

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Beatriz Regina Rainho de Oliveira**

**Avaliação da Secreção e Resistência à Insulina em Pacientes  
com Diabetes Mellitus Tipo 2 com e sem Hepatite Viral C**

Porto Alegre, 2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação da Secreção e Resistência à Insulina em Pacientes com  
Diabete Mellitus Tipo 2 com e sem Hepatite Viral C**

Beatriz Regina Rainho de Oliveira

**Orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2007

O48a **Oliveira, Beatriz Regina Rainho de**

Avaliação da secreção e resistência à insulina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com e sem hepatite viral C / Beatriz Regina Rainho de Oliveira ; orient. Marcello Casaccia Bertoluci. – 2007.

83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Diabetes mellitus tipo 2 2. Hepatite C 3. Resistência à insulina

I. Bertoluci, Marcello Casaccia II. Título.

NLM: WK 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pela oportunidade de participar deste Curso de Pós-Graduação e pela valiosa orientação na realização deste projeto.

À minha família, pela compreensão e apoio durante a realização desta etapa.

Ao Doutorando Otavio Magalhães, pela contribuição neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Weinmann pela oportunidade de realização deste Mestrado.

**Dedicatória**

Aos meus pais, pelo imenso amor e dedicação,  
exemplo de vida e incentivo aos estudos.

Ao meu esposo, por todo o amor e carinho,  
compreensão, estímulo e apoio na realização deste trabalho.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADA: American Diabetes Association

ALT: Alanina aminotransferase

CA: Cintura abdominal

DAG: diacylglycerol

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

GLUT: Facilitative glucose transporter

HBV: Vírus da hepatite B

HCV: Vírus da hepatite C

HOMA: Homeostasis Model Assessment

IL: Interleucina

IMC: Índice de massa corporal

IRS: Insulin receptor substrate

JNK: Fator de transcrição celular

MAPK: Fator de migração e crescimento de células musculares lisas

NCEP-ATPIII: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III

NFkB: Fator de transcrição celular que regula a resposta inflamatória

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAD: Pressão arterial diastólica

PAI: Inibidor do ativador do plasminogênio

PAS: Pressão arterial sistólica

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-US: Proteína C reativa ultra-sensível

PDK: Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfate-dependent kinase

PI-3-quinase: Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP: Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato

PKB: Proteína quinase B

PKC: Proteína quinase C

SAMIS: Serviço do Arquivo Médico e Informações em Saúde

SM: Síndrome metabólica

SOC3: Supressor de citocinas

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral- $\alpha$

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Mecanismos do diabetes mellitus tipo 2. ....	16
Figura 2. Ação usual da insulina no músculo .....	19
Figura 3. Fosforilação do receptor de insulina em serina .....	19
Figura 4. Resistência à insulina causada por ácidos graxos no fígado .....	22
Figura 5. Resistência à insulina e inflamação .....	23

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	
1 Diabetes mellitus tipo 2.....	14
1.1 Epidemiologia .....	14
1.2 Fisiopatogenia do diabetes mellitus tipo 2 .....	15
1.2 Diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica .....	16
2. Resistência à insulina .....	17
2.1 Sinalização da insulina .....	17
2.2 Resistência à insulina e o fígado .....	23
2.3 Resistência à insulina e inflamação .....	23
3. Hepatite pelo vírus C .....	24
3.1 Epidemiologia.....	24
3.2 História natural da hepatite viral C.....	25
4 Associação da hepatite pelo vírus C e diabetes mellitus tipo 2 .....	26
4.1 Possíveis mecanismos envolvidos na associação .....	31

5. Avaliação de resistência à insulina .....	35
JUSTIFICATIVA.....	37
OBJETIVOS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
ARTIGO (Versão em inglês).....	54
ARTIGO (Versão em português).....	69

## RESUMO

**Objetivo:** Diabetes tipo 2 (DM 2) e hepatite C são doenças altamente prevalentes. A associação entre DM2 e infecção pelo vírus C tem sido evidenciada em diversos estudos, porém os mecanismos envolvidos na associação dessas patologias não estão completamente estabelecidos. O objetivo deste estudo é avaliar o nível de resistência e de secreção de insulina em pacientes com DM2 apresentando ou não infecção pelo vírus da hepatite C (HCV).

**Métodos:** Quinze pacientes com diagnóstico de DM2, HCV positivos, e quinze pacientes DM2, HCV negativos (controles) pareados para a idade, sexo e índice de massa corporal (IMC), foram avaliados quanto à história familiar de DM2, uso de tiazídicos, pressão arterial, circunferência da cintura abdominal, glicemia de jejum, insulinemia, perfil lipídico, alanina aminotransferase (ALT), proteína C ultra-sensível (proteína C US) e hemoglobina glicada (HbA1c). O uso de hipoglicemiantes orais e a presença ou não de síndrome metabólica (SM) segundo os critérios da National Cholesterol Education Program' Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII), foram considerados em ambos os grupos. A avaliação da resistência à insulina foi realizada pelo HOMA-RI e HOMA peptídeo C. A função da célula beta foi avaliada pela insulinemia e peptídeo C basal e HOMA-B. A relação peptídeo C/insulina em todos os pacientes foi realizada para descartar hiperinsulinemia devido à disfunção hepática.

