



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AGLECIO LUIZ DE SOUZA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A ANÁLISE ESPECTRAL DA
FOTOPLETISMOGRAFIA E O CLAMP EUGLICÊMICO HIPERINSULINÊMICO NA
DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À INSULINA**

CAMPINAS

2016

AGLECIO LUIZ DE SOUZA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A ANÁLISE ESPECTRAL DA
FOTOPLETISMOGRAFIA E O CLAMP EUGLICÊMICO HIPERINSULINÊMICO NA
DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À INSULINA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Sarah Monte Alegre

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO:
AGLECIO LUIZ DE SOUZA, ORIENTADO PELO
PROFA. DRA. SARAH MONTE ALEGRE.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89e Souza, Aglecio Luiz de, 1979-
Estudo comparativo entre a análise espectral da fotopletismografia e o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico na detecção de resistência à insulina / Aglecio Luiz de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Sarah Monte Alegre.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Resistência à insulina. 2. Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. 3. Fotopletismografia. 4. Diabetes. I. Alegre, Sarah Monte, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Detection of insulin resistance by the hyperinsulinemic euglycemic clamp: comparison with the spectral analysis of photoplethysmography

Palavras-chave em inglês:

Insulin resistance

Photoplethysmography

Euglycemic-hyperinsulinemic clamp

Diabetes

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Sarah Monte Alegre [Orientador]

Rodolfo Borges dos Reis

Marcos Tobias Machado

José Rodrigo Pauli

Heraldo Mendes Garmes

Data de defesa: 30-09-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

AGLECIO LUIZ DE SOUZA

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SARAH MONTE ALEGRE

MEMBROS:

- 1. PROF. DRA. SARAH MONTE ALEGRE**
 - 2. PROF.DR. RODOLFO BORGES DOS REIS**
 - 3. PROF. DR. MARCOS TOBIAS-MACHADO**
 - 4. PROF. DR. JOSÉ ROGRIGO PAULI**
 - 5.PROF.DR. HERALDO MENDES GARMES**
-

Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA MÉDICA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 30 de Setembro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Álvaro (in memoriam) e Eusiliana, a minha irmã Agleciane, e a minha esposa Maíne. O suporte e apoio de vocês foram fundamentais na realização de mais essa etapa em minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus! Pelo milagre da vida!

A minha esposa, pelo amor, carinho, apoio, incentivo e paciência.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, educação e amor.

A minha irmã, pelo incentivo, apoio, companheirismo e partilha.

Ao amigo Azevedo, pelo apoio, conselhos, incentivo e amizade.

A todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha orientadora professora Dra. Sarah Monte Alegre, pela confiança, oportunidade, competência, apoio e ensinamentos, tanto acadêmicos quanto humanos!

A todos os professores que me incentivaram, orientaram e foram exemplos na área de ensino e pesquisa.

Aos voluntários, que possibilitaram a realização deste trabalho.

A Universidade Estadual de Campinas, e Faculdade de Ciências Médicas, cuja estrutura e funcionários possibilitaram o desenvolvimento deste estudo e a obtenção deste título.

Aos cidadãos brasileiros que através de seus impostos permitem a existência de serviços públicos de qualidade, seja na pesquisa, ensino ou assistência.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará!”
(Salmo 37:5)*

RESUMO

Introdução: A prevalência de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem aumentado dramaticamente em proporções pandêmicas; em 2014 acometeu 8,5% da população mundial, ou seja, 422 milhões de adultos. A resistência à insulina é fator de risco para intolerância à glicose (IGT), DM2 e doenças cardiovasculares e pode ser detectada em indivíduos assintomáticos.

Objetivo: Examinar a capacidade da análise espectral da fotopletismografia (PPG) em detectar a resistência à insulina em indivíduos não diabéticos.

Material e método: Um total de 100 indivíduos não diabéticos (glicemia de jejum $<126\text{mg/dL}$; $\text{HbA1c} \leq 6,4\%$), 43 homens e 57 mulheres com idade entre 20-63 anos foram avaliados. Estes indivíduos foram submetidos ao clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, e ao exame fotopletismográfico com análise espectral para cálculo e obtenção do algoritmo fotopletismográfico – Potência Total (PPG-TP). Para determinar a especificidade e sensibilidade do PPG-TP na detecção de resistência à insulina foi utilizada a curva Receiver Operating Characteristic (ROC).

Resultados: Houve correlação entre o M-value e PPG-TP ($r = -0,64$, $p < 0,0001$). Na análise geral do grupo a curva ROC mostrou que o ponto de corte de maior especificidade e sensibilidade foi $\text{PPG-TP} > 406,2$. Utilizando este dado a curva ROC apresentou sensibilidade = 95,7%, especificidade = 84,4% e $\text{AUC} = 0,929$ para identificar a resistência à insulina. Em análises por sexo, a curva ROC apresentou no grupo das mulheres sensibilidade = 100,0%, especificidade = 85,4% e $\text{AUC} = 0,926$; enquanto no grupo de homens foi observada sensibilidade = 92,9%, especificidade = 82,8% e $\text{AUC} = 0,933$. Todas as análises das áreas sob a curva (AUC) da curva ROC foram significativas ($p < 0,0001$).

Conclusão: Em relação a outros métodos de avaliação de resistência à insulina, a análise espectral da fotopletismografia demonstrou ser uma técnica vantajosa, visto que pode ser realizada de forma simples, rápida e não invasiva. O uso do marcador PPG-TP, obtido a partir da análise espectral fotopletismográfica pode ser uma ferramenta útil no rastreamento e acompanhamento de resistência à insulina, principalmente em estudos de larga escala.

Palavras-chave: diabetes, resistência à insulina, fotopletismografia, clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

ABSTRACT

Background: Insulin resistance is a strong risk factor of impaired glucose tolerance (IGT), type 2 diabetes (T2DM) and cardiovascular diseases. The objective of the study was to examine the ability of spectral analysis of photoplethysmography (PPG) to detect insulin resistance.

Material and method: A total of 100 nondiabetic subjects, 43 men and 57 women aged 20–63 years, mean BMI of 28.1 kg/m² (range 17.9-50.3), 30 lean, 42 overweight and 28 obese, classified according to BMI, were enrolled in the study. These patients underwent the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) and examination with the PPG spectral analysis and calculation of the PPG Total Power (PPG-TP). Receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed to determine the specificity and sensitivity of PPG-TP in detecting insulin resistance.

Results: There is a strong correlation between M-value and PPG-TP ($r = -0.64$, $p < 0.0001$). The ROC curves showed that the most relevant cutoff to the whole study group was a PPG-TP > 406.2. This cut-off had a sensitivity = 95.7%, specificity = 84.4% and AUC = 0.929 for identifying insulin resistance. In a separate ROC analysis, the women group presented a sensitivity = 100.0%, specificity = 85.4% and AUC = 0.926 (cutoff > 405.2); while the men group was observed at a sensitivity = 92.9%, specificity = 82.8% and AUC = 0.941 (cutoff > 406.2). All AUC ROC curve analysis were significant ($p < 0.0001$).

Conclusion: PPG-TP marker, which uses only a finger oximeter, has significant advantages in comparison with other methods. These advantages are: ease of use, non-invasive approach, no complex structure, and is cost effective. Therefore, our results show that the use of the PPG-TP marker measured from the PPG spectral

analysis is a useful tool in screening and follow up of IR, especially in practice as well as in large-scale studies.

Keywords: Diabetes, Insulin Resistance, Photoplethysmography, Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA – Associação americana de diabetes

AUC – Área sob a curva

CEH – Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

EPM – Erro padrão da média

ET-1 – Endotelina 1

FFM – Massa magra

FFT – Transformação rápida de Fourier

FSIVGTT – Teste de tolerância à glicose intravenosa com amostras frequentes

GLUT4 – Molécula transportadora de glicose 4

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c – Hemoglobina glicada

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HF – Alta frequência

HOMA-IR – Modelo de avaliação da homeostase – índice de resistência à insulina

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IDF – Federação internacional de diabetes

IGT – Intolerância à glicose

IKK – Complexo enzimático com atividade serina-quinase

IMC – índice de massa corporal

IRS – Substrato dos receptores de insulina

KITT – Teste de tolerância à insulina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LF – Baixa frequência

M-Value – Glicose metabolizada – índice de sensibilidade à insulina

NO – Óxido nítrico

NO_e – Óxido nítrico derivado do endotélio

OMS – Organização mundial da saúde

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PI3K – Fosfatidil-inositol 3 quinase

PKC – Proteína quinase C

PPG - Fotopletismografia

PPG-TP – Índice da potência total fotopletismográfica

QUICKI – Índice quantitativo da insulina de jejum

RI – Resistência à insulina

ROC – Característica de operação do receptor

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SBD – Sociedade brasileira de diabetes

SNA – Sistema nervoso autonômico

SNS – Sistema nervoso simpático

SOP – Síndrome do ovário policístico

SpO₂% - Saturação de oxigênio

TTOG – Teste de tolerância oral à glicose

UNICAMP – Universidade estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – EsComplex – dispositivo utilizado na análise fotopletiométrica. Integração do oxímetro de pulso com o software computacional..... 48
- Figura 2** – Análise Espectral Fotopletiométrica, PPG-TP. A1= Amplitude de frequência muito baixa (VLF), A2= Amplitude de baixa frequência (LF), A3= Amplitude de alta frequência (HF). S1= Área de frequência muito baixa (VLF), S2= Área de baixa frequência (LF), S3=Área de alta frequência (HF). W1= Largura de frequência muito baixa (VLF), W2= Largura de baixa frequência (LF), W3= Largura de alta frequência (HF)..... 49
- Figura 3** – Prevalência de indivíduos resistentes e não resistentes conforme o sexo. E prevalência total de indivíduos com RI..... 52
- Figura 4** – Prevalência de indivíduos resistentes e não resistentes conforme classificação pelo IMC..... 52
- Figura 5** – Correlação entre o M-value ($\text{mg/kg}_{\text{FFA}} \cdot \text{min}$) e o índice fotopletiométrico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r = - 0.64$; $p<0,0001$; 95% Intervalo de confiança: $- 0.743$ a $- 0.507$)..... 53
- Figura 6** – Correlação entre o IMC (kg/m^2) e o índice fotopletiométrico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r = 0.69$; $p<0,0001$; 95% Intervalo de confiança: $0,568$ a $0,779$)..... 54

Figura 7 – Correlação entre Massa Gorda (%) e o índice fotopletismográfico, PPG-TP (m/s^2) em indivíduos não diabéticos (n=100) ($r = 0,70$; $p < 0,0001$; 95% Intervalo de confiança: 0,589 a 0,791)..... 54

Figura 8 – Correlação entre HbA1c (%) e o índice fotopletismográfico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos (n=100) ($r = 0,34$; $p = 0,0006$; 95% Intervalo de confiança: 0,153 a 0,501)..... 55

Figura 9 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina (n = 100). (Erro padrão: 0,025; Intervalo de confiança de 95%: 0,860 a 0,971)..... 56

Figura 10 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina no grupo do sexo feminino (n = 53). (Erro padrão: 0,034; Intervalo de confiança de 95%: 0,825 a 0,978)..... 56

Figura 11 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina no grupo do sexo masculino (n = 47). (Erro padrão: 0,037; Intervalo de confiança de 95%: 0,814 a 0,987)..... 57

Sumário

1. Introdução.....	17
1.2. Diabetes mellitus.....	17
1.2.1. Prevalência e impacto socioeconômico.....	17
1.2.2. Conceito, diagnóstico e classificação.....	19
1.3. Resistência à insulina.....	22
1.3.1. Conceito e mecanismos moleculares de ação e resistência insulínica.....	22
1.3.2. Outras doenças e distúrbios associados à resistência insulínica.....	25
1.3.3. Função endotelial e resistência à insulina.....	26
1.3.3.1. Ação insulínica.....	27
1.3.3.2. Glicotoxicidade e lipotoxicidade.....	29
1.3.3.3. Sistema nervoso autonômico, RI e função endotelial.....	29
1.4. Avaliação da resistência à insulina.....	30
1.4.1. Método padrão ouro: Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico.....	30
1.4.2. Outros métodos para avaliação da resistência à insulina.....	33
1.5. Fotopletismografia.....	39
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo Geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. Sujeitos.....	43
3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão.....	43
3.3. Local do Estudo.....	44
3.4. Procedimentos Experimentais e Métodos Analíticos.....	45

3.4.1. Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico.....	45
3.4.2. Análise Espectral da Fotopletismografia.....	47
3.4.3. Análise Estatística.....	50
4. Resultados.....	51
5. Discussão.....	58
6. Conclusão.....	68
7. Referências.....	69
8. Anexos.....	88
8.1. Artigo submetido à publicação na revista Diabetes and Its Complications.....	88
8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	106

1. Introdução

1.2. Diabetes mellitus

1.2.1. Prevalência e impacto socioeconômico

Em contraposição às doenças infecciosas, causas de maior mortalidade no início do século 20, atualmente, as doenças de maior mortalidade são as denominadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que se concentram em quatro grandes grupos: as doenças cardiovasculares, o câncer, as doenças respiratórias e o diabetes mellitus (DM). No ano de 2005, essas doenças eram responsáveis por 60% de todos os óbitos mundiais, sendo que em países de baixa e média renda esse valor era ainda mais expressivo, cerca de 80% (1). Se por um lado, o avanço do conhecimento científico sobre mecanismos de infecção e prevenção, além das melhorias na saúde pública e condições de vida, propiciou a diminuição as doenças infecciosas; por outro, as mudanças sociais, econômicas, demográficas e culturais ocorridas ao longo do século, o aumento da longevidade e hábitos de vida inadequados, como sedentarismo, etilismo, tabagismo, alto consumo de gorduras e alimentos industrializados, tornaram as DCNT as principais causas de morte (2)

Dentre os quatro grandes grupos das DCNT, devido aos crescentes índices de prevalência e morbimortalidade, o DM é considerado o mais desafiador em termos de controle e impacto socioeconômico.

Em 2015 o número de mortes por complicações decorrentes do DM atingiu a marca de 5 milhões de pessoas (3). Além da alta taxa de mortalidade, a prevalência dessa doença tem aumentado em proporções pandêmicas. Em 1980 a prevalência global do DM era de aproximadamente 108 milhões de indivíduos, já em 2014 esse número chegou a 422 milhões de adultos, cerca de

8,5% da população mundial. Neste período, a prevalência de DM quase quadruplicou, apresentando taxa de crescimento médio de aproximadamente 4,2% ao ano. As estimativas apontam que, em 2040, a prevalência mundial de DM esteja em torno de 642 milhões, ou seja, mais de meio bilhão de indivíduos. O país com maior prevalência de DM é a China, seguida por Índia, EUA e Brasil. O Brasil ocupa o quarto lugar em prevalência de DM, apresentando 14,3 milhões de casos (3,4).

A alta prevalência de casos de DM gera um impacto econômico significativo. Mundialmente, o valor total anual dos gastos com o DM atinge a cifra de US\$ 673 bilhões. Quase metade deste valor, em torno de US\$ 320 bilhões, foi despendido apenas nos EUA; no Brasil, este gasto foi em torno de US\$ 22 bilhões, ou seja, aproximadamente R\$ 94 bilhões (3). Este valor representa quase a totalidade da execução orçamentária do Ministério da Saúde do Brasil em 2015, que foi de quase R\$103 bilhões. Em termos de produto interno bruto (PIB), projeções indicam que em 20 anos a perda no PIB mundial, em decorrência do DM, será em torno de US\$ 1,7 trilhões (4).

Diante destes números constata-se que o DM potencializa o aumento dos custos da saúde pública, podendo comprometer significativamente a sustentabilidade dos sistemas de saúde no longo prazo. E além dessa esfera econômica, o DM exerce também impactos sociais múltiplos, que refletem consideráveis limitações à qualidade de vida, à produtividade e à funcionalidade dos indivíduos acometidos.

1.2.2. Conceito, diagnóstico e classificação

Conceitualmente o DM é um distúrbio metabólico heterogêneo caracterizado pela hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambas (5). A hiperglicemia prolongada, devido à perda da homeostase glicêmica, tem efeito glicotóxico, que se expressa principalmente pela glicação de proteínas, hiperosmolaridade e aumento dos níveis de sorbitol intracelular. Os efeitos da glicotoxicidade estão associados a alterações micro e macrovasculares que promovem ao longo da evolução clínica da doença lesões orgânicas extensas e irreversíveis. Essas lesões implicam principalmente em complicações crônicas cardiovasculares, nefropatias, retinopatias e neuropatias (6).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (5,7), os critérios para diagnóstico do DM se baseiam na glicemia e na hemoglobina glicada (HbA1c). Utilizando a glicemia são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM : glicemia de jejum, glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose, e glicemia casual, que consiste naquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

Os valores de concentração glicêmica utilizados como diagnóstico para o DM são: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL; glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/L e glicemia casual ≥ 200 mg/dL. Os valores de glicemia considerados normais são: glicemia de jejum <100 mg/dL; glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose <140 mg/L (5).

Entre os valores considerados normais e os valores de diagnóstico, existe uma faixa de valores pertinentes a duas categorias intermediárias entre a homeostase normal da glicose e o DM. Essas categorias, referidas também

como pré-diabetes, são a glicemia de jejum alterada, ou intolerância de jejum, e a tolerância à glicose diminuída ou intolerância à glicose. A intolerância de jejum alterada ocorre quando a glicemia de jejum está entre 100 mg/dL e 126 mg/dL. Enquanto a intolerância à glicose ocorre quando, após sobrecarga de 75 g de glicose, o valor de glicemia aos 120 minutos situa-se entre 140 e 199 mg/dL (5).

Utilizando-se a Hb1Ac como critério diagnóstico para o DM tem-se como recomendação que os indivíduos com $HbA1c \geq 6,5\%$ sejam diagnosticados diabéticos, havendo necessidade da confirmação do valor em segunda coleta. Enquanto indivíduos com valores de HbA1c entre 5,7 e 6,4% são classificados como intolerantes à glicose. Os valores considerados normais são os compreendidos abaixo de 5,7% (5).

As avaliações diagnósticas são recomendadas de acordo com os sintomas clássicos do DM, apresentados pelo indivíduo. Sendo eles: poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso (5).

Embora, conhecida desde a antiguidade, somente no último século a etiologia e fisiopatologia do DM começou a ser compreendida. Conforme sua etiologia, o DM pode ser classificado em diferentes tipos: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes mellitus gestacional e outros tipos específicos, que incluem: defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças no pâncreas endócrino, endocrinopatias, induzidos por drogas, induzidas por infecções, formas incomuns de DM autoimune e outras síndromes genéticas por vezes associadas ao DM (8).

Considerando a prevalência dos tipos de DM, os de maior importância são o DM1 e DM2. Sendo que o DM1 compõe de 5 a 10% dos casos totais de DM e o DM2 representa de 90 a 95% dos casos de diabetes em adultos (9).

No DM1 o processo etiológico responsável pela hiperglicemia é a deficiência na síntese de insulina por parte das células β pancreáticas. Este tipo de DM pode ainda ser subdividido em diabetes mellitus tipo 1A, quando a destruição das células β pancreáticas tem origem autoimune; e em diabetes mellitus tipo 1B, de natureza idiopática. A maioria dos casos de DM1 é do tipo 1A (10).

No DM2, o mecanismo fisiopatológico básico presente é a resistência à ação periférica da insulina (RI). No entanto, o aparecimento clínico do DM2 está relacionado a um evento posterior ao surgimento da RI, que é a falência das células β pancreáticas que, num determinado momento da evolução clínica do paciente, perde a capacidade de compensar a RI, com o aumento de sua secreção (11–14).

A história natural do DM2, portanto, poderia ser compreendida da seguinte forma: alguns anos antes do início do DM2, ocorreria a RI, tendo como principais consequências a diminuição da captação de glicose pelo tecido muscular esquelético, hepático e adiposo; o aumento da lipólise e o bloqueio da inibição da gliconeogênese hepática (15). Estes efeitos levariam a um estado de hiperglicemia, caracterizando o quadro clínico de intolerância à glicose. Essa hiperglicemia, inicialmente, induziria o aumento da função das células β pancreáticas, que aumentariam a secreção de insulina a fim de compensar o quadro de RI. Entretanto, ao longo dos anos, devido a fatores como glicotoxicidade, lipotoxicidade, e mecanismos intrínsecos, as células β

pancreáticas entrariam em falência, perdendo sua capacidade secretória. Essa perda de secreção compensatória, somada a RI, já instalada anteriormente, marcariam o início do DM2, com a perda total da homeostase glicêmica (5,16). Estudos epidemiológicos, realizados em diferentes grupos populacionais corroboram essa sequência de eventos que ocorrem entre o surgimento da resistência à insulina e o aparecimento clínico do DM2, permitindo considerar que a RI é forte fator preditor para o DM2 (12,15,17). Sendo a RI componente chave na patogênese do DM2, tem-se que ambas apresentam fatores de risco comuns, como envelhecimento, sedentarismo, história familiar e obesidade (18,19). Este último, aparece como um fator de risco dos mais importantes devido a relação praticamente linear entre o ganho de peso e o aparecimento de resistência à insulina (20,21).

1.3. Resistência à insulina

1.3.1. Conceito e mecanismos moleculares de ação e resistência insulínica

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular, esse hormônio é secretado pelas células β pancreáticas das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose, aminoácidos e ácidos graxos. Regula a homeostase de glicose em vários níveis: reduzindo a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise; e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Estimula a lipogênese no fígado e nos

adipócitos, onde também age reduzindo a lipólise. E ainda aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (22,23).

A RI pode ser definida como um estado metabólico no qual as concentrações fisiológicas de insulina produzem resposta biológica diminuída, ou seja, um estado patológico no qual as células alvo têm resposta insuficiente às concentrações normais de insulina circulante (15,24,25). Como apresentado no tópico anterior, sobre a história natural do DM, na RI há um mecanismo compensatório de aumento da secreção pancreática de insulina, levando a hiperinsulinemia, para manter a glicemia em concentrações normais (26). Este estado foi definido como síndrome de resistência à insulina (27). Em populações não diabéticas a prevalência de RI está entre 20 a 25% dos indivíduos (12,28).

