

Novo Mecanismo de Controlo da Sensibilidade à Insulina: A Hipótese da HISS

M. P. Macedo^{1,2}, W. W. Lutt³

¹Departamento de Fisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

²Associação Portuguesa dos Diabéticos de Portugal

³Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

Resumo

Um novo mecanismo de controlo da sensibilidade à insulina é descrito cuja hipótese revela que no estado pós-prandial, após activação de um reflexo parassimpático hepático, a acetilcolina libertada vai actuar nos receptores muscarínicos do tipo M1 no fígado, levando à produção de monóxido de azoto (óxido nítrico, NO), que em conjunto com o glutatióno hepático promove a subsequente libertação da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS, "hepatic insulin sensitizing substance"). A secreção/acção da HISS é máxima após a refeição e mínima no estado de jejum quando a sua acção não é solicitada nem desejável. A reversão farmacológica da resistência à insulina dependente da HISS (HDIR) é passível com fármacos que interfiram na via de síntese/secreção da HISS tais como parassimpaticomiméticos, com maior eficácia os selectivos para os receptores muscarínicos do tipo M1, inibidores da acetilcolinesterase enzima responsável pela degradação da acetilcolina, dadores de óxido nítrico, percursores da síntese de glutatióno como a N-acetilcisteína ou dadores de glutatióno. No caso de alterações fisiopatológicas que inviabilizem a síntese/secreção da HISS o uso de RSNOs que irão mimetizar a acção da HISS no músculo esquelético parece ser a abordagem farmacológica mais vantajosa. Assim, uma alteração no paradigma da resistência à insulina é abordada com foco em novas abordagens terapêuticas e de novos métodos de diagnóstico de resistência à insulina.

Abstract

A new mechanism of control of insulin sensibility is described. This hypothesis reveals that in the post prandial state, after the activation of the hepatic parasympathetic reflex, the liberated acetylcholine acts upon the muscarinic receptors of M1 type in the liver, which results in the production of nitric oxide (NO), that conjunctly with hepatic glutathione promotes de subsequent liberation of the "hepatic insulin sensitizing substance" (HISS). The secretion/action of HISS is maximum after meals and minimum in the fasting state when its action is neither solicitude nor desirable. A pharmacological reversion of the insulin resistance dependent from the HISS can be done with drugs that interfere with the pathways of HISS synthesis/secretion as the parasympathomimetics (the more efficacious will be those selective for the muscarinic receptor-type M1), the inhibitors of the acetilcolinesterase (enzyme responsible for the degradation of nitric oxide), and the precursors of the glutathione synthesis. In the case of physiopathological alterations that make non viable de synthesis/secretion of HISS the use of RSNOs (that will monetize the action of HISS in the squeletic muscle seems to be the more advantageous pharmacological approach. Therefore, in this paper discusses an alteration of the paradigm of insulin resistance and focuses new therapeutically approaches and new methods of diagnosing insulin resistance.

INTRODUÇÃO

Este artigo apresenta uma revisão dos conceitos que deram origem à hipótese da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS, "hepatic insulin sensitizing substance"). Esta

Este trabalho teve o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (projectos POCTI/NSE/42397/2001 e POCI/SAU-OBS/56716/2004), da Associação Portuguesa de Diabetes de Portugal, da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Metabolismo e Diabetes (bolsa SPEDM/ABBOT) e dos "Canadian Institutes of Health Research."

Os autores agradecem aos seus colaboradores Ricardo Afonso, Rita Patarrão, Rogério Ribeiro, Ana Fernandes e Dallas Legare que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Correspondência:

M. Paula Macedo, PhD

¹Departamento de Fisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisboa, Portugal

Telef: (351) 218803017

Fax: (351) 218803078

E-mail: mpmacedo.biot@fcm.unl.pt

hipótese cujos primeiros estudos tiveram início na década de 90, foi proposta inicialmente por W. W. Lutt em Freiburg, Alemanha, 1997, segundo a qual o fígado funciona como um órgão crucial na regulação da sensibilidade periférica à insulina. Assim, no estado pós-prandial a secreção pulsátil de insulina resulta na secreção da HISS pelo fígado. A HISS actua no músculo esquelético, mas não no fígado ou intestino, potenciando a acção da insulina na captação e armazenamento de glucose. O comprometimento da acção da HISS resulta numa condição de resistência à insulina, a qual é responsável parcial ou totalmente pelo observado em patologias como a diabetes mellitus tipo 2, obesidade, doença crónica hepática, hipertensão crónica e efeitos alcoólicos no feto (1-5).

