

**ASSOCIAÇÃO ENTRE INSULINO RESISTÊNCIA E  
PARAMETROS HEMATOLÓGICOS EM ADULTOS JOVENS:  
ANÁLISE TRANSVERSAL E LONGITUDINAL**

DANIELA PATRÍCIA SOARES FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

SAÚDE PÚBLICA

Orientadora: Professora Doutora Elisabete Ramos,  
Professora Agregada na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Porto, 2015**



Dissertação realizada com base no projeto *EPITeen*, desenvolvido no Departamento de Epidemiologia Clínica, Medicina Preditiva e Saúde Pública da Faculdade de Medicina do Porto e no Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto.

Trabalho efectuado com base em projetos financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (POCTI/SAU-ESP/62399/2004 e PTDC/SAU-EPI/115254/2009).

Esta dissertação teve por base o manuscrito apresentado na secção de resultados. Para a sua elaboração fui responsável pela análise dos dados e pela redacção da versão inicial.



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Elisabete Ramos, pelo apoio, incentivo e amizade que generosamente me dispensou, pelos ensinamentos que me transmitiu e confiança que em mim depositou no decorrer deste trabalho.

Ao meu filho Gonçalo, pelo amor incondicional e pelo amável e incansável apoio a “pintar” e arrumar artigos.

Aos meus Pais, a quem tudo devo, pelo seu exemplo e incondicional incentivo e apoio, sem o qual não seria possível ter chegado até aqui.

A todos os colegas do Departamento de Epidemiologia Clínica, Medicina Preditiva e Saúde Pública da Faculdade de Medicina e do Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto que contribuíram para a minha formação e crescimento profissional, em particular, à Joana, à Maria, à Sofia e à Luísa pela amizade e apoio, que em muito contribuiu para que concluísse com maior ânimo e motivação esta etapa.

Aos meus colegas de mestrado, em particular à Catarina Guedes, Ana Duarte e Ana Abreu, pela amizade e pela partilha de conhecimentos e experiências ao longo destes dois anos.

A todos os meus amigos, em especial para à Raquel Vilaça, Joana Amaro, Sandra Carvalho, José Campos, Hugo Sousa e Inês Paulo pelo incondicional incentivo e amizade em todas as fases menos boas.



## Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>9</b>
1.Insulino Resistência .....	11
2.Insulino Resistência e Risco Cardiovascular .....	16
3.Efeito da Insulino Resistência na Produção de Células Vermelhas.....	18
<b>Objetivo</b> .....	<b>21</b>
<b>Referências</b> .....	<b>25</b>
<b>Manuscrito</b> .....	<b>31</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>55</b>



## **Lista de abreviaturas**

---



**AGL** = ácidos Gordos Livres

**AKT** = produto do akt proto-oncogene

**CDC** = Centros de Controle e prevenção de Doenças

**DCV** = doenças cardiovasculares

**GAP** = proteína ativadora de guanosina-trifosfato

**GLUT- 4** = transportador de glicose tipo 4

**GRB2** = proteína 2 ligada ao recetor de fator de crescimento

**GSK3** =glicogênio sintase quinase 3

**IGF-1** = fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo-1

**IL-1 $\beta$**  = interleucina- 1 beta

**IL-6** = interleucina- 6

**IRS** = substrato recetor da insulina

**LDL** = lipoproteínas de baixa densidade

**MAPK** = proteína quinase ativada por mitógeno

**PDK** = proteína quinase dependente fosfatidilinositol

**PEPCK** = fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**PI 3-K** = fosfatidilinositol 3 quinase

**PKC** = proteína quinase

**PPAR  $\gamma$ 2** = *peroxisoma proliferator activated receptor – gamma 2*

**SOS** = proteína *son of sevenless*

**Shc** = proteína semelhante ao colagénio com homologia src

**TNF- $\alpha$**  = fator de necrose tumoral alfa



## **Resumo**

---



**Introdução:** A insulino resistência é um estado caracterizado por uma resposta deficitária das células-alvo aos níveis normais de insulina circulante e que obriga ao aumento da produção de insulina – hiperinsulinismo compensatório. Este estado observa-se com frequência em indivíduos obesos e é reconhecido como um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Este hiperinsulinismo compensatório condiciona efeitos nos múltiplos mecanismos nos quais a insulina está envolvida, nomeadamente os efeitos no crescimento e proliferação das células progenitoras eritróides. Vários factores relacionados com as células vermelhas, incluindo os níveis de hematócrito e hemoglobina, condicionam o aumento da viscosidade sanguínea aumentando o risco de doença cardiovascular. A associação entre resistência à insulina e o aumento das células vermelhas, foi já descrita em adultos, mas pouco se sabe sobre esta associação na fase de transição da infância para a idade adulta.

**Objectivo:** Este trabalho teve como objectivo avaliar a relação entre insulino resistência e parâmetros hematológicos, principalmente glóbulos vermelhos e hematócrito, em adultos jovens, através de uma abordagem transversal e longitudinal.

**Métodos:** Os participantes incluídos na análise, são membros da coorte *Epidemiological Health Investigation of Teenagers in Porto (EPITeen)*, que inclui adolescentes nascidos em 1990 e matriculados em escolas públicas e privadas da cidade do Porto. Os adolescentes foram avaliados aos 13, aos 17 e aos 21 anos. Os dados foram recolhidos por questionários auto-administrados, foram realizadas medições antropométricas e a recolha de uma amostra de sangue em jejum, por uma equipa treinada. A resistência à insulina foi avaliada pelo modelo de avaliação da Homeostase (HOMA-IR). Para a análise transversal foram incluídos 1671 participantes, que consentiram fazer a colheita de sangue em jejum aos 21 anos e para a avaliação longitudinal os 535 participantes avaliados em jejum nos três momentos. Foram obtidos coeficientes regressão linear ( $\beta$ ) e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) para quantificar as associações entre os parâmetros hematológicos e o HOMA-IR. Foram identificadas as trajectórias de evolução dos valores de insulina e glicose dos 13 para os 21 anos. As trajectórias usando *Model-Based Clustering*.

**Resultados:** Após ajuste para o índice de massa corporal, nível de educação dos pais e nível de actividade física do participante, foram encontradas associações positivas significativas [ $\beta$  (IC 95%)], em ambos os sexos, entre HOMA-IR e contagem de células vermelhas [0,051 (0,030, 0,072) em mulheres e 0,022 (0,000, 0,043) em homens] e hematócrito [0,277 (0,107, 0,446) em mulheres e 0,216 (0,048, 0,384) em homens]. Nas mulheres, níveis mais elevados de HOMA-IR, foram inversamente associado, com o volume globular médio [-0,389 (-0,690, -0,088)] e os níveis de ferro [-4,423 (-7,362, -1,485)]. Ainda nas mulheres foi encontrada uma associação positiva entre o HOMA-IR e a contagem de células brancas [0,308 (0,185, 0,430)] e de plaquetas [7,622 (3,886, 11,358)]. Nos homens, níveis mais elevados de HOMA-IR, foram significativamente associados, com níveis mais elevados de hemoglobina [0,094 (0,028, 0,161)]. Na análise longitudinal, a trajectória que representa os participantes com valores tendencialmente mais baixos de insulina e glicose, apresentou valores mais baixos de hematócrito, volume globular médio e hemoglobina, embora estatisticamente significativo apenas em homens aos 21 anos.

**Conclusão:** Este estudo permitiu concluir que, em adultos jovens e saudáveis, menor sensibilidade à insulina se associa a valores mais elevados de células vermelhas e hematócrito, sendo o efeito mais forte nos indivíduos do sexo masculino.

**Palavras-chave:** insulino resistência; células vermelhas; hematócrito; adultos jovens

**Abstract**

---



**Introduction:** The association between insulin resistance and hematological parameters has been described in adults, but little is known regarding the transition from childhood to adulthood. We aimed to quantify the relationship between insulin resistance and hematologic parameters, mainly red blood cells (RBC) and hematocrit level, in young adults, using a cross-sectional and longitudinal approach.

**Methods:** Participants were part of the EPITeen cohort, which baseline evaluation was performed during 2003-04 school year and includes adolescents born in 1990, who were attending public and private schools in Porto, Portugal. Data was collected using standardized questionnaires and a fasting blood sample was obtained. Insulin resistance was evaluated by the homeostatic model assessment (HOMA-IR). For the cross-sectional analysis we included 1671 participants who provided a fasting blood sample at 21-year-old. For the longitudinal analysis, we considered participants who provided a fasting blood sample at the three study waves (13, 17 and 21 years of age, n=535). Multivariate linear regression coefficients ( $\beta$ ) and 95% CI were performed to quantify the association between HOMA-IR and hematological parameters at 21y. For the longitudinal analyses, trajectories for insulin and glucose were estimated using Model-Based Clustering, and means of hematological parameters at 21y were according trajectories were compared by ANOVA.

**Results:** In both sexes, at 21y, after adjustment for Body Mass Index, parent education and leisure-time activity, positive associations [ $\beta$  (95%CI)] were found between HOMA-IR and red blood count (RBC) [0.05 (0.03, 0.07) in women; 0.02 (0.00, 0.04) in men]; and haematocrit [0.28 (0.11, 0.45) in women; 0.22 (0.05, 0.38) in men]. In women, HOMA-IR was inversely associated with packed cell volume (PCV) [-0.39 (-0.69, -0.09)] and iron [-4.42 (-7.36, -1.48)]; but positively associated with white blood cells [0.31 (0.19, 0.43)] and platelets [7.62 (3.89, 11.36)]. In men, higher levels of HOMA-IR were associated with higher levels of haemoglobin [0.09 (0.03, 0.16)]. Regarding the longitudinal approach, the trajectory with tendentially lower levels of insulin and glucose ("Both Lower") presented lower levels of haematocrit, PVC and haemoglobin, although it only reaches statistical significance in males and at 21y.

**Conclusion:** In young adults lower insulin sensibility was associated with increased RBC count and hematocrit. This effect is stronger in the cross-sectional analysis at 21 years old, and more pronounced in males.

**Keywords:** insulin resistance; red blood cells; hematocrit; young adults

## **Introdução**

---



## 1. Insulino Resistência

A insulina, produzida pelas células  $\beta$  pancreáticas tem como acção primária a regulação da homeostase da glicose através da promoção da captação de glicose no músculo e tecido adiposo e da síntese de glicogénio no fígado (1). A insulino resistência define uma diminuição da sensibilidade normal ou capacidade de resposta da insulina nos tecidos-alvo, diminuindo a taxa de eliminação de glicose do sangue (2). Para garantir a homeostase da glicemia normalmente é desencadeado um hiperinsulinismo compensatório, podendo levar à sobre expressão de acções em tecidos que mantêm a sensibilidade normal ou minimamente diminuída à insulina (3).

A resistência à acção normal da insulina desempenha um importante papel na fisiopatologia da diabetes *Mellitus* tipo 2 e está estreitamente associada a diversas patologias que apresentam elevadas prevalências, representando grandes desafios para a saúde pública, incluindo obesidade, hipertensão, doença arterial coronária, dislipidemias, e um conjunto de anormalidades metabólicas e cardiovasculares que definem a síndrome metabólica (4, 5).