Do ponto de vista molecular, de forma simplificada, a sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina. Este receptor é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase, composta por duas subunidades α , extracelulares, onde se localiza o sítio de ligação da insulina, e duas subunidades β , intracelulares, onde se localiza o sítio catalítico. A ligação da insulina às subunidades α leva a mudança conformacional da subunidade β , e conseqüente autofosforilação, o que ativa sua capacidade tirosina-quinase (29). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina incluindo membros da família dos substratos dos receptores de insulina (IRS 1/2/3/4) (30). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS promove a ativação de proteínas chaves responsáveis pelas vias de sinalização intracelular, como a via da Fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K),

que ativa a proteína Akt, fundamental para a translocação da molécula transportadora de glicose 4 (GLUT4) para a superfície celular e transporte de glicose para o meio intracelular (31–33); a via da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), e a ativação do proto-oncogene Cbl (34). Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, o crescimento e diferenciação celular, e a expressão gênica específica (35).

Embora existam vias principais de ativação primária, os mecanismos moleculares de sinalização e ação insulínica envolvem uma complexa rede de proteínas e moléculas, que vão desde alterações conformacionais de proteínas intracelulares até modulação da transcrição e tradução gênica específica. Deste modo, a simples falha, em quaisquer dessas vias que compõe essa complexa rede de sinalização, pode levar a resposta diminuída da célula alvo em relação à ação insulínica normal.

Considerando essa complexa rede de sinalização insulínica, vários modelos experimentais de resistência à insulina têm sido propostos, de modo que o estudo destes modelos tem auxiliado na elucidação dos principais mecanismos moleculares de resistência à insulina.

Os modelos experimentais que se demonstraram mais relevantes apontam que a autofosforilação do receptor de insulina após a ligação do hormônio está reduzida em diversas situações de resistência à insulina, assim como está reduzida também sua atividade tirosina-quinase (36,37). Outro mecanismo molecular relevante de resistência à insulina acontece quando o IRS-1é fosforilado em serina por serinas-quinases intracelulares. Uma vez fosforilado em serina, torna-se incapaz de ser fosforilado em tirosina, impedindo a ativação da PI3K, bloqueando a transmissão do sinal insulínico (38,39).

Além disso, o IRS-1 fosforilado em serina, pode inibir retrogradamente a ativação do receptor de insulina, pois uma vez ligado ao receptor, inibe sua capacidade tirosina-quinase, impedindo a transmissão do sinal de insulina para outras moléculas de IRS-1, ou ainda para outros substratos deste receptor (40). Diversas serinas-quinases foram identificadas como capazes de fosforilar o IRS-1 em serina, como, por exemplo, a c-jun N-terminal quinase 1 (Jnk1) (41) e o complexo enzimático com atividade serina-quinase (IKK) (42).

A análise conjunta dos modelos experimentais permite entender que bloqueios na transmissão do sinal de insulina intracelular podem estar relacionados à resistência às ações fisiológicas deste hormônio. E a reversão destes bloqueios à sinalização pode resultar em melhora da sensibilidade à insulina.

1.3.2. Outras doenças e distúrbios associados à resistência insulínica

Além de fator preditor para o DM2, a RI, senão base fisiopatológica, está envolvida com diferentes entidades clínicas prevalentes na população.

A síndrome metabólica, descrita por Reaven (1988) (12) como síndrome X, e mais recentemente, e não por acaso, descrita como síndrome da resistência a insulina, tem a RI como componente central e elo entre as demais alterações que podem estar presente nesta síndrome, como obesidade abdominal, hipertensão arterial, dislipidemia, e alteração glicêmica (43,44).

Reaven (1988) (12), propôs ainda, ser a RI a causa central da etiologia da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e das doenças cardiovasculares (DCV). De fato, vários estudos confirmaram essa associação entre RI, HAS e DCV (45–47). Indivíduos portadores da síndrome de resistência à insulina, além de

maior prevalência de hipertensão arterial, possuem disfunção endotelial associada (48,49).

A RI também é associada ao aumento da concentração plasmática de triglicérides, e menor concentração de HDL (50,51). A presença de hipertensão arterial, associada à disfunção endotelial e dislipidemia, explicaria, em parte, a grande propensão deste grupo de indivíduos, portadores de RI, a morbimortalidade cardiovascular (12).

Estudos epidemiológicos mostram também que indivíduos com resistência à insulina e hiperinsulinemia, estão sob maior risco de desenvolver neoplasias, e esteato-hepatite não-alcoólica (52–54).

A síndrome dos ovários policísticos (sop) é uma das desordens endocrinológicas mais frequentes em mulheres na idade reprodutiva, e hoje está bem estabelecido que a prevalência de resistência à insulina e hiperinsulinemia é significativamente maior nessas pacientes (55,56).

Além das condições patológicas e distúrbios associados a RI, existem situações fisiológicas, como a puberdade, a gravidez, a menopausa e a própria senescência em que a resistência à insulina, de forma transitória ou definitiva, constitui alteração fisiopatológica frequente (57).

1.3.3. Função endotelial e resistência à insulina

A maior parte das complicações decorrentes do DM2 é de origem vascular, sejam cardiovasculares, ou associadas a acidentes vasculares encefálicos. Essa relação entre DM e alta incidência de complicações micro e macrovasculares, é explicada, em parte pelos efeitos da RI sobre o endotélio vascular (58).

Através da sua função autócrina/parácrina, o endotélio regula a secreção de múltiplos fatores que podem modificar a função plaquetária, o estado contrátil e proliferativo das células musculares lisas vasculares. Estas moléculas incluem o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que são vasodilatadoras e inibidoras da função plaquetária, adesão leucocitária e proliferativa das células musculares lisas (59,60). As células endoteliais podem também produzir vasoconstritores e promotores de crescimento, como a angiotensina II, endotelina-1 (ET-1), tromboxane A₂, prostaglandina H₂, e espécies reativas de oxigênio (ROS) (61).

A disfunção endotelial, refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, sendo o tônus vascular o aspecto mais estudado. Há evidências de que na disfunção endotelial o papel protetor do endotélio está diminuído ao passo que a produção de mediadores vasoconstritores, pró-agregatórios e pró-mitogênicos estão mantida ou acentuada (62).

1.3.3.1. Ação insulínica no endotélio

Além do controle da homeostase glicêmica, a insulina exerce controle sobre a homeostase vascular. No endotélio, a insulina age por duas vias: a via da PI3K, e a via da MAPK. Ou seja, a mesma via de ativação da PI3K, e IRS-1, que ocorre após a ligação da insulina com seu receptor, essencial para a captação de glicose nos tecidos-alvo dependentes de insulina, como o músculo esquelético e tecido adiposo; está presente no endotélio, estimulando a produção de NO endotelial (NO_e) mediada pela insulina. A produção de NO_e,

derivada da ação insulínica, tem efeito vasodilatador não apenas macrovascular, arterial, mas também na microvascularatura, controlando a resistência dos terminais arteriolas; levando ao aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético e outros tecidos alvos (63). Somado ao seu efeito vasodilatador primário o NO_e promoveria inibição da adesividade e migração de leucócitos, o primeiro indicador morfológico de aterosclerose; reduziria a permeabilidade endotelial para macromoléculas e lipoproteínas, assim diminuindo o acúmulo subendotelial de LDL colesterol e subsequente formação de células espumosas; inibição da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares; inibição da adesividade e agregação plaquetária, a via final comum mediando as síndromes vasculares agudas. Em resumo, a insulina, em sua ação normal, estimulando a produção de NO, tem ação inibitória nas principais vias envolvidas na aterogênese (64).

Se por um lado a ativação endotelial da via da PI3K promove efeitos antiateroscleróticos, por outro, a via da MAPK, também ativada pela insulina, pode mediar a expressão de fatores pró-aterogênicos. No endotélio, a via da MAPK medeia o crescimento celular; a capacidade migratória das células endoteliais, do músculo liso vascular e dos monócitos; a produção de fatores pró-fibrótico e trombóticos como o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1); e a produção de um potente vasoconstritor a endotelina 1 (ET-1) (65).

No endotélio a RI compromete a via de sinalização da PI3K, enquanto as funções mediadas pela via da MAPK operam normalmente. É possível que na tentativa de sobrepujar a inibição da via de sinalização insulínica, a

hiperinsulinemia possa continuar a estimular a via de sinalização mitogênica da insulina, exercendo seus efeitos aterogênicos indesejados (62). Assim, a resistência à insulina, através da hiperinsulinemia, contribui para a disfunção endotelial, sendo fator de risco independente para doenças cardiovasculares em indivíduos saudáveis (58,66,67).

1.3.3.2. Glicotoxicidade, lipotoxicidade e endotélio

A lipotoxicidade e glicotoxicidade, presentes na RI, também contribuem para a disfunção endotelial. A hiperglicemia e a dislipidemia levam ao aumento de ROS, que por sua vez acentuam o comprometimento da sinalização insulínica, e diminuem a biodisponibilidade do NO_e (68–70). Alternativamente, o aumento de ácidos graxos livres e metabólitos lipídicos podem interferir diretamente na via de sinalização insulínica, pela ativação de moléculas que fosforilam o IRS-1 em serina, como a proteína quinase C (PKC) e IKK (71,72).

1.3.3.3. Sistema nervoso autonômico, RI e função endotelial

A insulina exerce ainda, efeito sobre o sistema nervoso autonômico (SNA), agindo de forma excitatória sobre o sistema nervoso simpático (73,74). A hiperinsulinemia, presente na RI, pode levar a sobrecarga simpática, promovendo aumento no tônus basal vascular periférico (75), e contribuindo assim para a perda da homeostase endotelial vascular (76).

1.4. Avaliação da resistência à insulina

Apesar da RI possuir um componente genético importante (77), a mesma pode ser modulada de forma significativa por influência ambiental, principalmente pelo sedentarismo e pela obesidade (12). Assim, intervenções no estilo de vida, como a prática de exercícios físicos, bem como a perda de peso e a implementação de dietas adequadas, tem sido importantes no tratamento de indivíduos com risco para DM2, podendo reverter o quadro de resistência à insulina presente nestes casos (78,79).

Neste contexto, a capacidade de medir e diagnosticar a resistência à insulina é de suma importância, não apenas para a melhor compreensão da etiologia do DM2, mas também para estudos epidemiológicos, e principalmente para prevenir ou retardar o aparecimento do DM2 e suas complicações.

1.4.1. Método padrão ouro: Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico

Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a sensibilidade/resistência à insulina, tanto em estudos clínicos individuais como em estudos populacionais. O método padrão-ouro para avaliar a resistência à insulina é o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (CEH), que consiste em técnica de avaliação *in vivo*, que permite avaliar a sensibilidade tecidual à ação da insulina através da mensuração da captação total de glicose em resposta a hiperinsulinemia constante. A determinação da resistência à insulina pelo clamp baseia-se no conceito de que em condições glicêmicas e hiperinsulinêmicas constantes, a quantidade de glicose consumida pelos tecidos seria igual a quantidade de glicose infundida durante o teste, onde a glicemia é mantida dentro de limites constantes e normais. Durante o teste,

pressupõe-se que a produção hepática de glicose é completamente suprimida pela infusão de glicose realizada, e o estado de equilíbrio dinâmico da glicemia é mantido, tornando a quantidade de glicose infundida reflexo direto da glicose utilizada pelo organismo. Deste modo, a taxa média da necessidade de infusão da glicose, no repouso, traduz a medida da sensibilidade insulínica e é quantificada em miligramas de glicose por quilo de peso por minuto pelo índice denominado M-Value, ou simplesmente M (57,80,81). Assim, quanto maior o M-value, maior será a sensibilidade à insulina, ou seja, menor a resistência à insulina.

O M-value pode ser expresso como a utilização de glicose por quilo de massa total, ou ainda, pode ser normalizado pela massa magra (FFM) do indivíduo, de modo a ser mais fidedigno uma vez que em indivíduos com sobrepeso ou obesos não teria influência da massa gorda (28,82).

Considerando que muitos estudos são realizados de forma comparativa, em diferentes populações e com diferentes taxas de infusão insulínica, não há consenso sobre os valores de corte do M-value que definam resistência à insulina.

Nesse sentido, Bergman (1985) (83) examinando diferentes trabalhos de avaliação de sensibilidade à insulina *in vivo*, encontrou em estudos desenvolvidos com o CEH, com taxa de infusão de 40 mU/m².min, valores médios do M-value entre 4,7 a 8,7 mg/kg/minuto; e propôs de forma conservadora, como ponto de corte para diagnóstico de resistência à insulina, em populações não obesas e não idosas, o valor de 4,7mg/kg/min (81,83).

Outros estudos, realizados em populações com diferentes níveis de tolerância à glicose, variações de idade e peso consideraram, de forma

arbitrária, valores do M-value abaixo de 4,0 mg/kg/min como corte para diagnóstico de RI (84).

Uma das mais relevantes avaliações realizados com o CEH, liderados por grupos europeus e americanos de estudos em resistência à insulina, envolvendo mais 2000 indivíduos não diabéticos, utilizando medidas de sensibilidade e especificidade, encontrou como melhor ponto de corte para RI o M-value de 5,0 mg por quilo de massa magra por minuto (85).

Como não há consenso sobre o ponto de corte, considerando a prevalência de RI na população não diabética (12,85), alguns autores, têm adotado e sugerido a própria distribuição dos dados do grupo estudado para estabelecer o parâmetro de corte, utilizando para isso o valor do quartil inferior da distribuição amostral (85–88). Deste modo, valores abaixo do quartil inferior da distribuição do M-value, indicariam a presença de RI.

De modo geral, considerando os diferentes métodos de avaliação da RI, para qualquer índice, o ponto de corte para a definição de RI é arbitrário; podendo corresponder ao extremo inferior da distribuição normal da sensibilidade à insulina numa população, ou ainda, ao ponto de corte que apresenta o melhor equilíbrio entre especificidade e sensibilidade estatísticas (89).

Embora o CEH seja considerado um padrão ouro de avaliação de resistência à insulina, devido a fatores como alto custo, complexidade, treinamento específico de pessoal para realização e duração do teste, além de sua natureza invasiva; não é prático ou aplicável em larga escala, sendo restrito a estudos clínicos realizados em centros altamente capacitados e com um número reduzido de indivíduos.

1.4.2. Outros métodos para avaliação da resistência à insulina.

Devido às desvantagens restritivas do CEH, que o inviabiliza para uso na prática clínica ou em estudos de larga escala, métodos alternativos de avaliação da resistência à insulina foram desenvolvidos com base em modelos matemáticos derivados de parâmetros metabólicos.

De fato, os primeiros ensaios para avaliação da RI *in vivo* foram conduzidos no final dos anos 30. Estes ensaios compreendiam a realização de duas curvas glicêmicas, uma com e outra sem infusão de insulina intravenosa, de modo que a sensibilidade à insulina era expressa pela razão entre as áreas sob as respectivas curvas glicêmicas dos dois testes (24). Contudo, somente em 1968, com os estudos de Berson e Yalow (1968) (90), que descreveram as técnicas de mensuração da insulina, foi possível realizar a primeira descrição de RI baseada na concentração plasmática deste hormônio. A partir desta técnica, vários métodos de estimativa dos efeitos fisiológicos da insulina foram desenvolvidos (91).

Considerando que a RI se refere frequentemente ao metabolismo da glicose, os diferentes métodos para avaliação da RI, sejam eles dinâmicos ou baseados em dados basais, tem como princípio dois parâmetros fundamentais: as concentrações plasmáticas de glicose e de insulina circulante no estado de equilíbrio dinâmico (*steady state*).

O mais simples desses métodos é a insulinemia de jejum. Em indivíduos resistentes à insulina, as concentrações plasmáticas de jejum se encontram elevadas e se correlacionam com a intensidade da resistência à insulina determinada pelo clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (92). A desvantagem

desta técnica, no entanto, é que apresenta correlações fracas com a ação insulínica *in vivo*. Dependendo do ensaio utilizado, pode ter reação cruzada com a pró-insulina. A pró-insulina está tanto, ou mais elevada, quanto mais resistente à insulina é o indivíduo. Outro aspecto é que, em estado de jejum, a glicose é consumida principalmente pelos tecidos não dependentes da ação da insulina para a sua metabolização. Além do mais, não reflete a ação da insulina em tecidos dependentes de sua ação, como os músculos (93).

O índice do modelo de avaliação da homeostase- resistência à insulina (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance index* - HOMA-IR) também constitui um método simples para avaliação da RI, e de maior acurácia quando comparado à insulinemia, pois seu cálculo representa a relação entre a glicemia e a insulinemia de jejum (94,95). O HOMA-IR pode ser calculado pela fórmula: $[\text{insulina de jejum (mU/mL)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)}] / 22,5$, é um método prático e de baixo custo. Sendo alternativo ao CEH, é amplamente usado em estudos epidemiológicos. Os valores de corte são relativos, pois sofrem influência de vários fatores como etnia e idade. O modelo da equação HOMA-IR é útil para a avaliação da resistência à insulina em indivíduos normotolerantes, com intolerância à glicose, com diabetes e outras condições de resistência à insulina. Entretanto, em indivíduos com insuficiência na função das células β , o HOMA-IR pode não oferecer bons resultados (96). Em estudos de larga escala, nos quais se dispõe apenas de dados relativos a insulinemia e glicemia de jejum, o HOMA-IR constitui um método adequado e robusto para avaliação da RI (97).

Assim como o HOMA-IR, o índice quantitativo da insulina de jejum (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* - QUICKI) é também um método

de avaliação da RI baseado na glicemia e insulinemia de jejum. No entanto, para estabelecer a sensibilidade insulínica, os valores das duas variáveis sofrem transformação logarítmica permitindo a obtenção de um índice de acordo com a seguinte fórmula: $QUICK = 1/\log I + \log G$, onde: G = Glicemia plasmática em jejum, medida em mmol/L I = Insulinemia plasmática em jejum, medida em mU/L (98). Em sua validação inicial, em determinados grupos populacionais, este método demonstrou melhor correlação linear com o CEH, menor coeficiente de variação e melhor poder discriminatório do que o HOMA-IR (99,100). Tanto o HOMA-IR como o QUICKI fornecem informações sobre o estado de jejum refletindo em maior grau o efeito da insulina na supressão da produção hepática de glicose e não a captação de glicose pelos tecidos.

Como já mencionado, os primeiros testes de avaliação da RI utilizavam a curva glicêmica, expressa no teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Dessa forma, além de ser ferramenta diagnóstica para o DM, o TTOG é um método que pode fornecer diferentes índices para avaliação da RI. O TTOG padrão consiste na ingestão oral de 75g de glicose, dissolvidos em 300mL de água, em até 5 cinco minutos, com determinações de glicemia e insulinemia a cada 15 ou 30 minutos durante 2 ou 3 horas. A razão entre a glicemia e a insulinemia é calculada para cada ponto e também para toda a curva. Quanto menor o incremento na glicose por unidade de insulina, mais sensível o indivíduo (16). Além deste cálculo, existem vários outros propostos na obtenção de índices que avaliam a RI a partir do TTOG. Embora estes índices utilizem diferentes modelos matemáticos, todos se baseiam na dinâmica homeostática das concentrações de insulina e glicose, seja no jejum ou ao longo da curva glicêmica. Os principais marcadores de sensibilidade à insulina

obtidos pelo TTOG são os índices propostos por Hollenbeck (1984) (92), Cederholm (1990) (101), Gutt (2000) (102), Matsuda (1999) (16), Belfiore (2001) (103), Stumvoll (2000) (104) e Mari (2001) (105). As críticas ao TTOG incluem a baixa reprodutibilidade, a variação da absorção oral de glicose e seu efeito na produção intestinal de peptídeos estimuladores da secreção de insulina e a variação individual da supressão da produção hepática de glicose pela sobrecarga de glicose (106).

O teste de tolerância à glicose intravenosa com amostras frequentes com Modelo Mínimo (*Frequently sampled intravenous glucose tolerance test – FSIVGTT*) é um método de avaliação de RI que tem como princípio a infusão aguda intravenosa de glicose (0,3 g/kg de glicose a 50% em 1 min), seguida de múltiplas coletas num período de 3 horas, medindo-se as concentrações de glicose e insulina. A partir dos valores de insulinemia e glicemia, obtém-se o índice de sensibilidade à insulina, que representa o *clearance* de glicose plasmática por unidade de insulina plasmática. Este índice de sensibilidade é obtido através de modelo computacional que interpreta o padrão insulinêmico e glicêmico mensurados durante o teste. Assume-se neste método que o *clearance* da glicose plasmática é dependente de dois componentes distintos: um independente da resposta insulínica, ou seja, a capacidade da glicose em induzir a seu próprio metabolismo em termos de sua captação pelos tecidos ou supressão da produção de glicose pelo fígado; e outro dependente da resposta secretória de insulina. Estes dois componentes são utilizados na obtenção do índice de sensibilidade pelo programa computacional (107,108). Embora, o modelo utilizado neste método seja suficientemente complexo para refletir com acurácia os mecanismos de desaparecimento da glicose após sua injeção

intravenosa, alguns estudos mostram que a sensibilidade à insulina calculada pode ser superestimada em até 30% (109).

Os métodos de avaliação de RI descritos, com exceção do CEH, são considerados métodos indiretos de avaliação da RI, pois se baseiam na análise da insulina endógena, principalmente em condições homeostáticas. Como métodos diretos de avaliação, têm-se aqueles que analisam os efeitos da ação insulínica com base na insulina exógena administrada de forma intravenosa em quantidade e padrão específico para cada indivíduo. Além do CEH, o teste de tolerância à insulina (ITT) e o teste de supressão de insulina constituem métodos diretos na avaliação da RI.

O ITT se constitui na injeção intravenosa em bolo de 0,1 UI de insulina regular humana por quilo de peso corporal, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose entre 3 e 15 minutos após a infusão da insulina. A sensibilidade à insulina é indicada pela constante de desaparecimento da glicose (KITT), estimada pela inclinação da linha de regressão do logaritmo da glicemia contra o tempo durante os primeiros 3-15 min, quando a concentração de glicose plasmática cai linearmente. A queda da glicose é determinada por dois fatores: supressão da produção hepática de glicose e estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis. A interpretação do ITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose mais sensível o indivíduo é à insulina. O índice corresponde à queda da glicose expressa em % / minuto. Quanto maior o KITT maior a sensibilidade à insulina. Assim a queda da glicose observada nos primeiros 15 minutos após o início do teste reflete a captação de glicose pelos tecidos induzida pela insulina, bem como a inibição

da liberação de glicose pelo fígado. Este método apresenta boa reprodutibilidade e boa correlação com o CEH (110,111).