**Resultados:** Os pacientes de ambos os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à pressão arterial, história familiar de DM2, uso de tiazídicos, circunferência da cintura abdominal, glicemia de jejum, perfil lipídico, hemoglobina glicada, uso de hipoglicemiantes orais, e ao diagnóstico de SM. As médias dos HOMA-RI e HOMA peptídeo-C foram significativamente maiores no grupo dos pacientes com hepatite C ( $p=0,038$  e  $p=0,017$  respectivamente), assim como as dosagens da ALT ( $p=0,05$ ), insulinemia basal ( $p=0,029$ ) e as dosagens de peptídeo C ( $p=0,031$ ). As medidas do HOMA-B ( $p=0,19$ ), não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, assim como a relação peptídeo C/ insulina. A proteína C US ( $p=0,73$ ), mostrou uma correlação positiva com o log-HOMA-RI, mas não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

**Conclusões:** Os resultados do presente estudo são compatíveis com um maior grau de resistência à insulina nos pacientes com DM2, anti-HCV reagentes, quando comparados com os pacientes DM2, anti-HCV não reagentes. Os pacientes com DM2, anti-HCV reagentes não apresentaram deficiência de secreção de insulina, quando comparados ao grupo-controle. A hiperinsulinemia observada no grupo com HCV foi devida mais a um aumento de secreção do que pela diminuição de degradação hepática. O grau de inflamação sistêmica se correlaciona com o grau de resistência à insulina independente da presença do vírus C

## REVISÃO DA LITERATURA

### INTRODUÇÃO

A associação da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e diabetes tipo 2 (DM2), duas patologias que causam em longo prazo complicações severas em um número significativo de pacientes, tem sido evidenciada em diversos estudos (1-3).

HCV afeta principalmente o fígado, mas também outros tecidos são envolvidos. Tem sido questionado se a diabetes não seria mais uma das manifestações extra-hepáticas devidas à infecção pelo HCV (4).

Os mecanismos envolvidos na associação dessas patologias ainda não estão esclarecidos. Atualmente, algumas evidências suportam a relação de resistência à insulina e hepatite C. Resistência à insulina é mais freqüentemente observada em pacientes com HCV crônica, quando comparados a controles saudáveis pareados para o peso, correlacionando-se com a progressão da fibrose (5,6).

O objetivo deste estudo é procurar entender mais os mecanismos da associação de DM2 e infecção pelo HCV. Através do modelo matemático HOMA (Homeostasis Model Assessment), avaliamos a resistência à insulina em pacientes consultantes no ambulatório de medicina interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), portadores DM2 com e sem HCV pareados para IMC, sexo e idade.

## **1 Diabetes mellitus tipo 2**

### **1.1 Epidemiologia**

O diabetes mellitus (DM) caracteriza-se por hiperglicemia resultante de uma deficiência relativa ou absoluta da secreção de insulina pelas células  $\beta$ , associada ou não à resistência à ação da insulina, e conhecidamente associado a complicações crônicas micro e macrovasculares. De uma forma genericamente colocada, 90-95% dos casos existentes são de DM 2, e aproximadamente 5% a 10% são de DM1(7).

Atualmente, existem cerca de 171 milhões de pacientes com diabetes no mundo(8). Estima-se que a prevalência mundial de DM2 na população adulta cresça de 5,0% a 6,2 % de 2003 a 2025, especialmente em países em desenvolvimento como China e Índia, onde a população de pacientes adultos com diabetes deverá atingir 46 e 73 milhões, respectivamente. O crescimento também ocorre em faixas etárias mais jovens. Especialmente na Austrália, em 1981 1,7% e 1,4% de pessoas com idade entre 35-44 anos e 45-54 anos desenvolveram diabetes, passando para 2,4% e 6,2%, respectivamente, em 2000 (9). Assume-se que este aumento seja devido em parte à maior longevidade, mas, também, ao sedentarismo e à prevalência do crescimento mundial da obesidade (10-12).

O panorama no Brasil segue aspectos semelhantes. Um estudo multicêntrico realizado em capitais brasileiras no final da década de 80 por Malerbi e col. mostrou uma prevalência de 7,6% na população urbana brasileira entre os indivíduos com 30-69 anos. Nesses, 7,8% apresentaram tolerância diminuída à glicose. A taxa aumenta com a idade, atingindo 17,4% nos indivíduos com idade entre 60-69 anos (13). Mais recentemente, em estudo realizado em Ribeirão Preto as taxas de diabetes e intolerância a glicose foram 12,1% e 7,7%, na população com idade entre 30 a 69 anos, respectivamente. A

prevalência de diabetes em Ribeirão Preto foi comparável a que ocorre em países desenvolvidos(14).

## **1. 2 Fisiopatogenia do diabetes mellitus tipo 2**

Os principais mecanismos fisiopatológicos que ocasionam a hiperglicemia e envolvidos na patogênese da DM2 são a resistência periférica à insulina, principalmente na musculatura esquelética, mas também no fígado e adipócitos, associado a uma deficiência progressiva na secreção de insulina pela célula beta.

As principais causas da resistência à insulina estão ligadas à herança genética, associada a fatores ambientais, como obesidade, envelhecimento e sedentarismo. A importância dos fatores genéticos pode ser observada no estudo em descendentes de diabéticos tipo 2, magros e normoglicêmicos, apresentaram uma redução no metabolismo de glicose não oxidativa associada a uma redução da síntese do glicogênio intracelular. Aumento do conteúdo lipídico intracelular muscular foi identificado nesses descendentes de diabéticos insulino-resistentes, sugerindo que uma disfunção no metabolismo de ácidos graxos pode mediar a resistência à insulina nesses indivíduos(15).

No músculo, a resistência à insulina se manifesta por redução da utilização de glicose via não-oxidativa, principalmente na formação de glicogênio.

No fígado, leva à incapacidade de suprimir a produção hepática de glicose, mesmo na presença de hiperinsulinemia de jejum.

