

# Investigação Translacional na Patogénese da Diabetes: Hipótese Hepatocêntrica\*

## *Translational Research in Diabetes Pathogenesis: The Hepatocentric Hypothesis*

M. P. Macedo

Professora Auxiliar de Fisiologia, Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), Departamento de Fisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNL, Lisboa, Portugal

### Resumo

A Diabetes *Mellitus* (DM) tipo 2, enquanto doença crónica epidémica, é uma patologia multifatorial de etiopatogénese complexa e heterogénea que é acompanhada por múltiplas comorbidades. A prevalência de DM em Portugal é de 12,9 % mas apenas em 7,2 % da população a doença se encontra diagnosticada. O recurso a indicadores de estádios pré-diabéticos permite estimar que a hiperglicemia intermédia atinge 26,8% da população portuguesa, dos quais 14,0% apresentam tolerância diminuída à glucose 10,1% alteração da glicemia em jejum (AGJ) e 2,6% ambas as condições. De entre os pré-diabéticos, os com tolerância diminuída à glucose apresentam excursões de glucose pós-prandial cujo diagnóstico é mais difícil devido a limitações metodológicas, resultando numa predominância desastrosamente elevada de casos não detetados. Este aumento progressivo das excursões de glucose tem sido fortemente associada a uma diminuição na sensibilidade à insulina pós-prandial. A ação da insulina é ubíqua, e vários órgãos têm sido implicados na progressão de estados de intolerância à glucose para diabetes. Nos últimos anos, o fígado ganhou relevância como maestro da regulação direta e indiretamente dos níveis óptimos de glucose plasmática assim como na regulação de disponibilidade de quantidades apropriadas de glucose aos vários tecidos alvo, parecendo posicionar-se como o órgão central na patogénese do dismetabolismo independentemente da disfunção primordial residir em alterações da secreção de insulina pela célula beta ou da resistência à insulina. Esta revisão tem como objetivo discutir a chamada “hipótese hepatocêntrica”, ou seja, a noção de que o fígado é o orquestrador do controlo glicémico global, noção esta que desafia os conceitos clássicos da regulação do metabolismo da glucose. É discutido o papel do fígado na homeostase da glucose, em dois eixos principais: enquanto regulador da insulinémia periférica e como regulador da sensibilidade à insulina no estágio pós-prandial. É também abordada a patologia hepática de maior prevalência associada ao dismetabolismo gluco-lipídico: o fígado gordo não alcoólico (NAFLD). A compreensão de todas estas variáveis é relevante para uma abordagem terapêutica mais personalizada com requisitos clínicos específicos, tendo o objectivo final de não só prevenir a Diabetes *Mellitus* tipo 2 mas também criar novas estratégias interventivas ao nível da população em geral tendo em vista a promoção da vida saudável. Estas estratégias terão particular importância nos estratos mais idosos de modo a diminuir o impacto sócio-económico, e a fragilização da sua saúde.

### Abstract

Type 2 Diabetes *Mellitus* is a multifactorial chronic epidemic disease with a heterogeneous ethiopathogenesis and accompanied by multiple co morbidities. The prevalence of Diabetes *Mellitus* in Portugal is 12.9% but only 7.2% of the population is diagnosed. The use of indicators of pre-diabetic stages allows us to estimate that intermediate hyperglycemia reaches 26.8% of the Portuguese population, of which 14.0% have impaired glucose tolerance, 10.1% impaired fasting glucose (IFG) and 2.6% both conditions. Among the pre-diabetic those with impaired glucose tolerance have postprandial glucose excursions whose diagnosis is more difficult due to methodological limitations, resulting in a disastrously high predominance of undetected cases. The action of insulin is ubiquitous, and many organs have been implicated in the progression from intolerance states to glucose to diabetes. In recent years, the liver has gained prominence as conductor of the direct regulation and indirectly optimal levels of plasma glucose as well as in regulating the availability of appropriate amounts of glucose to the various target tissues, appearing to position itself as the central organ in the pathogenesis of dysmetabolism regardless of where the primary dysfunction resides in alterations of insulin secretion by the beta cell changes or insulin resistance. This review aims to discuss the so called “hepatocentric hypothesis”, i.e. the notion that the liver is the orchestrator of the overall glycaemic control, a notion that challenges the classical concepts of regulation of glucose metabolism. The role of the liver in glucose homeostasis in two main areas – as regulator of peripheral insulin and as insulin sensitivity regulator in the postprandial stage – is discussed. The most prevalent liver disease associated with the gluco-lipid dysmetabolism, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – is also discussed. Understanding that all of these variables are relevant to a more customized approach to therapy with specific clinical requests, having the ultimate goal of not only to prevent Type 2 diabetes but also to create new interventional strategies for the general population in view of promoting a healthy life. These strategies will be of particular importance in the elderly in order to reduce the socio-economic impact and the weakening of their health.

### CORRESPONDÊNCIA

Maria Paula Macedo  
Departamento de Fisiologia, FCML – UNL  
Campo Mártires da Pátria, 130  
1169-056 Lisboa

\* Lição elaborada para as Provas de Agregação, no Ramo de Ciências da Vida, pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, ao abrigo do nº 2 do artigo 3º do Decreto-Lei nº 239/2007 de 19 de Junho.

## > PREVALÊNCIA E EVOLUÇÃO DA INCIDÊNCIA DA DIABETES TIPO 2

A Diabetes *Mellitus* (DM) tipo 2 encontra-se em franca expansão em todo o mundo, ameaçando adquirir uma dimensão pandémica. Segundo estimativa da Federação Internacional de Diabetes em 2012/2013 existiam no mundo 382 milhões de diabéticos, isto é 8,3% da população adulta, dos quais 50% se encontram não diagnosticados. Durante 2013 a DM matou 5,1 milhões de pessoas metade das quais com idade inferior a 79. Prevê-se que em 2035 cerca de 592 milhões de pessoas com DM correspondam a uma morte atribuível à DM em cada 6 segundos. A distribuição geográfica da prevalência de DM varia bastante chegando em alguns países a ultrapassar os 30%. Na Europa existem 55 milhões de pessoas com DM das quais 21,2 milhões não sabem que têm a doença o que revela um dos aspectos epidemiológicos mais preocupantes da DM – a doença tem um longo período clinicamente silencioso o que possibilita a sua progressão sem que haja possibilidades de intervenção preventiva, terapêutica ou educativa (International Diabetes Federation. 2013). A prevalência DM em Portugal é de 12,9 % mas apenas em 7,2 % da população a doença se encontra diagnosticada (Gardete-Correia L. 2013). Mais ainda, a progressão da diabetes em Portugal revela um aumento de incidência em cerca de 80% nos últimos 10 anos. Em 2010 a Diabetes representou cerca de sete anos de vida perdida por cada óbito por Diabetes na população com idade inferior a 70 anos. O recurso a indicadores de estadios prédiabéticos permite estimar que a hiperglicemia intermédia atinge 26,8% da população portuguesa, dos quais 14,0% apresentam tolerância diminuída à glucose (TDG), 10,1% alteração da glicemia em jejum (AGJ) e 2,6% TDG e AGJ alteradas. Neste quadro epidemiológico torna-se impreterível promover a avaliação clínica e a análise de risco de diabetes ao nível dos cuidados primários, de modo a permitir a identificação da população de risco, e as intervenções terapêuticas e educacionais pertinentes. Esta intervenção epidemiológica pressupõe o reforço da educação dos profissionais e dos doentes e por último mas analogamente imperativo o desenvolvimento de novos instrumentos baseados em evidência científica, que nos permitam abordagens inovadoras na prevenção e tratamento da Diabetes.