O REFLEXO PARASSIMPÁTICO HEPÁTICO E A HIPÓTESE DA HISS

No estado pós-prandial, após activação de um reflexo paras-

simpático hepático, a acetilcolina libertada vai actuar nos receptores muscarínicos do tipo M1 no fígado, o que leva à produção de monóxido de azoto (óxido nítrico, NO), com subsequente libertação da HISS. A secreção/acção da HISS é máxima após a refeição e mínima no estado de jejum quando a sua acção não é solicitada nem desejável.

A descoberta de que a ablação do *plexus* hepático anterior resulta em resistência à insulina, cuja magnitude não se encontra aumentada pela posterior ablação do *plexus* posterior ou por vagotomia bilateral (6) originou a hipótese de que o sinal parassimpático é essencial para a libertação da HISS. A resistência à insulina dependente da HISS ("HISS dependent insulin resistance - HDIR") é não só observável aquando da ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos mas também após administração de atropina na veia porta (antagonista de receptores muscarínicos) resultando ambos os procedimentos em HDIR de igual magnitude, não sendo nenhum deles potenciado pelo procedimento subsequente (6). A atropina origina HDIR de uma forma dependente da dose de atropina cujo efeito máximo é obtido com a dose de 3 mg/kg nos gatos e de 1 mg/kg nos ratos (5). Posteriormente, foi observado que o bloqueio selectivo dos receptores muscarínicos do tipo M1 no fígado com pirenzepina em contraponto com bloqueio de outro tipo de subreceptores do tipo M bloqueava a libertação da HISS (7). Em experiências chave observou-se que a reversão da HDIR pode ser obtida com a administração intraportal de acetilcolina quando a HDIR é provocada pela ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos (8, 9).

ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO

A hipótese da HISS sustenta que a activação parassimpática origina subsequente síntese de óxido nítrico no fígado em conjunto com o glutathione hepático, que se encontra diminuído em jejum e é máximo após a refeição, sendo estes factores essenciais na síntese/secreção da HISS (10). Por grande parte dos efeitos biológicos da acetilcolina serem tradicionalmente mediados pelo óxido nítrico, Sadri e colaboradores testaram a hipótese de que a libertação da HISS pelo fígado é precedida pela activação dos nervos parassimpáticos hepáticos accionando a síntese do óxido nítrico. A administração intraportal (i.p.v.) de antagonistas selectivos da sintase do óxido nítrico (NOS), como o ester de metil NG-nitro-L-arginina (L-NAME) e o N-monometil-L-arginina (L-NMMA) nas doses de 2.5 mg/kg e 0.73mg/kg, respectivamente, produzem HDIR. A possibilidade de que a insulino-resistência observada poderia ser provocada por um efeito do antagonista no músculo-esquelético foi eliminada fazendo a comparação entre a administração de L-NAME na dose de 1 mg/kg, por via intravenosa (i.v.) *versus* via intraportal (i.p.v.), i.e., atingindo prioritariamente o fígado (11). Esta abordagem permite entender a origem do órgão envolvido, i.e., uma maior magnitude do efeito após administração intraportal, permite concluir que tal efeito é hepático. Com efeito, Sadri e colaboradores (1999) observaram nestas

experiências que a dose de 1 mg/kg i.v. não afectava significativamente a sensibilidade à insulina, enquanto que a mesma dose administrada na veia porta (directamente no fígado) originava uma resistência à insulina bastante marcada.

A hipótese subsequente formulada foi de que a libertação de óxido nítrico é efectivamente consequente da activação dos receptores muscarínicos hepáticos e não um fenómeno paralelo ou inverso desta activação tal como acontece no sistema nervoso central ou no sistema entérico (12, 13). Após inibição da síntese da HISS com atropina ou L-NAME, observou-se que o dador de óxido nítrico 3-morfolinossidnonimine (SIN-1, 10 mg/kg, i.p.v.) restaurou a acção da HISS, no entanto a administração de acetilcolina (2.5-5µg/kg i.p.v.) não restaurou a acção da HISS após se ter provocado HDIR com L-NAME. Assim sugere-se que a NOS é um dos mecanismos efectores dos receptores muscarínicos hepáticos na síntese/secreção da HISS.