No tecido adiposo, a resistência à insulina induz a uma menor supressibilidade da lipólise, com maior liberação de ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos podem agravar a resistência à insulina e alterar a secreção desse hormônio, e o glicerol é o substrato da gliconeogênese ( Figura 1) (16). O tecido adiposo tem importância na etiopatogenia da DM2 e em outras formas de resistência à insulina, por ser uma glândula endócrina que

produz diversos hormônios como leptina, resistina e adiponectina, e pela produção de citocinas como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF.

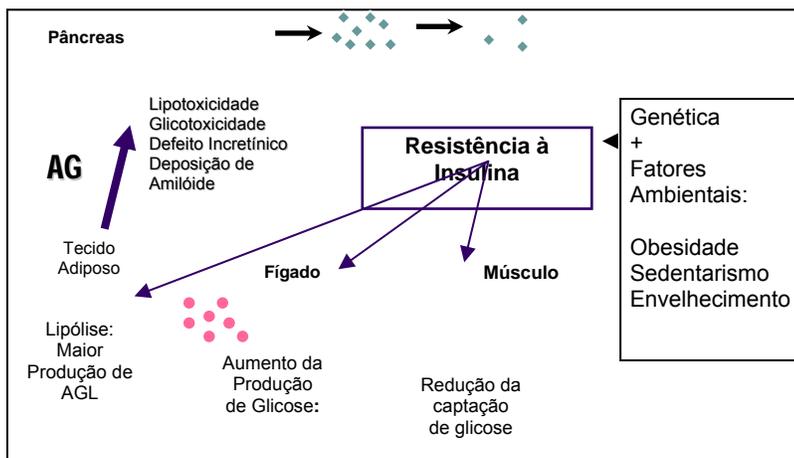


Figura 1. Mecanismos do DM2

### 1.2.1 Diabetes mellitus tipo 2 e a síndrome metabólica

Síndrome Metabólica (SM) é um conceito surgido na década de 80 que procura associar parâmetros clínicos e metabólicos a um elo comum caracterizado pela resistência à insulina. Muitas definições já fizeram parte desse conceito. A definição pelo Consenso da National Cholesterol Education Program' Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) de 2002 é uma das mais utilizadas. A definição do NCEP-ATPIII considera pelo menos três dos cinco itens assim referidos, para o diagnóstico de SM: medida da circunferência da cintura abdominal maior do que 102 cm para homens, e maior do que 88 cm para mulheres; triglicerídeos séricos maior ou igual a 150mg/dL; HDL colesterol menor que 50 mg/dL para mulheres, e menor 40mg/dL para homens; pressão arterial sistêmica sistólica

maior ou igual a 130mmHg; pressão arterial diastólica maior ou igual a 85 mmHg e glicemia de jejum maior ou igual a 110mg/dL(17).

A SM se acompanha de vários fatores de risco de origem metabólica, que levam a um risco aumentado para doenças cardiovasculares e DM2 (18).

## **2 Resistência à insulina**

### **2.1 Sinalização da insulina**

A insulina exerce sua atividade inicialmente ligando-se a um receptor de superfície celular. A cadeia de sinalização da insulina se encontra alterada na resistência à insulina e na DM2.

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, composto por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  estimula a autofosforilação da região intracelular da subunidade  $\beta$  do receptor.

O IRS-1 (insulin receptor substrate 1) e outros substratos do receptor de insulina ( IRS-2,-3,-4) são fosforilados após estímulo da insulina e exercem funções adaptadoras entre o receptor de insulina e outras proteínas intracelulares, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). A contribuição desses substratos para a resistência à insulina e diabetes foi testada através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (“knockout” de IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa o IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico. Foi demonstrado que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo “knockout” de IRS-1. O camundongo que não expressa IRS-2 foi gerado e apresentou fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido a diversas

anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e falência da atividade secretória das células  $\beta$  acompanhada de redução significativa da massa de células  $\beta$  pancreáticas. Esse fenótipo é muito semelhante com a DM2.

A insulina desencadeia a ativação do seu receptor e a fosforilação das proteínas IRS em resíduos de tirosina. A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para a PI-3 quinase, promovendo a sua ativação. A PI-3 quinase ativada converte PI-4 ou PI 4,5, fosfato em PI 3,4 e PI 3,4,5 (PIP3). O PIP3 pode se ligar à proteína quinase B (PKB) e a PDK -1 (fosfatidilinositol 3,4,5- quinase fosfato dependente). A co-localização da PKB e da PDK na membrana celular possibilita a fosforilação da PKB 3-8 pela PKD-1. A proteína quinase B ativada regula várias cascatas de quinases intracelulares envolvidas na transmissão do sinal de insulina até a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a síntese protéica. Além de fosforilar a PKB, há evidências que a PDK-1 seja capaz de fosforilar isoformas de proteína quinase C (PKC), as quais podem mediar a síntese protéica estimulada pela insulina (19). As isoformas de PKC estão envolvidas no transporte de GLUT4 para a membrana celular, para a captação de glicose ( Figura 2).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que diminuiu a transmissão do sinal, diminuindo a capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após o estímulo com a insulina. Essas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização insulínica e pode provocar resistência à insulina ( Figura 3).

Alguns estudos das etapas iniciais da sinalização de insulina na musculatura de diabéticos, quando comparados aos controles, demonstraram redução na fosforilação de IRS-1 e da ativação da PI-quinase, assim como redução da expressão de IRS-1 e PI 3-quinase, nos pacientes diabéticos (20).

