandial (Lutt, 2003a).

Quando existe a HDIR, por outro lado, a capacidade do fígado armazenar a glicose como glicogénio é bastante limitada, o que leva ao armazenamento na forma de gordura. A inexistência de HISS no estado prandial deveria resultar numa condição de hiperglicemia e ser o fator para aumentar a secreção de HISS, o que não acontece. Lutt sugere que a HDIR possa estar na base de diversos estados patológicos como o hiperinsulinismo, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e também a diabetes tipo 2 (Lutt, 2003a).

Afonso et al investigaram a possibilidade da adiposidade ser um fator desencadeante da resistência à HISS, ou por outro lado, se a HISS per se seria responsável pela adiposidade. A observação dos ratos Zucker<sup>2</sup>, que se tornaram obesos permitiu perceber que o componente dependente e independente da HISS estão igualmente afetados,

---

<sup>2</sup> Os ratos Zucker fa/fa são modelos de roedores obesos que resultam de uma mutação espontânea entre dois tipos de ratos. A mutação é autossómica recessiva e os animais homocigóticos sofrem com consequência da obesidade genética e acumulação progressiva de gordura do fígado (Argilés, 1989).

demonstrando que neste modelo a obesidade não afetou a ação da HISS (Afonso et al., 2007).

Lautt e o seu grupo também estudaram a relação entre a adiposidade e o nível de HDIR. Este grupo partiu das seguintes hipóteses: 1) a influência da HDIR na resistência à insulina que acontece com a progressão da idade, 2) a HDIR ser o defeito metabólico que desencadeia a progressão para a DM II e respetivo síndrome metabólico e 3) a possibilidade de uma cocktail sinérgico de antioxidantes conferir proteção contra a HDIR e subsequentes sintomas de diabetes. Para este efeito, foram testados 2 grupos de ratos Sprague Dawley à 9<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup> e 52<sup>a</sup> semana para determinar a sua resposta dinâmica da componente HISS-dependente da ação da insulina (indireta) e da HISS-independente da ação da insulina (ação direta) através de um teste de sensibilidade à insulina. Nos ratos jovens, a componente HISS-dependente representou 52,3+/- 2.1% da resposta a um bólus de insulina (50 mU/kg) que diminuiu para 29,8+/- 3.4% ao fim de 6 meses e para 17+/-2,7% aos 12 meses. O grupo observou que a ação HISS apresenta uma correlação negativa com a adiposidade corporal global e que o cocktail antioxidante utilizado (composto por vitamina C, vitamina E e S-adenosilmetionina) conferiu proteção a esta ação, confirmando a deteção precoce da HDIR e respetivo tratamento como um possível novo alvo terapêutico (Lautt et al., 2008).

No que se refere à relação entre a adiposidade e a HDIR, a análise dos dois grupos permitiu verificar a existência de dilatação entre a ocorrência de HDIR e a acumulação de adiposidade, tendo-se verificado que a ação HISS, ao fim de 6 meses, diminuiu em 66% no grupo de teste e apenas 37% no grupo de controlo mas não se observou qualquer diminuição significativa na adiposidade. Assim, se a adiposidade fosse causa de HDIR, o grau de HDIR deveria ter sido semelhante em ambos os grupos (Lautt, Ming, Macedo, & Legare, 2008). Para se considerar que a adiposidade causava a HDIR, não se deveria ter observado qualquer dilatação no tempo e, aos 6 meses, ambos os grupos deveriam apresentar o mesmo nível de redução da HISS, o que não se verificou.

A relação entre a resistência à insulina após uma hemorragia aguda, também foi estudada por Lautt e colaboradores, na tentativa de perceber se a resistência à insulina observada se devia à HISS-dependente ou HISS-independente da ação da insulina (Seredycz et al., 2006). Os investigadores procederam à determinação da hipótese da resistência à insulina produzida por uma hemorragia ser HDIR. Neste caso, a

hemorragia surge como modelo agudo de *stress*, o que permite perceber a ação da insulina quando exposta a este estado. No estudo em causa a hemorragia foi induzida em ratos anestesiados. A investigação permitiu verificar que após o processo hemorrágico a ação da HISS reduziu em 34%, enquanto se existir um bloqueio completo da ação da HISS esta pode decrescer até 55%. Também se percebeu que embora a hemorragia tenha resultado em resistência à insulina dependente da HISS, a ação da HISS independente da insulina não foi suprimida. A hemorragia conduziu à redução do volume aparente de distribuição e consequente redução da clearance de insulina. Verificou-se que a insulina causou a supressão completa da HISS conduzindo à HDIR, sem indução da resistência à ação direta da insulina. Por outro lado, a resposta à insulina administrada resultou no aumento da HISS-independente, ou seja, da ação direta da insulina. Conclui-se deste estudo que a inibição da libertação da insulina e a supressão da ação da HISS beneficia a manutenção da hiperglicemia no seguimento de uma hemorragia (Seredycz et al., 2006).