O teste de supressão de insulina pode ser considerado o reverso do CEH, ou seja, a taxa de infusão de glicose exógena durante a infusão de insulina é mantida constante enquanto a concentração plasmática de glicose pode variar, de modo que em estado de equilíbrio, quanto maior a hiperglicemia obtida pior a sensibilidade insulínica. O objetivo deste teste é observar o consumo de glicose injetada a partir de um nível fixo de hiperinsulinemia. Com a infusão de insulina a velocidade fixa, é atingido um nível estável de insulina (*steady-state plasma insulin- SSPI*). Como não há produção endógena de glicose, o nível estável de glicose (*steady-state plasma glucose- SSPG*) fornece uma medida da capacidade da insulina em estimular o consumo de glicose infundida. Durante o teste a glicose é dosada a cada 5 ou 10 minutos visando identificar e caracterizar o SSPG. Assim, quanto maior o SSPG mais resistente à insulina será o indivíduo (112,113). Devido ao fato de que a hiperglicemia induzida poder estimular a liberação endógena de insulina pode-se utilizar adrenalina ou somatostatina para suprimir a resposta da célula β pancreática (112).

Todos estes métodos abordados são os mais relevantes na avaliação da RI, seja por serem os mais frequentemente utilizados, ou ainda por apresentarem boa correlação com o padrão ouro de avaliação da RI, o CEH. Entretanto, é crescente o número de novos biomarcadores da RI propostos nos estudos científicos que abordam este tema. Moléculas protéicas, como a catepsina D, leptina, proteína ligadora de ácidos graxos – 4 (114,115); moléculas do perfil lipídico, como colesterol, triglicérides e HDL(116); e

moléculas glicadas, como a albumina glicada e a própria hemoglobina glicada têm sido alvo de extensa investigação em estudos que buscam marcadores práticos e confiáveis na detecção de RI (117–119).

Embora existam métodos de avaliação da RI alternativos ao clamp, ou seja, métodos menos complexos, de menor custo, mais facilmente executáveis; eles ainda apresentam um revés quando aplicados em larga escala, pois requerem, pelo menos, uma amostragem de sangue, bem como estrutura laboratorial mínima para coleta, processamento e análise das amostras sanguíneas. Assim, o desenvolvimento de novas técnicas para avaliação de resistência à insulina que sejam eficientes, simples, precisas, de baixo custo, e não invasivas tornam-se cada vez mais importantes, tanto nas investigações clínicas como em estudos populacionais. Essas novas técnicas poderiam ajudar não apenas na prevenção do DM2 como também em todas as doenças associadas ao mesmo.

1.5. Fotopletismografia

Com o avanço tecnológico, tanto de equipamentos quanto de recursos computacionais, é crescente o número de dispositivos e técnicas desenvolvidos e empregados tanto na avaliação de processos fisiológicos como em alterações patológicas. A fotopletismografia (PPG) é uma destas técnicas, que embora tenha sido validada na década de 30, atualmente é amplamente estudada na análise de variados processos fisiopatológicos, principalmente, por ser técnica não invasiva e apresentar características como boa reprodutibilidade, baixo custo, baixa complexidade e rápida execução.

A PPG consiste na leitura de mensurações ópticas, utilizadas para detectar variações de volume de sangue no leito microvascular tecidual (120,121). Este método tem como princípio a mensuração da quantidade de luz infravermelha absorvida ou refletida pelo sangue, em função das alterações de volume no leito microvascular provocadas por variações da pressão sanguínea nos vasos. Dada a relação existente entre o fluxo sanguíneo vascular e a quantidade de luz absorvida ou refletida, é possível observar a variação de volume com base na mensuração da luz detectada (121,122).

O dispositivo que realiza a PPG é composto basicamente de dois componentes: um óptico, fonte da luz que será direcionada ao tecido, e um eletrônico, fotodetector, que irá medir e registrar mínimas variações na intensidade de luz associadas a alterações na perfusão sanguínea; convertendo essas variações em sinais elétricos, graficamente representados por ondas pulsáteis (123). Tais ondas refletem diretamente o pulso arterial, caracterizado pela onda de pulso, que modifica o volume sanguíneo microvascular a cada ciclo cardíaco (124).

A PPG tem sua aplicação consolidada em diferentes segmentos clínicos, desde a monitoração de parâmetros fisiológicos, para avaliar saturação de oxigênio, frequência e débito cardíaco, pulsação e pressão arterial; como também em estudos específicos para avaliação da função vascular e função autonômica. Sendo realizada conforme orientações técnicas do equipamento, seu uso é seguro, apresenta boa reprodutibilidade, e seus resultados independem de fatores como etnia, espessura de epiderme e faixa etária (123,125). Dentre os diferentes estudos realizados com o emprego da PPG, destacam-se os relacionados à análise da variabilidade da frequência cardíaca

(125,126), da disfunção endotelial (127,128), rigidez arterial (129,130), síndrome metabólica (131), e diabetes (132,133). De fato, com o auxílio de programas computacionais e de novos recursos tecnológicos, uma ampla variedade de algoritmos e modelos derivados da análise da PPG tem sido desenvolvidos para o estudo e compreensão de doenças nas quais as alterações no sistema nervoso autônomo e na função vascular estejam associadas, incluindo neste sentido o DM e outros distúrbios metabólicos (122,134,135). A partir de referências padrão de variáveis fisiológicas, mínimas alterações detectáveis em estados patológicos, poderiam determinar o diagnóstico precoce, bem como auxiliar no acompanhamento e tratamento dessas doenças.

Neste contexto, este estudo se justifica a fim de testarmos a hipótese de que a análise espectral da fotopletismografia possa ser utilizada como ferramenta de rastreamento da RI, uma vez que apresente resultados compatíveis e significativos em relação ao padrão ouro de avaliação da RI, o CEH.

2. Objetivos

2.2. Objetivo geral

- Investigar a capacidade da análise espectral da fotopletiografia em identificar a resistência à insulina em indivíduos não diabéticos.

2.3. Objetivos específicos

- Verificar a prevalência de resistência à insulina na população estudada.
- Comparar a análise espectral da fotopletiográfica com o padrão ouro de avaliação de resistência à insulina, o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico.

3. Casuística e Métodos

3.1. Sujeitos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob o parecer nº 542/2010; e aderiu aos princípios éticos da Declaração de Helsinki. Todos os indivíduos assinaram consentimento informado para participar do estudo, incluindo a permissão de uso dos dados para fins de pesquisa. Tratou-se de estudo transversal, onde a população de estudo se concentrou em indivíduos da comunidade universitária, bem como seus amigos e familiares. Através de contato pessoal e telefônico, o protocolo de pesquisa foi apresentado, e o convite à participação realizado. De um total de aproximadamente 120 indivíduos convidados, aproximadamente 5% apresentaram algum critério de exclusão e 11% não aceitaram participar. Dessa forma, foram avaliados 100 indivíduos. Os participantes se propuseram a participar do estudo de forma voluntária, e num primeiro momento, após aceite ao protocolo de pesquisa, foram submetidos a exame médico preliminar, incluindo o preenchimento de questionário médico detalhado, exame físico, avaliação antropométrica e coleta de amostras de sangue para exames laboratoriais, após um período mínimo de 8h a 10h de jejum.

3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão foram: glicose plasmática em jejum <126 mg/dL e HbA1c $<6,5\%$, caracterizando estes indivíduos como não diabéticos, de acordo

com os critérios da American Diabetes Association (ADA) (5,136); e bom estado de saúde em geral, determinado por exame físico e questionário médico.

Foram excluídos do estudo os indivíduos que: 1) apresentavam doença em órgãos como o coração, pulmão, rim, fígado ou do sistema nervoso, além de doenças do sistema endócrino e vascular; 2) faziam uso de medicamentos conhecidos por afetar a homeostase da glicose; 3) estavam grávidas; 4) apresentavam implante de dispositivos cardíacos como marca-passo ou cardioversor; 5) tiveram corantes recentemente introduzidos na corrente sanguínea, como o azul de metileno, verde de indocianina, índigo carmim e fluoresceína; 6) apresentaram concentrações significativas de hemoglobina disfuncional, como carboxiemoglobina ou metemoglobina; 7) apresentavam qualquer fator de interferência na precisão da saturação periférica de oxigênio da hemoglobina arterial (SpO₂%), medidos pelo oxímetro de pulso.

3.3. Local do Estudo

Todos os procedimentos do estudo foram realizados na Unidade Metabólica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Essa unidade está localizada no sexto andar do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, cujo endereço é rua R. Vital Brasil, 251 - Cidade Universitária, Campinas - SP, 13083-888; e o horário de funcionamento é das 7h às 17:30h.

3.4. Procedimentos Experimentais e Métodos Analíticos

Todos os sujeitos tiveram a composição corporal avaliada por bioimpedanciometria elétrica, com o aparelho de bioimpedância Biodynamics 310e (Biodynamics Corp., Seattle, WA, EUA). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado com base na relação entre a massa corporal (em kg) e a estatura ao quadrado (em metros), obtidos por balança Welmy (Mod. R110) com estadiômetro acoplado. A pressão arterial foi avaliada por esfigmomanometria utilizando-se esfigmomanômetro aneróide Tycos (WelchAllyn, NY, USA). A glicemia plasmática foi analisada pelo método enzimático da glucose-oxidase, utilizando-se o bioanalisador de glicose YSI-2300 (YSI 2300 STAT plus; YSI, Yellow Springs, OH, EUA). A hemoglobina glicada (HbA1c) foi analisada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência com o equipamento HPLC Variant II (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

3.4.1. Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico

Os indivíduos incluídos neste estudo, após exame médico inicial, foram previamente agendados para realização do CEH.

As recomendações prévias ao exame foram: realizar jejum mínimo de 12h prévio ao exame; manter a alimentação padrão habitual; e não realizar atividade física exaustiva, fora do padrão habitual, no dia anterior ao exame.

O ambiente da sala de realização dos procedimentos foi climatizado com temperatura média de 25°C.

O CEH foi realizado seguindo a técnica previamente proposta por DeFronzo *et al.*, 1979 (28). Consistindo em período basal de estabilização de

120 minutos, seguido de período experimental de 120 minutos, com infusão insulínica e controle euglicêmico por infusão de glicose; e posteriormente, período mínimo de 60 minutos para observação do paciente após o término da infusão insulínica. A insulina foi administrada a taxa de 40mU por minuto por m² de superfície corporal, de modo a manter estado hiperinsulinêmico. Dois catéteres intravenosos foram utilizados para acessos venosos. O primeiro em veia antecubital para a infusão de insulina e glicose, e o segundo, em veia do punho, inserido de forma retrógrada para coleta das amostras de sangue arterializado. Para obtenção de amostra sanguínea arterializada, a mão na qual houve a punção para a coleta, foi inserida e mantida em caixa termostática com temperatura entre 50-60°C (137). Após início da infusão constante de insulina, a 40mU/m².min, a glicemia foi mantida dentro do valor de concentração basal, com variação de ±10%, ajustando-se a infusão de solução de glicose a 10%, conforme as determinações glicêmicas que ocorriam a cada 5-10 minutos no bioanalisador de glicose (YSI 2300 STAT plus; YSI, Yellow Springs, OH, EUA).

Para a análise da resistência à insulina, foi calculada a taxa média de infusão exógena de glicose, ou seja, a glicose consumida pelo organismo (M-value) expressa em miligramas de glicose por quilograma de peso por minuto, durante a segunda hora do CEH, período considerado de estabilização metabólica. O M-value foi normalizado por quilograma de massa livre de gordura (FFM), e como ponto de corte para diagnóstico de RI foi considerado o valor do quartil inferior da distribuição amostral do M-value.

Dessa forma, indivíduos que apresentaram M-value < 4,8 mg / kg_{FFM}·min foram considerados resistentes à insulina (85,87,89,92).

3.4.2. Análise Espectral da Fotopletismografia

A leitura e análise fotopletismográfica foi realizada com o oxímetro de dedo do dispositivo ES Complex (LD Tecnologia, Miami, Florida, EUA) (Figura 1) (138), trinta minutos antes das punções venosas necessárias ao CEH. O oxímetro emprega técnica óptica simples e não invasiva, pela qual, através da análise e processamento de feixe de luz infravermelho emitido sobre o tecido, e posteriormente absorvido e refletido, pode-se avaliar a onda de pulso, oriunda dos ciclos cardíacos, e que refletem o volume e fluxo sanguíneo microvascular (123). O oxímetro foi colocado no dedo indicador direito do paciente, exibindo em tempo real, a onda fotopletismográfica. A partir da onda de pulso captada pelo oxímetro, através do software computacional do ES Complex, foi realizada a análise espectral dessa onda, de modo a se obter algoritmo específico denominado de índice da potência total fotopletismográfica (PPG-TP) (132,138).

A análise espectral da fotopletismografia, na obtenção do PPG-TP, foi realizada inicialmente com a primeira derivada e, em seguida, utilizando a transformação rápida de Fourier (FFT) (Figura 2). O registro total da onda fotopletismográfica após a transformação rápida de Fourier fornece três frequências: alta (HF) (de 2,57 a 5 Hz), baixa (LF) (1,47-2,56 Hz) e muito baixas frequências (VLF) (0-1,46 Hz). Cada área de frequência foi medida e expressa em milissegundo ao quadrado (ms^2) (132,135). Os componentes harmônicos espectrais: amplitude, largura e área, são expressos respectivamente em Volts/segundo (V/s), Hertz (Hz) em milissegundos ao quadrado (ms^2). O PPG-TP corresponde a soma das três áreas/potências das ondas fotopletismográficas de alta, baixa e muito baixa frequência.



Figura 1 – EsComplex – dispositivo utilizado na análise fotopletismográfica. Integração do oxímetro de pulso com o software computacional.

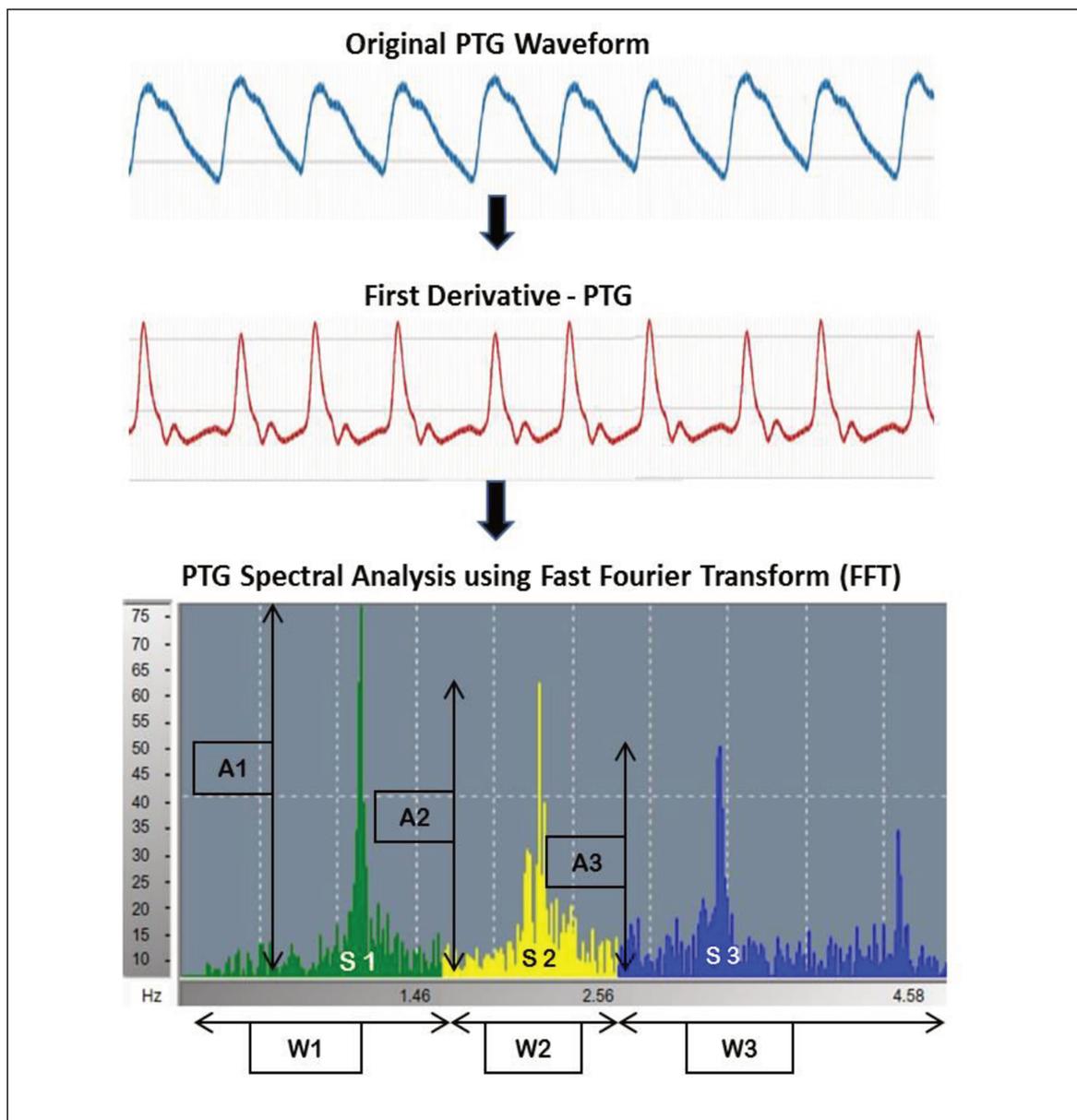


Figura 2 – Análise Espectral Fotopletiomográfica, PPG-TP. A1= Amplitude de frequência muito baixa (VLF), A2= Amplitude de baixa frequência (LF), A3= Amplitude de alta frequência (HF). S1= Área de frequência muito baixa (VLF), S2= Área de baixa frequência (LF), S3=Área de alta frequência (HF). W1= Largura de frequência muito baixa (VLF), W2= Largura de baixa frequência (LF), W3= Largura de alta frequência (HF).

3.4.3. Análise estatística

Para análises de correlação entre as variáveis estudadas foi utilizado o coeficiente de Spearman.

As análises de comparação entre os grupos resistentes e não resistentes foram realizadas com aplicação do teste U de Mann Whitney para amostras independentes.

Para avaliação do desempenho diagnóstico, ponto de corte e capacidade discriminativa, foi utilizada a curva ROC, que permitiu verificar a especificidade e sensibilidade do PPG-TP em detectar um M-value $<4,8$ mg/kg_{FFM} . min.

Os dados são apresentados como médias \pm EPM (erro padrão da média). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Com base nos resultados preliminares, com tamanho amostral de 100 indivíduos, assumindo um erro $\alpha = 0,05$, o poder do teste analítico foi de 90% para detectar diferença significativa entre os sujeitos com e sem resistência à insulina.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software MedCalc para Windows (versão 12.6.1, Ostend, Be).

4. Resultados

De um total de 120 indivíduos convidados ao estudo, 100, foram avaliados, sendo 57 mulheres e 43 homens, com idade entre 20-63 anos. Deste grupo amostral, 30 indivíduos eram eutróficos, 42 com sobrepeso e 28 obesos, classificados de acordo com o índice de massa corporal (IMC), foram avaliados. O IMC médio foi de $28,1 \text{ kg/m}^2$ (17,9-50,3).

De acordo com critérios da ADA, pela concentração de HbA1c, 25% foram identificados com intolerância à glicose [28].

As características basais dos indivíduos estudados, estratificadas por resistência à insulina pelo método do CEH, são apresentadas na tabela 1. O IMC, massa gorda, pressão arterial, HbA1c e PPG-TP foram significativamente maiores no grupo dos indivíduos com RI do que no grupo de indivíduos sem RI (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos participantes do estudo, agrupados de acordo com a presença ou ausência de resistência à insulina pelo método do CEH.

	M-value<4,8	M-value>4,8	p-value*
Número	23	77	-
Sexo (Masculino/Feminino)	14/9	33/44	-
Idade (anos)	32,0±2,1	33,5±1,0	ns
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	87,0±1,2	86,2±0,6	ns
Hb1Ac (%)	5,6±0,06	5,3±0,04	0.001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	124,5±4,0	111,9±1,6	0.001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	83,5±2,7	74,3±1,2	0.0001
Índice de massa corporal (kg/m^2)	34,5±1,7	26,7±0,5	<0.0001
Massa gorda (%)	37,2±1,5	29,3±0,8	<0.0001
PPG-TP (m/s^2)	527,29±24,15	327,7±10,7	<0.0001

*P-value indicando a comparação entre os indivíduos com (M-value<4,8) e sem (M-value>4,8) resistência à insulina.

A resistência à insulina, avaliada pelo CEH, esteve presente em 23% dos indivíduos, com M-value < 4,8. No grupo feminino a RI esteve presente em 15,8% dos voluntários, enquanto que entre os homens chegou a 32,6% (Figura 3). A prevalência de RI conforme o IMC foi de 3,3% nos indivíduos eutróficos, 23,8% nos indivíduos com sobrepeso e 42,8% nos obesos (Figura 4).

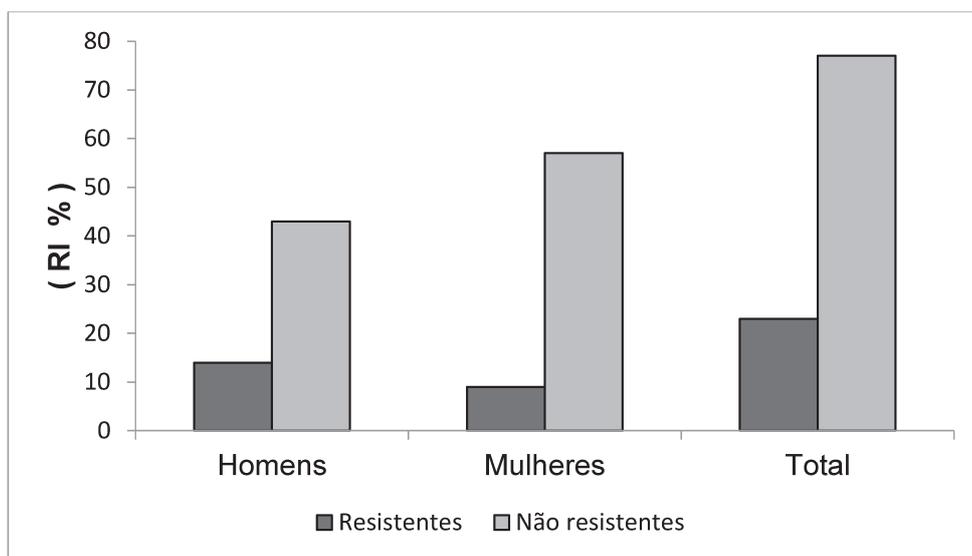


Figura 3 – Prevalência de indivíduos resistentes e não resistentes conforme o sexo. E prevalência total de indivíduos com RI.