A HISS E O ESTADO PRANDIAL

A relevância do estado metabólico pós-prandial *versus* jejum está a tornar-se cada vez mais premente o que tem sido sustentado em diferentes estudos. A relação entre a HbA1c e glicemias em diabéticos tipo 2 foi determinada em 4 diferentes tempos ao longo do dia cuja correlação com o estado diabético era prenunciada significativamente nas glicemias pós-almoço e durante as próximas 5 horas (14). A forte correlação entre género sexual e idade com mortalidade cardiovascular está associada a aumentos da glicemia 2 horas após a refeição (15). Esta mesma correlação está também presente com um aumento do risco de mortalidade em geral (16,17).

Apesar do enceto da descoberta da HISS ter ocorrido no início da década de 90, só em 2001 foram publicados os estudos que demonstraram que a libertação/secreção da HISS era regulada pelo estado prandial estando praticamente ausente após 24 horas de jejum (18). A regulação da amplitude deste sinal foi elucidada através de variadas experiências que resultam no bloqueio da libertação da HISS.

A variabilidade de acção da HISS observada nos primeiros estudos em que os animais (ratos e gatos) não eram submetidos a um jejum controlado originou a hipótese de que animais que tenham comido recentemente apresentam um tónus parassimpático hepático elevado e maior sensibilidade total à insulina por a acção da HISS estar maximizada. Ao invés, animais no estado de jejum apresentam baixo tónus parassimpático e diminuta resposta à insulina por inexistência da síntese/acção da HISS.

Foram efectuadas então experiências em que os animais eram submetidos a um jejum nocturno e lhes era permitido o acesso à comida durante 2 horas. A avaliação da sensibilidade à insulina dependente e independente da HISS foi avaliada com a progressão do jejum. A acção da HISS diminuía progressivamente até que se tornou insignificante com um jejum de 24 horas em ratos. Relembra-se que no estado

pós-prandial a acção da HISS corresponde a 50-60% do efeito do metabolismo da glucose por acção da insulina. Noutras espécies, como em gatos (9) e cães (19) jejuados durante 18 horas apresentaram ainda cerca de 25-35% da acção da HISS. O rato responde de forma diferente, pois após 24 horas de jejum as suas reservas de glicogénio estão completamente esgotadas, enquanto que tanto os gatos como os cães têm padrões alimentares bastante diferentes com respostas metabólicas ao jejum díspares; assim, nos cães as reservas de glicogénio mantêm-se normais após 24-horas de jejum (19).

O GLUTATIONO HEPÁTICO NA VIA DE SÍNTESE/SECREÇÃO DA HISS

O sinal prandial associado à síntese/secreção da HISS é ainda desconhecido. Lutt postulou inicialmente que o estímulo responsável pela síntese da HISS seriam os nervos parassimpáticos hepáticos o que é corroborado com o aumento do tónus vagal durante a fase cefálica originando um aumento dos níveis de óxido nítrico, que se encontram diminuídos no jejum, suscitando um incremento da síntese da HISS. No entanto, a administração de acetilcolina na veia porta em ratos em jejum não foi capaz de aumentar a sensibilidade à