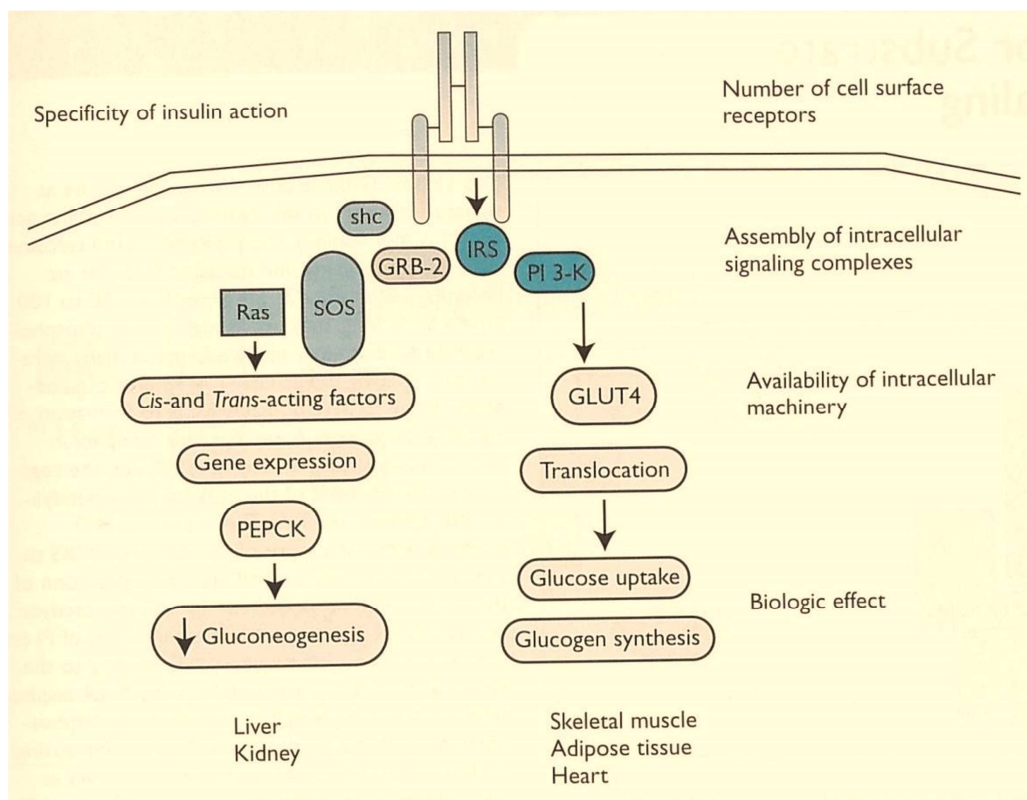
A obesidade representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da insulino resistência (6). Assim, é esperado um aumento do impacto da insulino resistência na morbidade e mortalidade em consequência do aumento da prevalência da obesidade verificada nas últimas décadas (7). Esta situação não está circunscrita às faixas etárias com maior incidência de doença, mas é também uma realidade nos adultos jovens, adolescentes e crianças.

O aumento da prevalência de obesidade infantil a um ritmo alarmante é um dos desafios mais relevantes para a saúde pública no século XXI. Nas últimas duas décadas, a prevalência de obesidade duplicou nas crianças e triplicou nos adolescentes (8). Globalmente, em 2013, o número de crianças com menos de cinco anos de idade que apresentavam excesso de peso, foi estimado em mais de 42 milhões (9). De acordo com a tendência das últimas duas décadas, prevê-se que em 2020 existam 60 milhões de crianças obesas ou com excesso de peso (10). Portugal não é excepção neste cenário, a prevalência da obesidade na infância e adolescência é das mais elevadas da Europa (11). Com base nos critérios do centros de controlo e prevenção

de doenças (CDC), a prevalência de excesso de peso e obesidade nestas faixas etárias é superior a 30% (12).

Sabe-se que diferentes tecidos têm diferentes mecanismos de resposta à insulina. A sensibilidade destes à ação da insulina está correlacionada com os níveis de receptores de insulina expressos na membrana plasmática. No entanto, tornou-se evidente que a ligação dos diferentes componentes da via de sinalização de insulina é também responsável por conferir especificidade de sinalização da insulina sobre as células-alvo (13).

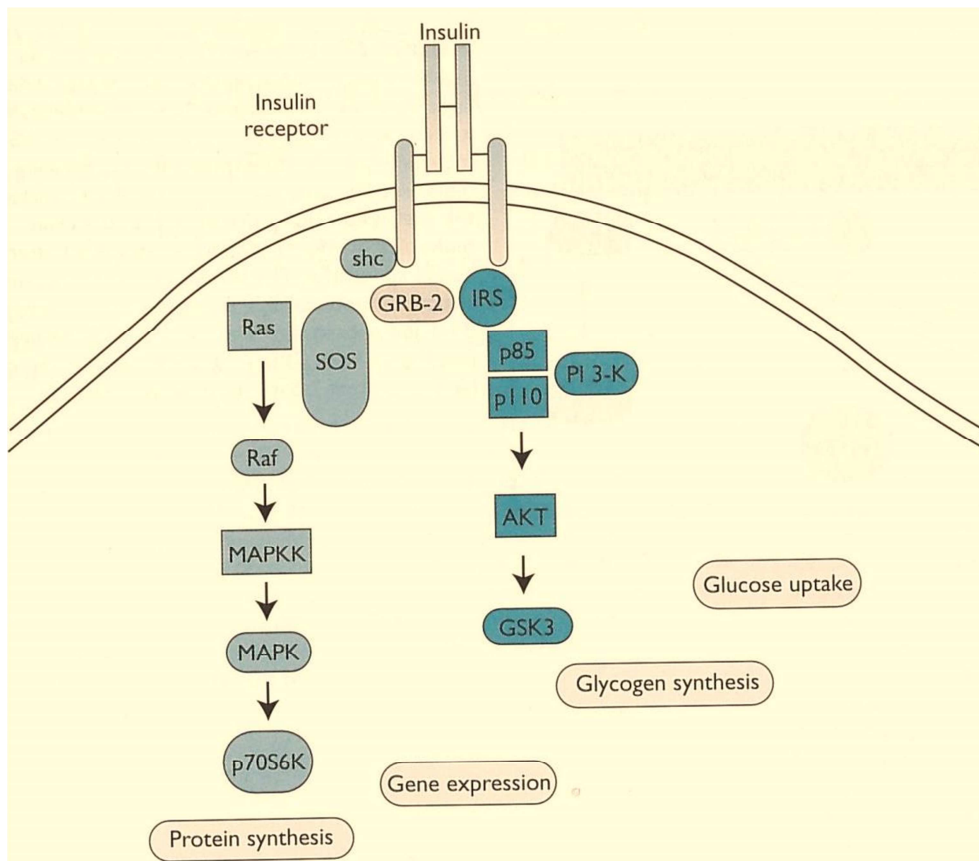
Assim, o transporte de glicose insulino-dependente encontra-se restrito a células de músculo-esquelético e tecido adiposo, uma vez que estas células possuem o transportador de glicose insulino-dependente tipo 4 (GLUT-4) (Fig.1). Da mesma forma o efeito de inibição da insulina sobre a glicogénese é específico do fígado e do rim. Em contraste o efeito sobre o transporte de iões, a síntese de ADN e a síntese de proteínas parece ser ubíquo (14).



**Figura 1: Efeitos específicos tecidulares da insulina (14).** GLUT- 4 – Transportador de glicose tipo 4; GRB-2 – Proteína 2 ligada a recetor de fator de crescimento; IRS- substrato recetor da insulina; PEPCCK- fosfoenolpiruvato carboxiquinase; PI 3-K – fosfatidilinositol 3 Kinase; Shc – proteína semelhante ao colagénio com homologia src; SOS – proteína son of sevenless

A diversidade da ação da insulina nos diferentes tecidos é em parte explicada pelas diferentes vias de sinalização activadas por esta (15). Existem duas vias principais que propagam o sinal gerado através do recetor de insulina: a via do substrato do recetor de insulina (IRS)/fosfatidilinositol 3 Kinase (PI 3-K), e a via Ras/proteína Kinase ativa por mitógeno (MAPK) (13, 16).

A via IRS/PI 3-k ativa a PI 3-fostato e a consequente ocorre a ativação das quinases dependentes de fosfoinositídeos como PDK1, PDK2 e PKC. Algumas destas quinases podem ser necessárias para ativar quinases a jusante, tais como a AKT quinase serina/treonina. Pensa-se ainda que a AKT possa fosforilar e inativar directamente a quinase glicogénio sintase 3(GSK3), conduzindo assim à desfosforilação e ativação de glicogénio sintase (GS), aumentando a síntese de glicogénio (Figura 2).



**Figura 2: Ativação das vias de sinalização intracelular mediadas pela insulina (14).** AKT – produto do akt proto-oncogene; GAP – Proteína ativadora de guanosina-trifosfato; GLUT4 – Transportador de glicose tipo 4; GRB2 – Proteína 2 ligada a recetor de fator de crescimento; GSK3– glicogénio sintase quinase 3 ; MAPK – proteína kinase ativada por mitógeno; PDK –proteína quinase dependente fosfatidilinositol; PKC – proteína quinase; SOS – proteína son of sevenless

Há evidência que relaciona a AKT à translocação dos transportadores de glicose. A Ras/MAPK pode ser ativada pela insulina através da formação de complexos de troca entre o factor SOS e GRB-2. GRB-2 pode ser ativo por IRS e/ou Shc, que são substratos directos do recetor de insulina quinase. Assim, efeitos metabólicos agudos da insulina requerem ativação do IRS/PI 3-K, enquanto que a Ras/MAPK pode desempenhar o seu papel apenas em alguns tecidos, estimulando os efeitos de proliferação e crescimento da insulina (14).

Apesar de não estar completamente compreendido como se desenvolve a insulino resistência, é conhecido que está relacionada com a interação de fatores genéticos e ambientais. As vias melhor conhecidas e mais aceites são: diminuição da atividade da cinase a nível do recetor da insulina, com eventuais mutações do gene; mutações/modificações de pós-translação do recetor da insulina ou das suas moléculas efetoras; defeitos na ligação insulina-recetor ou a nível do pós-recetor; aumento da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e translocação dos GLUT-4 (17-19).

Os trabalhos realizados têm incidido ainda no estudo de genes que quando mutados condicionam defeitos nos órgão alvo da insulina, sendo exemplo os que se relacionam com sintomas lipoatróficos parciais ou generalizados. São exemplos de genes em investigação da Seipina, das Lamininas nucleares A/C e do *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma 2* (PPAR  $\gamma$ 2) (20-22).