O crescente aumento da prevalência da DM 2 resultado de mais sedentarismo, excessos alimentares, obesidade e o aumento da esperança de vida, torna a população europeia particularmente frágil, pelo que urge tomar medidas para que uma população mais idosa e com co-

morbilidades permaneça ativa, diminuindo a sua fragilidade e contribuindo para uma sociedade sustentável. Para tal é necessário avaliar as populações nas faixas etárias críticas de modo a poder identificar os grupos de risco num estágio precoce. Os próximos anos serão determinantes para proceder a avanços no conhecimento da pré-diabetes e patologias associadas não só na compreensão da sua génese, da progressão para a diabetes e de medidas a tomar para evitar o seu desenvolvimento. De entre os pré-diabéticos os com tolerância diminuída à glucose, apresentam excursões de glucose pós-prandial cujo diagnóstico é mais difícil devido as limitações metodológicas, resultando numa predominância desastrosamente elevada de casos não detetados (Soriguer, Goday, *et al.*; Gardete-Correia, Boavida, *et al.* 2010). Este aumento progressivo das excursões de glucose tem sido fortemente associada a uma diminuição na sensibilidade à insulina pós-prandial (Ceriello 2009; Ceriello 2010). Um importante modulador do metabolismo da glucose pós-prandial é o sistema nervoso autónomo (SNA) (Greenfield and Campbell. 2008; Kalsbeek, Bruinstroop, *et al.* 2010) cujos desequilíbrios têm sido associados ao comprometimento da ação da insulina levando a um conjunto de alterações que culminam na DM2 (Lautt. 1980; Greenfield and Campbell. 2008). Especificamente, o compromisso da função vagal tem sido visto como a alteração do SNA mais associada à resistência à insulina (Takayama, Sakura, *et al.* 2001; Ribeiro, Lautt, *et al.* 2005; Teff. 2008).

A ação da insulina é ubíqua, e vários órgãos têm sido implicados na progressão de estados de intolerância à glucose para diabetes. Nos últimos anos, o fígado ganhou relevância como maestro da regulação direta e indiretamente dos níveis ótimos de glucose plasmática assim como na regulação de disponibilidade de quantidades apropriadas de glucose aos vários tecidos alvo. É objecto desta lição discutir os dogmas relativos ao papel do fígado na sensibilidade à insulina pós-prandial.

## > HOMEOSTASE DA GLUCOSE

Em indivíduos saudáveis as excursões de glucose plasmática permanecem sobre apertado controlo fisiológico e são relativamente estáveis ao longo do dia, independentemente da ingestão intermitente de hidratos de carbono. A interação concertada entre diferentes órgãos é crítica para a regulação dos mecanismos de manutenção da homeostase da glucose. O intestino tem um papel direto na homeostase da glucose regulando não só a quantidade de absorção de hidratos de carbono determinando a taxa de aparecimento de glu-

cose, mas também adquire um papel relevante através da secreção de incretinas que atuam sobre as células beta pancreáticas estimulando a secreção de insulina. Indirectamente, através da interacção do eixo intestino-cérebro a activação hipotalâmica é responsável por controlar a saciedade detendo também ações reguladoras na secreção e clearance da insulina (IC) (Macedo, Lima, *et al.* 2014). No intestino a glucose é detectada por células enterocromafinas libertando serotonina que, juntamente com as incretinas ativam o vago, regulando a homeostase da glucose e a secreção de insulina (Lee, Cummings, *et al.* 2012). O sistema nervoso parassimpático é regulador do primeiro pico de secreção de insulina pelo pâncreas, chamada a fase cefálica (Ahren and Larsson. 2001). Esta fase cefálica é complementada por respostas induzidas pela chegada de nutrientes ao intestino libertando *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e *Gastric Inhibitory Polypeptide* (GIP) que assumem o seu papel incretínico (cujo nome é derivado de *INtestine seCRETion INSulin*) ao estimular as células pancreáticas  $\beta$ . Por outro lado, a glucose, e/ou outros nutrientes têm uma ação direta sobre a célula pancreática beta promovendo a secreção de insulina que para além da sua função hipoglicémica é responsável pela supressão da produção endógena de glucose e pela inibição da gliconeólise e gliconeogénese. Durante o estado de jejum, os níveis de insulina descem em conjugação com o aumento das hormonas contra-reguladoras, tais como a glucagona, a adrenalina e corticosteróides, resultando no aumento da produção de glucose hepática e na prevenção de episódios hipoglicémicos. Além disso, e definitivamente não menos relevante, a quantidade de insulina que atinge o sangue periférico e cuja concentração plasmática é eficientemente regulada pelo fígado, é responsável por promover a captação de glucose pelo músculo-esquelético, tecido adiposo, bem como por outros órgãos. Este último efeito da insulina é dependente não apenas da concentração de insulina no plasma, mas também da eficiência da resposta dos tecidos periféricos à insulina, isto é, pela sensibilidade à insulina.

### > HIPÓTESE HEPATOCÊNTRICA

A noção de que o fígado é o orquestrador do controlo glicémico global desafia os conceitos clássicos da regulação do metabolismo da glucose. No entanto, é geralmente aceite que o dismetabolismo hepático está associado ao aumento de excursões de glucose e à resistência periférica à insulina. Na verdade, o fígado controla a homeostasia da glucose maioritariamente devido à sua capacidade de: captar a glucose absorvida

durante uma refeição e de a libertar para a corrente sanguínea quando necessário; regular os níveis de insulina plasmáticos; aumentar a sensibilidade à insulina periférica no estado pós-prandial não só por regulação hormonal mas também através da atividade vagal hepática. O fígado revela-se assim como um órgão crítico na modulação do metabolismo da glucose subsequente ao aporte digestivo.