insulina (Lutt, observações não publicadas). O glutatono hepático, tradicionalmente associado a fenómenos de stress oxidativo, com elevada capacidade de reagir com o óxido nítrico originando preferencialmente S-nitrosoglutationo, tem os seus níveis hepáticos baixos no estado de jejum e elevados no pós-prandial, tal como a acção da HISS tornando-se assim num candidato de primeira linha na regulação da síntese da HISS (20, 21). Em trabalhos efectuados pelo grupo de MP Macedo, observou-se que a depleção do glutatono hepático usando o L-butionina sulfoxima (BSO) como inibidor do γ -glutamilo-cisteína sintetase originou ratos que eram HDIR (22). A subsequente administração de um dador de óxido nítrico (SIN-1), o qual é capaz de reverter a HDIR resultante do bloqueio da NOS, não foi agora capaz de reverter a HDIR. Assomaram assim, as primeiras evidências de que o glutatono era um factor crucial na síntese da HISS. A relevância do glutatono na sensibilidade à insulina é ainda suportado por Khamaisi e colaboradores (23), que observaram diminuição de tolerância à glucose *in vivo* em ratos a que se administrou BSO para depletar glutatono. Baseado nestes resultados o grupo de M.P. Macedo formulou a hipótese de que co-administração de óxido nítrico e glutatono na veia porta em ratos em jejum, quando a síntese/secreção da HISS se encontra suprimida, aumentará a sensibilidade à insulina dependente da HISS. Efectivamente, administração isolada tanto do dador de glutatono, o éster monoetilo de glutatono (glutatono-E), como do dador de óxido nítrico SIN-1, não aumentaram a sensibilidade à insulina quando administrados tanto por via intraportal como intravenosa (10). No entanto, a administração conjunta dos dois dadores de glutatono e óxido nítrico quando administrados por via intraportal mas não por via intravenosa aumentaram a sensibilidade à insulina restaurando assim a acção da HISS.

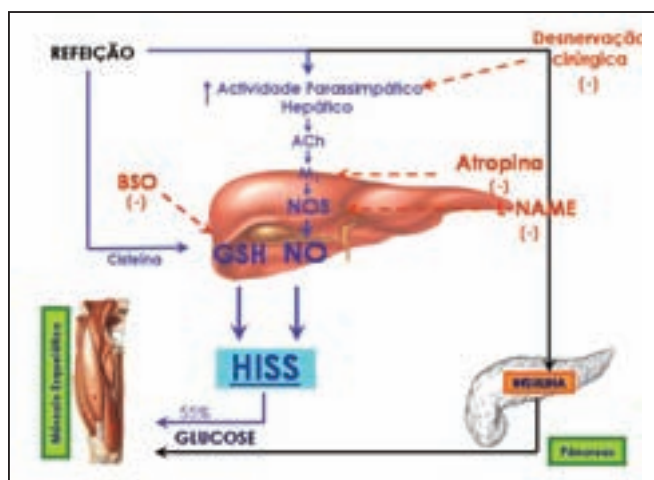


Figura 1 - Hipótese da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS): no estado pós-prandial por activação dos nervos parassimpáticos hepáticos há libertação de acetilcolina que, por sua vez vai estimular os receptores muscarínicos do tipo M1 resultando na activação da síntese do óxido nítrico hepático com subsequente aumento dos níveis de óxido nítrico hepático. Neste estadio ao haver incremento da disponibilidade do aminoácido cisteína as concentrações hepáticas de glutatono também vão aumentar. O glutatono ao reagir com o óxido nítrico irá formar um nitrosotiol, o S-nitrosoglutationo, que aumentará a secreção/acção da HISS. A HISS ao ser libertada para a corrente sanguínea vai actuar exclusivamente no músculo esquelético sendo responsável por cerca de 55% da acção hipoglicemiante da insulina no organismo. O comprometimento da função hepática através da ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos do bloqueio farmacológico tanto dos receptores muscarínicos, da síntese do óxido nítrico ou da depleção do glutatono ao inibir o sintetase do γ -glutamilo-cisteína sintetase com L-butionina sulfoxima originará resistência à insulina dependente da HISS (HDIR).

ENTIDADE DA HISS

A existência de um factor hepático que afecta a sensibilidade à insulina no músculo esquelético foi originalmente sugerida por Lang et al (24) quando ao esviscerar cães estes mostravam uma redução em 60% da utilização de glucose nos membros inferiores que era revertida após perfusão com sangue de um cão que não tinha sofrido evisceração. Resultados similares foram observados por Mertz e Schwarz (25) em ratos eviscerados cuja resistência foi revertida após administração de um extracto de fígado fresco (25 mg/100g peso corporal). Mais ainda, o aumento de captação de glucose por parte de uma co-preparação de membros inferiores isolados com fígado diminuía 30 minutos após a remoção do fígado da preparação (26). Apesar de não ser completamente conclusivo, todos estes factores apontam para a existência deste factor humoral por nós denominado HISS. Não é ainda possível determinar se a HISS é sensibilizadora da acção de diferentes concentrações de insulina ou se tem um efeito mimetizador da insulina sendo aditivo a este. A evidência de que funciona como uma hormona advém dos