As alterações metabólicas associadas com a obesidade desempenham um papel relevante no desencadeamento da resistência à insulina (23). Estudos mostraram que aproximadamente 50% da variação da sensibilidade à insulina em crianças e adolescentes pode ser explicada pela adiposidade total, e que esta condição está associada a alterações que representam um aumento do risco para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos na maturidade (24, 25). Esta associação pode ser explicada pelo aumento dos ácidos gordos livres (AGL) em circulação, inibindo a secreção de insulina pela célula pancreática e limitando a captação de glicose induzida pela insulina, provavelmente por competição dos substratos – ciclo de Rendle e aumento da gliconeogénese- ciclo de Cori (26). O aumento de AGL, induz ainda um estado de stress oxidativo, um mecanismo importante no desencadeamento da disfunção endotelial e consequente aterosclerose (27). Estes mecanismos podem conduzir a um círculo de disfunção

uma vez que o desenvolvimento de insulino resistência induz a limitação na lipogénese com consequente aumento dos AGL circulantes desencadeando um círculo contínuo de alterações metabólicas (28).

O tecido adiposo desempenha também um papel crítico na regulação do metabolismo glicose/insulina, apresentando capacidade secretora de substâncias com efeitos biológicos importantes com ação, tanto local (efeitos parácrinos) como sistémica (efeitos endócrinos), nomeadamente pela produção de adipocinas, tais como: o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6), a adiponectina, a leptina, a visfatina, vaspina e a omentina (29).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que diminui a resposta à insulina através da diminuição da expressão à superfície celular dos transportadores de glicose (GLUT-4), fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e fosforilação específica do receptor da insulina(29). A IL-6 é uma citocina imuno-moduladora que desempenha um papel importante no metabolismo dos lípidos e da glicose, por inibição da lipoproteína lipase, indução da lipólise e aumento da captação de glicose. Os seus níveis estão aumentados na obesidade e diminuem com a perda de peso (29, 30). A adiponectina é a adipocina produzida em maior quantidade e tem um importante efeito sensibilizador da insulina promovendo a diminuição da produção e inibição da acção do TNF- $\alpha$  e da IL-6 (31, 32). A expressão da adiponectina é também regulada pelo TNF- $\alpha$  e pela IL-6 (33).

A vaspina tem efeitos semelhantes à adiponectina na sensibilidade à insulina ao suprimir a produção de TNF- $\alpha$ , leptina e resistina. A visfatina tem uma acção insulino-mimética, através da ligação e activação do receptor da insulina. A omentina melhora o uptake de glicose estimulado pela insulina e a fosforilação de Akt, aumentando a sensibilidade à insulina. Os níveis destas três adipocitoquinas correlacionam-se inversamente com a obesidade e com a insulino resistência, e positivamente com os níveis de adiponectina (33, 34).

A leptina é regulada pelas alterações induzidas pela insulina no adipócito e os seus níveis correlacionam-se com o volume total de tecido adiposo (35). Tal como a adiponectina, promove uma maior sensibilidade à insulina por activação da MAPK, o que resulta numa redução da lipogénese associada a um aumento da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos. O facto dos

níveis desta adipocina estarem aumentados na obesidade sem um aumento proporcional da sua resposta nos órgão-alvo, sugere que a obesidade se associa a uma leptino-resistência (30). A inflamação crónica sistémica associada à obesidade parece também desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resistência à da insulina. A libertação de adipocitoquinas quer por parte dos adipócitos, quer pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo, leva a um estado crónico sub-inflamatório que desempenha um papel central no desenvolvimento de resistência à insulina (36). O aumento da libertação das citoquinas inflamatórias, IL-6, TNF- $\alpha$  e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e possivelmente outras citoquinas e factores segregados pelos macrófagos, exerce efeitos parácrinos envolvidos na ativação das vias inflamatórias nas células alvo da insulina, para além de contribuírem para a manutenção do estado de insulino resistência, aumentando o risco de doença cardiovascular (37).

Assim, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de insulino resistência contribuem para relações recíprocas entre resistência à insulina, inflamação e disfunção endotelial que fomentam o agrupamento de doenças metabólicas e cardiovasculares em indivíduos com resistentes à insulina (38).

## **2. Insulino Resistência e Risco Cardiovascular**

O aumento da incidência das doenças cardiovasculares (DCV), que estão intimamente associadas à transformação epidemiológica, determinada pela industrialização e pelas alterações do estilo de vida, permanecem como sendo a principal causa de morte e invalidez em todo o mundo (39). Neste contexto, a insulino resistência, apresenta uma enorme relevância pelo seu papel na patogénese da diabetes tipo 2 e também por ser considerada um denominador comum a outros factores de risco cardiovascular, nomeadamente os componentes da síndrome metabólica (6, 40, 41).

A par de alterações já descritas, novas vias de atuação vieram sustentar o papel da insulino resistência como factor de risco independente para o desenvolvimento de DCV, reconhecendo que esta resistência e a consequente hiperinsulinemia se associam à aterosclerose precoce,

disfunção endotelial, inflamação sistêmica e fibrinólise desordenada (42, 43). Um desses potenciais mecanismos poderá ser a proliferação celular. A insulina é um potente fator de crescimento, cujos efeitos são mediados pela via da MAPK. O comprometimento da sinalização da insulina, em indivíduos insulino resistentes, aumenta a expressão da MAPK promovendo a proliferação das células do músculo liso vascular, o aumento da formação de colagénio e a produção de fatores de crescimento (44).

A insulina desempenha ainda, um papel importante na ativação da síntese do óxido nítrico, um potente vasodilatador e agente anti-aterogénico, por ativação da via PI3K. Assim, em indivíduos com insulino resistência, a produção de óxido nítrico está diminuída. (45). A redução da produção de óxido nítrico aumenta a susceptibilidade das células do músculo liso vascular aos efeitos dos fatores de crescimento semelhantes à insulina Tipo-1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas e factor de crescimento epidérmico e angiotensina II (44).

O desencadeamento de fatores inflamatórios e de crescimento desencadeiam ações importantes em todos os elementos celulares do sangue, incluindo as células vermelhas, as brancas e as plaquetas (46).

O aumento das células brancas foi já consistentemente demonstrado como um fator de risco cardiovascular promovendo a aterosclerose por: mecanismos que medeiam a inflamação; ação proteolítica e oxidativa nas células endoteliais e por induzir a hipercoagulabilidade e o comprometimento da microcirculação (47). O papel do aumento das plaquetas na patogénese da doença coronária é principalmente explicado por: aumento da agregação plaquetária e consequente resistência ao óxido nítrico; promoção da aderência dos neutrófilos e monócitos à membrana sub-endotelial; aumento da sintetização de IL-1 $\beta$  e expressão da P-seletina, que promovem a inflamação, aterogénese e trombose; alterações oxidativas nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), contribuindo para a proliferação de células do músculo liso (46).

Menos estudado está o potencial efeito nas células vermelhas, apesar de haver estudos que mostram que os mecanismos envolvidos na insulino resistência desempenham funções biológicas e fisiológicas importantes no aumento das células vermelhas(48-50).

### 3. Efeito da Insulino Resistência na Produção de Células Vermelhas

Os eritrócitos são as células circulantes mais abundantes, representando 40% a 45% do volume total de sangue (51). Em humanos, a semi-vida do eritrócito é de aproximadamente 120 dias (52). As células hematopoiéticas são formadas continuamente a partir de uma pequena população de células estaminais pluripotentes. A primeira etapa de diferenciação e proliferação das células progenitoras inicia-se na fase mais imatura dos progenitores eritróides, a unidade formadora de colônias eritróides – burst (BFU-E), que se diferencia numa unidade formadora de colônias eritróides (CFU-E). A segunda etapa de diferenciação eritróide compreende a passagem de pró-eritroblastos até eritroblastos basófilos, passando a eritroblastos ortocromáticos e por fim a policromáticos e a terceira fase consiste na maturação dos reticulócitos em eritrócitos (53)

A proliferação e diferenciação normal das células progenitoras eritróides requerem vários nutrientes, tais como ferro, ácido fólico e vitamina B12, a interação com as células do estroma medular e a estimulação pela eritropoietina (EPO). Este processo é ainda condicionado por vários fatores de crescimento e citocinas que afetam o crescimento, diferenciação e sobrevivência (54) e que parecem justificar a relação com o estado de insulino resistência.

Um dos possíveis mecanismos que explicam a associação entre a insulino resistência e o aumento do hematócrito é o efeito das citocinas IL-6, uma vez que estas citoquinas estimulam o crescimento das BFU-E (55).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), insulina, IGF-I e IGF-II - cuja atividade efetiva é aumentada no âmbito da insulino resistência estimulam a proliferação tardia das BFU-E e das CFU-E (56, 57). Os recetores da insulina e dos IGF-I são estruturalmente homólogos, podendo desencadear uma ação sinérgica com a da eritropoietina (57, 58). Inicialmente, embora se pensasse que para a proliferação da CFU-E era indispensável à presença da eritropoietina e que o papel da insulina e IGF-1 era apenas sinérgico, foi possível verificar que a insulina e a IGF-1 favorecem a proliferação eritrocitária mesmo sem a presença de eritropoietina (59, 60). No entanto, o efeito estimulante da insulina sobre a formação de colônias eritróides só é observado em concentrações supra-fisiológicas da hormona (61).

Além disso, o aumento da insulina e do IGF-1 parecem ser, pelo menos parcialmente, responsáveis por estimular a atividade do fator de transcrição e do fator de indução da hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). O HIF-1 $\alpha$  fisiologicamente ativo tanto por hipoxia como por deficiência de ferro, promove a síntese de eritropoietina e pode também mediar a absorção intestinal de ferro, fatores que promovem a formação de eritrócitos (62).

Além dos estudos *in vitro* que suportam que o aumento da concentração de insulina estimula a produção de eritrócitos, o aumento dos parâmetros hematológicos observado em recém nascidos de mães diabéticas, nomeadamente, a policitemia do recém-nascido, apoiam a relação entre a insulino resistência e a eritropoiese, *in vivo* (63).

Vários fatores relacionados com o aumento das células vermelhas, incluindo os níveis de hematócrito, hemoglobina e volume globular médio, estão associados com o aumento da viscosidade do sangue e a resistência periférica ao fluxo sanguíneo (64). O aumento destas células no sangue que promove ainda o aumento da libertação de difosfato de adenosina, intervindo no aumento da agregação plaquetária, potenciando o efeito da viscosidade e aumentando a probabilidade de formação de trombos (65) e a formação de placas de ateroma nas artérias coronárias (66). Níveis de hemoglobina mais elevados estão ainda associados com o aumento do colesterol sérico e dos níveis de triglicédeos (67), bem como de efeitos de vasoconstrição, atribuíveis à elevada reatividade da hemoglobina com o óxido nítrico, inativando-o (68).

Há ainda que ter em consideração a possibilidade de se estabelecer um círculo que potencia o desequilíbrio destes mecanismos. A insulino resistência pode estimular a proliferação celular, nomeadamente a proliferação de células sanguíneas, mas o aumento da viscosidade e da aterosclerose resultante deste processo promove a própria insulino resistência limitando a entrega de glicose, insulina e oxigénio nos tecidos metabolicamente ativos (69).

Apesar do suporte teórico e dos estudos *in vitro* já existente, os dados de base populacional são insuficientes realçando a importância de mais estudos para esclarecer a associação entre insulino resistência e a proliferação de células sanguíneas, particularmente em indivíduos com valores de insulina e glicose dentro do limiar da normalidade.