Subsequente à assimilação, concentrações elevadas de glucose na circulação hepatoportal são detectadas em sensores localizados neste segmento vascular que ativam o sistema nervoso parassimpático por via aferente, a partir do fígado para o cérebro, afectando por via eferente, a partir do cérebro para o pâncreas, a secreção pancreática de insulina (Lee and Miller. 1985).

O fígado é também o principal órgão periférico sobre o qual o hipotálamo interfere na homeostase metabólica (Uyama, Geerts, *et al.* 2004). O hipotálamo através de um mecanismo mediado pelo nervo vago regula a síntese de glicogénio hepático (Shimazu, Matsushita, *et al.* 1976). Mais recentemente tem sido dada ênfase à capacidade do hipotálamo de regular não só a sensibilidade à insulina hepática mas também a sensibilidade à insulina noutros órgãos (Zhang, Yu, *et al.* 2013; Filippi, Bassiri, *et al.* 2014). No seu conjunto estes mecanismos são iniciadores do papel central do fígado nos processos que impactam na tolerância à glucose pós-prandial, conforme ilustrado na Figura 1.

O papel do fígado na homeostase da glucose vai ser aqui discutido em dois eixos principais enquanto regulador da insulinémia periférica e como regulador da sensibilidade à insulina no estado pós-prandial. Será também abordada a patologia hepática de maior prevalência associada ao dismetabolismo gluco-lipídico: o fígado gordo não alcoólico (NAFLD).

### > HIPÓTESE HEPATOCÊNTRICA – CLEARANCE DA INSULINA

A disponibilidade da insulina é regulada por dois efeitos concomitantes; a capacidade da célula beta secretar insulina e a capacidade de depuração da insulina (*Clearance* da Insulina, CI), processo que é exercido maioritariamente pelo fígado que assim participa criticamente na regulação da insulinémia periférica, mas cuja ação tem sido negligenciada na avaliação da disponibilidade de insulina.

A CI é largamente mediada pela ligação da insulina ao seu receptor expresso nos hepatócitos e tem sido sugerido que 80% da insulina que atinge o fígado via circulação explânquica se liga aos receptores hepatocitá-

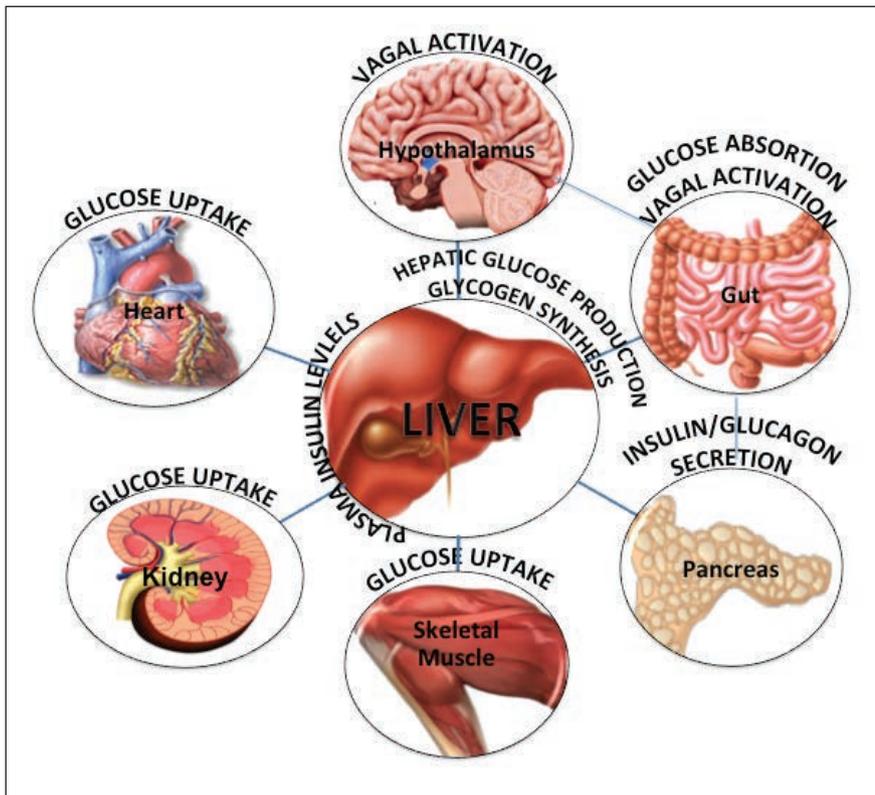


Figura 1 - Figura ilustrativa da hipótese hepatocêntrica integrando a relação entre os vários órgãos envolvidos na homeostase da glicose.

rios. A internalização do complexo de insulina ligada é crítica, não só relativamente ao processo de *clearance* mas também ao processo de ação da insulina nos hepatócitos. A insulina intra-hepatocitária pode sofrer total degradação ou ser reposta em circulação, quer intacta ou parcialmente degradada. A degradação da insulina é mediada essencialmente pela enzima degradante da insulina (IDE) e por uma proteína dissulfato isomerase (PDI). A PDI é responsável pela clivagem de insulina na ponte de dissulfureto, originando fragmentos da cadeia B com aparente atividade biológica residual (Duckworth, Bennett, *et al.* 1998). O atual modelo de degradação da insulina preconiza que a remoção da insulina do seu recetor resulta de variações de pH nas vias endocíticas e/ou da ação da IDE, tendo a PDI um papel posterior ao promover a quebra das pontes dissulfureto da insulina. Os fragmentos resultantes podem posteriormente sofrer degradação enzimática pela IDE. Estudos transversais e longitudinais sugerem uma associação íntima entre CI e a sensibilidade à insulina. Qualquer intervenção que melhore a sensibilidade à insulina também impacta na IC e vice-versa (Jones, Abbasi, *et al.* 2000; Kim, Abbasi, *et al.* 2005). Além disso, em modelos animais nos quais a IC está muito reduzida (Poy, Yang,

*et al.* 2002; Abdul-Hay, Kang, *et al.* 2011), a resistência à insulina desenvolve-se lentamente, sugerindo que a mudança de IC pode não ser só adaptativa, mas também mal adaptativa.