estudos de reversão da resistência à insulina. Nestes, a resistência à insulina resultante da deservação cirúrgica parassimpática hepática é completamente revertida após administração intraportal mas não intravenosa de acetilcolina (8). Visivelmente, a reversão da acção da insulina não pode ser atribuída a um reflexo hepático, pois estes nervos tinham sido sujeitos a uma ablação para originar inicialmente a resistência à insulina. Mais ainda, tanto o óxido nítrico como o glutatono só aumentam a sensibilidade à insulina quando administrados na veia porta mas não se administrados por via intravenosa (10). Em estudos recentes efectuados pelo grupo de M. P. Macedo a administração intravenosa mas não intraportal de RSNOs em ratos em jejum aumentaram a sensibilidade à insulina. Estes resultados, sugerem que os RSNOs mimetizam a acção da HISS ao reverter a HDIR induzida pelo estado de jejum (Macedo, Guarino e Fernandes resultados não publicados). Curiosamente, os RSNOs vão actuar no local de acção da HISS e não no seu local de síntese sugerindo que estes ao serem administrados por via intraportal vão ser metabolizados no fígado impedindo a sua recirculação e actuação no musculo esquelético. Por outro lado, a administração intravenosa dos RSNOs ao contrário da administração do dador de óxido nítrico SIN-1 pela mesma via de administração sugerem que a HISS será um RSNOs.

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA HISS

Apesar da acção da HISS ser demonstrável através do uso de gradientes de glucose artério-venosos (9,19) e através do uso de testes de tolerância à insulina (6,27), o desenvolvimento de um teste mais auxiliador para a avaliação da sensibilidade à insulina veio impulsionar um conhecimento mais detalhado da HISS. Foi assim desenvolvido um teste euglicémico rápido de sensibilidade à insulina denominado de RIST ("Rapid Insulin Sensitivity Test") que quantifica a captação de glucose em resposta a um bólus de insulina. O RIST está descrito e validado para ser usado em ratos e gatos (28) e mais recentemente também validado para humanos (29). Em síntese, após determinação dos níveis basais estáveis de glucose em intervalos de 5 minutos a insulina é administrada por via intravenosa numa dose de 100 mU/kg no gato ou de 50 mU/kg no rato e homem. O protocolo do clamp euglicémico é iniciado 1 min após o início da perfusão da insulina e as glicemias são quantificadas cada 2 min. A perfusão de glucose é iniciada ao minuto 1 com reajustes na perfusão de glucose durante o decurso do teste mantendo as glicemias próximo dos níveis basais. O índice de RIST é a quantidade de glucose perfundida para manter a euglicemia. Este teste tem várias vantagens, das quais se salienta a possibilidade de, em ratos, o reproduzir no mesmo animal até 4 vezes no mesmo dia obtendo-se sempre respostas estáveis e reprodutíveis (30). Entre cada teste permanecem constantes os valores de glicemia, glucagina, insulina e catecolaminas (31). O teste tem a duração de cerca de 30 minutos em ratos e de 60 minutos em gatos. O RIST é sensível e per-

mite a obtenção de uma curva dose-resposta da insulina com uma curva dose-resposta usando antagonistas dos receptores muscarínicos. A possibilidade do uso de estudos emparelhados permite a análise da sensibilidade à insulina no mesmo dia e no mesmo animal comparando por exemplo sensibilidades no estado de jejum com estados pós-prandiais, a reversão em modelos de resistência à insulina (mediante ablação cirúrgica ou intervenção farmacológica) com posterior administração de fármacos que restituem a sensibilidade à insulina.