Embora ainda não esteja totalmente esclarecido se valores de hematócrito nos limites da normalidade induzem aumento do risco de doença cardiovascular (70), os dados existentes e o conhecimento de que a policitemia aumenta o risco destes eventos (71) suportam a necessidade de aumentar o conhecimento nesta área. O aumento da prevalência de excesso de peso e da adoção de estilos de vida menos saudáveis, quer na infância quer na adolescência, faz prever um aumento relevante do número de indivíduos com insulino resistência, mesmo entre os adultos jovens. Este contexto reforça a necessidade de mais estudos que ajudem a esclarecer a associação entre a insulino resistência e o aumento dos fatores relacionados com as células vermelhas, não só em situações de patologia já estabelecida, mas preferencialmente antes da ocorrência de eventos clínicos.

## **Objetivo**

---



Este estudo foi desenvolvido no âmbito da coorte EPITeen. O estudo EPITeen é uma coorte de base populacional, na qual são acompanhados, desde os 13 anos de idade, 2942 adolescentes nascidos em 1990 e que estudaram em escolas públicas e privadas do Porto.

O objetivo geral do trabalho foi avaliar o efeito da insulino resistência em parâmetros hematológicos de adultos jovens. Para responder a esse objetivo foram desenhados dois objetivos específicos:

- 1- Usando uma abordagem transversal, quantificar a associação entre a insulino resistência, avaliada por HOMA-IR, e parâmetros hematológicos, nomeadamente a contagem e volume das células vermelhas e hematócrito, aos 21 anos.
- 2- Longitudinal, estimar a evolução da insulino resistência através de trajetórias de insulina e glicose dos 13 até aos 21 anos de idade, e avaliar a associação entre as trajetórias e os parâmetros hematológicos aos 21 anos de idade



## **Referências**

---



1. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 2000;43(7):821-35.
2. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S135-48.
3. Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1813-22.
4. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care*. 1991;14(3):173-94.
5. Petersen KF, Dufour S, Savage DB, Bilz S, Solomon G, Yonemitsu S, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12587-94.
6. McLaughlin T, Allison G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven G. Prevalence of insulin resistance and associated cardiovascular disease risk factors among normal weight, overweight, and obese individuals. *Metabolism: clinical and experimental*. 2004;53(4):495-9.
7. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81.
8. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *Jama*. 2002;288(14):1728-32.
9. World Health Organization. *Global Strategy on Diet, Physical Activity & Health - Childhood overweight and obesity*. Switzerland, Geneva 2014.
10. de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010.
11. World Health Organization-Regional office for Europe. *WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative. Implementation of round 1 (2007/2008) and round 2 (2009/2010)*. 2014.
12. Cattaneo A, Monasta L, Stamatakis E, Lioret S, Castetbon K, Frenken F, et al. Overweight and obesity in infants and pre-school children in the European Union: a review of existing data. *Obesity Reviews*. 2010;11(5):389-98.
13. Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cellular signalling*. 1999;11(8):563-74.
14. Kahn CR. *Atlas of diabetes* London: Science Press Limited; 2000.
15. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(2):165-9.
16. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(3):311-20.
17. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):718-27.
18. Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Herreros M, Pena FJ, Garcia-Marin LJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2005;129(3):283-9.
19. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(2):171-6.
20. Monteiro M. Causas genéticas In: GEIR-Grupo de Estudo de Insulino-Resistência da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo, editor. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Porto2009.
21. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ : a versatile metabolic regulator. *Annals of Medicine*. 1999;31(5):342-51.

22. Magre J, Delepine M, Van Maldergem L, Robert JJ, Maassen JA, Meier M, et al. Prevalence of mutations in AGPAT2 among human lipodystrophies. *Diabetes*. 2003;52(6):1573-8.
23. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007;21(12):1443-55.
24. Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes care*. 2006;29(11):2427-32.
25. Romualdo MCdS, de Nóbrega FJ, Escrivão MAMS. Insulin resistance in obese children and adolescents. *Jornal de Pediatria*. 2014;90(6):600-7.
26. Martins M. Etiologia da Insulino-Resistencia/Hiperinsulinismo. In: GEIR-Grupo de Estudo de Insulino-Resistência da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo, editor. Hospital Curry Cabral 2009.
27. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4673-6.
28. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-9.
29. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
30. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2005;96(9):939-49.
31. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes care*. 2003;26(8):2442-50.
32. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115(5):911-9.
33. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772-83.
34. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*. 2008;14(11-12):741-51.
35. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(5):911-9; quiz 20.
36. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism*. 2008;34(1):2-11.
37. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010;72:219-46.
38. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888-904.
39. World Health Organization. The top 10 causes of death Geneva 2014.
40. Reaven GM. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *The Medical clinics of North America*. 2011;95(5):875-92.
41. Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva medica*. 2005;47(4):201-10.
42. Balkau B, Eschwege E. Insulin resistance: an independent risk factor for cardiovascular disease? *Diabetes, obesity & metabolism*. 1999;1 Suppl 1:S23-31.
43. Taegtmeier H. Insulin Resistance and Atherosclerosis: Common Roots for Two Common Diseases? *Circulation*. 1996;93(10):1777-9.
44. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. *The Claude Bernard Lecture 2009. Diabetologia*. 2010;53(7):1270-87.
45. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(3):685-711, ix-x.

46. Madjid M, Fatemi O. Components of the Complete Blood Count as Risk Predictors for Coronary Heart Disease: In-Depth Review and Update. *Texas Heart Institute Journal*. 2013;40(1):17-29.
47. Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(10):1945-56.
48. Chen LK, Lin MH, Chen ZJ, Hwang SJ, Chiou ST. Association of insulin resistance and hematologic parameters: study of a middle-aged and elderly Chinese population in Taiwan. *J Chin Med Assoc*. 2006;69(6):248-53.
49. Choi KM, Lee J, Kim YH, Kim KB, Kim DL, Kim SG, et al. Relation between insulin resistance and hematological parameters in elderly Koreans-Southwest Seoul (SWS) Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003;60(3):205-12.
50. Ellinger VC, Carlini LT, Moreira RO, Meirelles RM. Relation between insulin resistance and hematological parameters in a Brazilian sample. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50(1):114-7.
51. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information (NCBI), editor. (US):  
; 2005.
52. Hattangadi SM, Wong P, Zhang LB, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 2011;118(24):6258-68.
53. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(37):4617-26.
54. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*. 2006;354(19):2034-45.
55. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications 2011 2011-12-08 00:00:00. 6258-68 p.
56. Miyagawa S, Kobayashi M, Konishi N, Sato T, Ueda K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Brit J Haematol*. 2000;109(3):555-62.
57. Akahane K, Tojo A, Urabe A, Takaku F. Pure erythropoietic colony and burst formations in serum-free culture and their enhancement by insulin-like growth factor I. *Experimental hematology*. 1987;15(7):797-802.
58. Merchav S, Silvian-Drachler I, Tatarsky I, Lake M, Skottner A. Comparative studies of the erythroid-potentiating effects of biosynthetic human insulin-like growth factors-I and -II. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74(2):447-52.
59. Kurtz A, Jelkmann W, Bauer C. A new candidate for the regulation of erythropoiesis: Insulin-like growth factor I. *FEBS Letters*. 1982;149(1):105-8.
60. Aoki I, Taniyama M, Toyama K, Homori M, Ishikawa K. Stimulatory effect of human insulin on erythroid progenitors (CFU-E and BFU-E) in human CD34+ separated bone marrow cells and the relationship between insulin and erythropoietin. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 1994;12(3):329-38.
61. Kurtz A, Jelkmann W, Bauer C. Insulin stimulates erythroid colony formation independently of erythropoietin. *Br J Haematol*. 1983;53(2):311-6.
62. McCarty MF. Hyperinsulinemia may boost both hematocrit and iron absorption by up-regulating activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Medical hypotheses*. 2003;61(5-6):567-73.
63. Perrine SP, Greene MF, Lee PD, Cohen RA, Faller DV. Insulin stimulates cord blood erythroid progenitor growth: evidence for an aetiological role in neonatal polycythaemia. *Br J Haematol*. 1986;64(3):503-11.

64. Pop G, Duncker D, Gardien M, Vranckx P, Versluis S, Hasan D, et al. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Netherlands Heart Journal*. 2002;10(12):512-6.
65. Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SB. The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol*. 1961;7:42-50.
66. Pasterkamp G, Virmani R. The erythrocyte: a new player in atheromatous core formation. *Heart*. 2002;88(2):115-6.
67. Elwood PC, Mahler R, Sweetnam P, Moore F, Welsby E. ASSOCIATION BETWEEN CIRCULATING HÆMOGLOBIN LEVEL, SERUM-CHOLESTEROL, AND BLOOD-PRESSURE. *The Lancet*. 295(7647):589-91.
68. Sakai H, Okuda N, Takeoka S, Tsuchida E. Increased viscosity of hemoglobin-based oxygen carriers retards NO-binding when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Microvascular research*. 2011;81(2):169-76.
69. Tamariz LJ, Young JH, Pankow JS, Yeh H-C, Schmidt MI, Astor B, et al. Blood Viscosity and Hematocrit as Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American journal of epidemiology*. 2008;168(10):1153-60.
70. Puddu PE, Lanti M, Menotti A, Mancini M, Zanchetti A, Cirillo M, et al. Red blood cell count in short-term prediction of cardiovascular disease incidence in the Gubbio population study. *Acta cardiologica*. 2002;57(3):177-85.
71. Michiels JJ. Erythromelalgia and vascular complications in polycythemia vera. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1997;23(5):441-54.

**Manuscrito**

---

**Association between insulin resistance and hematological parameters  
in young adults: A cross sectional and longitudinal approach**



## Abstract

**Introduction:** The association between insulin resistance and hematological parameters has been described in adults, but little is known regarding the transition from childhood to adulthood. We aimed to quantify the relationship between insulin resistance and hematologic parameters, mainly red blood cells (RBC) and hematocrit level, in young adults, using a cross-sectional and longitudinal approach.

**Methods:** Participants were part of the EPITeen cohort, which baseline evaluation was performed during 2003-04 school year and includes adolescents born in 1990, who were attending public and private schools in Porto, Portugal. Data was collected using standardized questionnaires and a fasting blood sample was obtained. Insulin resistance was evaluated by the homeostatic model assessment (HOMA-IR). For the cross-sectional analysis we included 1671 participants who provided a fasting blood sample at 21-year-old. For the longitudinal analysis, we considered participants who provided a fasting blood sample at the three study waves (13, 17 and 21 years of age, n=535). Multivariate linear regression coefficients ( $\beta$ ) and 95% CI were performed to quantify the association between HOMA-IR and hematological parameters at 21y. For the longitudinal analyses, trajectories for insulin and glucose were estimated separately by sex, using Model-Based Clustering, and means of hematological parameters at 21y were according trajectories were compared by ANOVA.