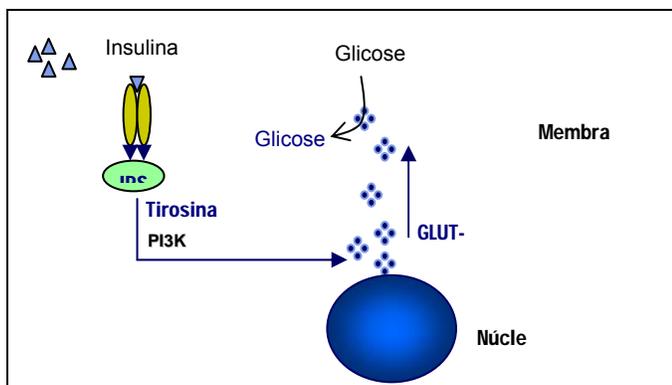


Figura 2. Ação usual da insulina no músculo.

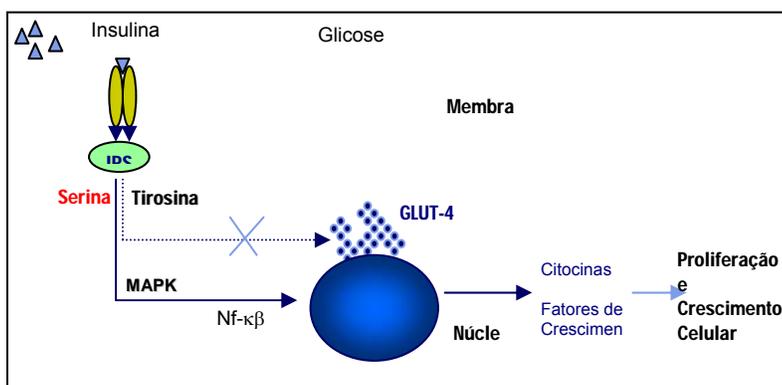


Figura 3. Fosforilação do receptor de insulina em serina.

A insulina também altera a quantidade de ácidos graxos livres liberados da gordura visceral (21). O aumento do fluxo direto de ácidos graxos na veia porta para o fígado modula a sensibilidade à insulina nesse órgão, regulando a produção de glicose.

Estudos de Boden e Griffin propuseram que a elevação de ácidos graxos livres resultaria em ativação da proteína quinase C (PKC), levando à fosforilação em serina de IRS-1, o que reduz a capacidade do IRS-1 de se ligar e ativar a PI-3-quinase, resultando em transmissão reduzida do sinal de insulina em direção a translocação de GLUT 4 para a membrana celular. Dessa forma, esses estudos propõem que os ácidos graxos livres

podem reduzir a captação de glicose celular, interferindo diretamente na cascata de proteínas envolvidas na transmissão do sinal de insulina (22,23).

Fatores ambientais interagem com suscetibilidade genética na patogênese da DM2. Obesidade e sedentarismo são fatores que contribuem para a resistência à insulina. Foi demonstrado que a sensibilidade à insulina pode melhorar com o aumento da atividade física, independentemente da redução de peso e de mudanças na composição corporal, e que o principal efeito do exercício pode ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética (24).

Obesidade causa resistência periférica à insulina e diminui a sensibilidade das células pancreáticas à glicose. O padrão de distribuição e provável anormalidade no receptor  $\beta$  3 adrenérgico parecem contribuir (25).

A concentração plasmática de ácidos graxos encontra-se aumentada em pacientes obesos. Uma alta concentração plasmática de ácidos graxos é um fator de risco para DM2 (26).

Estudos em animais geneticamente obesos sugerem que um aumento na liberação de TNF-alfa pelos adipócitos deve exercer um papel importante na alteração das ações da insulina. Essa observação é baseada no estudo em que a administração de anticorpos anti-TNF-alfa melhorou a utilização da glicose em ratos obesos, e ratos obesos geneticamente com ausência de TNF-alfa apresentaram sensibilidade normal à insulina. Em outros estudos, a redução de peso nesses animais foi associada com melhora da atividade da insulina e diminuição da expressão do gene TNF-alfa (27-30).

Através de observações foi sugerido que a deficiência de adiponectina, hormônio produzido pelos adipócitos, causa resistência à insulina e posteriormente diabetes tipo 2 (31).

Estudos epidemiológicos têm confirmado a importância de marcadores e mediadores inflamatórios na patogênese da resistência à insulina. Aumento dos níveis desses marcadores e mediadores inflamatórios, como fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), e leucócitos correlacionaram-se com a ocorrência de DM2 (32-34). A ativação dos IRS-1 em serina, ativa o fator de migração e crescimento de células musculares lisas (MAPK) e o fator de transcrição celular (NF- $\kappa$ B), que com citocinas pró-inflamatórias e TNF-alfa, promove inflamação e aterogênese.

O NF- $\kappa$ B corresponde a uma família de fatores de transcrição celulares envolvidos na expressão de uma grande variedade de genes de que regulam a resposta inflamatória. NF- $\kappa$ B permanece seqüestrado no citoplasma por proteínas inibitórias, as quais são fosforiladas por um complexo de quinases, permitindo a translocação do NF $\kappa$ B para o núcleo. A atividade quinase deste complexo é estimulada pelo fator de necrose tumoral (TNF) alfa (35). A translocação do NF $\kappa$ B ocasiona o aumento da expressão de numerosos marcadores e potenciais mediadores de inflamação que causam resistência à insulina. Obesidade induz a ativação do fator de transcrição celular (JNK), promovendo a ativação de IRS-1 em serina que regula de forma negativa o sinal do receptor/IRS-1.

A obesidade e dieta gordurosa ativam NF- $\kappa$ B nos adipócitos, hepatócitos e macrófagos.