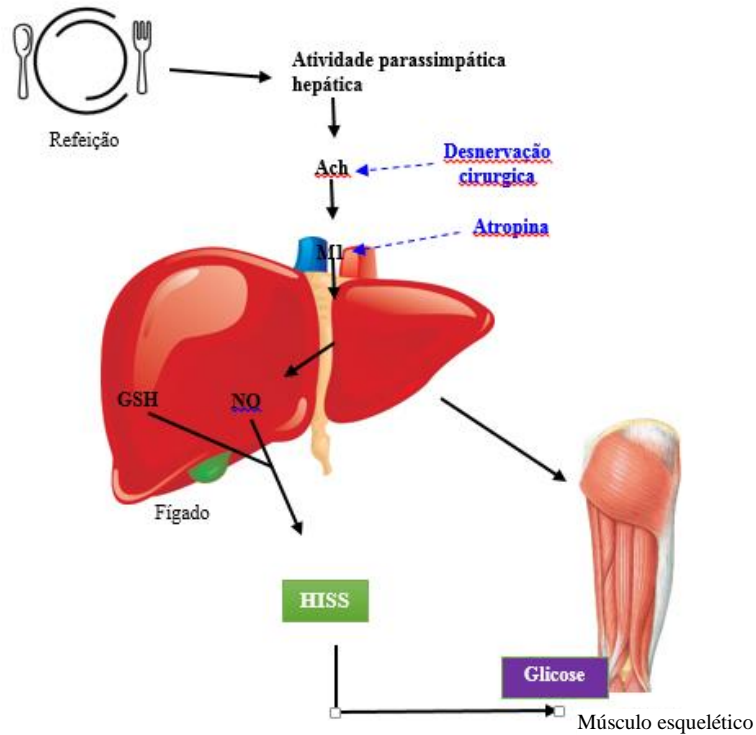
Sadri & Lutt demonstraram igualmente os efeitos do NO hepático e da desnervação hepática na indução da resistência à insulina (Sadri & Lutt, 1999). De acordo com Lutt a ablação cirúrgica dos nervos parassimpáticos conduz à resistência da insulina e a administração de acetilcolina intraportal não reverte a resistência à insulina causada por desnervação (W. Lutt et al., 2001). Sadri et al indicam que o NO é responsável pela mediação do reflexo parassimpático hepático na ação da insulina. A resistência à insulina produzida pela desnervação hepática é revertida com a administração de um dador de NO no fígado (Sadri & Lutt, 1999).

A componente HISS-dependente e HISS-independente também foi abordada pelo grupo. A análise foi feita em ratos através do índice de controlo RIST. Quando observado um maior índice de controlo RIST, então a resposta após desnervação ou administração de atropina era reduzida; já os ratos com o controlo de RIST menor um decréscimo na resposta. A componente HISS-dependente da ação da insulina é representada pela diminuição da RIST após desnervação ou administração de atropina, o que de acordo com Sadri, mostra a existência de uma componente parassimpático dependente e outra independente da ação da insulina, além do componente NO-dependente e independente que envolve a resposta da insulina. Estes dados levaram o grupo a concluir que ambos os elementos atuam por uma mesma via e que esta via contempla um reflexo parassimpático hepático induzido pela insulina, que atua nos

recetores muscarínicos e resulta na produção de NO no fígado com posterior libertação da eventual hormona HISS do fígado (Sadri & Lutt, 1999)

Os investigadores consideram a existência de uma forte relação entre a inibição do NO sintase no fígado e a resistência à insulina, propondo que o NO sintase é o responsável pela inibição da via HISS, e esta, sendo essencial para a sensibilização do músculo-esquelético, em resposta à insulina é inibida, ocorrendo resistência à insulina (Sadri & Lutt, 1999).

Lutt considera que a produção regulada de HDIR em jejum poderia conferir um papel protetor, através da prevenção da hipoglicémia causada pela insulina na ausência da ingestão de glicose derivada de uma refeição (Lutt et al., 2001). A inibição da ação total da insulina não é útil quando o organismo se encontra em jejum, pois o resultado pode culminar numa hipoglicemia acentuada. Se a HDIR ocorrer no estado prandial, contribuiu para a hiperglicemia pós-prandial e hiperinsulinismo compensatório (Lutt et al., 2008). O mecanismo fisiológico atribuído à HISS permite a partição seletiva da glicose no músculo-esquelético quando a absorção da glicose é elevada, minimizando a captação de glicose em jejum ou estados de resistência à insulina dependente da HISS (Lutt et al., 2001).



**Figura 5** Hipótese da HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina): No estado pós-prandial ocorre ativação da inervação parassimpática hepática seguida de liberação de acetilcolina e posterior estimulação dos receptores muscarínicos M1, o que resulta na ativação da sintase do NO e aumento dos níveis de NO. A HISS ao ser libertada vai atuar exclusivamente no músculo-esquelético sendo responsável por aproximadamente 55% da ação hipoglicemiante da insulina no organismo. O compromisso da função hepática através da ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos, do bloqueio farmacológico dos receptores muscarínicos ou da depleção de glutathione desencadeará resistência à insulina dependente HISS (HDIR) adaptado (Lautt & Macedo, 2007).

## 5. A HISS COMO ALVO TERAPÊUTICO

Após a ingestão de uma refeição, são ativados mecanismos fisiológicos, que contribuem para a libertação da HISS, conduzindo à sensibilidade da insulina pós-prandial. No entanto, a ausência ou inativação desta via é sugerida como o principal fator em disfunções do metabolismo que se observa no estado de resistência à insulina e de pré-diabetes