**Results:** In both sexes, at 21y, after adjustment for Body Mass Index, parent education and leisure-time activity, positive associations [ $\beta$  (95%CI)] were found between HOMA-IR and red blood count (RBC) [0.05 (0.03, 0.07) in women and 0.02 (0.00, 0.04) in men]; and haematocrit [0.28 (0.11, 0.45) in women and 0.22 (0.05, 0.38)] in men. In women, HOMA-IR was inversely associated with packed cell volume (PCV) [-0.39 (-0.69, -0.09)] and iron levels [-4.42 (-7.36, -1.48)]; but positively associated with white blood cells (WBC) [0.31 (0.19, 0.430)] and platelets [7.620 (3.89, 11.36)]. In men, higher levels of HOMA-IR were significantly associated with higher levels of haemoglobin [0.09 (0.03, 0.16)]. Regarding the longitudinal approach, the trajectory with tendentially low levels of insulin and glucose (“Both Lower”) presented lower

levels of haematocrit, PVC and haemoglobin, although it only reaches statistical significance in males and at 21y.

**Conclusion:** In young adults lower insulin sensibility was associated with increased RBC count and hematocrit. This effect is stronger in the cross-sectional analysis at 21 years old, and more pronounced in males.

## Introduction

Insulin resistance (IR) is essentially characterized by the diminished uptake and utilization of glucose by the target cells, resulting in an increased insulin production via compensatory secretion, leading to a state of chronic hyperinsulinemia (1). Many clinical and epidemiologic studies have showed that IR and iatrogenic hyperinsulinemia itself has emerged as an important risk factor for a large set of metabolic abnormalities and diseases, and as an independent predictor of cardiovascular disease (CVD) (2, 3).

IR is associated to a cluster of metabolic and cardiovascular alterations (diabetes, hypertension, obesity and dyslipidemia) that, besides being components of metabolic syndrome, are independent risk factors for CVD, per se (4). IR is also associated with chronic inflammation, promotes the proliferation of vascular smooth muscle cells, the increase of collagen formation rate and excessive production of growth factors, which contribute to the fast progression of atherosclerosis (5, 6).

Moreover, it has been demonstrated that hyperinsulinemia might begin important physiological and biological functions in erythropoiesis, *in vitro* (7, 8). The growth-promoting effect of insulin and IGF-I in late stage of erythroid differentiation and in proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow suggest that insulin acts as a co-factor in erythropoiesis, independently of erythropoietin (9, 10). Additionally, some cytokines such as cytokines IL-6, which are increased in a stage of insulin resistance, can boost the growth of primitive erythroid burst-forming units (BFU-E) (11). These effects could lead to an increase of red blood cell (RBC) and hematocrit level, and represent an alternative path to explain the association between IR and CVD by an increase in whole-blood viscosity (12, 13).

The association between IR and hematological parameters alterations has been studied in adults and elderly (14, 15), but little is known about this association in the transition from childhood to adulthood (16). In young individuals an emerging prevalence of IR has been observed, likely driven by the increasing prevalence of obesity (17, 18). The study of the effects of IR in early life stages, before clinical onset of disease, might be important to better understand the mechanisms underlying CVD.

We aimed to explore the effect of insulin resistance on hematologic parameters, mainly RBC and hematocrit level, in young adults, using both a cross-sectional and longitudinal approach.

## **Methods**

### Participants

The study was developed as part of the *Epidemiological Health Investigation of Teenagers in Porto (EPITeen)*, a population-based cohort that recruited 13-year-old adolescents born in 1990 and enrolled at public and private schools of Porto, Portugal, during 2003-2004, as previously described(19). The second evaluation took place in 2007-2008 and a third evaluation in 2011-2013.

In the first and second study waves, participants were evaluated at schools, the information was collected through self-administered questionnaires. In the third study wave, participants were invited to complete the evaluation at our University department for face-to-face interviews, anthropometrical and blood sample measurements, and self-administered questionnaires. All procedures were similar in the three waves, performed by a team of trained health professionals, included anthropometrical measurements, and collection of a fasting blood sample.

At the recruitment, 2159 adolescents agreed to participate and provided information for at least part of the planned assessment, resulting in a participation of 77.5%. In the second wave, we were able to reevaluate 1716 participants (79.5%) and a new group of 783 adolescents was integrated in the cohort as they moved to the schools' catchment area, who was evaluated for the first time. In the third study wave, 1764 (60% of the total cohort) participants were reevaluated.

To answer the first objective of the present study we considered all participants who provided a fasting blood sample in the third wave (n=1691), after excluding 20 participants for whom it was not possible to assess some of the parameters in study. Thus, the final sample comprised 1671 participants. We compared socio-demographic characteristics between included

(n=1671) with the remaining participants of the cohort (n=1271) and no statistical differences were found. For the longitudinal analysis, we considered the 559 participants, who provided a fasting blood sample at the three study waves and we included only participants with complete data on haematological parameters (n=535).

#### Blood sample and measurements

A venous blood sample was drawn after a 12-hour overnight fast. All the samples were analyzed at the central laboratory of the university hospital. Red blood cells (RBC) count, white blood cells (WBC) count, platelets, hemoglobin concentration and packed cell volume (PCV) were done using a haematology autoanalyzer (*Sysmex® XE-2100*). Serum glucose, cholesterol and triglycerides were determined using automatic standard routine enzymatic methods. High-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was determined after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins. Serum insulin was measured using a <sup>125</sup>I-labelled insulin radioimmunoassay method and iron was analyzed by colorimetric method (*Olympus AU2700, Melville, NY*). High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels were determined by the CardioPhase® high sensitivity CRP (hsCRP) method (Dimension Vista ®System, Marburg, Germany).

The degree of insulin resistance was calculated according to the homeostatic model assessment (HOMA-IR), as the product of fasting glucose (mmol/L) and insulin (μUI/mL) divided by the constant 22.5 (20). Participants were considered having insulin resistance if HOMA-IR were higher than 2.6 (21).

#### Assessment of other covariables

Anthropometric measures were obtained while subjects stood barefoot in light indoor clothing. Weight was measured to the nearest tenth of a kilogram (Tanita Corporation, Tokyo, Japan), and height was measured in centimetres to the nearest tenth. BMI was calculated as weight (in kilograms) divided by squared height (in meters).

Education level was measured as the number of successfully completed years of formal schooling. Parental education level was measured as the number of successfully completed years of formal schooling and it was considered the information from the parent with the higher educational level. The self-perception of their social class was evaluated using a question with five categories of answer (lower, lower middle, upper middle, upper, and does not know/answer). The categories upper middle and upper were combined for the analysis.

Family history of a medical diagnosis of diabetes, dyslipidaemia and hypertension was asked separately to the mother and the father. For each of these conditions, we calculated the variable family history combining information of both mother and father, classified as: positive, when at least one of the adolescent's parents had the diagnosis; negative, when both parents reported no diagnosis; or non-classifiable, when the available information showed no diagnosis for one of the parents, but the other did not answer.

Participants were classified according to self-perception of leisure-time activities according to four subjective intensity categories (mainly sitting, mainly standing, active or very active). For the present analysis the categories "Active" and "Very active" were combined.

Participants were considered 'current smokers' if they smoke daily, 'occasional smokers' if they smoke less than once a day, 'former smokers or experienced only' if had stopped smoking or experienced at least once; 'non-smokers' if they never smoke. Regarding alcohol intake, participants were categorized as 'frequent drinkers' if they drink daily or at least once a week; 'occasional drinkers' if they drink less than once a week and 'non-drinkers' if they did not consume any type of alcoholic beverages.

#### Ethical considerations

The Ethic Committee of Hospital S. João approved this project and appropriate standard procedures were developed to guarantee data confidentiality and protection. Parents and adolescents received written and oral information explaining the purpose and design of the study and written informed consent was obtained from both.

### Statistical Analysis

All analyses were stratified by sex. The distribution of quantitative variables was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Data with symmetric distribution were presented as mean (SD) or median (25th percentile, 75th percentile) according to their distribution, and were compared using the One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis test, respectively. Categorical items were described as counts and proportions and compared using the chi-square test or Fisher's exact test, whenever appropriate.

Sex-specific multivariate linear regression coefficients ( $\beta$ ) and respective 95% confidence intervals (95% CI) were performed to evaluate associations between HOMA-IR and each of the haematological parameters (RBC, Haematocrit, MCV, Hb, Platelet and WBC) and iron levels. Three adjusted models were performed: model 1 adjusted only for BMI; model 2 included BMI and parental education level; model 3 included variables from model 2 plus participant's physical activity.

Trajectories for insulin and glucose at 13y, 17y and 21y used as outcome variables was obtained using model based clustering using a Gaussian mixture model.

In this study, the number of trajectories and the Gaussian mixture model was defined according to the Bayesian information criterion (BIC). The model and number of trajectories with lower BIC was chose as the best model.

To estimate the trajectories of insulin and glucose the R language and software environment for statistical computation (version 2.12.1, R Foundation for Statistic Computing, Austria, 2010) was used. The other analyses were conducted using SPSS 19.0 software (SPSS INC. 2011, Chicago, IL, USA). The significance level was considered at 0.05.

## Results

At 21 years of age HOMA-IR ranged from 0.42 to 4.22 in women, and from 0.09 to 5.24 in men. The prevalence of insulin resistance (HOMA-IR>2.6) was 14.7% in women and 10.5% in men. Table 1 presents socio-demographic, behavioural and health-related characteristics of our sample by HOMA-IR quartiles. In both sexes, a higher proportion of obese and overweight was found in the highest levels of HOMA-IR. Those with highest levels of HOMA-IR also presented a higher proportion of less educated parents, positive parental history of disease (HTA, diabetes and dyslipidaemia) and former smokers/experienced. However, these differences reached statistical significance only in males.

As expected, the levels of insulin and glucose were higher in the 4<sup>th</sup> quartile of HOMA-IR. The levels of triglycerides and total cholesterol increased with a higher degree of insulin resistance, in both sexes. This trend was also found for levels of LDL cholesterol and hs-CRP, but only in females (table 2).

Table 3 shows hematological parameters and iron levels according to quartiles of HOMA-IR. In both sexes, levels of RBC and haematocrit increased with increasing levels of HOMA-IR. In females, we additionally found increasing levels of platelet and WBC but decreasing levels of iron. In males, Hb increased with increasing levels of IR.

Table 4 presents the sex-specific crude and adjusted association between levels of HOMA-IR and each of the haematological parameters and iron levels. After adjustment for BMI, parent education and leisure-time activity level, in both sexes, significant positive associations were found between HOMA-IR and RBC [ $\beta=0.051$ , (95%CI 0.030, 0.072) in women and  $\beta=0.022$ , (95%CI 0.000, 0.043) in men], and haematocrit [ $\beta=0.277$ , (95%CI 0.107, 0.446) in women and  $\beta=0.216$ , (95% 0.048, 0.384) in men]. In women higher levels of HOMA-IR were also positively associated with WBC ( $\beta=0.308$ , 95%CI 0.185, 0.430) and platelets ( $\beta=7.622$ , 95%CI 3.886, 11.358); but inversely associated with PCV ( $\beta=-0.389$ , 95%CI -0.690, -0.088) and iron levels ( $\beta=-4.423$ , 95%CI -7.362, -1.485). In men, besides RBC and HCT, higher levels of HOMA-IR were significantly associated with higher levels of haemoglobin ( $\beta=0.094$ , 95%CI 0.028, 0.161).