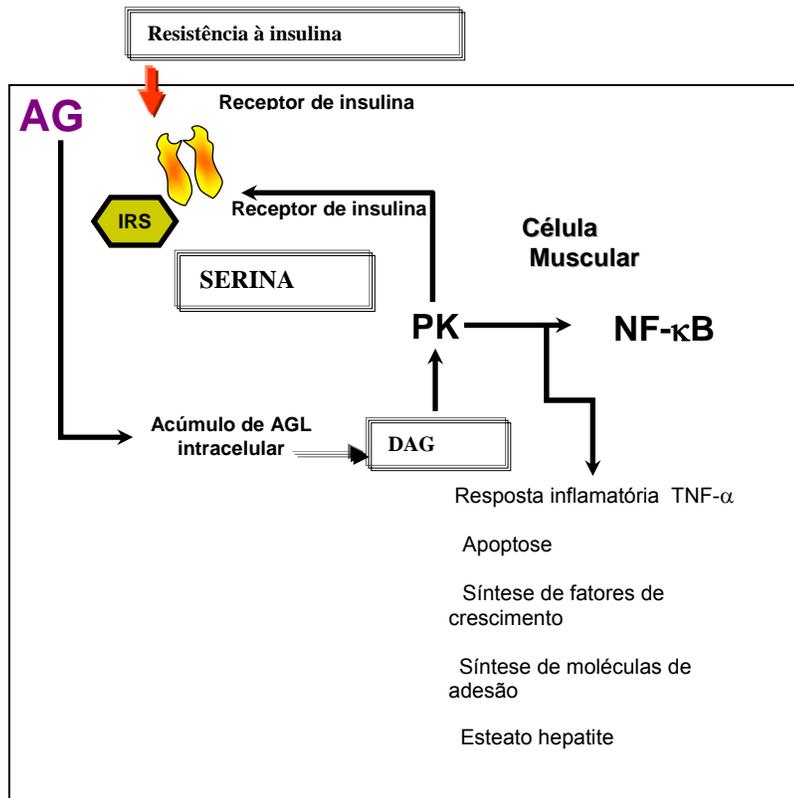


Figura 4. Resistência insulínica causada por ácidos graxos no fígado.

A resistina é um hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo branco e por monócitos. É uma proteína com propriedades pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-6. Promove a resistência insulínica por meio de aumento da gliconeogênese hepática. Outros estudos também encontraram efeitos na administração e neutralização da resistina na tolerância à glicose no tecido muscular esquelético e adiposo, por meio da modulação negativa da via de sinalização da insulina para a captação de glicose (36).

## 2.2 Resistência à insulina e fígado

O acúmulo de ácidos graxos livres no fígado aumenta níveis de diacylglicerol (DAG) intracelular que, atuando sobre PKC, promove a fosforilação do IRS-1 em serina, causando resistência à insulina. PKC ativa NF-kB, aumentando os níveis de TNF-alfa. Ocorre, então, resposta inflamatória, apoptose, síntese de fatores de crescimento, moléculas de adesão e esteato-hepatite ( Figura 4).

## 2.3 Resistência à insulina e inflamação

TNF-alfa causa resistência à insulina, ativando o fator de transcrição celular (JNK), que promove a fosforilação em serina do IRS-1. JNK atua sobre NF-kB, o que leva a resposta inflamatória, apoptose, síntese de fatores de crescimento, moléculas de adesão. A ativação do IRS-1 em serina ativa o MAPK, diminuindo a captação da glicose pelo GLUT4. Ocorre ativação da NF-kB que promove o aumento intracelular de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (Figura 5)(37).

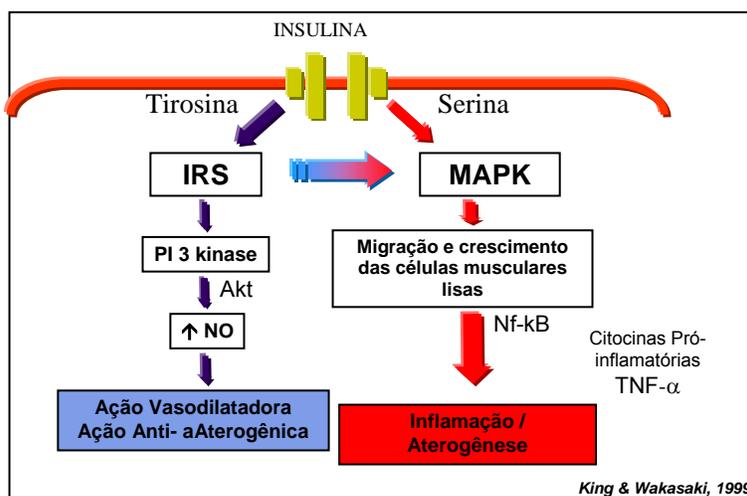


Figura 5. Resistência à insulina e inflamação.

### **3 Hepatite pelo vírus C**

#### **3.1 Epidemiologia da Hepatite pelo vírus C**

Estima-se que cerca de aproximadamente 170 milhões de pessoas sejam portadoras do vírus da hepatite C crônica no mundo(38). A prevalência de anticorpos anti-HCV (anti-HCV) nos Estados Unidos da América varia de 1,4%, em estudos com doadores de sangue a 1,8% em pesquisa com a National Health and Nutrition Examination Survey ( NHANES III)(39). Estima-se que existam 3,9 milhões de pessoas com anti-HCV reagente nos Estados Unidos da América, dos quais 2,7 milhões estejam com hepatite crônica (40).

Não se conhece ao certo a prevalência da infecção pelo HCV no Brasil. Em estudo transversal realizado em doadores de sangue, a prevalência de doadores com anti-HCV positivo foi de aproximadamente 1,23%. Existem diferenças regionais da prevalência de HCV no Brasil. (Portaria SAS-MS nº 863 de 4.11.02).