POTENCIAL TERAPÊUTICO DO MECANISMO DA HISS

A mimetização ou potenciação do sinal parassimpático hepático que leva ao aumento da acção da HISS pode ser obtido até à data através das seguintes abordagens. HDIR obtida por ablação cirúrgica dos nervos parassimpáticos hepáticos pode ser revertida, para valores próximos dos obtidos no estado pós-prandial, por perfusão intraportal de acetilcolina (2.5 µg/kg/min) (8, 19). O modelo patológico de posicionamento de uma banda no ducto biliar cronicamente resultando em patologias hepáticas onde se observa HDIR

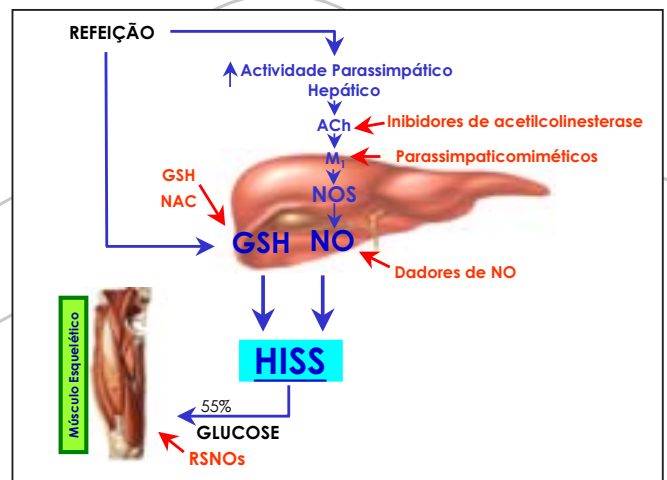


Figura 2- Potencial terapêutico da via da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS). Neuropatias do sistema nervoso parassimpático reconhecidamente associadas hoje em dia à diabetes e que originarão resistência à insulina dependente da HISS poderão ter como tratamento alvo tanto parassimpaticomiméticos, com maior eficácia os selectivos para os receptores muscarínicos do tipo M1, como inibidores da acetilcolinesterase enzima responsável pela degradação da acetilcolina. No comprometimento da síntese do óxido nítrico, dadores de óxido nítrico será alternativa terapêutica eficaz. Diminuição dos níveis de glutatono hepático, tal como em situações de elevado stress oxidativo, a suplementação com precursores da síntese de glutatono como a N-acetilcisteína ou dadores de glutatono elevarão a capacidade de síntese/secreção de HISS por parte do fígado. A nível hepático formulações com dupla abordagem poderão ser sem dúvida uma mais valia, isto é, uso de fármacos compostos que elevem tanto os níveis de glutatono como de óxido nítrico. No caso de alterações fisiopatológicas que inviabilizem a síntese/secreção da HISS o uso de RSNOs que irão mimetizar a acção da HISS no músculo esquelético parece ser a abordagem farmacológica mais vantajosa.

que é revertida após a administração intraportal de agonistas colinérgicos. Mais ainda, o uso de antagonistas de acetilcolinesterases reverte a HDIR parcial induzida pela atropina.

O óxido nítrico é também um potencial alvo terapêutico. Tal como em muitos mecanismos reguladores onde a via colinérgica se encontra envolvida, o óxido nítrico hepático representa aqui um factor chave no controlo da síntese/secreção da HISS. A HDIR produzida por deservação cirúrgica ou bloqueio da produção de óxido nítrico endógeno pode ser revertida após administração de dadores de óxido nítrico no fígado (11, 32). O óxido nítrico promove a libertação da HISS por activação do guanilato ciclase e consequente síntese de cGMP. O uso de inibidores de fosfodiesterases do cGMP, como o zaprinaste, enzima que degrada o cGMP, potencia o efeito do óxido nítrico na reversão da HDIR induzida pela atropina (33). Recentemente, a co-administração hepática de óxido nítrico e glutathione resultou na reversão da HDIR fisiológica observada no jejum (10). Estes resultados levaram ao uso de nitrosotíóis para reversão da HDIR no jejum. Em ratos em jejum, ambos os nitrosotíóis SNAP e GSNO aumentaram a sensibilidade à insulina (Macedo, Guarino e Fernandes resultados não publicados). Todos estes potenciais terapêuticos encontram-se perspectivados na Figura 2.

A descoberta da HISS e do seu impacto no processo inicial da resistência à insulina provocou uma alteração no paradigma da resistência à insulina conduzindo-nos a novas abordagens terapêuticas e de novos métodos de diagnóstico de resistência à insulina.