Using glucose and insulin values measured at 13y, 17y and 21y we found 3 trajectories: 'Higher Insulin' which grouped participants with tendentially high levels of insulin and with levels of glucose within mean levels of the sample (n=90 for women and n=36 for men); 'Higher Glucose' included participants with tendentially high levels of glucose and with levels of insulin within mean levels of the sample (n=87 for women and n=107 for men). The trajectory, named 'Both Lower', grouped together participants with tendentially low levels of insulin and glucose (n=82 for women and n=94 for men). Thirty nine participants were excluded as they were classified in a very small and undefined trajectory.

Hematologic parameters at 13, 17 and 21 years of age were compared across trajectories for insulin and glucose (table 5). In both sexes, as expected, the levels of HOMA-IR were significantly higher in trajectory 'Higher Insulin' and lower in those classified in 'Both Lower'. In general, no differences were found in haematological parameters according to the trajectory. However, men in the 'Both Lower' trajectory tended to present lower levels of HCT, PVC and haemoglobin, but only at 21y the difference reached statistical significance.

## **Discussion**

In this population-based sample of young adults, we found evidence that insulin resistance is positive associated with RBC counts and haematocrit, which is in accordance with previous studies among elderly (22, 23) and other cross sectional studies (15, 24, 25). To the best of our knowledge, the present study was the first one evaluating this effect, focusing early adulthood. In our multivariate analysis, HOMA-IR was significantly associated with RBC and haematocrit, in both sexes, independently of BMI, parent education and leisure-time activity level. Previous evidence *in vitro* and *in vivo* supports that hyperinsulinemia might exert its effects in erythropoiesis through different mechanisms. Insulin and its analogues, such as insulin-like growth factor (IGF), may have a synergistic effect together with erythropoietin on stimulating the proliferation of the erythroid colonies (9, 10). Furthermore, the presence of the insulin receptor (INS-R) in human erythropoietic cells at different stages of development, suggests

that human insulin acts as a co-factor in erythropoiesis, independently of erythropoietin (26). Also, hyperinsulinemia has been associated with increased levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  promotes the synthesis of proteins, including vascular endothelial growth factor and erythropoietin (27, 28). The *in vivo* relation between hyperinsulinemia and haematological parameters has also been reported in adults and elderly (15, 22, 23). Moreover, the observation that polycythaemia is often identified in newborn babies of diabetic mothers, also supports a cause effect relation between hyperinsulinemia and erythropoiesis *in vivo* (29, 30).

In women insulin resistance was inversely associated with iron levels and PCV. This could be the result of irregular menstrual cycle associated with insulin resistance. In adolescent females with insulin resistance, increase in circulating insulin levels results in an increase of functional androgens and higher circulating estrogen levels (31). Chronic increase levels of these hormones can lead to endometrial overgrowth and irregular menstrual cycle together with heavy bleeding. Frequent and/or heavy bleeding usually leads to iron deficiency, anaemia and fatigue (32). This hypothesis also supports that the effect found for RBC components was stronger in males.

Overall, in the longitudinal analysis, we did not find significant differences in haematological parameters across trajectories of insulin and glucose. One possible explanation may be an adaptation process among those with chronic high levels of insulin and glucose, within normal range, resulting in no alteration of haematological parameters. Also, we cannot exclude the hypothesis that the absence of statistical effect reflects the insufficient exposure, because even those in the trajectories with the worse profiles presented values of insulin and glucose considered healthy. Thus, the result among males showing lower levels of haematocrit, PVC and haemoglobin among those in the trajectory 'Both Lower' may represent an earlier effect.

It is important to highlight that our results derived from a healthy population with a prevalence of IR lower than 12%. Nevertheless, a chronic exposure to normal levels of HOMA-IR, influences the increase of these components in young adults. Nowadays, this is particular important within a context of increasing obesity in children and young adults, promoting the incidence of insulin resistance early in life (17, 18).

We also found, in women, higher levels of platelets and WBC among those with higher levels of HOMA-IR. One possible explanation for these alterations could be supported by the inflammatory stage unleashed by the insulin resistance mechanisms, which can also be observed by the higher levels of hs-CRP found in the HOMA-IR upper quartile, in women. This chronic inflammatory exposure may promote a higher concentration of inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6, unleashed by inflammatory features of insulin resistance (33). Also, the low levels of iron could justify the higher levels of platelet (34).

These results are of great importance since it is known that moderately increased levels of haematocrit, WBC and RBC count, may contribute to the increased cardiovascular mortality (35). Higher levels of these parameters increase blood viscosity and peripheral resistance to blood flow, resulting in rheological alteration and impaired tissue blood flow, which may reduce the rate of glucose delivery to skeletal muscle, and further contributing to IR (36, 37). Taking into account this process it is possible that a vicious cycle mutually enhances insulin resistance and hematological parameters. As blood viscosity has been shown previously as an independent factor for cardiovascular disease (38) it may be important to monitor the levels of haematological parameters since early ages.

Our study has some limitations. As our main findings were obtained from a cross-sectional analysis, we could not infer the direction of causality between insulin resistance and hematologic parameters. However, the results from the longitudinal analysis support our hypothesis. Nevertheless, we need to recognize that the longitudinal analysis was performed only in a subsample, which results in a loss of statistical power. In women, we do not evaluate gynecological issues to better understand the effect of insulin resistance on iron levels, haemoglobin and PCV.

Some strengths of this study can be also described. Our sample is from a population-based cohort which allows us to have quality and reliable data on participants' characteristics, levels of insulin resistance, haematological parameters and other co-variables associated.

In conclusion our results support that insulin resistance was associated with increased RBC count and hematocrit in young adults. This effect is stronger in the cross-sectional analysis and more pronounced in males.

## References

1. Cersosimo E, Triplitt C, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
2. Lakka H, Lakka TA, Tuomilehto J, Sivenius J, Salonen JT. Hyperinsulinemia and the risk of cardiovascular death and acute coronary and cerebrovascular events in men: The kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Archives of Internal Medicine*. 2000;160(8):1160-8.
3. Ruige JB, Assendelft WJ, Dekker JM, Kostense PJ, Heine RJ, Bouter LM. Insulin and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Circulation*. 1998;97(10):996-1001.
4. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*. 1992;41(6):715-22.
5. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*. 2014;2014.
6. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
7. BERSCH N, GROOPMAN JE, GOLDE DW. Natural and Biosynthetic Insulin Stimulates the Growth of Human Erythroid Progenitors in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1982;55(6):1209-11.
8. Ratajczak J, Zhang Q, Pertusini E, Wojczyk BS, Wasik MA, Ratajczak MZ. The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors. *Leukemia*. 1998;12(3):371-81.
9. Miyagawa S, Kobayashi M, Konishi N, Sato T, Ueda K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br J Haematol*. 2000;109(3):555-62.
10. Aoki I, Taniyama M, Toyama K, Homori M, Ishikawa K. Stimulatory effect of human insulin on erythroid progenitors (CFU-E and BFU-E) in human CD34+ separated bone marrow cells and the relationship between insulin and erythropoietin. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 1994;12(3):329-38.
11. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-85.
12. Jin YZ, Zheng DH, Duan ZY, Lin YZ, Zhang XY, Wang JR, et al. Relationship Between Hematocrit Level and Cardiovascular Risk Factors in a Community-Based Population. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2015;29(4):289-93.
13. Danesh J, Collins R, Peto R, Lowe GD. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2000;21(7):515-20.

14. Nebeck K, Gelaye B, Lemma S, Berhane Y, Bekele T, Khali A, et al. Hematological parameters and metabolic syndrome: findings from an occupational cohort in Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr*. 2012;6(1):22-7.
15. Chen LK, Lin MH, Chen ZJ, Hwang SJ, Chiou ST. Association of insulin resistance and hematologic parameters: study of a middle-aged and elderly Chinese population in Taiwan. *J Chin Med Assoc*. 2006;69(6):248-53.
16. Ellinger VC, Carlini LT, Moreira RO, Meirelles RM. Relation between insulin resistance and hematological parameters in a Brazilian sample. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50(1):114-7.
17. Romualdo MCdS, de Nóbrega FJ, Escrivão MAMS. Insulin resistance in obese children and adolescents. *Jornal de Pediatria*. 2014;90(6):600-7.
18. Steinberger J, Daniels SR, American Heart Association Atherosclerosis H, Obesity in the Young C, American Heart Association Diabetes C. Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation*. 2003;107(10):1448-53.
19. Ramos E, Barros H. Family and school determinants of overweight in 13-year-old Portuguese adolescents. *Acta Paediatr*. 2007;96(2):281-6.
20. Kurtoglu S, Hatipoglu N, Mazicioglu M, Kendirici M, Keskin M, Kondolot M. Insulin resistance in obese children and adolescents: HOMA-IR cut-off levels in the prepubertal and pubertal periods. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2010;2(3):100-6.
21. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care*. 2003;26(12):3320-5.
22. Barbieri M, Ragno E, Benvenuti E, Zito GA, Corsi A, Ferrucci L, et al. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. *Diabetologia*. 2001;44(10):1232-7.
23. Choi KM, Lee J, Kim YH, Kim KB, Kim DL, Kim SG, et al. Relation between insulin resistance and hematological parameters in elderly Koreans-Southwest Seoul (SWS) Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003;60(3):205-12.
24. Mardi T, Toker S, Melamed S, Shirom A, Zeltser D, Shapira I, et al. Increased erythropoiesis and subclinical inflammation as part of the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;69(3):249-55.
25. Hanley AJ, Retnakaran R, Qi Y, Gerstein HC, Perkins B, Raboud J, et al. Association of hematological parameters with insulin resistance and beta-cell dysfunction in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(10):3824-32.
26. Kurtz A, Jelkmann W, Bauer C. A new candidate for the regulation of erythropoiesis. Insulin-like growth factor I. *FEBS Lett*. 1982;149(1):105-8.
27. Wang GL, Semenza GL. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr Opin Hematol*. 1996;3(2):156-62.
28. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:551-78.
29. Salvesen DR, Brudenell JM, Snijders RJ, Ireland RM, Nicolaidis KH. Fetal plasma erythropoietin in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;168(1 Pt 1):88-94.
30. Salvesen DR, Brudenell MJ, Nicolaidis KH. Fetal polycythemia and thrombocytopenia in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(4):1287-93.
31. Wood PL, Bauman D. Gynaecological issues affecting the obese adolescent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015;29(4):453-65.

32. Wang W, Bourgeois T, Klima J, Berlan ED, Fischer AN, O'Brien SH. Iron deficiency and fatigue in adolescent females with heavy menstrual bleeding. *Haemophilia*. 2013;19(2):225-30.
33. Alexandrakis MG, Passam FH, Moschandrea IA, Christophoridou AV, Pappa CA, Coulocheri SA, et al. Levels of serum cytokines and acute phase proteins in patients with essential and cancer-related thrombocytosis. *Am J Clin Oncol*. 2003;26(2):135-40.
34. Kadikoylu G, Yavasoglu I, Bolaman Z, Senturk T. Platelet parameters in women with iron deficiency anemia. *J Natl Med Assoc*. 2006;98(3):398-402.
35. Madjid M, Fatemi O. Components of the Complete Blood Count as Risk Predictors for Coronary Heart Disease: In-Depth Review and Update. *Texas Heart Institute Journal*. 2013;40(1):17-29.
36. Aloulou I, Varlet-Marie E, Mercier J, Brun JF. The hemorheological aspects of the metabolic syndrome are a combination of separate effects of insulin resistance, hyperinsulinemia and adiposity. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35(1-2):113-9.
37. Tamariz LJ, Young JH, Pankow JS, Yeh HC, Schmidt MI, Astor B, et al. Blood viscosity and hematocrit as risk factors for type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol*. 2008;168(10):1153-60.
38. Pop GA, Duncker DJ, Gardien M, Vranckx P, Versluis S, Hasan D, et al. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Neth Heart J*. 2002;10(12):512-6.