Segundo estimativa do Centers for Disease Control (CDC), o número de casos novos de infecção aguda por HCV nos Estados Unidos da América diminuiu de aproximadamente 230.000 por ano em 1980 para 36.000 casos por ano em 1998 (41). A incidência anual está diminuindo, pois a transmissão por transfusão de hemoderivados, diminuiu significativamente. O uso de drogas endovenosas, que continua a ser o principal modo de contágio, também está diminuindo devido à conscientização cada vez maior do risco de compartilhar agulhas. Entretanto, um aumento na prevalência tem ocorrido devido a contaminações anteriores. A maior incidência de infecção por HCV ocorre entre as idades de 20 e 39 anos e a maior taxa de prevalência ocorre entre as idades de 30 a 49 anos (42).

A maioria dos pacientes infectados com HCV, nos Estados Unidos da América e Europa, adquiriu a infecção pelo uso de drogas intravenosas ou transfusão de

hemoderivados, porém a contaminação por transfusão foi se tornando rara, a partir de que a rotina de triagem sorológica para HCV do sangue doado passou a ser realizada desde 1990. Mais recentemente, após a introdução de mais um teste de triagem para hemoderivados, além do anti-HCV, o Teste de Amplificação Nucléica (NAT), que detecta material genético do vírus, o risco de contágio por transfusão diminuiu próximo à zero (43).

### **3.2 História natural da hepatite pelo vírus C**

A infecção pelo HCV pode resultar em hepatite aguda e crônica. Hepatite crônica por HCV é a causa mais comum de doença hepática crônica e a mais freqüente indicação de transplante hepático nos Estados Unidos da América.

Na fase aguda, o período médio de incubação é de 7 a 8 semanas. Sintomas adicionais são similares aos de outras formas de hepatites virais agudas, incluindo mal-estar, náusea, dor no quadrante superior direito (44). Nos pacientes que apresentam os sintomas agudos, a duração destes é de 2 a 12 semanas. Falência hepática fulminante é rara, sendo comum em pacientes com infecção crônica por HBV associada (45,46). Cerca de 85% dos indivíduos infectados pelo HCV não eliminarão o vírus e desenvolverão hepatite crônica de gravidade variável (47-49). A taxa de eliminação espontânea do vírus após a persistência por 6 meses é muito baixa. O mecanismo responsável pela alta prevalência de infecção crônica não está esclarecido. Deve estar relacionado com a diversidade genética do vírus e com sua tendência a rápida mutação, permitindo o constante escape do HCV do reconhecimento imune (50,51).

A hepatite crônica leve afeta 50% dos pacientes (49). A evolução é lenta, caracterizada por níveis flutuantes de transaminases, durante muitos anos. Hepatite crônica moderada ou grave é observada em 50% dos pacientes com diagnóstico recente e níveis elevados de ALT. Vários estudos têm fornecido estimativas da proporção de

pacientes com infecção crônica que desenvolverão cirrose no período de 20 anos. Estimativas de estudos retrospectivos (17% a 55% ) têm sido maiores que estudos prospectivos ( 7% a 16%). O consenso do National Institutes of Health sugere que o risco atual esteja mais próximo dos estudos prospectivos. É estimado que a média de duração de infecção entre os pacientes que desenvolverão cirrose seja de 20,6 anos (52-54).

A infecção por HCV é responsável por aproximadamente um terço dos casos de carcinoma hepatocelular. O risco de desenvolver carcinoma, uma vez que se desenvolveu cirrose, é de aproximadamente 0% a 3% por ano (55,56).

Uma vez que a descompensação da cirrose ocorra, a sobrevida em cinco anos é de 50%. Havendo a ocorrência de complicações secundárias à cirrose, o transplante hepático é a única terapia eficaz. A recorrência de infecção por HCV no enxerto ocorre em uma grande percentagem de pacientes. A sobrevida dos pacientes transplantados com HCV é semelhante à observada após o transplante por outras etiologias (57).

#### **4. Associação da hepatite viral C e diabetes mellitus tipo 2**

A infecção crônica pelo HCV está associada a um aumento da prevalência de DM2. A prevalência de anticorpos para HCV na população com DM2 varia entre 1,78 % e 12,1% (58-65). Tem sido reportada alta prevalência de HCV em pacientes diabéticos quando comparados com não diabéticos (66,67) e com a população em geral (68-70). Já a prevalência de anticorpos anti-HCV em diabetes tipo 1 não difere da encontrada na população em geral (71,72).

Muitos estudos têm demonstrado que o aumento de infecção pelo HCV em pacientes diabéticos não está relacionado aos principais fatores associados com a contaminação pelo HCV (73-77). A prevalência de DM2 em pacientes com infecção crônica pelo HCV sem cirrose varia de 4,9% a 33% (78-85).

O grande estudo transversal de Metha e col., baseado nas informações do Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), mostrou que pessoas acima de 40 anos, HCV positivas, têm uma prevalência três vezes maior de diabetes tipo 2 em relação às pessoas HCV negativas, mesmo após ajuste para idade, etnia, IMC e nível socioeconômico. A prevalência de diabetes tipo 1(DM1) entre pessoas com infecção pelo HCV não se mostrou aumentada neste estudo (86). Da mesma forma, em outro estudo o anti-HCV se mostrou associado a DM2 em indivíduos com idade de 35-49 anos (87). Em estudo realizado por Knobler e col, com pacientes infectados pelo HCV sem evidência clínica e histológica de cirrose hepática, foi encontrada uma alta prevalência de diabetes mellitus tipo 2 (33%) que foi seis vezes maior que o grupo controle pareado ( $p < 0,001$ ). Essa taxa aumentada não foi encontrada em pacientes com infecção crônica para HBV (88).