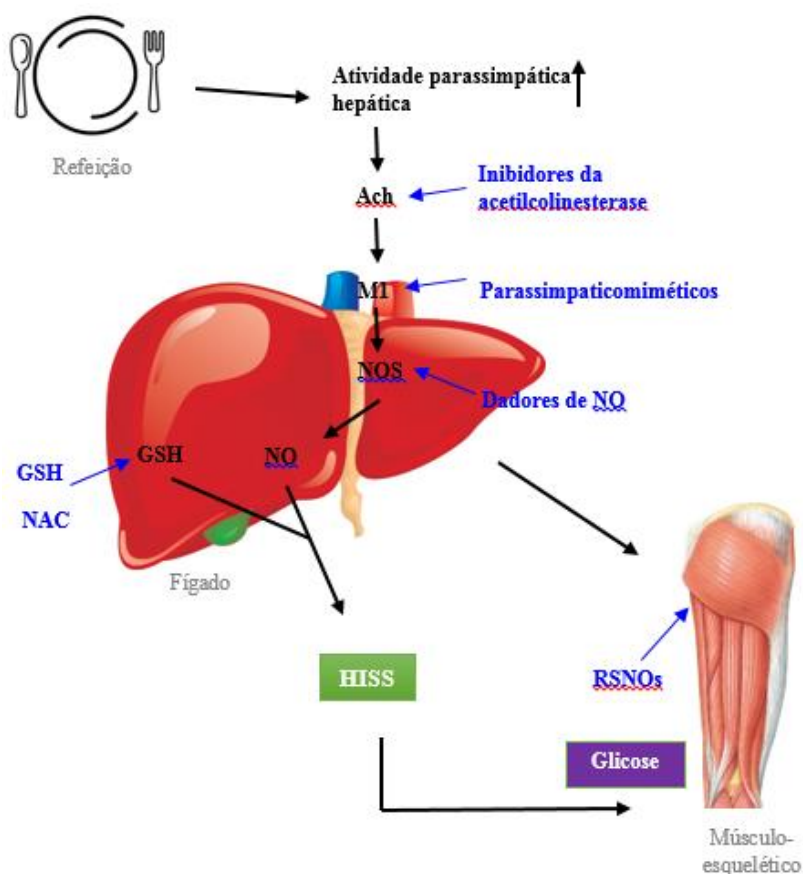
Os investigadores Lutt e Macedo acreditam que o paradigma da resistência foi alterado com a descoberta da HISS. Os estudos que têm sido desenvolvidos sobre a hormona encaminham os investigadores sobre a possibilidade de novas abordagens terapêuticas e de novos métodos de diagnóstico para a resistência à insulina (W W Lutt & Macedo, 2007).

A necessidade de novas abordagens terapêuticas é enfatizada por Moller numa revisão que elaborou sobre as terapêuticas existentes para o tratamento da diabetes tipo 2. O investigador indica que a terapêutica corrente para a diabetes tipo 2 não tem alvo terapêutico estipulado e o desconhecimento sobre a patogénese da doença também se apresenta como um fato crítico para aperfeiçoar os tratamentos. Uma das principais desvantagens da terapêutica é o ganho de peso associado à medicação. Moller também considera que “estas terapêuticas têm eficácia limitada, tolerabilidade limitada e ou efeitos adversos significativos”. Outra das preocupações da terapia atual consiste nos episódios de hipoglicemia e o facto da disponibilidade de terapias que reduzam ou anulem os efeitos subjacentes como resistência à insulina ou obesidade ser escasso. O autor indica que o “ênfase das novas abordagens terapêuticas deva ser colocado nos mecanismos fisiológicos e que resultem na perda de peso” (Moller, 2001).

Embora ainda em estudo a perceção dos mecanismos e fisiologia e patologia da HISS, Lutt considera que esta deve ser a nova abordagem. A HISS como alvo oferece uma nova perspetiva para a restauração o estado fisiológico da sensibilidade da insulina no músculo-esquelético, local do organismo descrito como principal órgão de resistência à insulina (Lutt, 2005). Macedo também considera que esta recente abordagem terapêutica é potencial para a restauração da sensibilidade à insulina pós-prandial (Lutt & Macedo, 2007). O modelo em estudo por Lutt e o seu grupo consiste na mimetização do sinal de *feeding* parassimpático através da utilização de dadores de NO

ou agonistas colinérgicos, conferindo assim a capacidade do pulso de insulina libertar um pulso de HISS (Sadri & Lautt, 1999). Esta abordagem foi aplicada pelo investigador num modelo de crónica de patologia do fígado, com resistência à insulina produzida por HDIR, observou-se que a resistência foi revertida através da administração de um agonista colinérgico diretamente no fígado (Lautt et al., 2008).

A interação com o NO sintase também é uma via possível, uma vez que nos mecanismos reguladores em que a via colinérgica está presente o NO torna-se um potencial fator para o controlo da síntese ou secreção da HISS. A reversão fisiológica da HDIR observada no jejum também pode ser revertida através da coadministração hepática GSH e NO. Os potenciais referidos encontram-se esquematizados na figura seguinte. (Figura 6)



**Figura 6:** Mecanismo da HISS como potencial alvo terapêutico. Para o tratamento da resistência à insulina o alvo terapêutico poderão ser parassimpaticomiméticos, como os inibidores da acetilcolinesterase, que é a enzima responsável pela degradação da insulina, estes são mais efetivos nos recetores muscarínicos M1. Os dadores de NO serão uma alternativa eficaz caso exista comprometimento da via do NO. Os dadores de glutathiona hepática, como N-acetilcisteína também terão capacidade para a incrementar a síntese/secreção da HISS no fígado. Os RSNOs aumentam a sensibilidade da insulina junto dos tecidos, em concreto do músculo-esquelético adaptado (Lautt & Macedo, 2007)

## 6. CONCLUSÃO

No estado pós-prandial a principal fonte de glucose para o organismo é o fígado (Rui, 2014). A estimulação da secreção de insulina pelo pâncreas ocorre essencialmente após a refeição, em que o aumento da hormona em circulação conduz a ativação de mecanismos metabólicos (Pirola, Johnston, & Van Obberghen, 2004). Com o aumento da glucose plasmática após uma refeição, a estimulação de insulina e concomitante supressão de glucagon a glucose é parcialmente armazenada e outra parte oxidada (McCall et al., 1998). A insulina é um fator chave para as repostas metabólicas supra referidas.