BIBLIOGRAFIA

- Ribeiro RT, Afonso RA, Macedo MP. Hepatic parasympathetic role in insulin resistance on an animal model of hypertension. *Metabolism* 2007;56(2): 227-233.
- Afonso RA, Ribeiro RT, Fernandes AB, Patarrão RS, Macedo MP. Hepatic-dependent and -independent Insulin Actions Are Impaired in the Obese Zucker Rat Model. *Obesity* 2007;15(2): 314-321.
- Ting JW, Lutt WW. The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity. *Pharmacology & Therapeutics* 2006;111(2): 346-373.
- Ribeiro RT, Lutt WW, Legare DJ, Macedo MP. Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia* 2005;48(5): 976-983.
- Lutt WW. A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci* 2004;95(1): 9-17.
- Xie H, Tsybenko VA, Johnson MV, Lutt WW. Insulin resistance of glucose response produced by hepatic denervations. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71(2): 175-8.
- Xie H, Lutt WW. MI muscarinic receptor blockade causes insulin resistance in the cat. *Proc West Pharmacol Soc* 1995;38: 83-4.
- Xie H, Lutt WW. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 1): E587-92.
- Xie H, Lutt WW. Insulin resistance of skeletal muscle produced by hepatic parasympathetic interruption. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1): E858-63.
- Guarino MP, Macedo MP. Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2006;147(8): 959-965.
- Sadri P, Lutt WW. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1): G101-8.
- Leonard TO, Lydic R. Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate. *J Neurosci* 1997;17(2): 774-85.
- Smith TK, McCarron SL. Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol (Lond)* 1998;512(3): 893-906.
- Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1997;20(12): 1822-6.
- de Vegt F, Dekker JM, Ruhe HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, et al. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 1999;42(8): 926-31.
- DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet* 1999;354(9179): 617-21.
- Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, et al. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia* 1996;39(12): 1577-83.
- Lutt WW, Macedo MP, Sadri P, Takayama S, Duarte Ramos F, Legare DJ. Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(1): G29-36.
- Moore MC, Satake S, Baranowski B, Hsieh PS, Neal DW, Cherrington AD. Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(2): E286-96.
- Gronget J-Fo, David J-C. Reciprocal Variations of nNOS and HSP90 Are Associated with Fasting in Gastrointestinal Tract of the Piglet. *Digestive Diseases and Sciences* 2003;48(2): 365-372.
- Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 1977;107(1):51-60.
- Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(4): G588-94.
- Khamaisi M, Kavel O, Rosenstock M, Porat M, Yuli M, Kaiser N, et al. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biochem J* 2000;349(Pt 2): 579-86.
- Lang S, Goldstein MS, Levine R. Influence of the Liver on Uptake of Glucose by Extrahepatic Tissues. *Am J Physiol* 1954;177(3): 447-450.
- Mertz W, Schwarz K. An effect of liver extracts on glucose tolerance in rats. *Am J Physiol* 1962;203(1): 53-56.
- Petersen KF, Tygstrup N. A liver factor increasing glucose uptake in rat hindquarters. *J Hepatol* 1994;20(4): 461-5.
- Reid MA, Latour MG, Legare DJ, Rong N, Lutt WW. Comparison of the rapid insulin sensitivity test (RIST), the insulin tolerance test (ITT), and the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) to measure insulin action in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80(8): 811-8.
- Xie H, Zhu L, Zhang YL, Legare DJ, Lutt WW. Insulin sensitivity tested with a modified euglycemic technique in cats and rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1996;35(2): 77-82.
- Patarrão RS, Lutt WW, Guarino MP, Afonso RA, Ribeiro RT, Fernandes AB, et al. A new technique to assess insulin sensitivity in humans: the rapid insulin sensitivity test (RIST). *Proc West Pharmacol Soc* 2007;(submitted).
- Lutt WW, Wang X, Sadri P, Legare DJ, Macedo MP. Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76(12): 1080-6.
- Xie H, Lutt WW. Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J Auton Pharmacol* 1995;15(5): 361-9.
- Guarino MP, Correia NC, Lutt WW, Macedo MP. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(3): G527-32.
- Lutt WW, Macedo MP, Sadri P, Legare DJ, Reid MA, Guarino MP. Pharmaceutical reversal of insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc* 2004;47: 30-2.