Aproximadamente 50-70% da insulina secretada no pâncreas é removida pelo fígado, antes de atingir a circulação periférica, e a alteração da taxa de remoção varia na transição do jejum para o estado pós-prandial, sendo mais elevada no jejum (Natali e Macedo, resultados não publicados). A variabilidade da CI na população tanto em jejum como em resposta a uma refeição é de cerca de dez vezes e cerca de metade desta variabilidade inter-individual é atribuível a factores hereditários (Poy, Yang, *et al.* 2002).

A observação de uma apreciável variabilidade na IC em indivíduos com a mesma secreção de insulina (Natali e Macedo, resultados não publicados) sugerem que a CI não estará diretamente dependente da estimu-

lação da secreção de insulina e que a CI mediada pelo fígado não seja habitualmente um processo saturável. Assim outros mecanismos deverão influenciar a CI tanto em condições crónicas como agudas. Igualmente na transição do jejum para o pós-prandial a CI poderá ter um papel crítico na regulação do “disposal” dos nutrientes. É de realçar que a hiperinsulinémia pode induzir alterações na CI já que elevadas concentrações plasmáticas crónicas de insulina promovem uma diminuição dos recetores periféricos de insulina e também conduzem à saturação da máquina enzimática responsável pela CI. Por outro lado, a hiperglicémia parece também comprometer a CI tanto porque um aumento crescente da glicémia leva a um aumento de secreção de insulina com concomitante diminuição da sua *clearance* como pela capacidade inibidora da glucose diretamente na IDE (Duckworth, Bennett, *et al.* 1998; Pivovarova, Gogebakan, *et al.* 2009). Identicamente, os ácidos gordos livres inibem a capacidade de ligação da insulina ao seu recetor assim como também têm capacidade inibidora da IDE (Hamel. 2009). Esta capacidade de inibição da CI pelos ácidos gordos livres em indivíduos saudáveis é independente da ação da glucose (Hennes, Dua, *et al.* 1997). No entanto, estão ainda por esclarecer os primordiais

determinantes da CI. Estudos *in vitro* sugeriram que o monóxido de azoto (NO) tem a capacidade de inibir a IDE (Cordes, Bennett, *et al.* 2009). Em estudos que realizámos recentemente em indivíduos saudáveis observou-se que a inibição da sintetase do óxido nítrico com L-NAME originava um aumento da CI (Natali, Ribeiro, *et al.* 2013). Complementarmente estudos *in vivo* em ratos Wistar revelaram que a alteração do NO hepático afetava a CI já que a diminuição de NO aumentava a atividade da IDE (Martins e Macedo, resultados não publicados). No seguimento destas experiências foi também observado que durante uma refeição há um aumento dos níveis de NO hepático os quais parecem estar associados à diminuição de CI por via do aumento da biodisponibilidade da insulina a nível periférico a fim de exercer a sua ação. Mais ainda, evidência farmacológica sugere que o NO hipotalâmico também regula a CI a nível hepático (Martins e Macedo, resultados não publicados). No entanto, em situações patológicas que envolvem inflamação, o NO é produzido massivamente pela NOS indutível (iNOS) hepática. Este é o caso de um modelo de resistência à insulina induzida por uma dieta rica em sacarose em que se observa supressão da CI e hiperinsulinémia, o que constitui um paralelo com o que se observa no estadio prediabético. Esta hiperinsulinémia mantida poderá ser responsável por uma diminuição do número de recetores de insulina a nível periférico agravando assim a resistência à insulina.

Estudos de CI em indivíduos obesos apontam para uma associação entre CI e sensibilidade à insulina. A perda de peso de 10% nos indivíduos obesos resistentes à insulina resultou numa modesta melhoria na sensibilidade à insulina. Este processo foi acompanhado por uma redução da hiperinsulinémia que foi exclusivamente dependente do aumento da CI, já que a secreção de insulina das células  $\beta$  permaneceu inalterada (Jones, Abbasi, *et al.* 2000). Erdmann *et al.* também observaram uma redução progressiva da CI com o aumento da obesidade, sendo mais acentuada no estado pós-prandial (Erdmann, Mayr, *et al.* 2009). Estes resultados implicam que a CI é um factor determinante do desenvolvimento do estado de resistência à insulina.

Assim, a diminuição hepática da CI é um marcador fenotípico precoce de distúrbios no metabolismo da insulina, tal como foi observado em parentes de primeiro grau de pacientes diabéticos tipo 2 (Rudovich, Rochlitz, *et al.* 2004). A avaliação da CI em indivíduos saudáveis com a secreção de insulina comparável demonstra que quando estes são estratificados em três grupos com baixa, média e alta CI os indivíduos com maior capacidade de CI são também aqueles que são mais sensíveis

à insulina. Recentemente, alguns grupos têm relatado uma associação de polimorfismos do gene da IDE com diabetes (Pivovarova, Gogebakan, *et al.* 2009; Pivovarova, Nikiforova, *et al.* 2009; Rudovich, Pivovarova, *et al.* 2009).

### > HIPÓTESE HEPATOCÊNTRICA – SENSIBILIDADE À INSULINA PÓS-PRANDIAL

O intestino é o primeiro órgão a ter impacto sobre uma refeição ao regular a absorção de nutrientes. No estado pós-prandial, a capacidade de captação da glucose pelos órgãos periféricos é aproximadamente o dobro decrescendo progressivamente até um nível baixo de sensibilidade à insulina após 24 horas de jejum (Lautt, Macedo, *et al.* 2001; Patarrao, Lautt, *et al.* 2012). Este processo é resultante de um postulado factor hepático que actua sobre o músculo-esquelético, coração e rim para estimular a absorção de glucose (Fernandes, Patarrao, *et al.* 2011) e que é designado por substância hepática sensibilizadora de insulina (HISS). Percentualmente, o músculo-esquelético é o principal responsável pela captação de glucose a nível periférico (Fernandes, Patarrao, *et al.* 2011). A existência de um factor hepático que afeta a sensibilidade à insulina no músculo-esquelético foi originalmente sugerida por Lang, *et al.* (Lang, Goldstein, *et al.* 1954) que demonstraram uma redução em 60% da utilização de glucose pelo músculo dos membros inferiores em cães que sofreram hepatectomia total. Esta redução era revertida após perfusão com sangue de cães não manipulados. Resultados similares foram observados por Mertz e Schwarz (Mertz and Schwarz. 1962) em ratos cuja resistência à insulina foi revertida após administração de um extrato de fígado fresco (25 mg/100g peso corporal). Mais ainda, a captação de glucose numa co-preparação de membros inferiores isolados com fígado diminuía 30 minutos após a remoção do fígado da preparação (Petersen and Tygstrup. 1994). Apesar de não ser completamente conclusivo este conjunto de observações apontam para a existência de um factor humoral de origem hepática por nós denominado por substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS).