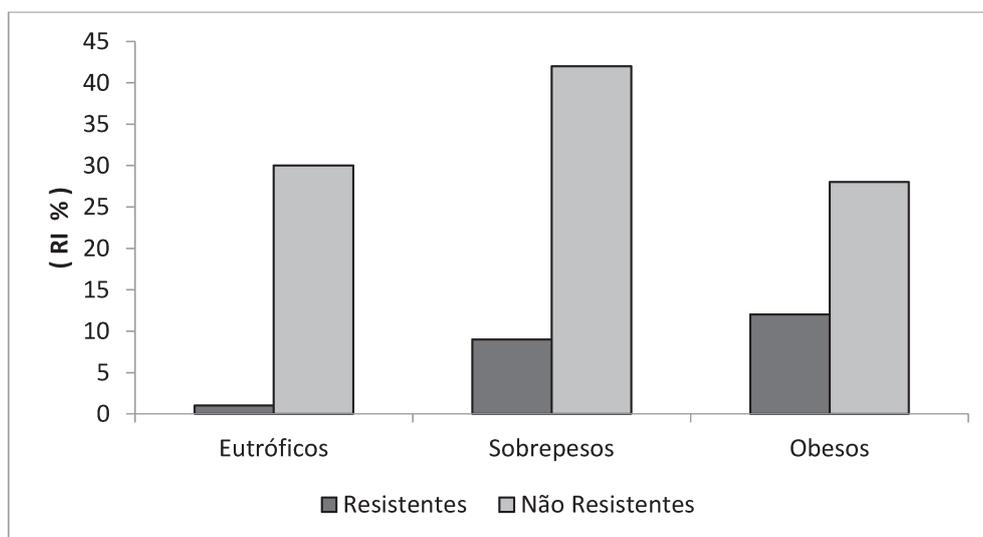


Figura 4 – Prevalência de indivíduos resistentes e não resistentes conforme classificação pelo IMC.

Nas análises de correlação o PPG-TP apresentou correlação negativa com o M-value, $r = -0,64$ e $p < 0,0001$, conforme a Figura 5; e correlação positiva com o IMC, $r = 0,69$ e $p < 0,0001$ (Figura 6); massa gorda, $r = 0,70$ e $p < 0,0001$ (Figura 7); e HbA1c, $r = 0,34$ e $p = 0,0006$ (Figura 8). Não houve correlação significativa entre o PPG-TP e a glicemia.

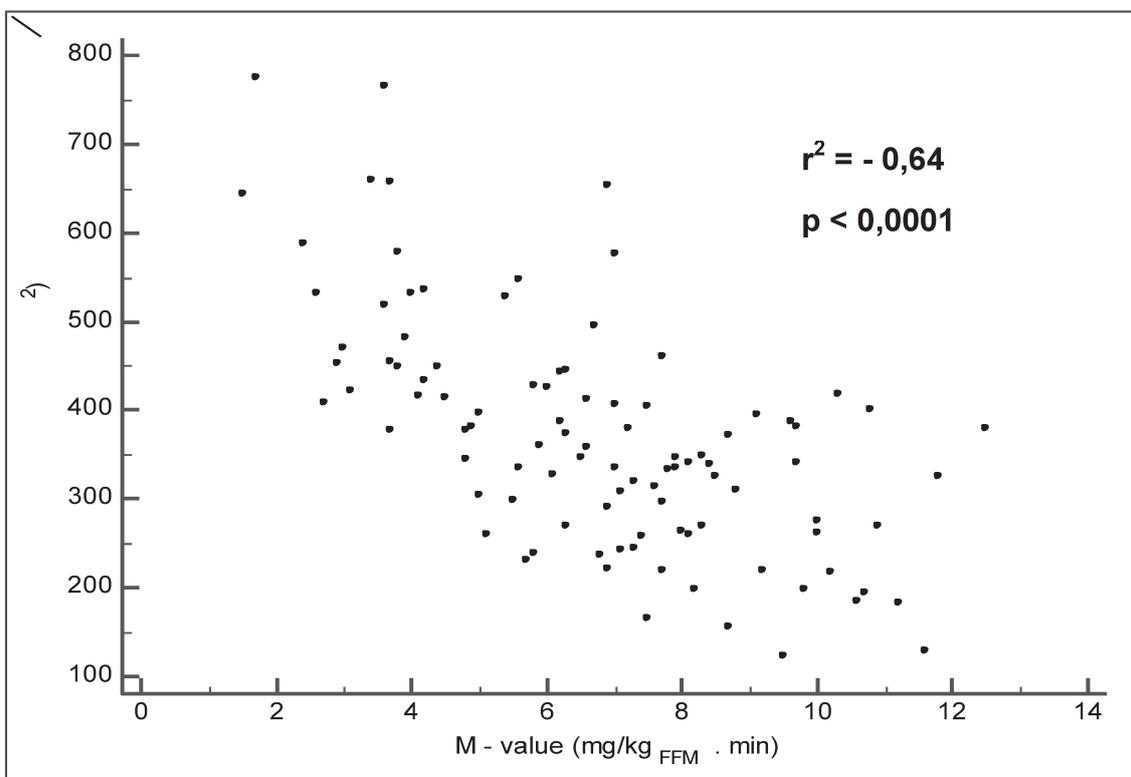


Figura 5 – Correlação entre o M-value ($\text{mg/kg}_{\text{FFA}} \cdot \text{min}$) e o índice fotopleletismográfico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r=-0.64$; $p<0,0001$; 95% Intervalo de confiança: -0.743 a -0.507).

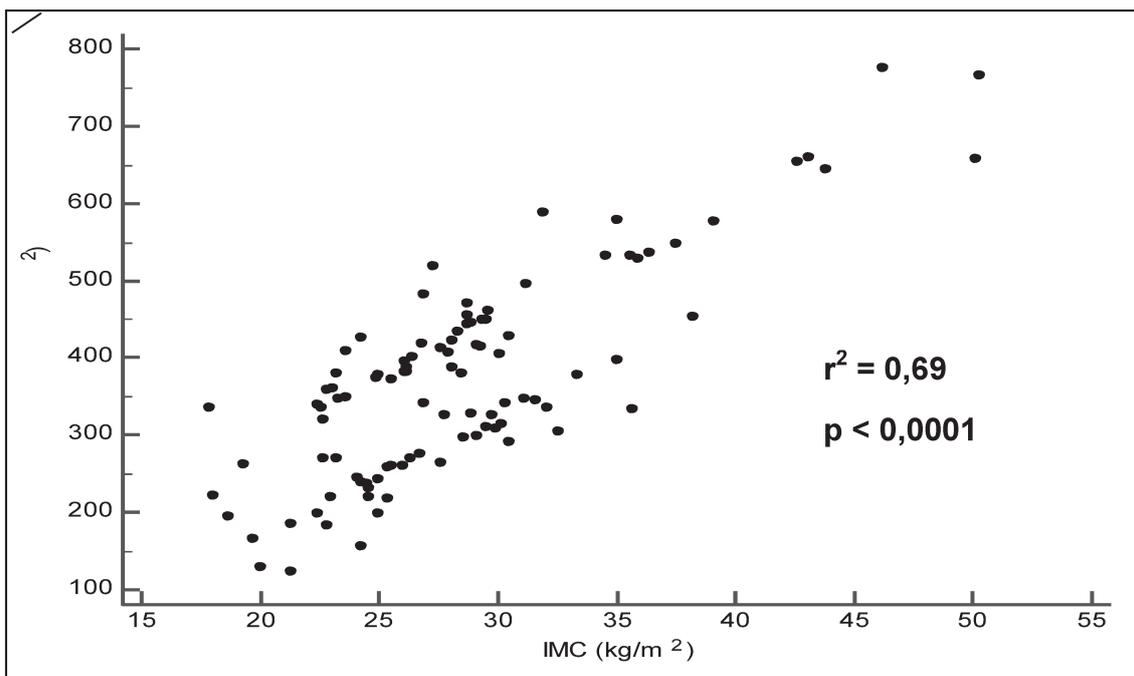


Figura 6 – Correlação entre o IMC (kg/m^2) e o índice fotopletismográfico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r = 0,69$; $p < 0,0001$; 95% Intervalo de confiança: 0,568 a 0,779).

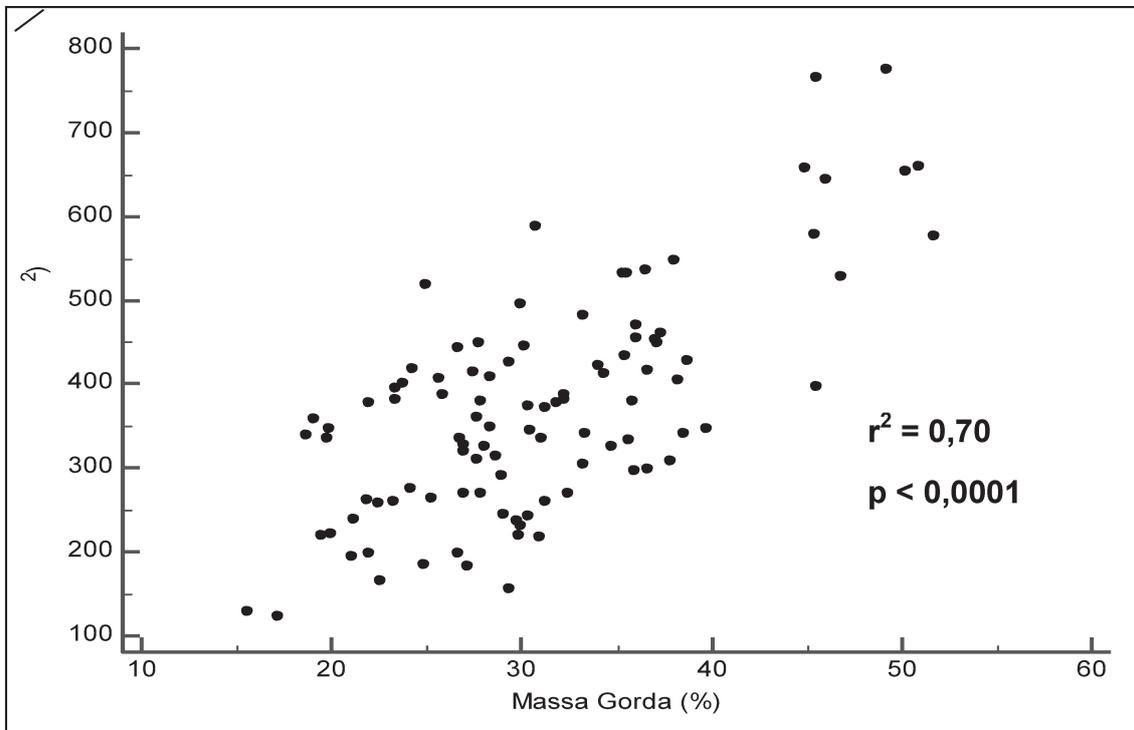


Figura 7 – Correlação entre Massa Gorda (%) e o índice fotopletismográfico, PPG-TP (m/s^2) em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r = 0,70$; $p < 0,0001$; 95% Intervalo de confiança: 0,589 a 0,791).

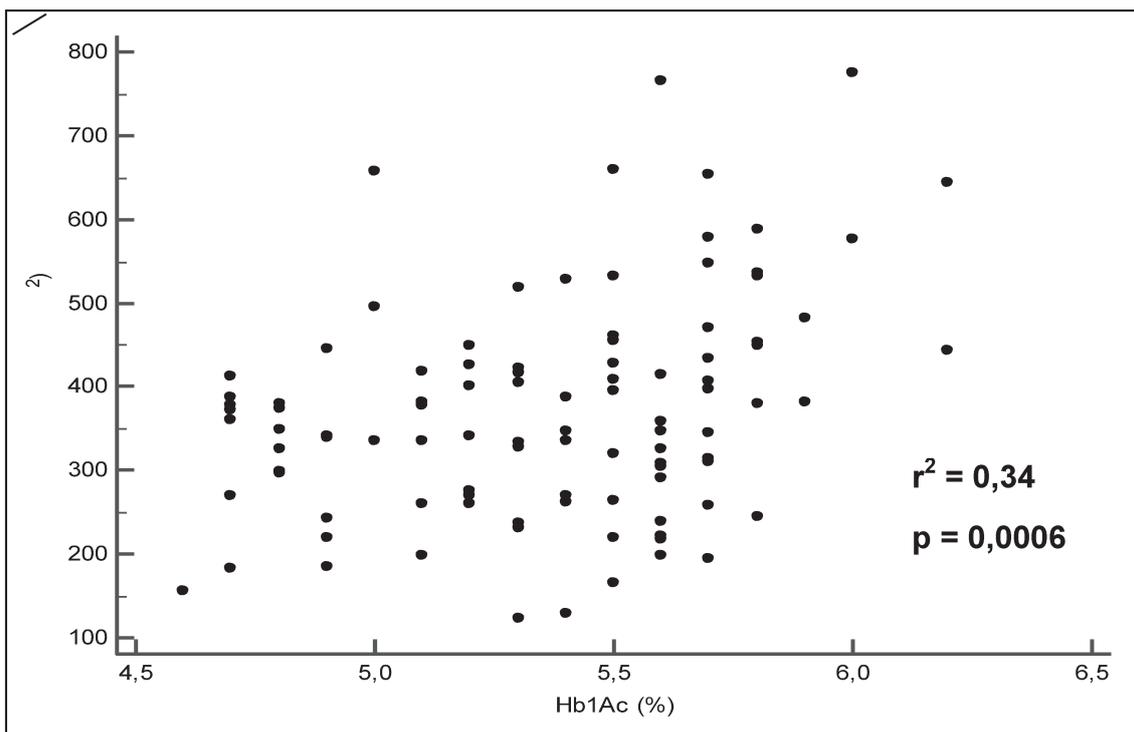


Figura 8 – Correlação entre HbA1c (%) e o índice fotopletismográfico, PPG-TP (m/s^2), em indivíduos não diabéticos ($n=100$) ($r = 0,34$; $p=0,0006$; 95% Intervalo de confiança: 0,153 a 0,501).

A análise da curva ROC mostrou que o ponto de corte mais relevante para a detecção de resistência à insulina foi um PPG-TP $>406,2$ (m/s^2). Com este ponto de corte a curva apresentou sensibilidade = 95,7%, especificidade = 84,4%, e área sob a curva (AUC) = 0,929 na identificação da resistência à insulina (Figura 10). Analisando separadamente o grupo do sexo feminino, a curva ROC apresentou sensibilidade = 100,0%, especificidade = 85,4% e AUC = 0,926 (PPG $> 405,2$) (Figura 11); enquanto que no grupo do sexo masculino foi observada sensibilidade = 92,9%, especificidade = 82,4%, e AUC = 0,933 (PPG $>406,2$) (Figura 12). Em todas as análises da curva ROC, as áreas sob as curvas, AUC, apresentaram $p < 0,0001$, demonstrando-se significativas.

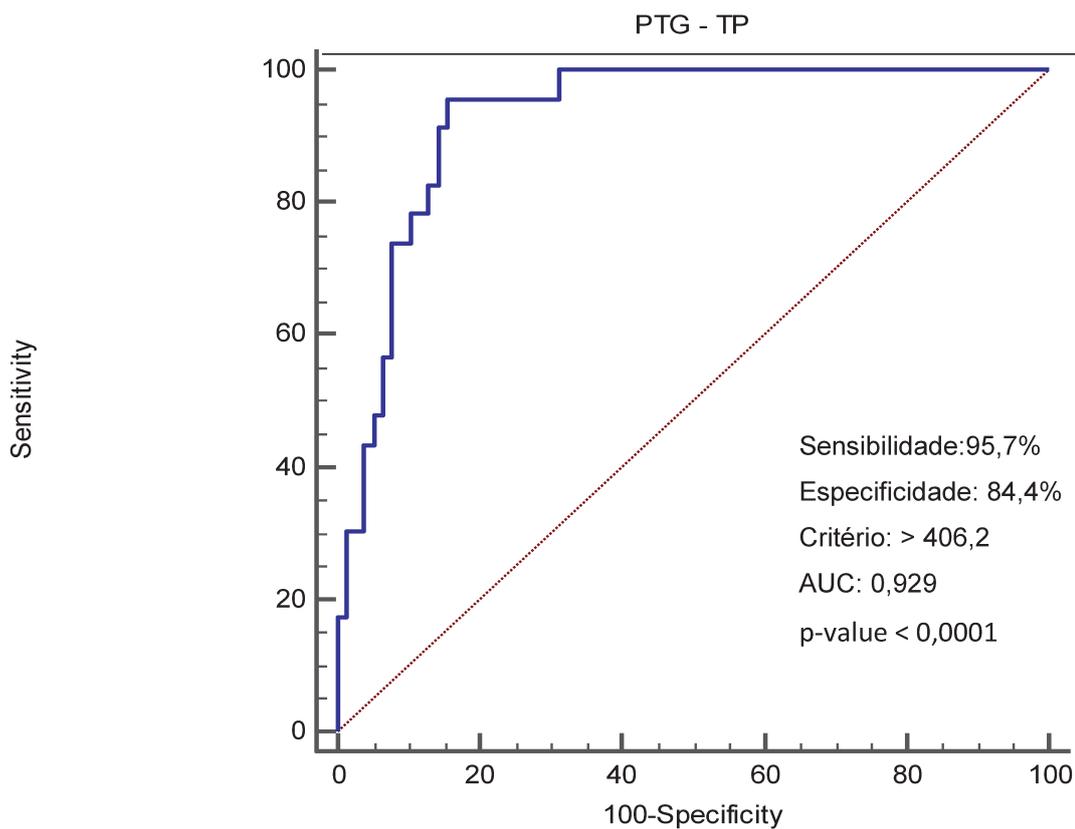


Figura 9 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina (n = 100). (Erro padrão: 0,025; Intervalo de confiança de 95%: 0,860 a 0,971).

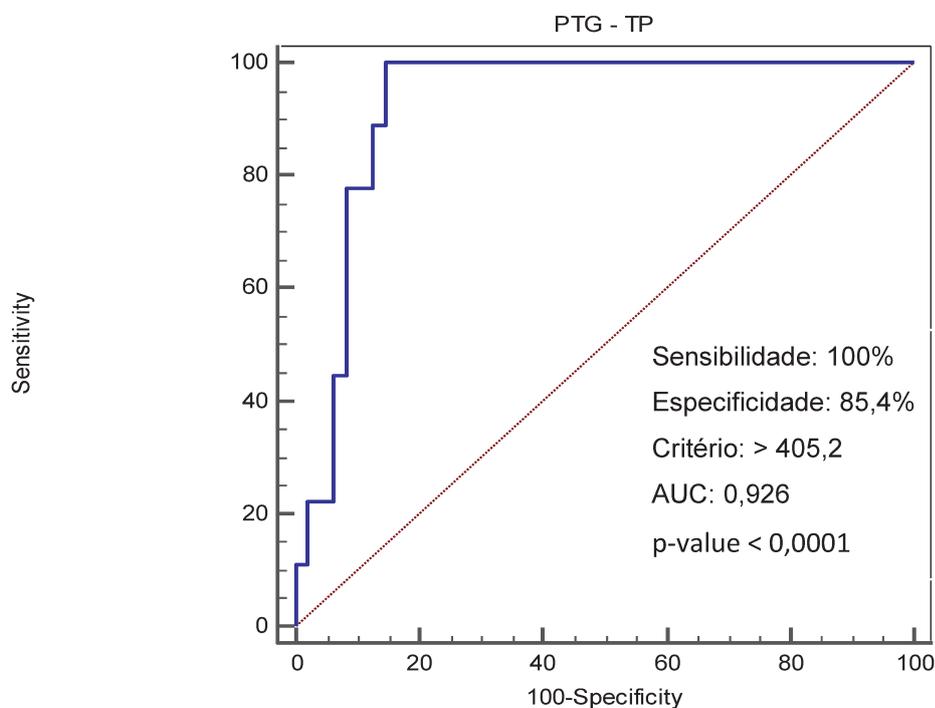


Figura 10 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina no grupo do sexo feminino (n = 53). (Erro padrão: 0,034; Intervalo de confiança de 95%: 0,825 a 0,978).

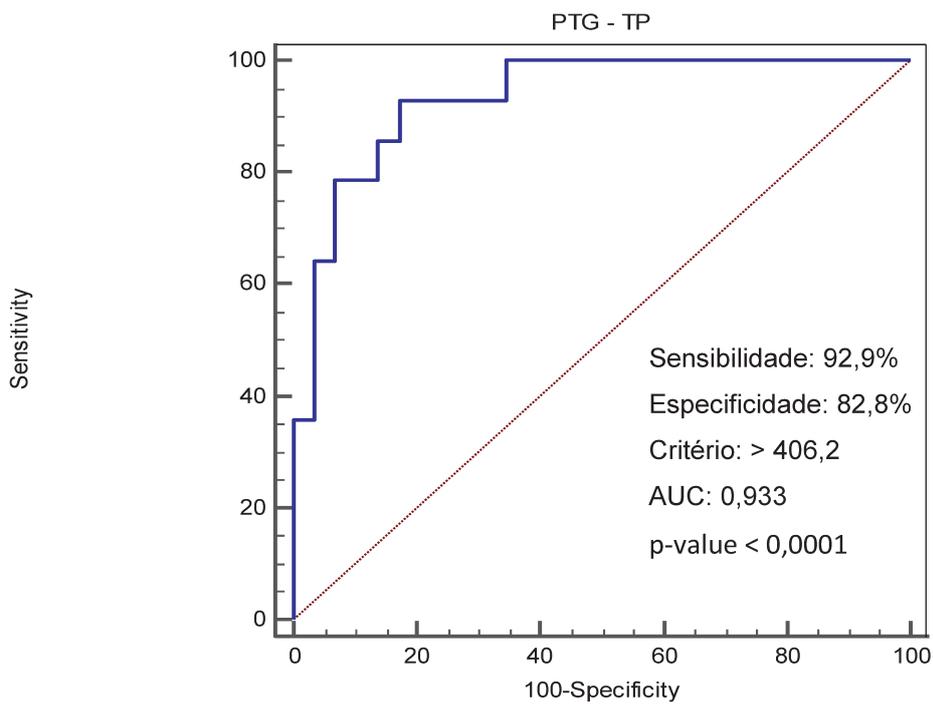


Figura 11 – Análise da curva ROC, utilizando o algoritmo PPG-TP para detectar resistência à insulina no grupo do sexo masculino (n = 47). (Erro padrão: 0,037; Intervalo de confiança de 95%: 0,814 a 0,987).