**Table 1:** Characteristics of the participants at 21years according to HOMA-IR quartile

	Female					Male				
	N (%)	N (%)	N (%)	N(%)	p	N (%)	N (%)	N (%)	N(%)	P
	1 <sup>o</sup> Quartil	2 <sup>o</sup> Quartil	3 <sup>o</sup> Quartil	4 <sup>o</sup> Quartil		1 <sup>o</sup> Quartil	2 <sup>o</sup> Quartil	3 <sup>o</sup> Quartil	4 <sup>o</sup> Quartil	
	206 (23.8)	229 (26.4)	217 (25.0)	215 (24.8)		202 (25.1)	202 (25.1)	196 (24.4)	204 (25.4)	
<b>Parental Education (Years)</b>										
0-6	38 (18.1)	51 (24.3)	55 (26.2)	66 (31.4)	0.150	36 (23.7)	37 (24.3)	34 (22.4)	45 (29.6)	0.054
7-9	43 (26.4)	37 (22.7)	41 (25.2)	42 (25.8)		34 (24.1)	27 (19.1)	32 (22.7)	48 (34.0)	
10-12	59 (25.1)	66 (28.1)	63 (26.8)	47 (20.0)		53 (23.3)	58 (25.6)	54 (23.8)	62 (27.3)	
>12	66 (26.1)	73 (28.9)	56 (21.7)	59 (23.3)		77 (27.6)	80 (28.7)	74 (26.5)	48 (17.2)	
<b>Social class</b>										
Lower	16 (25.0)	16 (25.0)	14 (21.9)	18 (28.1)	0.471	16 (40.0)	8 (20.0)	10 (25.0)	6 (15.0)	0.097
Lower middle	109 (23.2)	119 (25.4)	122 (26.0)	119 (25.4)		95 (23.0)	99 (24.0)	101 (24.5)	118 (28.6)	
Upper	70 (25.0)	80 (28.6)	72 (25.7)	58 (20.7)		76 (26.1)	78 (26.8)	76 (26.1)	61 (21.0)	
Not know/answer	11 (20.4)	14 (25.9)	9 (16.7)	20 (37.0)		15 (25.0)	17 (28.3)	9 (15.0)	19 (31.7)	
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>										
Normal weight	193 (28.0)	203 (29.4)	172 (24.9)	122 (17.7)	<0.001	175 (31.1)	158 (28.1)	140 (24.9)	89 (15.8)	<0.001
Overweight	10 (7.9)	21 (16.7)	40 (31.7)	55 (43.7)		26 (13.6)	40 (20.9)	50 (26.2)	75 (39.3)	
Obese	1 (2.1)	5 (10.6)	3 (6.4)	38 (80.9)		1 (2.0)	4(8.0)	6(12.0)	39 (78.0)	
<b>Alcohol intake</b>										
Frequent drinkers	48 (24.2)	55(27.8)	51 (25.8)	44 (22.2)	0.875	105 (27.4)	106 (27.7))	86 (22.5)	86 (22.3)	0.120
Occasional drinkers	142 (23.5)	160 (26.5)	151 (25.0)	150 (24.9)		86 (22.5)	92 (24.1)	100 (26.2)	104 (27.2)	
No drinker <sup>a</sup>	13 (22.8)	12 (21.1)	14 (24.6)	18 (31.6)		10 (21.3)	3 (9.4)	9 (28.1)	10 (31.3)	
<b>Family history of disease<sup>b</sup></b>										
No	42 (30.0)	42 (30.0)	29 (20.7)	27 (19.3)	0.255	31 (20.8)	50 (33.6)	37 (24.8)	31 (20.8)	0,019
Yes	111 (21.5)	132 (25.5)	138 (26.7)	136 (26.3)		100 (23.3)	107 (24.9)	107 (24.9)	115 (26.8)	
No-Diagnosis	53 (25,0)	55 (26,0)	50 (24,0)	52 (25,0)		71 (31,0)	45 (20,0)	52 (23,0)	58 (26,0)	
<b>Smoking</b>										
Daily smoker	68 (32.5)	48 (23.0)	47 (22.5)	46 (22.0)	0.071	85 (33.5)	65 (25.6)	53 (20.6)	51 (20.1)	0.002
Occasional smoker	13 (20.6)	19 (30.2)	17 (27.0)	14 (22.2)		18 (24.3)	23 (31.1)	17 (23.0)	16 (21.6)	
Former smoker/Experienced	64 (20.8)	82 (26.7)	88 (28.7)	73 (23.8)		57 (21.0)	54 (19.9)	80 (29.4)	81 (29.8)	
Non-Smokers	58 (20.8)	78 (28.0)	64 (22.9)	79 (28.3)		41 (20.8)	59 (29.9)	45 (22.8)	52 (26.4)	
<b>Leisure-time physical activity</b>										
Mainly sitting	67 (24.4)	78 (28.4)	63 (22.9)	67 (24.4)	0.649	63 (22.2)	72 (25.4)	69 (24.3)	80 (28.2)	0.108
Mainly standing	98 (22.8)	111 (25.9)	106 (24.7)	114 (26.6)		78 (24.6)	87 (27.4)	68 (21.5)	84 (26.5)	
Very active	41 (25.8)	39 (24.5)	47 (29.6)	32 (20.1)		60 (30.2)	42 (21.1)	59 (29.6)	38 (19.1)1	
	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>p</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>Mean(SD)</b>	<b>P</b>
<b>Fasting Insulin (µ U/mL)</b>	4.94(1.29)	7.41(0.90)	9.85(1.27)	15.64(5.46)	<0.001	4.13(1.11)	6.20(0.73)	8.31(0.92)	14.39(5.24)	<0.001
<b>Fasting Glucose (mg/dL)</b>	77.42(5.42)	81.17(12.17)	82.18(5.56)	83.64(6.08)	<0.001	81.54(5.48)	84.50(7.39)	86.55(7.28)	88.91(8.08)	<0.001
<b>Triglicerideos (mg/dL)</b>	80.16(33.98)	91.82(39.38)	93.58(38.59)	111.05(55.12)	<0.001	67.73(23.14)	71.66(26.52)	75.48(34.90)	97.48(51.15)	<0.001
<b>Total cholesterol (mg/dL)</b>	179.96(33.67)	184.35(33.25)	186.91(35.70)	192.43(34.39)	0.002	162.42(30.18)	162.34(28.61)	163.06(29.10)	172.00(28.30)	0.001
<b>LDL cholesterol (mg/dL)</b>	101.61(28.09)	103.35(26.44)	109.78(67.18)	113.96(66.56)	0.045	102.81(69.70)	107.44(93.78)	98.21(24.58)	113.54(91.90)	0.206
<b>HDL cholesterol (mg/dL)</b>	62.32(11.00)	62.65(12.58)	62.86(13.02)	60.65(12.56)	0.231	50.82(9.71)	49.97(8.62)	49.77(9.60)	48.45(9.57)	0.085
<b>PCR (mg/L)</b>	2.16(3.66)	2.38(3.74)	2.76(4.71)	4.10(5.08)	<0.001	1.53(3.25)	1.72(4.25)	1.05(1.81)	1.48(2.81)	0.197

<sup>a</sup> Included Never drink and ex-drinker <sup>b</sup> Hypertension, Diabetes Type II and Cholesterol



**Table 2:** Hematological parameters and iron values according to quartiles of HOMA-IR

	RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)	HCT (%)	PCV (fL)	Hb (g/dl)	Platelet (x 10 <sup>9</sup> /L)	WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	Iron (µg/dL)	
Female	1 <sup>st</sup> quartile (<1.23)	4.34±0.30	38.22±2.50	88.14±4.29	12.83±0.91	231.73.21±47.07	6.24±1.58	102.80±43.03
	2 <sup>nd</sup> quartile (1.23-1.71)	4.41±0.28	38.39±2.18	87.31±4.12	12.89±0.82	243.75±48.14	6.50±1.70	98.79±41.98
	3 <sup>rd</sup> quartile (1.71-2.33)	4.44±0.30	38.69±2.40	87.26±3.65	12.96±0.87	245.29±57.92	6.70±1.77	95.82±42.28
	4 <sup>th</sup> quartile (>2.33)	4.52±0.30	38.86±2.45	86.10±4.66	12.97±0.98	260.39±53.26	7.25±1.86	85.87±37.23
	P-value	<0.001	0.026	0.119	0.311	<0.001	<0.001	<0.001
Male	1 <sup>st</sup> quartile (<1.08)	5.01±0.31	43.98±2.26	87.81±3.09	15.08±0.93	216.75±43.68	6.68±1.85	105.78±35.83
	2 <sup>nd</sup> quartile (1.08-1.51)	5.03±0.33	43.81±2.64	87.26±4.16	15.00±1.03	220.85±43.75	6.66±1.83	110.32±41.79
	3 <sup>rd</sup> quartile (1.52-2.13)	5.07±0.29	44.30±2.17	87.49±3.24	15.17±0.82	212.80±37.72	6.49±1.48	113.32±37.79
	4 <sup>th</sup> quartile (>2.13)	5.17±0.30	45.02±2.29	87.15±3.50	15.51±0.89	217.55±46.62	6.83±1.63	109.11±37.20
	P-value	<0.001	<0.001	0.173	<0.001	0.324	0.252	0.370