A descoberta de que a ablação do *plexus* hepático anterior resulta em resistência à insulina, cuja magnitude não é alterada pela posterior ablação do *plexus* posterior ou por vagotomia bilateral (Xie and Lautt. 1996) 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 administra-

ção de atropina na veia porta (antagonista de recetores muscarínicos) resultando ambos os procedimentos em HDIR de igual magnitude, não sendo nenhum deles agravado pelo outro procedimento (Xie and Lutt. 1995). Em experiências subsequentes 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 (Xie and Lutt. 1996).

A libertação da HISS é pois dependente da integridade dos nervos parassimpáticos hepáticos. A ablação destes nervos resulta na diminuição da sensibilidade à insulina pós-prandial em 50%, tornando-se indistinguível das medidas de sensibilidade no estado de jejum. A indução da sensibilidade à insulina por uma refeição como atrás referido foi recentemente avaliada em voluntários saudáveis do sexo masculino, e o seu bloqueio foi confirmado em seres humanos após a administração do antagonista muscarínico atropina (Patarrao, Lutt, *et al.* 2008). A relevância deste mecanismo foi confirmada em indivíduos com excesso de peso mostrando elevada prevalência de resistência à insulina pós-prandial mas sem alterações da função das células (Patarrao, Lutt, *et al.* 2012). Estes resultados evidenciam que o decréscimo da ação da HISS resulta numa condição de resistência à insulina, que é um importante componente fisiopatológico em diversas afeições crónicas como a diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, doença crónica hepática, hipertensão crónica e efeitos alcoólicos no feto (Lutt. 2004; Ribeiro, Lutt, *et al.* 2005; Ting and Lutt. 2006; Afonso, Ribeiro, *et al.* 2007; Ribeiro, Afonso, *et al.* 2007).

A hipótese mecanística de síntese da HISS sustenta que a ativação parassimpática origina a consequente síntese de óxido nítrico no fígado que em conjunto com glutatióno hepático, que se encontra diminuído em jejum e é máximo após a refeição, são factores essenciais na síntese/secreção da HISS (Lutt, Macedo, *et al.* 2001). Uma vez que grande parte dos efeitos biológicos da acetilcolina são mediados pelo óxido nítrico, Sadri, *et al.* (Sadri and Lutt. 1999) testaram a hipótese de que a libertação da HISS pelo fígado é precedida pela ativação dos nervos parassimpáticos hepáticos acionando a síntese do óxido nítrico. A administração intraportal (i.p.v.) de antagonistas selectivos da sintetase do óxido nítrico (NOS), como o ester de metil NG-nitro-L-arginina (L-NAME) e o N-monometil-L-arginina (L-NMMA) produzem HDIR (Guarino, Correia, *et al.* 2004).

Subsequentemente testou-se a hipótese de que a libertação de óxido nítrico é efectivamente subsequente à ativação dos receptores muscarínicos hepáticos e não um fenómeno paralelo ou inverso desta ativação tal

como acontece no sistema nervoso central ou no sistema entérico (Selz, Theintz, *et al.* 2003; Ribeiro, Lutt, *et al.* 2005). Após inibição da síntese da HISS com atropina ou L-NAME, observou-se que o dador de óxido nítrico 3-morfolinossidenonimine administrado por via intraportal restaurou a ação da HISS, no entanto a administração de acetilcolina não restaurou a ação da HISS após se ter provocado HDIR com L-NAME. Assim sugere-se que a ativação da NOS é um dos mecanismos efetores dos recetores muscarínicos hepáticos na síntese/secreção da HISS (Guarino, Correia, *et al.* 2004).

Apesar da descoberta da HISS ter ocorrido no final da década de 90, só em 2001 foram publicados os estudos que mostram que a libertação/secreção da HISS é regulada pelo estado prandial estando praticamente ausente após 24 horas de jejum (Lutt, Macedo, *et al.* 2001). A regulação da amplitude deste sinal foi elucidada através de várias experiências que resultam no bloqueio da libertação da HISS.

O glutatióno 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 ação da HISS tornando-se assim num candidato de primeira linha na regulação da síntese/secreção da HISS (Tateishi, Higashi, *et al.* 1977; Grongnet and David. 2003). Em trabalhos subsequentes, observou-se que a depleção do glutatióno hepático usando o L-butionina sulfoxima (BSO) como inibidor do  $\gamma$ -glutamilo-cisteína sintetase induziu HDIR em ratos (Guarino, Afonso, *et al.* 2003). 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 glutatióno era um fator crucial na síntese da HISS. A relevância do glutatióno na sensibilidade à insulina é ainda suportada por Khamaisi e colaboradores (Khamaisi, Kavel, *et al.* 2000), que observaram diminuição de tolerância à glucose *in vivo* em ratos a que se administrou BSO para depletar glutatióno. Posteriormente observou-se que a co-administração de óxido nítrico e glutatióno na veia porta, mas não por via intravenosa, em ratos em jejum, quando a síntese/secreção da HISS se encontra suprimida, aumentou a sensibilidade à insulina dependente da HISS (Guarino and Macedo. 2006).

Estudos recentes mostram que a administração intravenosa mas não intraportal de nitrosotióis (RSNOs) em ratos em jejum aumentaram a sensibilidade à insulina. Estes resultados sugerem que os RSNOs mimetizam a

ação da HISS ao reverter a HDIR induzida pelo estado de jejum (Patarrao, Lauth, *et al.* 2012). Consistente com esta hipótese é que os RSNOs vão actuar no local de ação 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 atuação no músculo-esquelético.