5. Discussão

Em nosso estudo, o diagnóstico da RI foi realizado através do CEH. Os indivíduos que apresentaram um M-value $< 4,8 \text{ mg / kg}_{\text{FFM}} \cdot \text{min}$ foram considerados resistentes à insulina. Como não há consenso nos valores de corte que definam RI, este valor foi adotado por representar o quartil inferior da distribuição amostral do M-value, obtido em nossa população de estudo, como sugerido em estudos com indivíduos não diabéticos (12,85,87,92).

A prevalência geral de RI foi de 23%. Este resultado é semelhante a RI encontrada em indivíduos não diabéticos na literatura, com prevalências que variam de 20% a 25% (12,16,46). Entretanto, publicações mais recentes apontam para o crescimento da prevalência de RI na população (Stern, 2005). O estilo de vida da sociedade atual, no qual fatores de risco para RI, como sedentarismo e dietas inadequadas, estão presentes em uma parcela crescente da população, corroboram o aumento da prevalência de RI nos estudos mais recentes (139,140).

Assim, como encontrado na literatura (141,142), o grupo do sexo feminino apresentou maior sensibilidade à insulina do que o do sexo masculino. Este resultado pode estar associado às diferenças de sexo quanto à distribuição de gordura abdominal, onde o padrão ginecóide relacionado a fatores como maior adiponectinemia, promoveria maior sensibilidade à insulina (141,143,144).

A prevalência de RI nos indivíduos eutróficos, com sobrepesos e obesos foi de 3,3%, 23,8% e 42,8%, respectivamente. Essa prevalência de RI, aumentando de acordo com a elevação do IMC já era esperada; uma vez que a relação entre RI e obesidade, na qual quanto maior a massa gorda, maior

também será a prevalência de RI, está bem estabelecida na literatura científica (82,145).

Dentro do subgrupo de indivíduos intolerantes à glicose, classificados pela HbA1c, a prevalência de RI foi de 44%. Embora este subgrupo tenha alteração no metabolismo da glicose, é provável que a causa primária dessa alteração, pelo menos em parte destes indivíduos, seja a deficiência secretória das células β pancreáticas, associada a fatores genéticos de predisposição (77,146,147).

Nos estudos de validação e comparação de métodos de avaliação da RI grupos com alteração no metabolismo da glicose são incluídos, visando uma análise ampla do poder diagnóstico do método (16,81,85,91,118,148). Assim, neste grupo é possível avaliar o processo etiológico envolvido na alteração do metabolismo da glicose, RI ou deficiência secretória das células β pancreáticas; e também, considerando a história natural do DM e aumento progressivo da RI, avaliar possíveis diferenças na intensidade da RI (91,95,146,149,150). A discriminação desses diferentes graus de intensidade da RI são importantes na validação dos métodos de avaliação, pois poderão ser úteis no acompanhamento da RI, verificando progressão ou regressão da mesma.

Nas análises de correlação obtivemos correlação negativa moderada entre o M-value e o algoritmo PPG-TP, $r = -0,64$ e $p < 0,0001$. Os principais índices derivados do TTOG, utilizados com maior frequência nas avaliações *in vivo*, foram objeto de correlação com o M-value, do CEH, em diferentes estudos (16,92,97,101–105). As correlações obtidas nestes, variaram de 0,61($p=0,001$) a 0,96 ($p<0,0001$). A correlação obtida em nosso estudo foi semelhante a essa faixa de valores de correlação encontrados. E embora

tenha sido moderada, foi superior a pelo menos três índices, frequentemente usados na prática clínica, avaliados nestes estudos. Sendo eles: a área sob a curva de insulina de Hoenbeck (1984) (92), $r=0,61$ e $p=0,001$; índice de sensibilidade à insulina proposto por Cederholm (1990) (101), $r=0,62$ e $p<0,0001$; e índice de sensibilidade à insulina de Gutt (2000) (102), $r=0,63$ e $p<0,001$.

As correlações do IMC e massa gorda com o PPG-TP encontradas (IMC: $r = 0,69$; Massa gorda: $r = 0,70$), evidenciam a possível associação entre o marcador PPG-TP com a RI. Havendo forte correlação entre IMC e massa gorda com a RI (27,53,82,145,151), seria esperado que o PPG-TP também se correlacionasse bem com a RI, o que de fato ocorreu.

A correlação entre HbA1c e PPG-TP ($r=0,34$), embora fraca, indica que alterações endoteliais consequentes da RI, e captadas pela fotopletismografia, poderiam estar associadas a alterações em moléculas glicadas, como a hemoglobina.

Os resultados da análise da curva ROC na avaliação do desempenho diagnóstico do algoritmo PPG-TP na detecção da RI foram significativos. A sensibilidade e especificidade geral encontrada (sensibilidade = 95,4%, especificidade = 83,0%; $AUC_{ROC} = 0,930$), bem como os resultados por sexo (mulheres: sensibilidade = 100%, especificidade = 83,0%; $AUC_{ROC} = 0,926$; Homens: sensibilidade = 92,2 %, especificidade = 86,7%, $AUC_{ROC} = 0,941$) mostraram resultados mais consistentes do que os obtidos em outros estudos com métodos e índices anteriormente consolidados na avaliação de RI (152). Qu H *et al.* (153), utilizando o HOMA-IR para avaliar a RI em 1.854 americanos de origem mexicana obteve sensibilidade de 64,1%, especificidade de 81,8% e

$AUC_{ROC} = 0,809$ na avaliação do método. Em outro estudo, Lee *et al.* (154), analisando diferentes pontos de corte do HOMA-IR e do QUICKI, obteve 62,8% de sensibilidade, 65,7% de especificidade e $AUC_{ROC} = 0,672$ para o HOMA; e sensibilidade = 61,2%, especificidade = 66,8% e $AUC_{ROC} = 0,671$ para um QUICKI. George *et al.* (155) comparando a insulinemia de jejum, o HOMA-IR, o Quicki e outros índices derivados de TTOG, em obesos jovens, obteve valores da área sob a curva ROC variando de 0,888-0,946.

Em concordância com os resultados dos estudos supracitados, que investigaram, através da curva ROC, métodos de avaliação da RI comuns na prática clínica e pesquisa científica; neste projeto, a sensibilidade, especificidade e AUC_{ROC} encontrados no diagnóstico da RI pelo algoritmo PPG-TP, em comparação com o método padrão-ouro, demonstram a importância e relevância deste novo método como ferramenta de rastreamento da RI, tanto na prática clínica como em populações.

Os resultados por nós encontrados, neste trabalho, podem ser explicados pelas alterações exercidas pela RI na função endotelial vascular. O comprometimento das vias de sinalização da insulina no endotélio, seja pela via de indução do NO_e , ou pela via de expressão da ET-1, poderia levar desde sutis a significantes alterações no fluxo e volume sanguíneo no leito microvascular tecidual, de modo que as mínimas alterações poderiam ser detectadas pela análise espectral fotopleletismográfica (123,132,135).

A inibição do NO_e basal reduz a complacência arterial e aumenta a resistência vascular sistêmica (156). Dessa forma, a RI inibindo a via da Akt/IRS, responsável pela produção de NO_e , alteraria a homeostase vascular endotelial basal (157). Se por um lado a via do NO_e é comprometida na RI, por

outro, a via da MAPK é hiperestimulada pela hiperinsulinemia, resultando no aumento da produção de ET-1. A ET-1, que agindo sobre as células musculares lisas vasculares, promove vasoconstrição e altera a onda de pulso arterial. Além disso, a ET-1 está associada à rigidez arterial, contribuindo também para a perda da homeostase vascular (158). A hiperinsulinemia também pode contribuir com alterações vasculares endoteliais à medida que está associada ao aumento da atividade simpática e atenuação do balanço simpato-vagal (58,74,159).

Tanto a inibição do NO_e quanto a regulação aumentada da ET-1 presentes na RI promovem alterações na onda de pulso arterial, que poderiam ser detectadas pela fotopletismografia. A análise espectral fotopletismográfica poderia discriminar mínimas alterações na homeostase vascular, detectadas pela fotopletismografia e traduzidas através do algoritmo PPG-TP.

Assim, pode-se considerar que a relação entre todas as etapas de evolução do DM, da resistência à insulina, passando pelo estágio de pré-diabetes, até o aparecimento do diabetes propriamente, incluindo suas complicações, poderiam ser analisadas, e identificadas precocemente pela análise espectral fotopletismográfica.

Frente ao atual cenário do DM2, e seu impacto negativo sobre a saúde, sociedade, economia e política pública, o diagnóstico precoce desta doença tornou-se extremamente importante para o seu controle e tratamento. No entanto, 45,8% dos indivíduos diabéticos não são diagnosticados (160). Essa alta prevalência de diabéticos não diagnosticados poderia ser explicada, entre outros motivos, pela lenta progressão do DM2. O início insidioso, com característica oligo/assintomática do DM leva os indivíduos a realizarem os

testes diagnósticos tardiamente, quando complicações micro ou macrovasculares, refletidas em quadros de retinopatia, nefropatia ou doença arterial coronariana, já se instalaram (161,162).

No intuito de incentivar e divulgar o diagnóstico precoce do DM2, a organização mundial da saúde (OMS) recomenda de forma enfática o desenvolvimento de métodos e técnicas de rastreio do DM (163). Considerando-se que a RI, associada a disfunções das células β pancreáticas, precedem o desenvolvimento do DM2 (12,17), o diagnóstico da RI poderia permitir a intervenção médica e / ou alterações do estilo de vida do indivíduo com o objetivo de prevenir ou retardar o aparecimento do DM2, tornando igualmente importante o desenvolvimento de métodos diagnósticos da RI.

Embora existam vários métodos disponíveis para avaliar a RI, os mais precisos consistem em testes de análise *in vivo*; e incluem tanto o CEH, como o teste de tolerância endovenoso à glicose com amostras frequentes (FSIVGTT) (107,108). Estes testes são utilizados em um grande número de estudos como referência para correlação e validação de outros métodos de avaliação da RI (16,155,164,165). Estas técnicas, no entanto, são complicadas, trabalhosas, de alto custo, e em geral, não adequadas para estudos de grande escala ou exames clínicos de rotina. Alternativamente, por apresentar boa correlação com o CEH, ser mais simples e de menor custo, o teste de tolerância oral à glicose (TTOG), além de método diagnóstico para DM e intolerância à glicose, é o método de avaliação *in vivo* utilizado com maior frequência para medir a RI (92,97,105,166). Além destes métodos de avaliação *in vivo* para investigação da RI, índices mais simples, tem sido desenvolvidos, dentre estes índices se destacam o HOMA-IR e QUICKI (97,164,165). Estes

índices possuem boa correlação com o CEH; são mais simples de serem obtidos, uma vez que constituem métodos indiretos de avaliação; e são rápidos, pois não exigem grande período de tempo para que o paciente realize o exame. No entanto, a obtenção destes índices exige pelo menos uma coleta de amostra sanguínea para análise; bem como, estrutura laboratorial mínima para processamento e análise dos parâmetros sanguíneos que irão compor os cálculos necessários ao índice; esses fatores constituem fatores limitantes para a realização de determinados estudos, seja pela ausência de estrutura laboratorial, comum em muitas regiões brasileiras, ou mesmo pela natureza invasiva da coleta sanguínea, aversiva a muitos indivíduos.

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas e utilizadas como alternativas a estes métodos clássicos de avaliação. Essas tecnologias se baseiam na análise de variáveis fisiológicas – captação dessas variáveis, através de biossensores; interpretação e correlação, através de algoritmos específicos e programas computacionais; e avaliação/expressão de resultados e diagnósticos (135,138,167).

Nossos resultados apontam que a fotopleetismografia em conjunto com os novos recursos tecnológicos de processamento e interpretação de dados, através da análise espectral, pode abrir novas perspectivas no diagnóstico e monitoramento da RI.

Estudos sobre a análise fotopleetismográfica tem reforçado a utilização deste método como ferramenta de detecção de alterações endoteliais significativas, associadas tanto a doenças cardiovasculares como a distúrbios metabólicos. A maioria dos estudos, que utilizam de forma específica a análise espectral processada por modelos matemáticos e computacionais, ainda são

incipientes, contudo, demonstram resultados promissores no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e controle.

Em estudo de doença cardiovascular, Gandhi (2014) (132), utilizando outro componente da análise espectral, caracterizado pela soma da amplitude da análise espectral fotopletismográfica, encontrou, através da curva ROC, sensibilidade de 86,1% e especificidade de 87,3% para detectar a disfunção endotelial em pacientes com doença arterial coronariana em comparação com o grupo controle. Já em um estudo metabólico, Lewis (2014) (135), utilizando o mesmo marcador de análise fotopletismográfica do trabalho de Gandhi (2014) (132), demonstrou ao longo do TTOG correlações significativas entre as concentrações de glicose, insulina e peptídeo-C com o PPGi. Este estudo mostra que além das disfunções endoteliais, a análise fotopletismográfica, pode ser correlacionada a estes parâmetros, diretamente alterados na RI. Em um estudo com 1.096 indivíduos, Maarek (2016) (168), utilizando a análise espectral fotopletismográfica encontrou sensibilidade de 78,5% e especificidade de 90,2% na detecção de pacientes diabéticos.

Nossos resultados corroboram estes achados, permitindo verificar que além do uso da análise espectral fotopletismográfica na detecção de doenças já instaladas, essa ferramenta poderia ser utilizada na identificação de alterações precoces que possibilitem a intervenção no processo fisiopatogênico do DM em populações similares às avaliadas neste estudo.

Atualmente o diagnóstico do DM é realizado com base na glicemia e HbA1c (5). Entretanto, antes das alterações destes parâmetros, seja no diagnóstico de DM como de intolerância à glicose, é possível a detecção de RI. Essa detecção precoce permitiria o controle/intervenção na progressão da RI,

evitando ou minimizando a exaustão das células β pancreáticas, e postergando o surgimento do DM, e por conseguinte melhorando a qualidade de vida do indivíduo.

Embora o avanço científico traga melhorias significativas no tratamento do DM, o controle glicêmico absoluto é difícil de ser alcançado, de modo que por maior que seja o acompanhamento e controle, as complicações associadas ao DM, embora em menor intensidade, poderão ocorrer. Assim, a melhor estratégia no controle do DM ainda é prevenção, que pode ser feita através do diagnóstico da RI, e posteriormente intervenção para que haja regressão ou progressão diminuída da mesma (2,19).

O uso da PPG como ferramenta de *screening* seria útil na detecção da RI, trazendo benefícios aos indivíduos e impactando positivamente nos gastos com saúde pública, que hoje emprega uma quantia significativa no tratamento do DM e complicações associadas a essa doença (160)

Frente ao crescente aumento na prevalência do DM, atingindo proporções pandêmicas, programas de saúde pública que incentivem a institucionalização da prevenção do DM, através do diagnóstico precoce da RI, seriam de extrema importância nas estratégias de combate e prevenção do DM e suas complicações.

Neste contexto, a análise espectral da fotopletismografia, através do marcador PPG-TP, pode ser considerada uma ferramenta útil no rastreamento e acompanhamento da RI, especialmente em estudos de grande escala.

O emprego da análise espectral fotopletismográfica, em relação a outros métodos, se justificaria principalmente por caracterizar-se como um método não invasivo, indolor, rápido, de fácil realização, que não requer estrutura

complexa, sem riscos ao indivíduo, e apresentar boa relação custo-benefício. Além disso, demonstrou relevante correlação e poder diagnóstico quando comparado com o CEH, padrão ouro de avaliação da RI.

Além de confirmar o possível uso da análise fotopletismográfica na detecção da RI, nossos resultados abrem perspectivas para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e controle de doenças, que tenham como base a mesma tecnologia e princípio utilizado neste estudo.

6. Conclusão

- A análise espectral da fotopletismografia, de acordo com os resultados obtidos, foi capaz de identificar a RI na população estudada.
- A prevalência de RI na população estudada foi de 23%.
- Através dos índices de sensibilidade, especificidade e AUC da curva ROC, os resultados de detecção da RI pelo marcador PPG-TP em comparação com os resultados de detecção da RI obtidos pelo método padrão ouro, o CEH, foram satisfatórios e significativos na população estudada.

7. Referências

1. Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegón M, Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007; 370:1929–38.
2. Ezzati M, Riboli E, Doll R, Peto R, Ezzati M, Henley SJ, *et al*. Can noncommunicable diseases be prevented? Lessons from studies of populations and individuals. *American Association for the Advancement of Science*; 2016, 337(6101):1482–7.
3. International Diabetes Federation, 2015. Available from:<http://www.idf.org/>
4. WHO | *Global report on diabetes*. WHO. World Health Organization. 2016. Available from: <http://eds.a.host.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid6-8443-ce78@sessionmgr4001&id=4108>
5. Cefalu, W. American Diabetes Association standards of medical care in diabetes—2015. *Diabetes Care*. 2015; 38 (1): 9-10.
6. Tadeu Ferreira L, Hideo Saviolli I, Engrácia Valenti V, Carlos de Abreu L. Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic complications. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*; 2011;36(3):182–8.
7. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997; 20(7): 183–97.
8. Sociedade Brasileira de Diabetes - Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Scientific Research Publish. 2015; Available from: <http://www.scirp.org/reference/Papers.aspx?ReferenceID=1652953>
9. Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and its Burden in the United States. US Department of Health and Human Services. 2014.
10. WHO and ADA criteria for the diagnosis of diabetes mellitus [cited 2016 May]. Available from: <http://eds.a.host.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid6->

8443-ce78@sessionmgr4001&id=4108.

11. Olefsky J, Farquhar JW, Reaven G. Relationship between fasting plasma insulin level and resistance to insulin-mediated glucose uptake in normal and diabetic subjects. *Diabetes*. 22 (7): 507–13.
12. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-1607.
13. Levy J, Atkinson AB, Bell PM, McCance DR, Hadden DR. Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in Type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet Medicine*. 1998; 15(4):290–6.
14. Matthews DR, Cull CA, Stratton IM, Holman RR, Turner RC. UKPDS 26: sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. *Diabet Medicine*. 1998;15(4):297–303.
15. DeFronzo R a. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*. 2004; 88 (4) :787–835.
16. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999; 22 (9) :1462–70.
17. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E *et al*. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non–insulin–dependent diabetes. Prospective Study of Pima Indians. *N Engl J Med*. 1993; 329: 1988–92.
18. Howard B V, Rodriguez BL, Bennett PH, Harris MI, Hamman R, Kuller LH, *et al*. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular disease: Writing Group: epidemiology. *Circulation*. 2002; 105 (18): 132–7.
19. Redberg RF, Greenland P, Fuster V, Pyörälä K, Blair SN, Folsom AR, *et al*. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group III: risk assessment in persons with diabetes. *Circulation*. 2002; 105(18):e144–52.
20. Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L,

et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985; 34 (10):1055–8.

21. MANSON, J EÇ COLDIZ. GRAHAM KC. A prospective study of obesity and risk os coronary disease in woman. *New Engl J Med*; 1990; (13): 332.
22. Sonksen P, Sonksen J. Insulin: understanding its action in health and disease. *British Journal of Anaesthesia*. 2000; 85 (1): 69–79.
23. Cahill GF. The Banting Memorial Lecture 1971. Physiology of insulin in man. *Diabetes*. 1971; 20 (12): 785–99.
24. Himsworth HP. RBK. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clinical Science*. 1939; 4: 119–52.
25. Taylor SI, Accili D, Imai Y. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM?. *Diabetes*. 1994; 43 (6): 735–40.
26. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, *et al.* Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest*. 1988 ; 81(2):435–41.
27. Rao G. Insulin resistance syndrome. *American family physician*. 2001; 63 (6):1159–63, 1165–6.
28. DeFronzo R a, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology*. 1979; 237(3): 214–23.
29. Patti M-E, Kahn CR. The Insulin Receptor - A Critical Link in Glucose Homeostasis and Insulin Action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1998 ; (9): 2 - 4.
30. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest [Internet]*. American Society for Clinical Investigation; 1992; 90 (5): 1839–49.
31. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a

- Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *J Biol Chem.* 271 (49): 1372–8.
32. Czech MP, Corvera S. Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 1999; 274(4):1865–8.
 33. Brozinick JT, Roberts BR, Dohm GL. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes.* 2003; 52 (4): 935–41.
 34. Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Journal;* 1997 (3):839–45.
 35. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2002; 46 (4): 419–25.
 36. Reddy SS, Lauris V, Kahn CR. Insulin receptor function in fibroblasts from patients with leprechaunism. Differential alterations in binding, autophosphorylation, kinase activity, and receptor-mediated internalization. *J Clin Invest [Internet]. American Society for Clinical Investigation;* 1988; 82 (4): 1359–65.
 37. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Investigation;* 1993; 92 (4): 2065–72.
 38. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, *et al.* A Molecular Basis for Insulin Resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of irs-1 and irs-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997; 272 (47): 29911–8.
 39. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with

- Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem.* 2000 ;275(12):9047–54.
40. Hotamisligil GS. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996; 271: 5249:665.
 41. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J Biol Chem.* 2002; 277(2):1531–7.
 42. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, *et al.* Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor B Kinase Complex. *J Biol Chem.* 2002; 277 (50): 48115–21.
 43. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults *JAMA.* 2000; 285(19) 2486–97.
 44. Rigo JC, Vieira JL, Dalacorte RR, Reichert CL. Artigo Original Prevalência de Síndrome Metabólica em Idosos de uma Comunidade: Comparação entre Três Métodos Diagnósticos Prevalence of Metabolic Syndrome in an Elderly Community: Comparison between Three Diagnostic Methods. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93 (2): 85-91.
 45. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, *et al.* Insulin Resistance in Essential Hypertension. *N Engl J Med.* 1987; 317 (6): 350–7.
 46. 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.
 47. Festa A, D’Agostino R, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance

- syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000; 102 (1): 42–7.
48. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Investigation*. 1996; 97 (11): 2601–10.
 49. Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007; 3 (1): 46–56.
 50. Reaven GM, Lerner RL, Stern MP, Farquhar JW. Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. *J Clin Investigation*. 1967; 46 (11): 1756–67.
 51. Golay A, Zech L, Shi M-Z, Chiou Y-Am, Reaven Gm, Chen Y-Di. High Density Lipoprotein (HDL) Metabolism in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus: Measurement of HDL Turnover Using Tritiated HDL*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65 (3): 512–8.
 52. Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM. Insulin Resistance as a Predictor of Age-Related Diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86 (8): 3574–3578.
 53. Capasso I, Esposito E, Pentimalli F, Montella M, Crispo A, Maurea N, *et al*. Homeostasis model assessment to detect insulin resistance and identify patients at high risk of breast cancer development: National Cancer Institute of Naples experience. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013; 32 (1):14.
 54. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes & Metabolism*. 2000; 26(1): 98-106.
 55. Dunaif A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocrine Reviews*. 1997; 18 (6): 774–800.

56. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R. Effects of Metformin on Spontaneous and Clomiphene-Induced Ovulation in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*. 1998; 338 (26): 1876–80.
57. DeFronzo RA. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes*. 1979; 28 (12): 1095–101.
58. Arcaro G. Insulin Causes Endothelial Dysfunction in Humans: Sites and Mechanisms. *Circulation*. 2002; 105 (5): 576–82.
59. Furchgott RF. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Dialogues Cardiovasc Med*. 1980; 288 (1): 373–6.
60. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996; 23 (12): 1082–90.
61. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Federation proceedings*. 1979; 38 (1): 66–71.
62. Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 32 (3): 54–61.
63. Ignarro, Louis J.; Cirino G. Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System. *Journal of Cardiovascular Pharm*. 1999; 34 (6): 879-86
64. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, *et al*. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*; 1999; 99 (9): 1141–6.
65. Arce-Esquivel AA, Bunker AK, Mikus CR, Laughlin MH. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Macro and Microangiopathy. 2013; Intech open science; [cited 2016 Aug 5]; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/56475>
66. Hsueh WA, Lyon CJ, Quiñones MJ. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*. 2004;117(2): 109–17.
67. Hsueh WA, Quiñones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*. 2003; 92 (4): 10–7.

68. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M, *et al.* Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest Investigation*. 2001; 108 (9): 1341–8.
69. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114 (6): 597–605.
70. Schiffrin EL. Oxidative Stress, Nitric Oxide Synthase, and Superoxide Dismutase: A Matter of Imbalance Underlies Endothelial Dysfunction in the Human Coronary Circulation. *Hypertension*. 2008; 51 (1): 31–2.
71. Kim F, Tysseling KA, Rice J, Pham M, Haji L, Gallis BM, *et al.* Free Fatty Acid Impairment of Nitric Oxide Production in Endothelial Cells Is Mediated by IKK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (5): 989–94.
72. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7 (2): 85–96.
73. Fagius J. Sympathetic nerve activity in metabolic control - some basic concepts. *Acta Physiol Scand*. 2003; 177(3):337–43.
74. Muscelli E, Emdin M, Natali A, Pratali L, Camastra S, Gastaldelli A, *et al.* Autonomic and hemodynamic responses to insulin in lean and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 3 (6): 2084–90.
75. Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL. Obesity-Associated Hypertension: New Insights Into Mechanisms. *Hypertension*. 2005; 45 (1): 9–14.
76. Sowers JR. Insulin and Insulin-Like Growth Factor in Normal and Pathological Cardiovascular Physiology. *Hypertension*. 1997; 29 (3): 691–9.
77. Hunter SJ, Garvey WT, Himsworth H., Shipp J., Cunningham R., Russell R. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector

- system. *Am J Med.* 1998; 105 (4): 331–45.
78. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ, Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Comprehensive Physiology.* 2013; 3 (1): 1-58.
79. Salmerón J, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Spiegelman D, Jenkins DJ, *et al.* Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care.* 1997; 20 (4): 545–50.
80. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal.* 2005; 149 (1): 33–45.
81. Tam CS, Xie W, Johnson WD, Cefalu WT, Redman LM, Ravussin E. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care.* 2012; 35 (7): 1605–10.
82. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Investigation.* 1997; 100 (5): 1166–73.
83. Bergman RN, Finegood DT, Ader M. Assessment of Insulin Sensitivity *in Vivo.* *Endocr Reviews.* 1985; 6 (1): 45–86.
84. Tuzcu A, Yalaki S, Arıkan S, Gokalp D, Bahcec M, Tuzcu S. Evaluation of insulin sensitivity in hyperprolactinemic subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Pituitary;*12 (4): 330–4.
85. Stern SE, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP. Identification of Individuals With Insulin Resistance Using Routine Clinical Measurements. *Diabetes.* 2005; 54 (2): 333–9.
86. Hollenbeck C, Reaven GM. Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; 64(6):1169–73.
87. Færch K; Vistisen D. Comment on: Tam *et al.* Defining Insulin Resistance From HyperinsulinemicEuglycemic Clamps. *Diabetes Care* 2012;35:

- 1605–1610. *Diabetes Care - Comments Responses*. 2013; 36:e9.
88. Kim JK. Hyperinsulinemic–Euglycemic Clamp to Assess Insulin Sensitivity In Vivo. 2009; 1: 221–38.
89. Semple RK, Savage DB, Cochran EK, Gorden P, O’Rahilly S. Genetic Syndromes of Severe Insulin Resistance. *Endocr Reviews*. 2011; 32 (4): 498–514.
90. Berson SA, Yalow RS. General principles of radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta*. 1968; 22 (1): 51–69.
91. Wallace TM, Matthews DR. The assessment of insulin resistance in man. *Diabetic Medicine*. 2002; 19 (7): 527–34.
92. Hollenbeck CB, Chen N, Chen Y-DI, Reaven GM. Relationship Between the Plasma Insulin Response to Oral Glucose and Insulin-stimulated Glucose Utilization in Normal Subjects. *Diabetes*. 1984; 33(5): 460–3.
93. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TDR, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: Estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism*. 1979; 28 (11): 1086–96.
94. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Furuta M, Araki-Sasaki R, *et al*. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24 (2): 362–5.
95. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28 (7): 412–9.
96. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. American Physiological Society; 2008; 294 (1): 15–26.
97. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere

- MB. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000; 23 (1): 57–63.
98. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, *et al*. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85 (7): 2402–10.
99. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Fonseca V, Batuman V, Whelton PK, *et al*. Insulin Resistance and Risk of Chronic Kidney Disease in Nondiabetic US Adults. *J Am Soc Nephro*. 2003; 14 (2): 469–77.
100. Mather KJ, Hunt AE, Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Katz A, *et al*. Repeatability Characteristics of Simple Indices of Insulin Resistance: Implications for Research Applications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 86 (11): 5457- 64.
101. Cederholm J, Wibell L. Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990. 10 (2): 167–75.
102. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM, *et al*. Validation of the insulin sensitivity index (ISI_{0,120}): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000; 47 (3): 177–84.
103. Belfiore F, Iannello S, Camuto M, Fagone S, Cavaleri A. Insulin sensitivity of blood glucose versus insulin sensitivity of blood free fatty acids in normal, obese, and obese-diabetic subjects. *Metabolism*. 2001; 50 (5): 573–82.
104. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haeften T. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000; 23 (3): 295–301.
105. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care*. 2001; 24 (3):539–48.

106. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50(2):208–15.
107. Bergman R, Ider Y, Bowden C, Cobelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1979; 236 (6): 667–77.
108. Pacini G, Bergman RN. MINMOD: a computer program to calculate insulin sensitivity and pancreatic responsivity from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *Comput Methods Programs Biomed.* 1986; 23 (2): 113–22.
109. Cobelli C, Pacini G, Toffolo G, Saccà L. Estimation of insulin sensitivity and glucose clearance from minimal model: new insights from labeled IVGTT. *Am J Physiol.* 1986; 250 (5): 591–8.
110. Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, *et al.* Resistência à insulina: métodos diagnósticos e fatores que influenciam a ação da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 1999; 43 (2): 76–85.
111. Geloneze B, Tambascia MA, Pareja JC, Repetto EM, Magna LA. The Insulin Tolerance Test in Morbidly Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Obes Res.* 2001; 9 (12): 763–9.
112. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes.* 1981; 30 (12): 1000–7.
113. Greenfield MS, Doberne L, Kraemer F, Tobey T, Reaven G. Assessment of insulin resistance with the insulin suppression test and the euglycemic clamp. *Diabetes.* 1981; 30 (5): 387–92.
114. Nowak C, Sundström J, Gustafsson S, Giedraitis V, Lind L, Ingelsson E, *et al.* Protein Biomarkers for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Risk in Two Large Community Cohorts. *Diabetes.* 2016; 65 (1): 276–84.
115. Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Comparison of Different Definitions of Pediatric Metabolic Syndrome: Relation to Abdominal

- Adiposity, Insulin Resistance, Adiponectin, and Inflammatory Biomarkers. *J Pediatr*. 2008;152(2):177–84.
116. Zehra Esra Önal, Vildan Atasayan, Tamay Gürbüz, Evrim Hepkaya ÇN. Association of glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels with insulin resistance in obese children. *African Heal Sci*. 2014; 14 (3): 533-38.
 117. Heianza Y, Hara S, Arase Y, Saito K, Fujiwara K, Tsuji H, *et al*. HbA1c 5.7–6.4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet*. 2011;378 (9786): 147–55.
 118. Tahara N, Yamagishi S, Matsui T, Takeuchi M, Nitta Y, Kodama N, *et al*. Serum Levels of Advanced Glycation End Products (AGEs) are Independent Correlates of Insulin Resistance in Nondiabetic Subjects. *Cardiovasc Ther*. 2012; 30 (1): 42–8.
 119. Challoner a VJ, Ramsay C a. A photoelectric plethysmograph for the measurement of cutaneous blood flow. *Phys Med Biol*. 1974; 19 (3): 317–28.
 120. Akdemir Akar S, Kara S, Latifoğlu F, Bilgiç V. Spectral analysis of photoplethysmographic signals: The importance of preprocessing. *Biomed Signal Process Control*. 2013; 8 (1): 16–22.
 121. Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas*. 2007; 28 (3): 1–39.
 122. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure—a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37 (4): 975–84.
 123. Gil E, Orini M, Bailón R, Vergara JM, Mainardi L, Laguna P. Photoplethysmography pulse rate variability as a surrogate measurement of heart rate variability during non-stationary conditions. *Physiol Meas*. 2010; 31(9):1271–90.
 124. Wong J-S, Lu W-A, Wu K-T, Liu M, Chen G-Y, Kuo C-D. A comparative study of pulse rate variability and heart rate variability in healthy subjects. *J Clin Monit Comput*. 2012; 26 (2): 107–14.

125. Hayward CS, Kraidly M, Webb CM, Collins P. Assessment of endothelial function using peripheral waveform analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40 (3): 521–8.
126. Gopaul NK, Manraj MD, Hébé A, Yan SLK, Johnston A, Carrier MJ, *et al.* Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia.* 2001; 44 (6): 706–12.
127. Von Wowern E, Östling G, Nilsson PM, Olofsson P. Digital Photoplethysmography for Assessment of Arterial Stiffness: Repeatability and Comparison with Applanation Tonometry. *PLoS One.* 2015; 10 (8):1-19.
128. Wei C-C. Developing an effective arterial stiffness monitoring system using the spring constant method and photoplethysmography. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013; 60 (1): 151–4.
129. Chang Y-W, Hsiu H, Yang S-H, Fang W-H, Tsai H-C. Characteristics of beat-to-beat photoplethysmography waveform indexes in subjects with metabolic syndrome. *Microvasc Research.* 2016;106(1): 80–7.
130. Gandhi PG, Rao GH. The spectral analysis of photoplethysmography to evaluate an independent cardiovascular risk factor. *Int J Gen Med.* 2014; 7(1) :539–47.
131. Wu H-T, Hsu P-C, Sun C-K, Wang H-J, Liu C-C, Chen H-R, *et al.* Assessment of autonomic dysfunction in patients with type 2 diabetes using reactive hyperemia. *J Theor Biol.* 2013; 330 (1): 9–17.
132. Chuang S-Y, Liao J-J, Chou C-C, Chang C-C, Fang W-C. Spectral analysis of photoplethysmography based on EEMD method. 2015; International Conference on Consumer Electronics - Taiwan. 2015; 1(1): 224–5.
133. Lewis JE, Lantigua L, Atlas SE, Lopez J, Mendez A, Goldberg S, *et al.* A cross-sectional assessment to detect type 2 diabetes with endothelial and autonomic nervous system markers using a novel system. *J Diabetes Metab Disord.* *BioMed Central*; 2014;13 (1):118.

134. Chamberlain JJ, Rhinehart AS, Shaefer CF, Neuman A. Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes. *Ann Intern Med.* 2016; 164(8):542–52.
135. McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R, Berman M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol.* 1976; 41(4): 565–73.
136. Adami CE, Gobato RC, Gestic MA, Cazzo E, Pimentel MU, de Carvalho Ramos M. Correlations of HOMA2-IR and HbA1c with algorithms derived from bioimpedance and spectrophotometric devices. *Obes Surg.* 2012; 22 (12): 1803–9.
137. Edwardson CL, Gorely T, Davies MJ, Gray LJ, Khunti K, Wilmot EG, *et al.* Association of Sedentary Behaviour with Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis. *PLoS One*; 2012; 7(4): e34916.
138. Salvador CCZ, Kitoko PM, Gambardella AMD. Estado nutricional de crianças e adolescentes: fatores associados ao excesso de peso e acúmulo de gordura. *Rev Bras crescimento e Desenvolv Hum. Centro de Estudos de Crescimento e Desenvolvimento do Ser Humano*; 2014;24(3):313–9.
139. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, *et al.* The Concurrent Accumulation of Intra-Abdominal and Subcutaneous Fat Explains the Association Between Insulin Resistance and Plasma Leptin Concentrations: Distinct Metabolic Effects of Two Fat Compartments. *Diabetes.* 2002; 51 (4): 1005–15.
140. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, *et al.* Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care.* 2009; 32 (9): 1678–83.
141. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism.* 1987; 36 (1): 54–9.

142. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1212: E1–19.
143. Lillioja S, Bogardus C. Obesity and insulin resistance: Lessons learned from the Pima Indians. *Diabetes / Metab Reviews.* 1988; 4 (5): 517–40.
144. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE, DeFronzo R, Reaven G, *et al.* The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Investigation.* 1999; 104 (6): 787–94.
145. Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Evron W, *et al.* Pancreatic Beta-Cell Dysfunction as the Primary Genetic Lesion in NIDDM. *JAMA.* 1995; 273 (23): 1855.
146. Hara S, Arase Y, Saito K, Fujiwara K, Tsuji H, Kodama S, *et al.* HbA1c 5.7–6.4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2011; 378 (9786): 147–55.
147. Pfützner A, Langenfeld M, Kunt T, Löbig M, Forst T. Evaluation of human resistin assays with serum from patients with type 2 diabetes and different degrees of insulin resistance. *Clin Lab.* 2003; 49 (11-12): 571–6.
148. Laakso M. How good a marker is insulin level for insulin resistance? *Am J Epidemiol.* 1993; 137(9): 959–65.
149. Despres J-P, Nadeau A, Tremblay A, Ferland M, Moorjani S, Lupien PJ, *et al.* Role of Deep Abdominal Fat in the Association Between Regional Adipose Tissue Distribution and Glucose Tolerance in Obese Women. *Diabetes.* 1989; 38(3): 304–9.
150. Abdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo RA, Stern M. What is the best predictor of future type 2 diabetes? *Diabetes Care.* 2007; 30 (6): 1544–8.
151. Qu H-Q, Li Q, Rentfro AR, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for Americans of Mexican descent using machine learning. *PLoS One.* 2011; 6 (6): e21041.
152. Lee S, Choi S, Kim HJ, Chung Y-S, Lee KW, Lee HC, *et al.* Cutoff values

- of surrogate measures of insulin resistance for metabolic syndrome in Korean non-diabetic adults. *J Korean Med Sci.* 2006; 21 (4): 695–700.
153. George L, Bacha F, Lee S, Tfayli H, Andreatta E, Arslanian S. Surrogate estimates of insulin sensitivity in obese youth along the spectrum of glucose tolerance from normal to prediabetes to diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (7): 2136–45.
154. McVeigh GE, Allen PB, Morgan DR, Hanratty CG, Silke B. Nitric oxide modulation of blood vessel tone identified by arterial waveform analysis. *Clin Sci.* 2000; 100 (4): 387–93.
155. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation.* 2002; 105 (2): 213–7.
156. McEniery CM, Qasem A, Schmitt M, Avolio AP, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42 (11): 1975–81.
157. Bergholm R, Westerbacka J, Vehkavaara S, Seppälä-Lindroos A, Goto T, Yki-Järvinen H. Insulin sensitivity regulates autonomic control of heart rate variation independent of body weight in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(3):1403–9
158. Beagley J, Guariguata L, Weil C, Motala AA. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103 (2): 150–60.
159. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at Least 4-7 yr Before Clinical Diagnosis. *Diabetes Care.* 1992; 15(7):815–9.
160. Thompson TJ, Engelgau MM, Hegazy M, Ali MA, Sous ES, Badran A, *et al.* The Onset of NIDDM and its Relationship to Clinical Diagnosis in Egyptian Adults. John Wiley & Sons, Ltd.; 1996;
161. Team WHO CRD and A. Screening for type 2 diabetes : report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. Geneva : World Health Organization; 2003 [cited 2016 May 4]; Available

from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/68614>

162. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, *et al.* Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000; 85 (7): 2402-10
163. Saad MF, Anderson RL, Laws A, Watanabe RM, Kades WW, Chen Y-DI, *et al.* A Comparison Between the Minimal Model and the Glucose Clamp in the Assessment of Insulin Sensitivity Across the Spectrum of Glucose Tolerance. *Diabetes.* 1994; 43 (9): 1114–21.
164. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1999; 22 (9): 1462–70.
165. Ramachandran A, Moses A, Shetty S, Thirupurasundari CJ, Seeli AC, Snehalatha C, *et al.* A new non-invasive technology to screen for dysglycaemia including diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 88 (3): 302–6.
166. Albert Maarek; Pratiksha G Gandhi; Pr Gundu HR Rao. Identifying Autonomic Neuropathy and Endothelial Dysfunction in Type II Diabetic Patients. [cited 2016 May 5]; Available from: <http://www.ldteck.com/images/pdf/ECNE-02-000013.pdf>
167. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet.*; 2016; 387 (10027): 1513–30.
168. McAuley KA, Williams SMS, Mann JI, Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Temple LA, *et al.* Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care.* 2001; 24 (3): 460–4.
169. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2003; 46(1):3–19.
170. Ferrannini E, Natali A. Essential hypertension, metabolic disorders, and

insulin resistance. *Am Heart J.* 1991; 121(4):1274–82.

171. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297(3): 568–77.
172. Natali A, Taddei S, Quiñones Galvan A, Camastra S, Baldi S, Frascerra S, *et al.* Insulin sensitivity, vascular reactivity, and clamp-induced vasodilatation in essential hypertension. *Circulation.* 1997; 96 (3): 849–55.

8. Anexos

8.1. Artigo submetido a publicação na revista *Diabetes and Its Complications*

Spectral analysis of photoplethysmography for detecting insulin resistance

Aglecio Luiz De Souza*^a, Gisele Almeida Batista^a, Sarah Monte Alegre^a.

^a Department of Internal Medicine - Faculty of Medical Sciences - State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author:

Aglecio Luiz De Souza, MSc

Internal Medicine Department, State University of Campinas (Unicamp), 126 Alexandre Fleming Street, Campinas, SP, 13083970, Brazil. Tel.: +55 19 3521-7155; fax: +55 19 3289-4107. E-mail address: aglecios@fcm.unicamp.br (A. L. De Souza).

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of interest: none

Abstract

Aims: We aimed to examine the ability of spectral analysis of photoplethysmography (PTG) to detect insulin resistance (IR).

Material and method: A total of 100 nondiabetic subjects, 43 men and 57 women aged 20–63 years, 30 lean, 42 overweight and 28 obese were enrolled in the study. These patients underwent the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) and examination with the PTG spectral analysis and calculation of the PTG Total Power (PTG-TP). Receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed to determine the specificity and sensitivity of PTG-TP in detecting insulin resistance.

Results: There is a moderate correlation between insulin sensitivity (M-value) and PTG-TP ($r = -0.64$, $p < 0.0001$). The ROC curves showed that the most relevant cutoff to the whole study group was a $PTG-TP > 406.2$. This cut-off had a sensitivity = 95.5%, specificity = 83.3% and the area under the ROC curve (AUC) = 0.932 for identifying insulin resistance. All AUC ROC curve analysis were significant ($p < 0.0001$).

Conclusion: The use of the PTG-TP marker measured from the PTG spectral analysis is a useful tool in screening and follow up of IR, especially in large-scale studies.

Keywords: Insulin Resistance, Photoplethysmography, Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp

Introduction

The prevalence of diabetes mellitus (DM), which type 2 diabetes mellitus (T2DM) represents 85–95% of cases of diabetes in adults (Centers for Disease Control and Prevention, 2014), has increased dramatically to pandemic proportions; Its global prevalence was 8.5% of the world population in 2014, 422 million adults, and is predicted to rise 11,6% by 2025 (NCD Risk Factor, 2016). Due to its high prevalence, chronic course, morbidity and mortality, T2DM has become one of the most challenging public health problems in the world. This problem is also reflected in the heavy economic burden placed on the global health care system.

A higher prevalence of insulin resistance was found in impaired glucose tolerance (IGT) and T2DM subjects. Impaired glucose tolerance is an intermediate stage between normal glucose tolerance and overt diabetes (Lillioja *et al.*, 1993; Reaven, 1988).