Em nosso meio, a relação entre hepatite C e DM2 foi estudada por Cheinquer e col. em 140 pacientes HCV positivos, dos quais 12% apresentaram diabetes. Entre os pacientes que apresentaram DM2, a idade variou entre 42-80 anos (média  $55,8 \pm 10$  anos) com mediana em 54 anos. No grupo com diabetes, 93% apresentaram cirrose, comparativamente a 47% em pacientes sem diabetes. A associação entre hepatite C e diabetes, neste estudo, foi um achado particularmente associado à presença de cirrose e à idade acima de 50 anos (89).

No estudo realizado por Simo e col. uma alta prevalência de HCV foi observada em pacientes diabéticos quando comparados a doadores de sangue, pareados para fatores de risco para HCV (11,5% vs 2,5%;  $P < 0,001$ ) (90).

O estudo realizado por Rudone e col. teve como objetivo investigar a prevalência de anti-HCV em pacientes diabéticos admitidos em hospital. O grupo-controle foi constituído de doadores de sangue. Os pacientes diabéticos foram divididos em 2 grupos

de acordo com status do anti-HCV e analisado para variáveis como: idade, duração da doença, tratamento para diabetes, admissões hospitalares prévias e uso aparelhos com agulhas para controle glicêmico. Não foi observada diferença entre pacientes diabéticos com anti-HCV positivo e negativo sobre o modo de tratamento, admissões hospitalares prévias, ou uso de aparelho para coleta capilar de sangue. As observações desse estudo indicam que práticas médicas não apresentam um papel na transmissão nosocomial de HCV em pacientes diabéticos (91).

Petit e col. investigaram fatores específicos virais e dos pacientes associados a DM e a resistência à insulina em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Cento e três pacientes infectados pelo HCV foram estudados para avaliar o efeito do genótipo de vírus C, ferro hepático, esteatose, fibrose hepática, IMC e história familiar de diabetes na ocorrência de DM2. HOMA-RI foi determinado em um grupo de pacientes não diabéticos com objetivo de determinar os mecanismos associados de resistência à insulina nesse grupo. Neste estudo os achados indicaram que idade, obesidade, fibrose hepática severa e história familiar de diabetes auxiliam identificar os pacientes que apresentam um risco potencial para o desenvolvimento de DM2. Foi observado que resistência à insulina em pacientes não diabéticos infectados pelo vírus C está relacionada ao grau de fibrose, que ocorre nos estágios iniciais do curso da infecção pelo HCV (92).

A associação entre a infecção pelo HCV e DM2 tem sido um achado válido para diferentes grupos étnicos (93-95). Okan e col. investigaram a prevalência de hepatite B e C em pacientes DM2 em Gaziantep, Turkey. Seiscentos e noventa e dois pacientes DM2 foram comparados a um mil e quatorze doadores de sangue. Não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes diabéticos e o grupo controle para a soropositividade de HBsAg (5,3% vs 5,1%,  $p > 0,05$ ). Em contraste anti-HCV foi

significativamente mais freqüente em pacientes diabéticos ( 7,5% vs 0,1%, $p > 0,0001$ )(96).

No estudo de Chen e col. o objetivo era investigar a prevalência e fatores de risco intolerância à glicose em pacientes chineses com hepatite C crônica e avaliar a relação do tratamento com interferon e a intolerância à glicose nesses pacientes. Os autores detectaram nesses estudos, que 34,6% dos pacientes chineses com HCV apresentaram intolerância à glicose. Os pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C que eram mais velhos, obesos, e tinham história de tratamento prévio com interferon e história familiar de diabetes foram os mais suscetíveis a desenvolver diabetes (97).

A associação entre HCV e pacientes coreanos diabéticos foi estudada por Ryu e col.. O diabetes foi observado mais frequentemente em indivíduos infectados cronicamente por HCV (24%) do que aqueles infectados por HBV (10,4%) (98).

Entre mulheres índias americanas, DM2 é mais comum entre as que são HCV positivas em relação as que não são, segundo estudo realizado por Wilson (99).

Além do diabetes, também já foi relatada maior prevalência de intolerância à glicose em pacientes infectados pelo vírus C. Nos pacientes HCV positivos com hepatite crônica, foi observado um aumento da prevalência de intolerância à glicose, em comparação aos pacientes HCV negativos portadores de outras doenças hepáticas. Em análise multivariada, a infecção por HCV se mostrou independentemente relacionada a anormalidades de glicose em pacientes com hepatite crônica, mas não em pacientes cirróticos (100). Devido à alta prevalência de intolerância à glicose e diabetes encontradas em pacientes infectados pelo HCV, alguns autores sugerem que esse grupo deva ser considerado de risco para o desenvolvimento do diabetes, e recomenda a investigação dessa patologia nesses pacientes (101).

A cirrose está especialmente associada a presença de diabetes e leva à intolerância à glicose em mais de 80% dos pacientes (102). Allison e col. estudaram pacientes cirróticos, avaliados para transplante hepático, e observaram uma prevalência de DM2 quase cinco vezes maior nos pacientes com infecção crônica pelo HCV. Entre os pacientes HCV positivos estudados, 50% tinham DM2 em comparação a apenas 9% dos 66 pacientes HCV negativos (103).

Quando pacientes HCV positivos com cirrose são avaliados, a prevalência de DM2 varia de 19,6% a 50%, sendo maior do que a reportada em pacientes com hepatite crônica (104-110). Pacientes cirróticos sem doença hepática colestática apresentam uma maior prevalência de diabetes, quando comparados com os pacientes portadores de hepatite crônica, mas esse achado não se mostrou significativamente diferente entre pacientes cirróticos com ou sem infecção HCV (111-117). A presença de doença hepática avançada parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes maior do que a infecção por HCV (118).