Ainda que o mecanismo de regulação do glutathione hepático em resposta à alimentação seja desconhecido, nós propomos que a sua síntese é dependente dos aminoácidos presentes em uma refeição. Com efeito, foi demonstrado que uma refeição líquida, mas não exclusivamente de sacarose ou glucose, resultou no aumento da sensibilidade à insulina (Sadri, Reid, *et al.* 2006). Estudos detalhados relativos a diferentes nutrientes mostram que nem glucose nem os lípidos ou aminoácidos por si só resultam em aumento na sensibilidade à insulina. Da associação de nutrientes apenas uma refeição de glucose com aminoácidos foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina. Este efeito foi no entanto anulado quando a experiência foi feita em animais onde foi realizada uma desnervação parassimpática hepática previamente (Afonso e Macedo, resultados não publicados). Em humanos, a excursão de glucose encontra-se diminuída durante um teste oral de tolerância à glucose quando imediatamente antes foi fornecida uma refeição composta de proteínas e lípidos, embora a produção endógena de glucose e secreção de insulina não se encontrem alterados (Natali e Macedo, resultados não publicados). A partir destes estudos, chegamos à conclusão de que a glucose e os aminoácidos são necessários para aumentar a sensibilidade à insulina induzida por uma refeição, que por sua vez depende da ativação dos nervos parassimpáticos hepática para potenciar a ação da insulina periférica e, por conseguinte, regular a glicémia pós-prandial.

A importância dos nervos parasimpáticos hepáticos na sensibilidade à insulina pós-prandial tem sido avaliada e esta encontra-se dramaticamente reduzida não só em indivíduos obesos como em modelos de animais resistentes à insulina induzida por dietas ricas ou em hidratos de carbono (dieta rica em sacarose) ou em lípidos, em modelos de animais obesos (ratos Zucker), obesos com diabetes (ratos diabéticos Zucker) ou num modelo de hipertensão (Ribeiro, Afonso, *et al.* 2007; Afonso, Fernandes, *et al.* 2012).

Um quadro semelhante é observado no envelhecimento onde se desenvolve uma perda progressiva da sensibilidade à insulina pós-prandial que se correlaciona com aumento do risco de desenvolver diabetes (Ribeiro, Afonso, *et al.* 2008). Outros têm também proposto que

o decaimento do tónus parassimpático derivado do desequilíbrio do sistema nervoso autónomo com simultâneo aumento do tónus simpático se encontra na génese da intolerância à glucose e contribui para a diabetogénese (Wu, Yang, *et al.* 2007).

O estudo de centenários constitui uma abordagem fascinante na investigação sobre as características que permitem aos indivíduos atingir uma vida saudável excepcionalmente longa. Zulfiqar observou que em indivíduos recrutados até 99 anos de idade, a longevidade saudável está correlacionada com a preservação da função autonómica em particular do domínio do sistema parassimpático conferindo uma vantagem de sobrevivência (Zulfiqar, Jurivich, *et al.* 2010). Além disso, a descendência de centenários parecem ter um retardamento cronológico no aparecimento de doenças metabólicas (Rozing, Westendorp, *et al.* 2010), evidenciando que a longevidade humana é determinada em parte por fatores genéticos e pela sua interação com fatores ambientais. É plausível que os hábitos sedentários e o excesso de aporte energético desempenhem um papel determinante no dismetabolismo e consequentemente na longevidade.

Assim, a tríade disfunção parassimpática, dismetabolismo e envelhecimento deverá ser alvo de estudos mais detalhados. No seu conjunto as nossas observações antecipam a hipótese que a preservação da função parasimpática terá um impacto sobre a homeostasia da glucose, com implicações na longevidade saudável.

### > HIPÓTESE HEPATOCÊNTRICA – ESTEATOSE HEPÁTICA E DISMETABOLISMO

O armazenamento de energia é primordial nos processos de sobrevivência de organismos complexos e os triglicérides (TGs) detêm um papel fundamental na satisfação das necessidades e das biodisponibilidades energéticas. O fígado desenvolveu a capacidade de acumular TGs particularmente em regimes hipercalóricos. O fígado gordo não alcoólico (NAFLD), definido como uma acumulação superior a 5% do teor de gordura dos hepatócitos, é uma condição assintomática cuja incidência tem aumentado dramaticamente na obesidade e na diabetes tornando-se na patologia hepática mais prevalente dos países desenvolvidos. Estima-se que esta patologia atinge 23% dos indivíduos ocidentais aparentemente saudáveis (Blachier, Leleu, *et al.* 2013), refletindo o impacto epidemiológico de dietas hipercalóricas que provocam um desequilíbrio gerado pela excessiva quantidade de TGs absorvidos, sintetizados *de novo* e armazenados, que se opõe à incapacidade da sua re-

moção pelo fígado com indesejáveis repercussões fisiológicas.

Em vários estudos têm-se observado uma forte associação entre NAFLD e dismetabolismo o que constitui um risco acrescido de desenvolver DM 2. Estudos que abordem a prevalência de NAFLD em Portugal são exíguos. A prevalência de NAFLD foi avaliada no contexto de um estudo de prevalência de diabetes (PREVADIAB2), numa *cohort* de 1200 indivíduos que tinham sido identificados como não diabéticos no estudo PREVADIAB1 que decorreu 5 anos antes. Nestes indivíduos observou-se a presença de diabetes *de novo* em 9,6% da população. Adicionalmente, 20% dos indivíduos apresentaram hiperglicemia intermédia dos quais 4% em jejum (IFG), 13% com intolerância à glucose (IGT) ou 3% com ambas (IFG+IGT). Nesta população a prevalência de NAFLD avaliada pelo índice de fígado gordo (FLI) foi identificada em 66% da população diabética e em cerca de metade dos indivíduos com hiperglicemia intermédia (47.0% em IFG+IGT, 47.6% em IFG, e 44.1% em IGT). Surpreendentemente 28,9% da população aparentemente saudável e sem distúrbios da glicemia apresentou um valor de FLI indicador de NAFLD. Os valores de FLI e hiperglicemia intermédia mostraram estar correlacionados sendo esta correlação mais marcada na intolerância à glucose ( $r=0,543$ ). Observou-se ainda uma forte correlação entre os valores de FLI e resistência hepática à insulina ( $r=0,631$ ). Os resultados do estudo PREVADIAB estão assim em concordância com outros resultados que revelam uma estreita relação entre NAFLD e dismetabolismo e sugerem que a NAFLD é um fator de risco na progressão para a diabetes, com grande incidência nas populações mais idosas (Hallsworth, Fattakhova, *et al.* 2011; Gariani, Philippe, *et al.* 2013).