No entanto, para a atividade da insulina ser máxima em estado pós-prandial, são necessários sinais proveniente do sistema parassimpático hepático, o que indica a existência de uma substância responsável por causar um *boost* na ação da insulina. Essa substância os investigadores nomearam como HISS, *hepatic insulin sensitizing substance*. Esta crê-se ser a maior responsável pelo aumento da insulina pós-prandial e também o aumento da sensibilidade da hormona para a captação pelos tecidos, essencialmente do tecido músculo-esquelético (Lautt, 1999; Lautt et al., 2001)

A potenciação da sensibilidade da insulina pós-prandial é dependente da ativação dos nervos parassimpáticos hepáticos, com conseqüente estimulação dos recetores colinérgicos, libertação de óxido nítrico hepático e estimulação da libertação da HISS. Se existir algum tipo de disfunção nos nervos parassimpáticos hepáticos há uma conseqüente redução da clearance de glucose, uma vez que, a HISS não é libertada, o aumento da sensibilidade da insulina ao músculo-esquelético está reduzido e a captação de glucose vê igualmente em decréscimo (W Wayne Lautt, 2004).

A ausência ou redução da HISS, por denervação hepática ou administração de antagonistas colinérgicos, como a atropina, conduzem à redução da sensibilidade da insulina, a um estado que é denominado resistência à insulina dependente da HISS. Este estado também pode ser induzido pelo jejum, em que se pensa que o HDIR é responsável pela proteção da homeostase, pois uma vez que não há ingestão de glucose não há propriamente a necessidade da insulina estar ativa para estabelecer as suas funções. Por outro lado crê-se que a HDIR possa ser um estadio precoce de resistência à insulina e até diabetes tipo 2 (Xie & Lautt, 1993; Xie & Lautt, 1996). O diagnóstico de

casos nesta fase pode ser decisivo para o sucesso terapêutico e possivelmente reversão de efeitos (Lautt et al., 2008)

O estudo da fisiologia e fisiopatologia da insulina é preponderante para definir e melhorar as terapêuticas e os alvos terapêuticos existentes. De momento ocorrem estudos sobre a possibilidade de melhorar essa componente, tornando a ação dos possíveis fármacos mais fisiológica, ou seja, mimetizando a ação da HISS ou da sensibilidade da insulina e reduzindo assim os efeitos adversos associados às terapêuticas correntes.

A forma que os investigadores estão a desenvolver os seus estudos delega como principais vias de ação o sistema parassimpático hepático. Quer através da indução da acetilcolina, administração de dadores de NO ou GSH e também os RSNOs, que são responsáveis pela mimetização da ação da insulina no músculo-esquelético. O futuro das patologias associadas à insulina passa sem dúvida pela intervenção a nível hepático, e possivelmente compostos com dupla abordagem isto é, por exemplo, que aumentem a GSH e NO e mimetizem a ação no músculo-esquelético (Lautt & Macedo, 2007)

## BIBLIOGRAFIA

- Afonso, R. A., Lutt, W. W., Ribeiro, R. T., Legare, D. J., & Macedo, M. P. (2007). Insulin resistance in two animal models of obesity: A comparison of HISS-dependent and HISS-independent insulin action in high-fat diet-fed and Zucker rats. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, *50*, 110–114.
- Afonso, R. A., Ribeiro, R. T., Fernandes, A. B., Patarra, R. S., & Macedo, M. P. (2007). Hepatic-dependent and -independent Insulin Actions Are Impaired in the Obese Zucker Rat Model, *15*(2).
- Alonso, A., Fernández, Y., Fernández, R., Ordóñez, P., Moreno, M., Díaz, F., ... González, C. (2005). Effect of food restriction on the insulin signalling pathway in rat skeletal muscle and adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(10), 602–9. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.03.002
- Argilés, J. M. (1989). The obese zucker rat: A choice for fat metabolism 1968–1988: Twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Progress in Lipid Research*, *28*(1), 53–66. doi:10.1016/0163-7827(89)90007-6
- Avogaro, a, Toffolo, G., Miola, M., Valerio, a, Tiengo, a, Cobelli, C., & Del Prato, S. (1996). Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(1), 108–15. doi:10.1172/JCI118754
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., & Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 586–623. doi:10.1210/er.2008-0047
- Benninger, R. K. P., & Piston, D. W. (2014). Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *25*(8), 399–406. doi:10.1016/j.tem.2014.02.005
- Bergsten, P., & Grapengiesser, E. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *Journal of Biological ...*, 8749–8753. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/269/12/8749.short>
- Bertram, R., Sherman, A., & Satin, L. S. (2007). Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(4), E890–900. doi:10.1152/ajpendo.00359.2007
- Bradley, E. a, Richards, S. M., Keske, M. a, & Rattigan, S. (2013). Local NOS inhibition impairs vascular and metabolic actions of insulin in rat hindleg muscle in vivo. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *305*(6), E745–50. doi:10.1152/ajpendo.00289.2013
- Capaldo, B., Gastaldelli, A., Antonello, S., Auletta, M., Pardo, F., Ciociaro, D., ... Saccà, L. (1999). Ingestion of a Natural Mixed Meal in Humans, *48*(May).
- Chang, S., Choi, K., Jang, S., & Shin, H. (2003). Role of Disulfide Bonds in the Structure and Activity of Human insulin, *16*(3), 323–330.
- Chausmer, A. B. (1998). Zinc, Insulin and Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, *17*(2), 109–115. doi:10.1080/07315724.1998.10718735