Insulin resistance (IR) has long been recognized as a strong predictor of T2DM, because it is a major underlying factor in the T2DM pathogenesis (Lillioja *et al.*, 1993; Reaven, 1988). In addition, IR has been identified as a risk factor for many other diseases, including endothelial dysfunction and cardiovascular disease (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Steinberg *et al.*, 1996). IR is a state in which physiologic concentrations of insulin produce a subnormal biologic response and this disturbance contributes to the defects in insulin action and insulin secretion in T2DM disease. Thus, the ability to measure and diagnose insulin resistance is important in order to understand the etiology of T2DM, to examine the epidemiology, and to prevent or delay T2DM and its complications.

Several methods have been employed to assess insulin sensitivity/resistance both in individuals and in study populations. The gold standard for assessing insulin sensitivity is the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC), which measures the whole body insulin sensitivity in vivo because it directly measures the capacity of insulin to promote glucose utilization under steady-state conditions (DeFronzo *et al.*, 1979). However, due to the costs of highly trained personnel, and the labor-intensive, time-consuming, and invasive nature of the method, it is not practical or applicable in large-scale epidemiological studies.

For epidemiologic and clinical studies, surrogate measures of insulin resistance have been developed based on mathematical models derived from metabolic blood parameters. These surrogate measures provide a simple estimate for whole body insulin

sensitivity with excellent results to predict insulin sensitivity comparable to those of the HEC, and therefore they have been widely used in large scale investigations (Hara *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2000; Matsuda & DeFronzo, 1999; Matthews *et al.*, 1985; McAuley *et al.*, 2001). Yet, even though these methods are simpler, less expensive, and less laborious than the HEC method, they are still problematic when applied in a large number of subjects because they require at least one blood sampling and a laboratory setting for blood analysis and storage. Therefore, the development of new approaches, which are inexpensive, accurate, and non-invasive to evaluate insulin resistance and hence T2DM prevention, have become important in clinical investigations and large-scale studies.

Photoplethysmography (PTG) is an optical measurement technique that can be used to detect blood volume changes in the microvascular bed of tissue (Challoner & Ramsay, 1974). PTG has widespread clinical application as a clinical physiological monitoring, vascular assessment and autonomic function (Allen, 2007; Challoner & Ramsay, 1974). PTG has been intensively investigated in different clinical settings and studies, including heart rate variability analysis (Wong *et al.*, 2012), endothelial dysfunction (Gopaul *et al.*, 2001; Hayward *et al.*, 2002), metabolic syndrome (Chang *et al.*, 2016), and diabetes (Gandhi & Rao, 2014; Wu *et al.*, 2013). In fact, a wide variety of algorithms and models derived from PTG analysis have been proposed to study and understand diseases which autonomic nervous system and vascular function could be affected, including diabetes and metabolic disorders (Chuang *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2014).

In this study, we investigate the ability of the spectral analysis of the PTG to identify insulin resistance in nondiabetic subjects, comparing the M-value of the HEC.

Research Design and Methods

Subjects:

The study was approved by the ethics committee of the Faculty of Medical Sciences – State University of Campinas (UNICAMP), and adheres to the ethical principles of the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent to participate in the study, including permission to use their data for research purposes. This was a cross-sectional study. A total of 100 subjects, 43 men and 57 women aged 20–63 years, were studied. Participants were recruited by voluntary participation through advertising amongst the university community. They were invited

to attend a health assessment following a minimum fasting period of 8 hours. The health assessment included the completion of a detailed medical questionnaire, physical examination, anthropometric measurements, and blood tests. The inclusion criteria were fasting plasma glucose (FPG) <7.0 mmol/L and HbA1c <6.5%, featuring nondiabetic individuals, according to the revised American Diabetes Association criteria (Chamberlain *et al.*, 2016); and good general health as determined by physical examination and medical questionnaire. The Subjects excluded from the study were individuals: 1) who had major organ disease involving the heart, lung, kidney or the nervous system, and other endocrine diseases; 2) taking drugs known to affect glucose homeostasis; were pregnant; had erratic, accelerated, or mechanically-controlled irregular heart rhythms; 3) wore an automatic external defibrillator device; had arterial fibrillation or flutter; 4) had atrioventricular block; had any implanted electronic device; 5) had dyes recently introduced into the bloodstream, such as methylene blue, indocyanine green, indigo carmine, and fluorescein; 6) had significant levels of dysfunctional hemoglobin, such as carboxyhemoglobin or methemoglobin; 7) had any condition restricting blood flow, such as severe systemic vascular resistance; and/or 8) worn fingernail polish or false fingernails during the testing. Any of these factors could affect the accuracy of peripheral oxygen saturation of arterial hemoglobin (SpO₂%) measurement from the pulse oximeter.

Experimental procedures and analytical methods

Body mass index (BMI) was calculated based on the ratio between body mass (in kg) and squared height (in meters). In all of the study subjects, body composition was evaluated by electrical bioimpedance with a Biodynamics monitor (Biodynamics Corp., Seattle, WA, USA). Arterial blood pressure was measured by aneroid sphygmomanometer. Plasma glucose was measured with the glucose oxidase method using an YSI glucose analyzer (YSI 2300-Stat Plus analyzer; YSI, Yellow Springs, OH, USA). Glycosylated hemoglobin (HbA1c) was measured by high performance liquid chromatography method using a HPLC Variant II (BioRad Inc., Hercules, CA, USA).

Clamp study:

The hyperinsulinemic euglycemic clamp study, which was carried out after an overnight (12 to 14 hours) fast, consisted of 2 hours of euglycemic insulin infusion at a rate of 40 mU/min per meter squared of body surface area, and was preceded by a 2-

hour control period as previously described (DeFronzo *et al.*, 1979). Intracatheters were inserted into an antecubital vein for the infusion of insulin and glucose. A second catheter was inserted retrogradely into a wrist vein, and the hand was placed in a heated box (50-60 °C) for the sampling of arterialized blood. The infusion was adjusted according to glucose determinations made every 5 minutes on a glucose analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). For calculation of insulin sensitivity, the glucose disposal rate (M-value) (milligrams per kilogram per minute) was calculated from the infusion rate of exogenous glucose during the second hour of the insulin clamp period, M-value was normalized per kg fat-free mass (FFM). M-value < 4.8 mg/kg_{ffm}·min was considered as a diagnosis of Insulin resistance.

Spectral Analysis of Photoplethysmography

The fingertip oximeter of ES Complex system device (LD Technology, Miami, Florida, USA) were used to assess photoplethysmography (Adami *et al.*, 2012) (Figure1). The fingertip oximeter is a simple and noninvasive optical technique, which is comprised of a pulsatile physiological waveform or photoplethysmography (PTG) attributed to cardiac synchronous changes in the artery blood volume with each heartbeat and it is used to estimate the skin blood flow using infrared light (Allen, 2007). The oximeter was placed on the right index finger, and it displays in real time the photoelectrical plethysmography waveform, and the signal processing analysis of the waveform allows to determine PTG-TP by the ES Complex software (Adami *et al.*, 2012; Gandhi & Rao, 2014). The PTG contour analysis has been described in various studies in Asia, Europe, and the United States (Allen, 2007; Chang *et al.*, 2016; Gandhi & Rao, 2014; Wong *et al.*, 2012).

In the present study, the PTG contour has been analyzed in first using the first derivative (FD) and then using the fast Fourier transform (FFT) (Figure 2). The PTG spectral analysis, using Fast Fourier Transforms (FFT) of the total records of the oximeter wave form provides 3 frequencies – High (HF) (From 2.57 to 5 Hz and 2 peaks at 3.2 Hz and 4.58Hz), low (LF) (from 1.47 to 2.56 Hz and peak at 2 Hz) and very low frequencies (VLF) (from 0 to 1.46 Hz and Peak at 1.16 Hz). Each frequency area was measured in millisecond square (ms²) (Gandhi & Rao, 2014; Lewis *et al.*, 2014). The harmonic components are expressed in amplitude (in Volt/second or V.s unit), width (in Hertz or Hz unit) and surface or power (in square millisecond or ms² unit).

The PTG Total Power or PTG-TP is the sum of the 3 surfaces or powers of VLF, LF and HF.

Statistical Data Analysis

The objective of the study was to examine the ability of PTG-TP to detect insulin resistance (M-value < 4.8). Statistical analysis was performed to correlate M-value and PTG-TP using the Spearman's coefficient. We compared groups by using independent-sample t tests. Receiver-operating characteristic curves were constructed to determine the specificity and sensitivity of PTG-TP in detecting M-value < 4.8. Data are reported as means \pm SEM. A p-value <0.05 was considered statistically significant. Based upon the preliminary study results to have 90% power to detect a significant difference between Insulin sensitivity subjects with the above mean and standard deviation at alpha =0.05. Analyses were performed using MedCalc software for Windows (version 12.6.1, Ostend, Be).

Results

A total of 100 subjects, 30 lean, 42 overweight and 28 obese, classified according to BMI, were enrolled in the study. The mean BMI was 28.1 Kg/m² (range 17.9-50.3). Baseline characteristics of the study subjects stratified by insulin resistance were shown in table 1. IR as evaluated by HEC was presented in 23% of the subjects, which had an M-value < 4.8. Women were presented at 15.8% of the IR prevalence, while men were presented 32.6%. The BMI, Fat mass and PTG-TP were significantly higher for subjects with IR than those without IR (Table 1).

Figure 3 depicts a moderate correlation between M-value and PTG-TP ($r = - 0.64$, $p < 0.0001$), which were observed in table 2 in comparison with distinct insulin resistance indices.

The ROC analysis showed that the most relevant cutoff to the whole study group was a PTG-TP > 406.2. This cut-off had a sensitivity= 95.7%, specificity = 84.4% and AUC=0.929 for identifying insulin resistance (Figure 4). In a separate ROC analysis, the women group presented a sensitivity=100.0%, specificity=85.4% and AUC= 0.926 (cutoff > 405.2); while the men group was observed at a sensitivity= 92.9%, specificity=82.4% and AUC=0.933 (cutoff >406.2). All AUC ROC curve analysis were significant ($p < 0.0001$).

Discussion

Given the rising global burden of diabetes, and its impact on human health, society, economics, and public policy, the early diagnosis of this disease has become exceedingly important for its control and treatment. However, 45.8% of diabetic individuals go undiagnosed (Beagley *et al.*, 2014). This high prevalence of undiagnosed diabetics could be explained, among other reasons, by the slow progression of T2DM. The slow onset and/or asymptomatic feature of DM leads individuals to perform diagnostic tests much later, when micro or macrovascular complications, such as retinopathy, nephropathy, and coronary artery disease, have appeared (Thompson *et al.*, 1996). In order to perform earlier diagnosis of DM, the World Health Organization has recommended the development of methods and techniques for screening DM (WHO, 2003). Insulin resistance predicts the development of type 2 diabetes (Lillioja *et al.*, 1993; Reaven, 1988). The increase of IR and beta cell dysfunction has been viewed as the trigger for the onset of T2DM (Ferrannini & Natali, 1991; Kahn, 2003). Thus an IR diagnosis could enable a medical intervention and / or changes to an individual's life style to prevent or delay the onset of T2DM.

Although several methods have been available for making definitive measurements for IR, the most accurate are in vivo assessments, including the intravenous glucose tolerance test with frequent samples (FSIVGTT) (Pacini & Bergman, 1986) and HEC - which are used as a reference for correlation and validation of other methods for IR assessment (George *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2000; Matsuda & DeFronzo, 1999). These techniques, however, are complicated, labor intensive, expensive and, in general, not suitable for large-scale studies or routine clinical work. The oral glucose tolerance test (OGTT) is another in vivo test, and it is the most often used to measure IR because it is simple, less expensive, and has a good correlation with the HEC (Cederholm & Wibell, 1990; Gutt *et al.*, 2000; Hollenbeck, 1984; Mari *et al.*, 2001; Matsuda & DeFronzo, 1999; Stumvoll *et al.*, 2000). Surrogate measures of insulin sensitivity have been developed from OGTT. These indices correlate reasonably well with IR measured by the HEC (Cederholm & Wibell, 1990; Gutt *et al.*, 2000; Mari *et al.*, 2001; Matsuda & DeFronzo, 1999; Stumvoll *et al.*, 2000). Besides the traditional in vivo methods to investigate IR, another index was developed to measure IR in large-scale studies. The HOMA-IR and QUICKI are the most used indices, because they are simple and have a good correlation with the HEC (Bonora *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2000). Although these methods are the most used in the IR assessment in

epidemiological studies, they required a blood specimen for analysis; which may represent a limitation in some studies. Various technologies have been developed and employed as alternatives to these methods. These technologies have been based on physiological variables - inputs derived through biosensors; variable interpretation and correlation through specific algorithms; and output assessment/diagnosis (Adami *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2014).

In our study, adopting a cutoff M-value $< 4.8 \text{ mg/kg}_{\text{ffm}} \cdot \text{min}$ to detect IR, the overall prevalence of IR was 23% in subjects studied. This result is similar to the IR prevalence found in non-diabetics who were shown in the literature to be between 20 to 25% (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Matsuda & DeFronzo, 1999; Reaven, 1988). Women had higher insulin sensitivity results than men; these results may be associated with gender differences in abdominal fat distribution, in which the standard gynoecia distribution and related to factors, such as higher adiponectinemia, promotes high insulin sensitivity (Deng & Scherer, 2010). The prevalence of IR in normal weight, overweight and obese subjects was 1, 8 and 12%, respectively. As an established relationship between IR and obesity (Ferrannini *et al.*, 1997).

The ROC curve analysis results were very significant to evaluate the PTG-TP algorithm in IR diagnostic performance. The PTG-TP sensitivity and specificity overall results (sensitivity 95.7%, specificity = 84.4%; $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.929$), and results by gender (women: sensitivity = 100%, specificity = 85.4%; $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.926$; Men: Sensitivity = 92.9%, Specificity = 82.4%, $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.933$) show better results compared to those obtained in other studies using consolidated methods and indices for IR assessment (Abdul-Ghani *et al.*, 2007). For instance, Qu H *et al.*(2011) , using HOMA-IR to assess the IR in 1854 Americans of Mexican descent had a sensitivity of 64.1% and specificity of 81.8%, $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.809$. In another study Lee *et al.*(2006), analyzing a different cutoffs in HOMA and Quick, had a 62.8% sensitivity and 65.7% specificity with $\text{AUC} = 0.672$ for HOMA, and sensitivity = 61.2% and specificity = 66.8%, $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.671$ for a QUICKI. In a study of obese youth, George *et al.* (2011) comparing fasting insulin, HOMA-IR, Quick, and derived indices from OGTT obtained a AUC_{ROC} curve range from 0.888 to 0.946.

In accordance with the aforementioned studies' data, the sensitivity, specificity and AUC_{ROC} found in PTG-TP IR screening, compared with the gold standard method, showed the significance and relevance of this new method as a practical screening tool in clinical practice and also for large-scale studies.

Indeed, our results showed a moderate correlation between HEC and the PTG-TP algorithm ($r = -0.64$, $p < 0.0001$). This correlation was similar to those found in the other IR studies (Belfiore *et al.*, 2001; Cederholm & Wibell, 1990; Gutt *et al.*, 2000; Hollenbeck *et al.*, 1984; Katz *et al.*, 2000; Mari *et al.*, 2001; Matsuda & DeFronzo, 1999; Stumvoll *et al.*, 2000) (table 2).

Our results could be explained in the relationship between the pathogenesis of insulin resistance, autonomic nervous system (ANS) and endothelial responses. In addition to the metabolic homeostasis, insulin plays an important role in haemodynamic homeostasis. At the cellular level, balance between phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent insulin-signaling pathways that regulate endothelial NO production and mitogen activated protein kinase (MAPK)-dependent insulin-signaling pathways regulating the secretion of the vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) determines the vascular response to insulin. Diminished sensitivity to the vascular actions of insulin is typically accompanied by reduced PI3K-NO pathway and heightened MAPK-ET-1 pathway (Natali *et al.*, 1997; Potenza *et al.*, 2009). These changes coupled with the metabolic abnormalities, that include glucotoxicity, lipotoxicity, and inflammation also lead to endothelial dysfunction. On the other hand, the hyperinsulinemia, present in IR state, was associated with increased sympathetic activity and attenuation of sympathetic/vagal balance; both processes, consequently, may lead to vascular dysfunction (Arcaro, 2002; Muscelli *et al.*, 1998).

Thus, in IR state autonomic and endothelial dysfunction, associated with the loss of insulin action, lead to changes in the PTG spectral analysis, which was evaluated by the PTG-TP.

Thereby, a link exists between all the evolving steps of diabetes from insulin resistance to prediabetes, the onset of diabetes, diabetes complications, and the PTG spectral analysis.

The main clinical interest in IR detection is the prevention of T2DM, as well as its related diseases. The early diagnosis of IR could prevent or prolong the onset of T2DM, and it could positively impact the health of individuals, as well as control public health expenditures which are strongly impacted by T2DM.

Although many methods have been proposed for screening individuals in the general population, the methods were always invasive, and required a minimum apparatus to execute. In this context, the PTG-TP marker, which uses only a pulse oximeter, has significant advantages in comparison with other methods. These

advantages are: ease of use, non-invasive approach, no complex structure, and is extremely cost effective.

Therefore, in conclusion the use of the PTG-TP marker measured from the PTG spectral analysis is a useful tool in screening and follow up of IR, especially in large-scale studies.

Adverse Events

No adverse events are reported with the use of the device and during the HEC or PTG tests.

Acknowledgments:

The authors want to thank the health care professionals at UNICAMP hospital who assisted with surveillance in their respective facilities, including the Metabolic Unit Laboratory personnel. The authors also want to thank LD Technology for providing the medical device and ES Complex software, which was used during the study.

References

- Abdul-Ghani, M. A., Williams, K., DeFronzo, R. A., & Stern, M. (2007). What is the best predictor of future type 2 diabetes? *Diabetes Care*, *30*(6), 1544–1548.
<http://doi.org/10.2337/dc06-1331>
- Adami, C. E., Gobato, R. C., Gestic, M. A., Cazzo, E., Pimentel, M. U., & de Carvalho Ramos, M. (2012). Correlations of HOMA2-IR and HbA1c with algorithms derived from bioimpedance and spectrophotometric devices. *Obesity Surgery*, *22*(12), 1803–9.
<http://doi.org/10.1007/s11695-012-0683-3>
- Allen, J. (2007). Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiological Measurement*, *28*(3), R1–39. <http://doi.org/10.1088/0967-3334/28/3/R01>
- Arcaro, G. (2002). Insulin Causes Endothelial Dysfunction in Humans: Sites and Mechanisms. *Circulation*, *105*(5), 576–582. <http://doi.org/10.1161/hc0502.103333>
- Beagley, J., Guariguata, L., Weil, C., & Motala, A. A. (2014). Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *103*(2), 150–60.
<http://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.001>
- Belfiore, F., Iannello, S., Camuto, M., Fagone, S., & Cavaleri, A. (2001). Insulin sensitivity of blood glucose versus insulin sensitivity of blood free fatty acids in normal, obese, and obese-diabetic subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *50*(5), 573–82.
<http://doi.org/10.1053/meta.2001.22518>

- Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R. C., Saggiani, F., Zenere, M. B., ... Muggeo, M. (2000). Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, *23*(1), 57–63. <http://doi.org/10.2337/diacare.23.1.57>
- Cederholm, J., & Wibell, L. (1990). Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *10*(2), 167–175. [http://doi.org/10.1016/0168-8227\(90\)90040-Z](http://doi.org/10.1016/0168-8227(90)90040-Z)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). *National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and its Burden in the United States*. US Department of Health and Human Services.
- Challoner, a V. J., & Ramsay, C. a. (1974). A photoelectric plethysmograph for the measurement of cutaneous blood flow. *Physics in Medicine and Biology*, *19*(3), 317–328. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/19/3/003>
- Chamberlain, J. J., Rhinehart, A. S., Shaefer, C. F., & Neuman, A. (2016). Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes. *Annals of Internal Medicine*, *164*(8), 542–552. <http://doi.org/10.7326/M15-3016>
- Chang, Y.-W., Hsiu, H., Yang, S.-H., Fang, W.-H., & Tsai, H.-C. (2016). Characteristics of beat-to-beat photoplethysmography waveform indexes in subjects with metabolic syndrome. *Microvascular Research*, *106*, 80–87. <http://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.04.001>
- Chuang, S.-Y., Liao, J.-J., Chou, C.-C., Chang, C.-C., & Fang, W.-C. (2015). Spectral analysis of photoplethysmography based on EEMD method. In *2015 IEEE International Conference on Consumer Electronics - Taiwan* (pp. 224–225). IEEE. <http://doi.org/10.1109/ICCE-TW.2015.7216867>
- DeFronzo, R. a, Tobin, J. D., & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American Journal of Physiology*, *237*(3), G214–223. Retrieved from <http://ajpgi.physiology.org/content/237/3/G214.short>
- DeFronzo, R. A., & Ferrannini, E. (1991). Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*, *14*(3), 173–194. <http://doi.org/10.2337/diacare.14.3.173>
- Deng, Y., & Scherer, P. E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1212*, E1–E19. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x>
- Ferrannini, E., & Natali, A. (1991). Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *American Heart Journal*, *121*(4), 1274–1282. [http://doi.org/10.1016/0002-8703\(91\)90433-I](http://doi.org/10.1016/0002-8703(91)90433-I)
- Ferrannini, E., Natali, A., Bell, P., Cavallo-Perin, P., Lalic, N., & Mingrone, G. (1997). Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *The Journal of Clinical Investigation*, *100*(5), 1166–73. <http://doi.org/10.1172/JCI119628>
- Gandhi, P. G., & Rao, G. H. (2014). The spectral analysis of photoplethysmography to evaluate an independent cardiovascular risk factor. *International Journal of General Medicine*, *7*,