Estas observações têm suscitado o interesse de vários investigadores que têm abordado a temática do NAFLD e do seu impacto nas doenças metabólicas. A acumulação de TGs no fígado até um certo nível, *per se*, parece não ter um papel potencialmente ativo no processo, no entanto o efeito global do aumento sistémico de TGs está associado ao desenvolvimento de resistência à insulina (Neuschwander-Tetri. 2010). A lipogénese *de novo*, fortemente estimulada pelo excesso de consumo de carboidratos na dieta, começa a emergir como um aspecto determinante no NAFLD consequente à glico-lipotoxicidade e está relacionada com um aumento de resistência à insulina não só hepática mas também em outros órgãos. Está descrito que fisiologicamente a lipogénese *de novo* contribui em cerca de 10% para a síntese de TGs no entanto em indivíduos com NAFLD este valor aproxima-se dos 25% (Donnelly, Smith, *et al.* 2005). Há

dois fatores de transcrição *major* envolvidos na lipogénese, a proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (ChREBP) e a proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP), ambos reguladores de genes de enzimas lipogénicas. A possibilidade de reduzir estes fatores de transcrição terá definitivamente impacto no NAFLD. Esse é o caso do enzima ROCK1 hepática (*Rho-associated coiled-coil-containing kinase*), cuja deficiência genética no fígado confere proteção tanto para NAFLD (por diminuir a lipogénese de novo, o SREBP, assim como a expressão dos genes lipogénicos) como para a sensibilidade à insulina (Lima, Macedo e Kim resultados não publicados). Este estudo mostra também que a metformina, fármaco de primeira linha em diabetes, diminui a expressão, e a atividade da ROCK1 hepática e reduz o NAFLD em ratinhos submetidos a uma dieta rica em gordura.

A inflamação é outra condicionante da progressão da NAFLD e do seu impacto no metabolismo tanto hepático como no metabolismo geral. Os processos inflamatórios associados ao NAFLD são complexos e ainda está por compreender a base molecular da comunicação entre as células parenquimatosas e as células do sistema inato imunitário do fígado que está subjacente ao desenvolvimento da NAFLD (Ganz and Szabo. 2013). A recente descoberta dos receptores Toll-like e NOD-like parecem oferecer hipóteses explicativas de ligação da resposta inflamatória à patogénese da NAFLD bem como a possibilidade de novas abordagens terapêuticas. Presentemente os pontos mais controversos radicam em dois aspectos; como é que os fatores lipogénicos e inflamatórios afetam o metabolismo não só lipídico mas também glicídico conduzindo à progressão para a hiperglicemia intermédia e posteriormente para a diabetes; e porque é que alguns indivíduos com NAFLD permanecem neste estadio e outros progridem para estadios de fibrose hepática (NASH) e eventualmente cancro hepático.

## > CONCLUSÕES

A Diabetes *Mellitus* tipo 2 enquanto doença crónica epidémica é uma patologia multifatorial de etio-patogénese complexa e heterogénea e que é acompanhada por múltiplas comorbidades. Ganha progressivamente mais apoio a noção de que a etiologia do dismetabolismo nas pessoas com hiperglicemia intermédia e com alterações da glicemia em jejum é díspar das que apresentam intolerância à glucose. Neste patamar de heterogeneidade etio-patogénica, assume particular importância a predisposição genética para a diabetes ou

para as comorbidades associadas e a sua interação com o estilo de vida, onde o exercício físico é um fator determinante na interação entre a nutrição e a genética. O fígado parece pois posicionar-se como o órgão central na patogénese do dismetabolismo independentemente da disfunção primordial residir em alterações da secreção de insulina pela célula beta ou da resistência à insulina. Neste contexto um fígado afetado conduzirá necessariamente a alterações metabólicas como no caso do NAFLD. A compreensão de todas estas variáveis são relevantes para uma abordagem terapêutica mais personalizada com requisitos clínicos específicos, tendo o objectivo final de não só prevenir a patologia mas também criar novas estratégias interventivas ao nível da população em geral tendo em vista a promoção da vida saudável. Estas estratégias terão particular importância nos estratos mais idosos de modo a diminuir o impacto sócio-económico, e a fragilização da sua saúde. <

## BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Hay SO, Kang D, McBride M, Li L, Zhao J, Leissring MA. Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance. *PLoS One*. 2011; 6(6): e20818.
- Afonso RA, Fernandes AB, Santos C, Ligeiro D, Ribeiro RT, Lima IS, et al. Postprandial insulin resistance in Zucker diabetic fatty rats is associated with parasympathetic-nitric oxide axis deficiencies. *J Neuroendocrinol*. 2012; 24(10): 1346-55.
- 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 (Silver Spring)*. 2007; 15(2): 314-21.
- Ahren B, Larsson H. Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations. *Diabetologia*. 2001; 44(11): 1998-2003.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013; 58(3): 593-608.
- Ceriello A. Does postprandial blood glucose matter and why? *Endocrinol Nutr*. 2009; 56 Suppl 4: 8-11.
- Ceriello A. Point: postprandial glucose levels are a clinically important treatment target. *Diabetes Care*. 2010; 33(8): 1905-7.
- Cordes CM, Bennett RG, Siford GL, Hamel FG. Nitric oxide inhibits insulin-degrading enzyme activity and function through S-nitrosylation. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77(6): 1064-73.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005; 115(5): 1343-51.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*. 1998; 19(5): 608-24.
- Erdmann J, Mayr M, Ooppel U, Sypchenko O, Wagenpfeil S, Schusdziarra V. Weight-dependent differential contribution of insulin secretion and clearance to hyperinsulinemia of obesity. *Regul Pept*. 2009; 152(1-3): 1-7.
- Fernandes AB, Patarrão RS, Videira PA, Macedo MP. Understanding postprandial glucose clearance by peripheral organs: the role of the hepatic parasympathetic system. *J Neuroendocrinol*. 2011; 23(12): 1288-95.
- Filippi BM, Bassiri A, Abraham MA, Duca FA, Yue JT, Lam TK. Insulin signals through the dorsal vagal complex to regulate energy balance. *Diabetes*. 2014; 63(3): 892-9.
- Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int*. 2013; 7(Suppl 2): 771-81.
- Gardete Correia L, Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Massano Cardoso S, Dores J, Sequeira Duarte J, et al. (2013). Diabetes: Factos e Números 2013. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes 11/2013, Sociedade Portuguesa de Diabetologia.
- Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med*. 2010; 27(8): 879-81.
- Gariani K, Philippe J, Jornayvaz FR. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside. *Diabetes Metab*. 2013; 39(1): 16-26.
- Greenfield JR, Campbell LV. Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? *Curr Pharm Des*. 2008; 14(18): 1815-20.
- Grongnet JF, David JC. Reciprocal variations of nNOS and HSP90 are associated with fasting in gastrointestinal tract of the piglet. *Dig Dis Sci*. 2003; 48(2): 365-72.
- 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.
- 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.
- Guarino MP, Macedo MP. Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(8): 959-65.
- Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its me-