- Chimienti, F., Devergnas, S., Pattou, F., Schuit, F., Garcia-Cuenca, R., Vandewalle, B., ... Seve, M. (2006). In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 20), 4199–206. doi:10.1242/jcs.03164
- Chiu, S.-L., & Cline, H. T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*, 5, 7. doi:10.1186/1749-8104-5-7
- Chowdhury, K. K., Legare, D. J., & Lutt, W. W. (2013). Exercise enhancement of hepatic insulin-sensitising substance-mediated glucose uptake in diet-induced prediabetic rats. *The British Journal of Nutrition*, 109(5), 844–52. doi:10.1017/S0007114512002267
- Claessens, M., Calame, W., Siemensma, a D., van Baak, M. a, & Saris, W. H. M. (2009). The effect of different protein hydrolysate/carbohydrate mixtures on postprandial glucagon and insulin responses in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(1), 48–56. doi:10.1038/sj.ejcn.1602896
- Clausen, J. O., Borch-Johnsen, K., Ibsen, H., Bergman, R. N., Hougaard, P., Winther, K., & Pedersen, O. (1996). Insulin sensitivity index, acute insulin response, and glucose effectiveness in a population-based sample of 380 young healthy Caucasians. Analysis of the impact of gender, body fat, physical fitness, and lifestyle factors. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), 1195–209. doi:10.1172/JCI118903
- Coll, A. P., & Yeo, G. S. H. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 970–6. doi:10.1016/j.coph.2013.09.010
- Delaere, F., Duchampt, A., Mounien, L., Seyer, P., Duraffourd, C., Zitoun, C., ... Mithieux, G. (2012). The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Molecular Metabolism*, 2(1), 47–53. doi:10.1016/j.molmet.2012.11.003
- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., & Korber, F. (1989). Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly. *British Medical Bulletin*, 45(1), 4–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2676073>
- Dunn, M. F. (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 18(4), 295–303. doi:10.1007/s10534-005-3685-y
- Dunning, B. E., & Gerich, J. E. (2007). The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*, 28(3), 253–83. doi:10.1210/er.2006-0026
- Edgerton, D. S., Lautz, M., Scott, M., Everett, C. A., Stettler, K. M., Neal, D. W., ... Cherrington, A. D. (2006). Insulin 's direct effects on the liver dominate the control of hepatic glucose production, 116(2), 521–527. doi:10.1172/JCI27073.rectly
- Eliasson, L., Abdulkader, F., Braun, M., Galvanovskis, J., Hoppa, M. B., & Rorsman, P. (2008). Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *The Journal of Physiology*, 586(14), 3313–24. doi:10.1113/jphysiol.2008.155317
- Fernandes, a B., Patarrão, R. S., Videira, P. A., & Macedo, M. P., Afonso, R. (2009) Postprandial Glucose Disposal is subject to hepatic parasympathetic control.

- Fernandes, a B., Patarrão, R. S., Videira, P. A., & Macedo, M. P. (2011). Understanding postprandial glucose clearance by peripheral organs: the role of the hepatic parasympathetic system. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(12), 1288–95. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02226.x
- Fery, F., Plat, L., & Balasse, E. (1999). Effect of fasting on the intracellular metabolic partition of intravenously infused glucose in humans. *American Journal of Physiology* Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/277/5/E815.short>
- Féry, F., Plat, L., & Balasse, E. (1998). Mechanisms of Whole-Body Glycogen Deposition after Oral Glucose in Normal Subjects. Influence of the Nutritional Status 1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(8), 2810–2816. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jcem.83.8.5022>
- Fisher, S. J., & Kahn, C. R. (2003). Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(4), 463–8. doi:10.1172/JCI16426
- Fulzele, K., Riddle, R. C., DiGirolamo, D. J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., ... Clemens, T. L. (2010). Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*, 142(2), 309–19. doi:10.1016/j.cell.2010.06.002
- Gannon, M., & Nuttall, F. (2003). An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 734–741. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/78/4/734.short>
- Ganti, S., Nammi, S., & Lodagala, D. (1999). Molecular mechanisms of insulin action, 245–256.
- Girard, J. (2006). Insulin 's effect on the liver : “ Direct or indirect ?” continues to be the question, 116(2), 8–10. doi:10.1172/JCI26295.19.
- Guarino, M. P., Afonso, R. a, Raimundo, N., Raposo, J. F., & Macedo, M. P. (2003). Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(4), G588–94. doi:10.1152/ajpgi.00423.2002
- Guarino, M. P., Correia, N. C., Lutt, W. W., & Macedo, M. P. (2004). Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(3), G527–32. doi:10.1152/ajpgi.00085.2004
- Guarino, M. P., & Macedo, M. P. (2006a). Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *British Journal of Pharmacology*, 147(8), 959–65. doi:10.1038/sj.bjp.0706691
- Guarino, M. P., & Macedo, M. P. (2006b). Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *British Journal of Pharmacology*, 147(8), 959–65. doi:10.1038/sj.bjp.0706691
- Guo, X., Li, H., Xu, H., Woo, S., Dong, H., Lu, F., ... Wu, C. (2012). Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4), 358–367. doi:10.1016/j.apsb.2012.06.002
- Gylfe, E., & Tengholm, A. (2014). Neurotransmitter control of islet hormone pulsatility. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16 Suppl 1, 102–10. doi:10.1111/dom.12345
- Haller, W., & Bines, J. (2013). Starvation and Fasting biochemical aspects. In *Encyclopedia of Human Nutrition*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00254-3