**RBC**= red blood cell; **HCT**=hematocrit; **PCV**= packed cell volume; **Hb**=Hemoglobin; **WBC**=white blood cell.



**Table 3:** Predicted Mean Differences and 95 % CIs in Hematological Parameters and Iron by HOMA-IR

	HOMA-IR			
	Crude β (95% C.I.)	Model 1 <sup>a</sup> β (95% C.I.)	Model 2 <sup>b</sup> β (95% C.I.)	Model <sup>c</sup> β (95% C.I.)
<b>Female</b>				
RBC ( x10 <sup>12</sup> /L)	0.06 (0.04;0.08)	0.05 (0.03;0.07)	0.05 (0.03;0.07)	0.051 (0.030;0.072)
HCT (%)	0.26 (0.11;0.41)	0.29 (0.12;0.46)	0.28 (0.11;0.45)	0.277 (0.107;0.446)
PCV (fL)	-0.56 (-0.82; -0.29)	-0.35 (-0.66;-0 .05)	-0.37 (-0.68;-0.07)	-0.389 (-0.690;-0.088)
Hb (g/dL)	0.06 (0.01; 0.12)	0.07 (0.01;0.14)	0.07 (0.00;0.13)	0.063 (-0.001;0.127)
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.38 (0.27;0.49)	0.31 (0.19;0.43)	0.30 (0.18;0.43)	0.308 (0.185;0.430)
Platelet (x 10 <sup>9</sup> /L)	9.08 (5.80;12.36)	7.66 (3.93;11.39)	7.49 (3.76;11.23)	7.622 (3.886;11.358)
Iron (μ g/dL)	-5.82 (-8.42;-3.21)	-3.98 (-6.94;-1.03)	-4.12 (-7.07;-1.17)	-4.423 (-7.362;-1.485)
<b>Male</b>				
RBC ( x10 <sup>12</sup> /L)	0.05 (0.03;0.07)	0.02 (0.00;0.04)	0.023 (0.001;0.05)	0.02 (0.00;0.04)
HCT (%)	0.32 (0.17;0.47)	0.21 (0.04;0.38)	0.218 (0.052;0.38)	0.22 (0.05;0.38)
PCV (fL)	-0.19 (-0.41;0.03)	0.00 (-0.24;2.5)	0.016 (-0.231;0.26)	0.04 (-0.21;0.29)
Hb (g/dL)	0.13 (0.08;0.19)	0.09 (0.03;0.16)	0.094 (0.029;0.16)	0.09 (0.03;0.16)
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.00;0.21)	0.04 (-0.09;0.15)	0.026 (-0.094;0.15)	0.02 (-0.10;0.14)
Platelet (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.51 (-2.20;3.21)	-0.44 (-3.47;2.60)	-0.274 (-3.309;2.76)	-0.37 (-3.44;2.70)
Iron (μ g/dL)	-0.16 (-2.55;2.23)	-0.22 (-2.90;2.45)	-1.39 (-2.818;0.82)	0.01 -2.70;2.71)

<sup>a</sup> Adjusted for BM; <sup>b</sup> Model 1 + Parental Education; <sup>c</sup> Model 2+ Leisure-time physical activity



**Table 4:** Median (P25-P95) of the Hematological Parameters for trajectories of Insulin and Glucose.

	Female			P	Male			P
	Both Lower (n=82)	Higher Insulin (n=90)	Higher Glucose (n=87)		Both Lower (n=94)	Higher Insulin (n=36)	Higher Glucose (n=107)	
<b>HOMA_IR</b>								
HOMA_IR_13y	1.11 (0.92-2.34)	1.99 (0.99-2.3)	1.60 (0.94-2.69)	<0.001	0.84 (0.40-1.35)	2.02 (1.34-2.66)	1.54 (0.89-2.42)	<0.001
HOMA_IR_17Y	0.61 (0.6-1.11)	1.40 (0.60-1.50)	1.07 (0.45-1.02)	<0.001	0.76 (0.42-0.98)	1.81 (1.04-2.25)	1.08 (0.77-1.64)	<0.001
HOMA_IR_21y	1.30 (1.46-2.65)	2.36 (1.17-2.33)	1.68 (1.44-2.36)	<0.001	1.21 (0.85-1.54)	2.03 (1.03-3.10)	1.58 (1.22-2.04)	<0.001
<b>Insulin</b>								
Insulin_13y	5.41 (2.94-6.77)	9.52 (6.48-12.76)	7.27 (4.86-10.89)	<0.001	4.09 (2.06-6.74)	9.61 (6.53-13.69)	7.33 (4.05-10.84)	<0.001
Insulin_17y	3.13 (1.95-4.61)	6.82 (4.70-9.32)	5.00 (3.23-6.78)	<0.001	3.62 (2.06-5.04)	8.53 (4.85-11.45)	4.77 (3.55-7.42)	<0.001
Insulin_21y	6.50 (4.85-8.30)	12.00 (8.85-14.25)	8.10 (6.55-10.00)	<0.001	6.00 (4.40-7.60)	10.60 (5.50-15.70)	7.35 (5.65-9.38)	<0.001
<b>Glucose</b>								
Glucose_13y	81.00 (78.00-84.00)	83.00(79.00-87.00)	90.00 (87.00-94.00)	<0.001	81.00 (76.00-84.00)	84.00 (80.75-86.25)	90.00 (86.00-93.00)	<0.001
Glucose_17y	80.00 (76.00-83.00)	80.00 (77.00-83.00)	88.00 (84.00-92.00)	<0.001	82.00 (77.00-85.00)	82.50 (80.00-88.50)	88.00 (85.00-93.00)	<0.001
Glucose_21Y	79.00 (76.00-81.50)	79.00 (75.00-83.00)	83.00 (80.00-87.00)	<0.001	82.00 (78.00-86.00)	80.00 (74.00-83.00)	87.00 (84.00-90.00)	<0.001
<b>Hematological Parameters</b>								
RBC_13Y (x10 <sup>12</sup> /L)	4.62 (4.48-4.87)	4.61 (4.43-4.83)	4.64 (4.40-4.79)	0.787	4.86 (4.86-5.29)	5.00 (4.61-5.16)	4.82 (4.82-5.17)	0.115
RBC_17Y (x10 <sup>12</sup> /L)	4.64 (4.49-4.77)	4.60 (4.33-4.76)	4.56 (4.30-4.78)	0.185	5.11 (4.97-5.37)	5.16 (4.94-5.35)	5.05 (4.81-5.31)	0.095
RBC_21y (x10 <sup>12</sup> /L)	4.45 (4.25-4.64)	4.41 (4.20-4.67)	4.38 (4.19-4.58)	0.585	5.05 (4.85-5.34)	5.06 (4.86-5.30)	5.04 (4.74-5.17)	0.092
HCT_13Y (%)	40.50 (39.28-41.83)	40.60 (39.00-42.13)	40.30 (38.70-41.30)	0.247	41.05 (39.30-43.20)	41.85 (40.03-43.60)	41.20 (39.10-43.00)	0.378
HCT_17Y (%)	39.90 (38.80-41.40)	39.45 (37.98-40.83)	39.60 (37.70-41.00)	0.339	44.10 (42.38-45.23)	44.70 (42.90-45.65)	43.60 (42.00-45.10)	0.105
HCT_21y (%)	38.80 (37.28-40.23)	38.60 (37.00-40.20)	38.40 (36.50-39.90)	0.378	43.85 (41.98-45.93)	44.75 (43.73-46.80)	44.10 (42.20-45.30)	0.024
PVC_13Y (fL)	87.30 (84.95-90.30)	87.50 (85.80-89.63)	87.40 (85.20-89.30)	0.860	85.00 (82.78-87.70)	85.55 (82.60-87.15)	86.50 (83.90-88.60)	0.072
PVC_17Y (fL)	86.55 (83.90-89.00)	86.75 (84.45-88.60)	87.00 (83.90-88.70)	0.929	85.25 (82.88-88.03)	86.05 (83.80-87.56)	86.60 (84.00-88.60)	0.082
PVC_21y (fL)	87.90 (85.68-89.83)	87.60 (85.30-89.43)	87.60 (85.10-89.70)	0.632	87.20 (84.88-89.18)	88.05 (85.93-90.08)	88.30 (86.30-90.50)	0.009
Hb_13Y (g/dL)	13.40 (12.80-14.10)	13.50 (12.90-14.03)	13.40 (12.90-13.90)	0.556	14.00 (13.38-14.80)	14.30 (13.60-14.90)	14.00 (13.30-14.60)	0.260
Hb_17Y (g/dL)	13.40 (12.90-13.90)	13.25 (12.60-13.90)	13.20 (12.50-13.70)	0.291	15.00 (14.58-15.70)	15.20 (14.70-15.80)	15.10 (14.40-15.80)	0.472
Hb_21y (g/dL)	12.40 (12.48-13.53)	12.90 (12.30-13.53)	13.60 (12.30-13.40)	0.493	15.05 (14.40-15.70)	15.50 (14.63-16.27)	15.10 (14.50-15.70)	0.059
Wbc_13Y (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.16 (5.22-7.58)	6.20 (5.30-7.67)	6.09 (5.10-7.34)	0.408	5.69 (4.74-6.62)	6.17 (4.85-6.69)	5.99 (5.19-6.94)	0.348
Wbc_17Y (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.09 (5.17-7.77)	6.31 (5.48-7.28)	6.15 (5.24-7.27)	0.566	6.07 (5.21-6.81)	5.92 (4.96-6.86)	6.12 (5.37-7.04)	0.736
Wbc_21Y (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.23 (5.12-7.50)	6.60 (5.57-7.71)	6.14 (5.17-7.47)	0.199	6.54 (5.37-6.54)	6.57 (5.64-7.93)	6.40 (5.16-7.51)	0.421
Platelet_13Y (x10 <sup>9</sup> /L)	260.00 (214.00-298.00)	258.50 (235.50-286.50)	247.00 (199.00-283.50)	0.375	249.00 (215.00-285.00)	248.50 (207.25-369.75)	265.00 (211.00-290.00)	0.807
Platelet_17Y (x10 <sup>9</sup> /L)	255.00 (215.00-290.00)	251.50 (222.25-278.25)	237.00 (206.75-260.25)	0.354	227.00 (203.00-250.00)	252.50 (195.25-281.75)	228.00 (200.00-254.00)	0.590
Platelet_21Y (x10 <sup>9</sup> /L)	243.00 (210.00-272.00)	253.00 (224.25-289.75)	261.00 (200.50-266.00)	0.193	218.00 (196.00-244.00)	226.00 (171.25-285.75)	226.00 (190.00-260.00)	0.889
<b>Iron</b>								
Iron_13Y (μ g/ dL)	91.00 (68.75-128.0)	90.50 (65.50-112.25)	94.00 (71.00-130.00)	0.370	92.00 (63.75-123.50)	93.5 (69.50-119.25)	96.00 (76.00-114.00)	0.777
Iron_17Y (μ g/ dL)	95.50 (72.75-121.50)	94.50 (67.00-118.00)	84.00 (63.00-108.00)	0.184	98.50 (80.50-133.25)	99.5 (88.50-112.75)	100.00 (74.00-130.00)	0.740
Iron_21y (μ g/ dL)	100 (68.75-127.50)	94.50 (73.00-126.00)	82.00 (62.00-111.00)	0.088	101.00 (78.25-125.25)	105.00 (75.75-125.50)	106.00 (77.00-138.00)	0.633

**RBC**= red blood cell; **HCT**=hematocrit; **PCV**= packed cell volume; **Hb**=Hemoglobin; **WBC**=white blood cell.



## **Conclusão**

---



## Conclusões

Este estudo permitiu concluir que, em adultos jovens e saudáveis, menor sensibilidade à insulina se associa a valores mais elevados de células vermelhas e hematócrito, sendo o efeito mais forte nos indivíduos do sexo masculino.

A tendência observada na análise longitudinal (dos 13 aos 21 anos de idade) reforça a existência de uma associação entre sensibilidade à insulina e os valores células vermelhas e hematócrito, embora, no geral, não se tenham observado efeitos estatisticamente significativos.

Estes resultados, em indivíduos que, na sua maioria, apresentam valores de glicose e insulina dentro dos limites da normalidade, vêm reforçar a necessidade de desenvolver investigação com o objectivo de aumentar o conhecimento sobre o efeito da insulino resistência nas células sanguíneas. Por outro lado, verificamos apenas um efeito ligeiro no aumento do número de células vermelhas e do hematócrito, sendo necessário futuros estudos para compreender em que medida este efeito condiciona aumento no risco de doença.