- diators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut*. 2011; 60(9): 1278-83.
- Hamel FG. Preliminary report: inhibition of cellular proteasome activity by free fatty acids. *Metabolism*. 2009; 58(8): 1047-9.
  - Hennes MM, Dua A, Kissebah AH. Effects of free fatty acids and glucose on splanchnic insulin dynamics. *Diabetes*. 1997; 46(1): 57-62.
  - International Diabetes, F. (2013). *IDF Diabetes Atlas*. Belgium: International Diabetes Federation. 6th edition.
  - Jones CN, Abbasi F, Carantoni M, Polonsky KS, Reaven GM. Roles of insulin resistance and obesity in regulation of plasma insulin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 278(3): E501-8.
  - Kalsbeek A, Bruinstroop E, Yi CX, Klieverik LP, La Fleur SE, Fliers E. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1212: 114-29.
  - 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.
  - Kim SH, Abbasi F, Chu JW, McLaughlin TL, Lamendola C, Polonsky KS, et al. Rosiglitazone reduces glucose-stimulated insulin secretion rate and increases insulin clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. 2005; 54(8): 2447-52.
  - Lang G, Goldstein MS, Levine R. Influence of the liver on uptake of glucose by extrahepatic tissues. *Am J Physiol*. 1954; 177(3): 447-50.
  - Lutt WW. Hepatic parasympathetic neuropathy as cause of maturity-onset diabetes? *Gen Pharmacol*. 1980; 11(4): 343-5.
  - Lutt WW. A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci*. 2004; 95(1): 9-17.
  - 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.
  - Lee J, Cummings BP, Martin E, Sharp JW, Graham JL, Stanhope KL, et al. Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 302(6): R657-66.
  - Lee KC, Miller RE. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinology*. 1985; 117(1): 307-14.
  - Macedo MP, Lima IS, Gaspar JM, Afonso RA, Patarrão RS, Kim YB, et al. Risk of postprandial insulin resistance: the liver/vagus rapport. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014; 15(1): 67-77.
  - Mertz W, Schwarz. An effect of liver extracts on glucose tolerance in rats. *Am J Physiol*. 1962; 203: 53-6.
  - Natali A, Ribeiro R, Baldi S, Tulipani A, Rossi M, Venturi E, et al. Systemic inhibition of nitric oxide synthesis in non-diabetic individuals produces a significant deterioration in glucose tolerance by increasing insulin clearance and inhibiting insulin secretion. *Diabetologia*. 2013; 56(5): 1183-91.
  - Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010; 52(2): 774-88.
  - Patarrão RS, Lutt WW, Afonso RA, Ribeiro RT, Fernandes AB, Boavida JM, et al. Postprandial but not fasting insulin resistance is an early identifier of dysmetabolism in overweight subjects. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90(7): 923-31.
  - Patarrão RS, Lutt WW, Afonso RA, Ribeiro RT, Guarino MP, Fernandes AB, et al. Meal-induced insulin sensitization and its parasympathetic regulation in humans. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008; 86(12): 880-8.
  - Petersen KF, Tygstrup N. A liver factor increasing glucose uptake in rat hindquarters. *J Hepatol*. 1994; 20(4): 461-5.
  - Pivovarova O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia*. 2009; 52(8): 1656-64.
  - Pivovarova O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AF, Rudovich N. The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009; 25(2): 156-62.
  - Poy MN, Yang Y, Rezaei K, Fernström MA, Lee AD, Kido Y, et al. CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet*. 2002; 30(3): 270-6.
  - Ribeiro RT, Afonso RA, Guarino MP, Macedo MP. Loss of postprandial insulin sensitization during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63(6): 560-5.
  - Ribeiro RT, Afonso RA, Macedo MP. Hepatic parasympathetic role in insulin resistance on an animal model of hypertension. *Metabolism*. 2007; 56(2): 227-33.
  - 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): 976-83.
  - Rozing MP, Westendorp RG, de Craen AJ, Frölich M, de Goeij MC, Heijmans BT, et al; Leiden Longevity Study Group. Favorable glucose tolerance and lower prevalence of metabolic syndrome in offspring without diabetes mellitus of nonagenarian siblings: the Leiden longevity study. *J Am Geriatr Soc*. 2010; 58(3): 564-9.
  - Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, et al. Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of

- type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87(11): 1145-51.
- Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2004; 53(9): 2359-65.
  - Sadri P, Lutt WW. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol*. 1999; 277(1 Pt 1): G101-8.
  - Sadri P, Reid MA, Afonso RA, Schafer J, Legare DJ, Paula Macedo M, et al. Meal-induced insulin sensitization in conscious and anaesthetized rat models comparing liquid mixed meal with glucose and sucrose. *Br J Nutr*. 2006; 95(2): 288-95.
  - Selz R, Theintz G, Tappy L, Schneiter P. Evaluation of hepatic and whole body glycogen metabolism in humans during repeated administrations of small loads of <sup>13</sup>C glucose. *Diabetes Metab*. 2003; 29(6): 643-9.
  - Shimazu T, Matsushita H, Ishikawa K. Cholinergic stimulation of the rat hypothalamus: effects of liver glycogen synthesis. *Science*. 1976; 194(4264): 535-6.
  - Soriquer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55(1): 88-93.
  - Takayama S, Sakura H, Katsumori K, Wasada T, Iwamoto Y. A possible involvement of parasympathetic neuropathy on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(5): 968-9.
  - 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.
  - Teff KL. Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008; 32(5): 569-71.
  - Ting JW, Lutt WW. The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity. *Pharmacol Ther*. 2006; 111(2): 346-73.
  - Uyama N, Geerts A, Reynaert H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 280(1): 808-20.
  - Wu JS, Yang YC, Lin TS, Huang YH, Chen JJ, Lu FH, et al. Epidemiological evidence of altered cardiac autonomic function in subjects with impaired glucose tolerance but not isolated impaired fasting glucose. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(10): 3885-9.
  - Xie H, Lutt WW. Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J Auton Pharmacol*. 1995; 15(5): 361-9.
  - 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.
  - Zhang Q, Yu J, Liu B, Lv Z, Xia T, Xiao F, et al. Central activating transcription factor 4 (ATF4) regulates hepatic insulin resistance in mice via S6K1 signaling and the vagus nerve. *Diabetes*. 2013; 62(7): 2230-9.
  - Zulfiqar U, Jurivich DA, Gao W, Singer DH. Relation of high heart rate variability to healthy longevity. *Am J Cardiol*. 2010; 105(8): 1181-5.