- Hellman, B. (2009). Pulsatility of insulin release--a clinically important phenomenon. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 114(4), 193–205. doi:10.3109/03009730903366075
- Hellman, B., Salehi, A., Grapengiesser, E., & Gylfe, E. (2012). Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(4), 1219–23. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.113
- Henquin, J. C. (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, 52(5), 739–51. doi:10.1007/s00125-009-1314-y
- Horwitz, D. L., Starr, J. I., Mako, M. E., Blackard, W. G., & Rubenstein, A. H. (1975). Proinsulin, Insulin, and C-peptide concentrations in Human Portal and Peripheral Blood, 55(June), 1278–1283.
- Juhl, C., Grøfte, T., Butler, P. C., Veldhuis, J. D., Schmitz, O., & Pørksen, N. (2002). Effects of fasting on physiologically pulsatile insulin release in healthy humans. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S255–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815488>
- Kahn, C. R., & Crettaz, M. (1985, January). Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. In *Diabetes/metabolism reviews*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3013542>
- Latour, M. G., & Lutt, W. W. (2002). Insulin sensitivity regulated by feeding in the conscious unrestrained rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(1), 8–12. doi:10.1139/y01-094
- Lutt, W., Macedo, M. P., Sadri, P., Takayama, P., Ramos, D., & Legare, J. (2001). Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281, G29–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408252>
- Lutt, W. W. (1980). Hepatic nerves: a review of their functions and effects. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, (Rappaport 1975).
- Lutt, W. W. (1983). Afferent and efferent neural roles in liver function. *Progress in Neurobiology*, 21(4), 323–348. doi:10.1016/0301-0082(83)90016-3
- Lutt, W. W. (1999). The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77(8), 553–562. doi:10.1139/y99-067
- Lutt, W. W. (2003a). A proposed new paradigm for insulin resistance. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 1(4), 261–70. doi:10.1089/1540419031361417
- Lutt, W. W. (2003b). Practice and principles of pharmacodynamic determination of HISS-dependent and HISS-independent insulin action: Methods to quantitate mechanisms of insulin resistance. *Medicinal Research Reviews*, 23(1), 1–14.
- Lutt, W. W. (2004). Current Perspective A New Paradigm for Diabetes and Obesity : the Hepatic Insulin Sensitizing Substance ( HISS ) Hypothesis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 17, 9–17.
- Lutt, W. W. (2005). Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle Regulated by a Hepatic Hormone, HISS. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 30(3), 304–312. doi:10.1139/h05-123
- Lutt, W. W. (2007). Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 761–70.

Retrieved from  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Lautt, W. W., & Macedo, M. P. (2007). Novo Mecanismo de Controlo da Sensibilidade à Insulina: A Hipotese da HISS. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 22–26.
- Lautt, W. W., Ming, Z., Macedo, M. P., & Legare, D. J. (2008). HISS-dependent insulin resistance (HDIR) in aged rats is associated with adiposity, progresses to syndrome X, and is attenuated by a unique antioxidant cocktail. *Experimental Gerontology*, 43(8), 790–800. doi:10.1016/j.exger.2008.04.013
- Lautt, W. W., Schafer, J., Macedo, M. P., & Legare, D. J. (2011). Bethanechol and N-acetylcysteine mimic feeding signals and reverse insulin resistance in fasted and sucrose-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(2), 135–42. doi:10.1139/y11-001
- Lautt, W. W., Wang, X., Sadri, P., Legare, D. J., & Macedo, M. P. (1998). Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(12), 1080–1086. doi:10.1139/cjpp-76-12-1080
- Lee, J., Cummings, B. P., Martin, E., Sharp, J. W., Graham, J. L., Stanhope, K. L., ... Raybould, H. E. (2012). Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(6), R657–66. doi:10.1152/ajpregu.00345.2011
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6), 361–70. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.004
- Liu, Z. (2007). Insulin at physiological concentrations increases microvascular perfusion in human myocardium. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1250–5. doi:10.1152/ajpendo.00451.2007
- Lu, S. C., Kuhlenkamp, J., Garcia-Ruiz, C., & Kaplowitz, N. (1991). Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(1), 260–9. doi:10.1172/JCII15286
- Macedo, M. P., Lima, I. S., Gaspar, J. M., Afonso, R. a, Patarrão, R. S., Kim, Y.-B., & Ribeiro, R. T. (2014). Risk of postprandial insulin resistance: the liver/vagus rapport. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 15(1), 67–77. doi:10.1007/s11154-013-9281-5
- Manders, R. (2005). Co-ingestion of a protein hydrolysate and amino acid mixture with carbohydrate improves plasma glucose disposal in patients with type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, (3), 76–83. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/82/1/76.short>
- Manders, R. J. F., Hansen, D., Zorenc, A., Dendale, P., Loon, J. C. Van, & Saris, W. H. (2003). Protein Co-Ingestion Strongly Increases Postprandial Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Patients. *Medicinal Research Reviews*, 23(1), 1–14. doi:10.1002/med.10022
- Manders, R. J. F., Hansen, D., Zorenc, A. H. G., Dendale, P., Kloek, J., Saris, W. H. M., & van Loon, L. J. C. (2014). Protein co-ingestion strongly increases postprandial insulin secretion in type 2 diabetes patients. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 758–63. doi:10.1089/jmf.2012.0294
- Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., Shiba, Y., Nakahara, I., Kuroda, A., Tomita, T., ... Hori, M. (2000). Important role of the hepatic vagus nerve in glucose uptake and production by the liver. *Metabolism*, 48(1), 11–16.