539–47. <http://doi.org/10.2147/IJGM.S70892>

- George, L., Bacha, F., Lee, S., Tfayli, H., Andreatta, E., & Arslanian, S. (2011). Surrogate estimates of insulin sensitivity in obese youth along the spectrum of glucose tolerance from normal to prediabetes to diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *96*(7), 2136–45. <http://doi.org/10.1210/jc.2010-2813>
- Gopaul, N. K., Manraj, M. D., Hébé, A., Yan, S. L. K., Johnston, A., Carrier, M. J., & Änggård, E. E. (2001). Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia*, *44*(6), 706–712. <http://doi.org/10.1007/s001250051679>
- Gutt, M., Davis, C. L., Spitzer, S. B., Llabre, M. M., Kumar, M., Czarnecki, E. M., ... Marks, J. B. (2000). Validation of the insulin sensitivity index (ISI_{0,120}): comparison with other measures. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *47*(3), 177–184. [http://doi.org/10.1016/S0168-8227\(99\)00116-3](http://doi.org/10.1016/S0168-8227(99)00116-3)
- Hara, S., Arase, Y., Saito, K., Fujiwara, K., Tsuji, H., Kodama, S., ... Sone, H. (2011). HbA1c 5.7–6.4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet (London, England)*, *378*(9786), 147–55. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60472-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60472-8)
- Hayward, C. S., Kraidly, M., Webb, C. M., & Collins, P. (2002). Assessment of endothelial function using peripheral waveform analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, *40*(3), 521–528. [http://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01991-5](http://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01991-5)
- Hollenbeck, C. B., Chen, N., Chen, Y.-D. I., & Reaven, G. M. (1984). Relationship Between the Plasma Insulin Response to Oral Glucose and Insulin-stimulated Glucose Utilization in Normal Subjects. *Diabetes*, *33*(5), 460–463. <http://doi.org/10.2337/diab.33.5.460>
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, *46*(1), 3–19. <http://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *85*(7), 2402–10. <http://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6661>
- Lee, S., Choi, S., Kim, H. J., Chung, Y.-S., Lee, K. W., Lee, H. C., ... Kim, D. J. (2006). Cutoff values of surrogate measures of insulin resistance for metabolic syndrome in Korean non-diabetic adults. *Journal of Korean Medical Science*, *21*(4), 695–700. <http://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.4.695>
- Lewis, J. E., Lantigua, L., Atlas, S. E., Lopez, J., Mendez, A., Goldberg, S., ... Aliffe, K. H. (2014). A cross-sectional assessment to detect type 2 diabetes with endothelial and autonomic nervous system markers using a novel system. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *13*(1), 118. <http://doi.org/10.1186/s40200-014-0118-x>
- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., ... Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 1988–1992. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199312303292703>
- Mari, A., Pacini, G., Murphy, E., Ludvik, B., & Nolan, J. J. (2001). A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care*, *24*(3),

- 539–548. <http://doi.org/10.2337/diacare.24.3.539>
- Matsuda, M., & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, *22*(9), 1462–1470. <http://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, *28*(7), 412–419. <http://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McAuley, K. A., Williams, S. M. S., Mann, J. I., Walker, R. J., Lewis-Barned, N. J., Temple, L. A., & Duncan, A. W. (2001). Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care*, *24*(3), 460–464. <http://doi.org/10.2337/diacare.24.3.460>
- Muscelli, E., Emdin, M., Natali, A., Pratali, L., Camastra, S., Gastaldelli, A., ... Ferrannini, E. (1998). Autonomic and hemodynamic responses to insulin in lean and obese humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *83*(6), 2084–90. <http://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4878>
- Natali, A., Taddei, S., Quiñones Galvan, A., Camastra, S., Baldi, S., Frascerra, S., ... Ferrannini, E. (1997). Insulin sensitivity, vascular reactivity, and clamp-induced vasodilatation in essential hypertension. *Circulation*, *96*(3), 849–55. <http://doi.org/10.1161/01.cir.96.3.849>
- NCD Risk Factor. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. (2016). *The Lancet*, *387*(10027), 1513–1530. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)
- Pacini, G., & Bergman, R. N. (1986). MINMOD: a computer program to calculate insulin sensitivity and pancreatic responsiveness from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *23*(2), 113–122. [http://doi.org/10.1016/0169-2607\(86\)90106-9](http://doi.org/10.1016/0169-2607(86)90106-9)
- Potenza, M. A., Addabbo, F., & Montagnani, M. (2009). Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *297*(3), E568–77. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2009>
- Qu, H.-Q., Li, Q., Rentfro, A. R., Fisher-Hoch, S. P., & McCormick, J. B. (2011). The definition of insulin resistance using HOMA-IR for Americans of Mexican descent using machine learning. *PloS One*, *6*(6), e21041. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021041>
- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*.
- Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., & Baron, A. D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *97*(11), 2601–10. <http://doi.org/10.1172/JCI118709>
- Stumvoll, M., Mitrakou, A., Pimenta, W., Jenssen, T., Yki-Jarvinen, H., Van Haften, T., ... Gerich, J. (2000). Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, *23*(3), 295–301. <http://doi.org/10.2337/diacare.23.3.295>
- Thompson, T. J., Engelgau, M. M., Hegazy, M., Ali, M. A., Sous, E. S., Badran, A., & Herman, W. H. (1996). The Onset of NIDDM and its Relationship to Clinical Diagnosis in Egyptian Adults. Retrieved from <http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/116375>

- W. H. O. C. R. D. and A. (2003). Screening for type 2 diabetes : report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. Retrieved from <http://www.who.int/iris/handle/10665/68614>
- Wong, J.-S., Lu, W.-A., Wu, K.-T., Liu, M., Chen, G.-Y., & Kuo, C.-D. (2012). A comparative study of pulse rate variability and heart rate variability in healthy subjects. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 26(2), 107–14. <http://doi.org/10.1007/s10877-012-9340-6>
- Wu, H.-T., Hsu, P.-C., Sun, C.-K., Wang, H.-J., Liu, C.-C., Chen, H.-R., ... Lo, M.-T. (2013). Assessment of autonomic dysfunction in patients with type 2 diabetes using reactive hyperemia. *Journal of Theoretical Biology*, 330, 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.03.022>

Tables:**Table 1** – Study participant characteristics in the groups with and without insulin resistance.

	M-value≤4.8	M-value>4.8	p-value*
Number	23	77	
Sex (male/Female)	14/9	33/44	
Age (years)	32.0±2,1	33.5±1.0	ns
Fasting Plasma Glucose (mmol/L)	4.8±0.07	4.7±0.03	ns
Hb1Ac (%)	5.6±0.06	5.3±0.04	0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	124.5±4.0	111.9±1.6	0.001
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.5±2.7	74.3±1.2	0.0001
Body Mass Index (kg/m ²)	34.5±1.7	26.7±0.5	<0.0001
Fat mass (%)	37.2±1.5	29.3±0.8	<0.0001
PTG-TP (m/s ²)	527.29±24.15	327.7±10.7	<0.0001

*P-value indicates comparison between those with (M-value ≤4.8) versus without (M-value>4.8) insulin resistance.

Table 2 – Indexes to estimate insulin resistance/sensitivity and their correlation with euglycemic hyperinsulinemic clamp (HEC)

	Subjects	Correlation with HEC
OGTT derived Indexes		
Hollenbeck <i>et al.</i> (Hollenbeck <i>et al.</i> , 1984)	NGT	r=0.61. p=0.001
Cederholm <i>et al.</i> (Cederholm & Wibell, 1990)	NGT, IGT, DM	r=0.62. p<0.0001
Gutt <i>et al.</i> (Gutt <i>et al.</i> , 2000)	NGT, IGT, DM	r=0.63. p<0.001
Matsuda <i>et al.</i> (M. Matsuda & DeFronzo, 1999)	NGT, IGT, DM	r=0.73. p<0.0001
Belfiore <i>et al.</i> (Belfiore <i>et al.</i> , 2001)	NGT, O, ODM	r=0.96. p<0.001
Stumvoll <i>et al.</i> (Stumvoll <i>et al.</i> , 2000)	NGT, IGT	r=0.80. p<0.00005
Mari <i>et al.</i> (Mari <i>et al.</i> , 2001)	IGT, DM, O, L	r=0.73. p<0.0001
Fasting Insulin/Glucose Plasma Indexes		
Homa-IR (Bonora <i>et al.</i> , 2000)	ND	r=-0.75. p<0.0001
Quicki (Katz <i>et al.</i> , 2000)	NO, O, DM	r=0.78. p<2x10 ⁻¹²
Photoplethysmography Index		
PTG-TP	NGT, IGT,O,OW,L	r=-0.64. p<0.0001

OGTT=oral glucose tolerance test, NGT=normal glucose tolerance , IGT=impaired glucose tolerance, DM=type 2 diabetes, ND=non diabetic, O=obese, L=lean, OW=overweight, NO=non obese, HOMA-IR=homeostasis model assessment for insulin resistance, Quicki=quantitative insulin sensitivity check index, PTG-TP=photoplethysmography total power

Legends for Figures:

Fig.1 - ES Complex device; Integration of the ES complex software with the fingertip oximeter.

Fig.2 - PTG Spectral Analysis. A1= Amplitude Very Low Frequencies (VLF), A2= Amplitude Low frequencies (LF), A3= Amplitude High Frequencies (HF). S1= Surface Very Low Frequencies (VLF), S2= Surface Low Frequencies (LF), S3=Surface High frequencies (HF). W1= Width Very Low Frequencies (VLF), W2= Width Low Frequencies (LF), W3= Width High Frequencies (HF).

Fig.3 - Simple correlation between M-value ($\text{mg}/\text{kg}_{\text{ffm}} \cdot \text{min}$) and photoplethysmographic Index, PTG-TP in 100 nondiabetic subjects. ($r=-0.64$; $p<0.0001$; 95% confidence interval: -0.743 to -0.507).

Fig.4 - ROC analyses of the utility of Photoplethysmographic Index, PTG-TP, for diagnosing insulin resistance. ($n = 100$) (Standard error: 0.0247; 95% confidence interval: 0.863 to 0.973).

Fig.1



Fig. 2

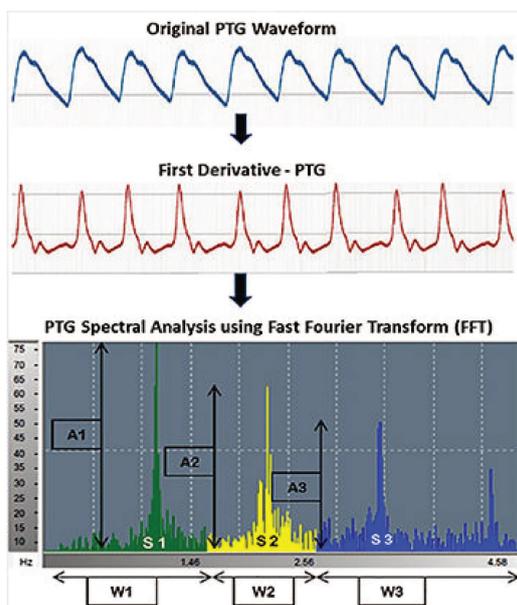


Fig. 3

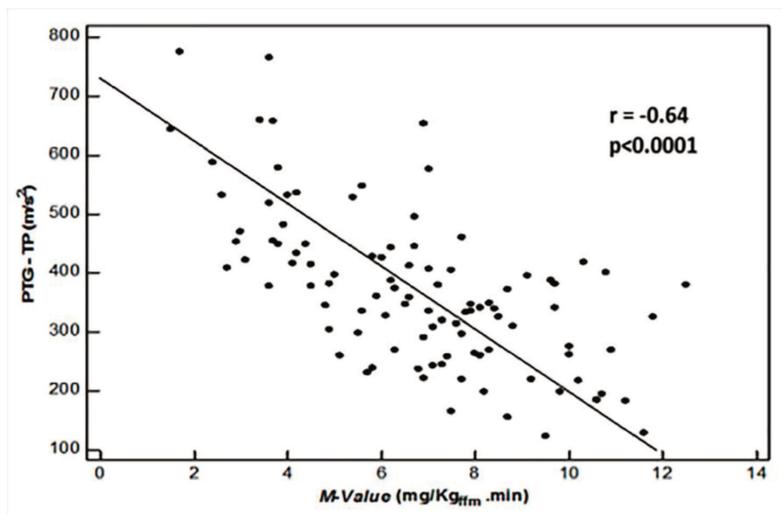
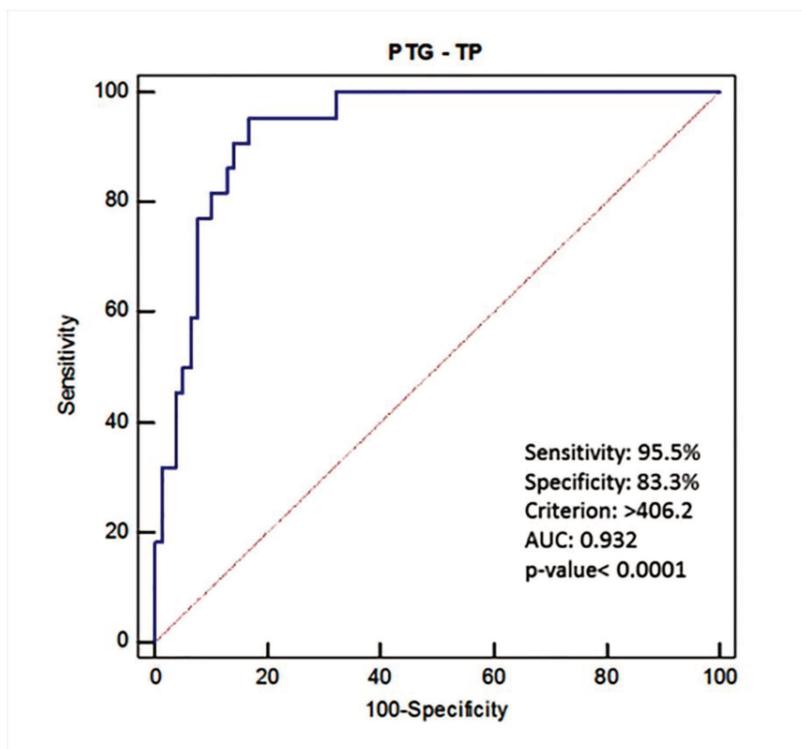


Fig. 4



8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo:	<p>“Identificação da resistêncnia à insulina em humanos por uma nova técnica não invasiva de screening tecnológico – ES Complex; comparação com um padrão ouro de avaliação – Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico”</p> <p>Aprovação comitê de ética sob número: 542/2010.</p>
-------------------	---

Identificação do Paciente

Nome completo do Sujeito/Paciente:

Identificação do Médico do Estudo

Nome completo do Médico do Estudo: Dra. Sarah Monte Alegre

Endereço: UNIDADE METABÓLICA - Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP – Rua Alexandre Fleming, 181 – Cidade Universitária – Campinas – São Paulo – CEP: 13081-970

Telefone para contato: 19 - 35217155

1) Participação

Este é um convite para participar de um estudo clínico. Sua participação dependerá dos procedimentos de seleção descritos a seguir e outros critérios. Antes de concordar em participar deste estudo, é importante que você entenda o que ele envolve. Leia com atenção estas informações e esclareça todas as suas dúvidas. Uma Comissão de Ética em Pesquisa revisou os objetivos e a condução proposta deste estudo e concedeu um parecer favorável.

2) Objetivo do Estudo

O exame visa avaliar a resistência à insulina do indivíduo através de um padrão ouro, o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico; e comparar com a mesma avaliação através do sistema ES-Complex. Este sistema utiliza a tecnologia de bioimpedanciometria e oximtria para avaliar a resistência à insulina

A técnica é segura, indolor, rápida e não invasiva, e tem sido utilizada há mais de 25 anos. A relação custo/benefício será muito favorável se esta técnica for utilizada como um adjunto aos métodos convencionais.

O objetivo deste estudo é o de avaliar a sensibilidade e especificidade do Sistema ES-complex como um auxiliar na triagem das desordens do metabolismo da glicose, particularmente a resistêncnia à insulina.

3) Número aproximado de participantes e duração prevista da sua participação no estudo

O número de participantes será de 100. Cada paciente participará do estudo realizando um exame pré agendado, o tempo médio para realização do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico é de 5h. A duração do exame do ES-complex é de 4 minutos.

Você pode decidir interromper sua participação neste estudo em qualquer momento. Se você se retirar do estudo, esta decisão não afetará seu tratamento médico e/ou benefícios. Se você decidir parar de participar do estudo, encorajamos você a discutir sua decisão com o médico do estudo. Entretanto, este estudo somente será interrompido após autorização do Comitê de Ética em Pesquisa que o aprovou.

4) Procedimentos do Estudo

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que você assine este termo de consentimento livre e esclarecido.

No dia do exame, você será submetido a duas punções venosas, uma para infusão de insulina e glicose, e outra para coleta de sangue. O sangue será coletado de 5 em 5 minutos para controle glicêmico e análises laboratoriais. O volume total médio de sangue coletado será de 250 mL, sem risco para sua saúde. A duração do exame será de cinco horas, sendo duas horas de estabilização, duas horas de experimentação e uma hora para observação.

Antes do início do exame do clamp você será submetido ao exame do ES-Complex, o qual durará no máximo 4 minutos, sendo indolor e não invasivo.

5) Suas Responsabilidades

Se você decidir participar deste estudo você:

- Informará o médico de quaisquer sintomas, possíveis efeitos colaterais ou outros problemas médicos que tiver durante o estudo.
- Comparecerá a todas as consultas agendadas
- Deverá informar o médico do estudo de qualquer medicação que tomar enquanto estiver no estudo.

6) Riscos e Possíveis Reações Adversas

Quanto ao ES-Complex não é esperada nenhuma reação adversa, pois não são previstos efeitos colaterais desde que respeitadas as contra-indicações. A corrente elétrica é de apenas 1,28V sendo segura e sem qualquer efeito indesejável nos últimos 25 anos. E quanto ao Clamp, seguindo todas as recomendações no dia do exame, não é esperada nenhuma reação adversa.

Contra-indicações

- Paciente passou por desfibrilação externa.
- Presença de lesões cutâneas em contato com os eletrodos.
- Sinusite em particular no seio frontal.
- Paciente possui marca-passo cardíaco, paciente conectado a aparelho para suporte de vida, ou qualquer dispositivo eletrônico implantado.
- Paciente possui pinos metálicos ou próteses nos dedos ou articulações.
- Mulheres grávidas após o sexto mês.
- Ausência um ou mais membros.

7) Benefícios

O objetivo deste estudo é verificar a capacidade do ES-complex em avaliar a resistência à insulina de indivíduos submetidos ao clamp. No caso de validação dessa hipótese, este estudo poderá ser introduzido como novo método de baixo custo, rápido e não invasivo, podendo ajudar a descobrir distúrbios metabólicos em estágios precoces, facilitando o tratamento e aumentando as chances de cura ou controle.

8) Pagamento ao Sujeito da Pesquisa

Você não será pago por participar deste estudo.

9) Participação Voluntária / Descontinuação do Estudo

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você decide se quer fazer parte ou não. Mesmo se você decidir fazer parte, você poderá deixar o estudo a qualquer momento sem dar uma razão para isso. Essa decisão não afetará seu futuro tratamento médico de forma alguma. O médico do estudo também pode retirá-lo deste estudo se achar que isso é o melhor para você, ou no caso do estudo ser interrompido prematuramente. Se você decidir retirar seu consentimento para participar do estudo, o médico do estudo pedirá sua autorização para realizar a avaliação final e para coletar dados através de um formulário de relato. Se você não concordar, não serão acrescentados novos dados a seu respeito na base de dados.

10) Confidencialidade

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

A equipe do Patrocinador e Autoridades Regulatórias aplicáveis têm o dever de verificar os seus documentos-fonte, ou seja, seus documentos médicos originais, desde que autorizado pelo médico do estudo e pelo hospital. O objetivo é assegurar que as informações são verdadeiras e corretas.

Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros são cumpridas no decorrer deste estudo.

Caso esteja de acordo, seu médico particular será informado de sua participação no estudo.

11) Contato em Caso de Dúvidas / Emergência

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O médico responsável pelo estudo é o Dra. Sarah Monte Alegre, e o pesquisador Aglecio Luiz de Souza, que poderão ser encontrados no endereço: Clínica Médica-UNICAMP - Rua Alexander Flemming, 181 - Cidade Universitária - Campinas/SP - CEP: 13083-878–Telefone(s): 19-3521-7155.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126- Barão Geraldo – Campinas – SP – CEP: 13083-887- TEL: (19) 3521-8936, FAX: (19) 3521-7187 – e-mail: cep@fcm.unicamp.br .

O CEP é um grupo formado de cientistas e não-cientistas que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo de pesquisa para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Todas as informações que forem descobertas durante este estudo de pesquisa e que possam mudar sua opinião quanto à participação neste estudo serão fornecidos a você assim que se tornarem disponíveis.

12) Declaração de Consentimento do Sujeito

Por favor, leia esta seção com cuidado e, se estiver de acordo, assine e date na parte inferior da página.

Fui informado de todos os detalhes relacionados com os efeitos conhecidos e imprevisíveis, efeitos colaterais e riscos deste estudo e de qualquer procedimento do estudo ao qual serei submetido.

Entendo que sou livre para aceitar ou recusar participar e que posso retirar-me do estudo em qualquer ocasião, sem apresentar uma razão para isto e sem nenhuma consequência para a continuação de meu tratamento. Meu direito a tratamento e a terapias alternativas será mantido.

Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

Se eu quiser, eu posso pedir ao meu médico do estudo para repassar todos os meus dados ao meu Médico particular.

Ao assinar este termo de consentimento não estarei abrindo mão de meus direitos legais.

Li e entendi as informações apresentadas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Pude fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

‘Receberei uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre’.

13) ASSINATURA

EU ACEITO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE DESTE ESTUDO.

A ser assinado simultaneamente, ou seja, na mesma data por todas as partes envolvidas:

_____	_____	_____
Nome em letra de forma do Paciente	Data (a ser informada pelo paciente)	Assinatura
RG. _____		
_____	_____	_____
Nome em letra de fôrma da pessoa que está obtendo o consentimento	Data	Assinatura

Distribuição: original para o médico do estudo, cópia para o Paciente.

Para estudos que podem recrutar populações especiais (ex.: mentalmente incapacitados, analfabetos, pacientes pediátricos) são necessárias as seguintes assinaturas adicionais.

A qualquer momento um paciente adulto incapacitado pode se recusar explicitamente a participar ou pode solicitar que seja retirado do estudo clínico. O investigador deve respeitar a solicitação.

Se o paciente não souber ler, o campo a seguir deverá ser assinado por uma testemunha:

_____	_____	_____
Nome da testemunha imparcial	Data (a ser informada pela testemunha)	Assinatura
_____	_____	_____
Nome do representante legalmente constituído do paciente (se aplicável)	Data (registrada pelo representante legalmente constituído)	Assinatura

Grau de parentesco/ relação com o paciente		