- McCall, R. H., Wiesenthal, S. R., Shi, Z. Q., Polonsky, K., & Giacca, a. (1998). Insulin acutely suppresses glucose production by both peripheral and hepatic effects in normal dogs. *The American Journal of Physiology*, 274(2 Pt 1), E346–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486168>
- Ming, Z., & Lutt, W. W. (2011). HISS, not insulin, causes vasodilation in response to administered insulin. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 110(1), 60–8. doi:10.1152/jappphysiol.00714.2010
- Mirbolooki, M. R., Taylor, G. E., Knutzen, V. K., Scharp, D. W., Willcourt, R., & Lakey, J. R. T. (2009). Pulsatile intravenous insulin therapy: the best practice to reverse diabetes complications? *Medical Hypotheses*, 73(3), 363–9. doi:10.1016/j.mehy.2009.02.042
- Moller, D. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414(December 2001), 821–827.
- Moore, M. C., Connolly, C. C., & Cherrington, a D. (1998). Autoregulation of hepatic glucose production. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 138(3), 240–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539293>
- Moore, M., & Satake, S. (2002). Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, 0615, 286–296. Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/282/2/E286.short>
- Mourad, N. I., Nenquin, M., & Henquin, J.-C. (2011). Metabolic amplification of insulin secretion by glucose is independent of  $\beta$ -cell microtubules. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(3), C697–706. doi:10.1152/ajpcell.00329.2010
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Victor, W., & Weil, P. A. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry*, 28e (28th ed., p. 159,173,174).
- Nadal, A., Quesada, I., & Soria, B. (1999). Homologous and heterologous asynchronicity between identified alfa ,  $\alpha$  ,  $\beta$ - and  $\delta$ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse, 85–93.
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernández-Cruz, A., & Hiriart, M. (2007). Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292(4), E1018–29. doi:10.1152/ajpendo.00457.2006
- Newsholme, P., Brennan, L., Rubi, B., & Maechler, P. (2005). New insights into amino acid metabolism ,  $\beta$  -cell function and diabetes, 194, 185–194.
- Newsholme, P., Cruzat, V., Arfuso, F., & Keane, K. (2014). Nutrient regulation of insulin secretion and action. *The Journal of Endocrinology*, 221(3), R105–20. doi:10.1530/JOE-13-0616
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. Retrieved September 06, 2014, from <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.19.1.379>
- Ogawa, W., Matozaki, T., & Kasuga, M. (1998). Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182(1-2), 13–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609110>
- Olson, a L., & Pessin, J. E. (1996). Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annual Review of Nutrition*, 16, 235–56. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.001315

- Patarrão, R. S., Lutt, W. W., Afonso, R. a, Ribeiro, R. T., Guarino, M. P., Fernandes, A. B., ... Macedo, M. P. (2008). Meal-induced insulin sensitization and its parasympathetic regulation in humans. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(12), 880–8. doi:10.1139/Y08-080
- Patti, M. E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E. J., & Kahn, C. R. (1998). Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(7), 1519–29. doi:10.1172/JCI1326
- Pauli, J. R., Ropelle, E. R., Cintra, D. E., Carvalho-Filho, M. a, Moraes, J. C., De Souza, C. T., ... Saad, M. J. a. (2008). Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *The Journal of Physiology*, 586(2), 659–71. doi:10.1113/jphysiol.2007.142414
- Permutt, M. (1981). Biosynthesis of insulin. In *The Islets of Langerhans*. Retrieved from [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=n5t2adFeZyQC&oi=fnd&pg=PA75&dq=Biosynthesis+of+Insulin&ots=jXoTcGAOUI&sig=xLm\\_FxYI7fu0YxQVZDl6kSzqgzY](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=n5t2adFeZyQC&oi=fnd&pg=PA75&dq=Biosynthesis+of+Insulin&ots=jXoTcGAOUI&sig=xLm_FxYI7fu0YxQVZDl6kSzqgzY)
- Perreault, N. E., & Roy, D. (1998). Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *American Physiological Society*, 50, 692–699.
- Pirola, L., Johnston, a M., & Van Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia*, 47(2), 170–84. doi:10.1007/s00125-003-1313-3
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Reviews. Cancer*, 12(3), 159–69. doi:10.1038/nrc3215
- Polonsky, K. S., & Rubenstein, a H. (1984). C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes*, 33(5), 486–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373457>
- Prentki, M., Matschinsky, F. M., & Madiraju, S. R. M. (2013). Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metabolism*, 18(2), 162–85. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.018
- Püschel, G. P. (2004). Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280(1), 854–67. doi:10.1002/ar.a.20091
- Rabøl, R., Petersen, K. F., Dufour, S., Flannery, C., & Shulman, G. I. (2011). Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13705–9. doi:10.1073/pnas.1110105108
- Ribeiro, R. (2010). *Hepatic parasympathetic nerve dysfunction involved in the deregulation of postprandial whole-body insulin sensitivity: a road to diabetes and associated pathologies*. Universidade Nova de Lisboa. Retrieved from <http://run.unl.pt/handle/10362/4828>
- Ribeiro, R. T., Duarte-ramos, F., & Macedo, M. P. (2001). The Fatty Zucker Rat fa / fa Shows a Dysfunction of the HISS-Dependent and -Independent Components of Insulin Action. *Western Pharmacology Society*, 30, 29–30.

- Rizza, R., Cryer, P., & Gerich, J. E. (1979). Role of Glucagon, Catecholamines, and Growth Hormone in Human Glucose Counterregulation. *Journal of Clinical Investigation*, 64(July), 62–71.
- Rojas, J. M., & Schwartz, M. W. (2014). Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16, 33–40. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dom.12332/pdf>
- Rui, L. (2014). NIH Public Access, 4(1), 177–197. doi:10.1002/cphy.c130024.
- Sadri, P., & Lutt, W. (1999). Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *American Journal of Physiological Society*. Retrieved from <http://ajpgi.physiology.org/content/277/1/G101.short>
- Sadri, P., Reid, M. a. G., Afonso, R. a., Schafer, J., Legare, D. J., Macedo, M. P., & Lutt, W. W. (2006). Meal-induced insulin sensitization in conscious and anaesthetized rat models comparing liquid mixed meal with glucose and sucrose. *British Journal of Nutrition*, 95(02), 288. doi:10.1079/BJN20051644
- Schafer, J., Legare, D. J., & Lutt, W. W. (2010). Acetylcholinesterase antagonist potentiated insulin action in fed but not fasted state. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(2), 621–8. doi:10.1124/jpet.109.164509
- Schiavon, M., Hinshaw, L., Mallad, A., Dalla Man, C., Sparacino, G., Johnson, M., ... Basu, A. (2013). Postprandial glucose fluxes and insulin sensitivity during exercise: a study in healthy individuals. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(4), E557–66. doi:10.1152/ajpendo.00182.2013
- Seino, S., Shibasaki, T., & Minami, K. (2011). Review series Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes, 121(6). doi:10.1172/JCI45680.2118
- Selz, R., Theintz, G., Tappy, L., & Schneiter, P. (2003). Evaluation of hepatic and whole body glycogen metabolism in humans during repeated administrations of small loads of 13 C glucose. *Diabetes & Metabolism*, 29, 643–649. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1262363607700812>
- Seredycz, L. I., Ming, Z., & Lutt, W. W. (2006). Acute hemorrhage causes hepatic insulin sensitizing substance (HISS)-dependent insulin resistance. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(11), 1145–51. doi:10.1139/y06-064
- Sherwin, R. S., Hendler, R., DeFronzo, R., Wahren, J., & Felic, P. (1977). Glucose homeostasis during prolonged suppression of glucagon and insulin secretion by somatostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(1), 348–52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=393257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shrayyef, M. Z., & Gerich, J. E. (2010). Principles of Diabetes Mellitus. In L. Poretsky (Ed.), *Principles of diabetes mellitus* (pp. 22, 24–28). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-0-387-09841-8
- Sluijsmans, W. E., Berg, R. Van Den, Manders, R. J., Verbeek, K., Saris, W. H., Wagenmakers, A. J., & Loon, L. J. Van. (2006). Nutrition and Disease Co-Ingestion of a Protein Hydrolysate with or without Additional Leucine Effectively Reduces Postprandial Blood Glucose Excursions in Type 2 Diabetic Men 1, (October 2005), 1294–1299.
- Stagner, J., Samols, E., & Weir, G. (1980). Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant

- glucose concentration. *Journal of Clinical Investigation*, 65(April), 939–942. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434485/>
- Tarasov, A., Dusonchet, J., & Ashcroft, F. (2004). Metabolic Regulation of the Pancreatic  $\beta$ -Cell ATP-Sensitive  $K^+$  Channel. *Diabetes Journal*, 53, 113–122. Retrieved from [http://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/suppl\\_3/S113.full.pdf](http://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/suppl_3/S113.full.pdf)
- Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141–5. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009
- Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., & Marette, A. (2007). Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annual Review of Nutrition*, 27, 293–310. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092545
- Van Loon, L. J. C., Kruijshoop, M., Menheere, P. P. C. a., Wagenmakers, a. J. M., Saris, W. H. M., & Keizer, H. a. (2003). Amino Acid Ingestion Strongly Enhances Insulin Secretion in Patients With Long-Term Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 26(3), 625–630. doi:10.2337/diacare.26.3.625
- Voshol, P. J., Haemmerle, G., Ouwens, D. M., Zimmermann, R., Zechner, R., Teusink, B., ... Romijn, J. a. (2003). Increased hepatic insulin sensitivity together with decreased hepatic triglyceride stores in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology*, 144(8), 3456–62. doi:10.1210/en.2002-0036
- Wales, N. S., Prince, R., Hospital, A., Hospital, I. R., Storlien, L., & Science, B. (1996). Dietary fats and insulin action. *Diabetologia*, 39, 621–631.
- White, M. F., & Kahn, C. R. (1994). The insulin signaling system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 1–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855332>
- Xie, H., & Lutt, W. (1993). Insulin resistance of glucose response produced by hepatic denervations. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, (Lutt 1993).
- Xie, H., & Lutt, W. W. (1995). Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 15(5), 361–369. doi:10.1111/j.1474-8673.1995.tb00402.x
- Xie, H., & Lutt, W. W. (1996). Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *American Journal of Physiology-* .... Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/ajpendo/271/3/E587.full.pdf>
- Ye, H., Hill, J., Kauffman, J., Gryniewicz, C., & Han, X. (2013). Detection of Protein Modifications and Counterfeit Protein Pharmaceuticals Using iTRAQ and MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry: Studies with Insulins. *Anal Biochemistry*, 379(2), 182–191. doi:10.1016/j.ab.2008.04.037.Detection
- Zhao, W.-Q., & Alkon, D. L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177(1-2), 125–134. doi:10.1016/S0303-7207(01)00455-5