A prevalência de diabetes em receptores no período de pós-transplantante hepático, infectados por HCV, tem se mostrado significativamente maior quando comparados a pacientes transplantados por outras causas de falência hepática (119-122). A infecção por HCV no estudo de Baid e col. mostrou ser um fator de risco independente para o desenvolvimento do diabetes após o transplante (123,124). Ainda que ocorra a restauração da função hepática após transplante, o diabetes mellitus é mais freqüente entre os pacientes que são submetidos ao transplante por HCV do que por outras causas (125).

No estudo feito por Lecube e col., em portadores de hepatite crônica sem diabetes conhecido foi realizado o teste de tolerância à glicose em cinquenta pacientes HCV positivos e comparados a cinquenta pacientes HCV negativos, pareados para idade, IMC

e sexo. Foram diagnosticados 18% de novos casos de diabetes e 30% de intolerância à glicose nos pacientes HCV positivos, o que representou uma diferença significativa em relação aos pacientes HCV negativos. Esses achados sugerem que o teste de tolerância à glicose deve ser adotado como teste de diagnóstico para diabetes em pacientes infectados por HCV (126).

É interessante observar que esta seja uma característica inerente ao vírus C, uma vez que não foi relatada uma prevalência aumentada de infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em pacientes com diabetes (127-130).

#### **4.1 Possíveis mecanismos envolvidos na associação**

A patogênese da associação entre vírus C e DM2 não está totalmente esclarecida.

A redução da sensibilidade à insulina tem sido sugerida com base em evidências de estudos clínicos e experimentais. Ratos transgênicos para vírus da hepatite C apresentam marcada resistência insulínica e hiperinsulinemia quando estudados através do teste de tolerância à insulina (131). Estudos com biópsias hepáticas de pacientes HCV positivos não-diabéticos mostram haver alteração na sinalização intracelular da insulina (132). Se por um lado a resistência à insulina no fígado pode elevar a glicemia, por outro a mesma pode alterar o curso da hepatite C crônica propiciando o surgimento, em alguns casos, de esteatose que conhecidamente agrava a fibrose hepática (133-135), ou mesmo diretamente por mecanismos não bem conhecidos, mas provavelmente envolvendo a produção de citocinas estimuladoras de matriz extracelular.

O próprio processo inflamatório causado pelo vírus C pode através da ativação de sinalizadores intra-celulares promover o surgimento de resistência à insulina. Citocinas como TNF-alfa e a Interleucina-6 (IL-6), têm sido relacionados não somente à resistência

a insulina, mas também ao risco de desenvolvimento de DM2 (136,137). Estudos têm demonstrado que um aumento no nível plasmático do TNF-alfa em pacientes HCV infectados (138,139) pode causar resistência à insulina inibindo a fosforilação do substrato 1 receptor de insulina pela tirosina- IRS 1- (140). Estas evidências também estão presentes em estudos com animais. Em um estudo com ratos transgênicos para o vírus C, a resistência à insulina se desenvolveu, enquanto que o mesmo não ocorreu o mesmo em animais não transgênicos. Outro estudo mostrou que uma dieta rica em gorduras induz DM2 em animais transgênicos para o vírus da hepatite C, mas não em controles (141).

A base teórica para este mecanismo seria de que a Hepatite C poderia induzir a uma produção aumentada de TNF- $\alpha$ . A ativação do receptor do fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, através da ativação da JNK, fosforila os resíduos de serina nos substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1-2), aumentando a produção de supressor de citocinas (SOC3). O SOC3 inibe a fosforilação do fosfatidilinositol-quinase 3 (PI3K). Todo esse desarranjo na sinalização intracelular de insulina bloqueia a translocação do transportador da glicose GLUT4, do núcleo à periferia da célula, impedindo a captação de glicose pela célula hepática. De fato alguns estudos tem mostrado haver correlação entre TNF- $\alpha$  e a presença de hiperinsulinemia que, quando bloqueado com drogas anti-TNF- $\alpha$ , impedem o desenvolvimento de resistência à insulina (142).

Além do TNF- $\alpha$ , IL-6 também está envolvida na gênese da resistência à insulina através de sua ação inibidora no IRS-1 e do GLUT4. O efeito inibidor da IL-6 é acompanhado por uma marcada redução no IRS-1 mas não no IRS-2 e na fosforilação por tirosina estimulada por insulina. Como consequência, o GLUT-4 se encontra significativamente reduzido (143). Pacientes infectados por HCV, apresentam níveis de IL-6 maiores do que em indivíduos saudáveis (144,145). Uma evidência importante

deriva do estudo de Lecube e cols. que verificaram que pacientes HCV positivos não diabéticos apresentavam resistência à insulina maior que em pacientes com outras doenças crônicas hepáticas, e esta foi relacionada à ativação do sistema TNF-alfa e a níveis de IL-6. A secreção de insulina, assim como a resposta à infusão de glucagon EV, e de níveis séricos de peptídeo-C foram mais altos nos pacientes HCV positivos, quando comparados aos HCV negativos (146).

A esteatose hepática pode estar envolvida no processo de agravamento da resistência à insulina. Ela ocorre em mais de 50% dos pacientes com hepatite C crônica (147,148) e os mecanismos envolvidos parecem ser genótipos-dependentes (149-151). Alguns estudos sugerem que a esteatose pode ser causada diretamente pelo HCV, pois uma associação com o genótipo 3 foi encontrada (152,153), mas também está fortemente associada ao aumento do índice de massa corporal, à obesidade visceral e ao próprio diabetes (154,155). A esteatose hepática pode contribuir para a associação do diabetes ao HCV, causando alteração na função da insulina em diminuir a produção hepática de glicose, favorecendo assim a fibrose (156-158).

A própria fibrose hepática também se associa ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina. Estudos mostram que pacientes HCV positivos com diferentes graus de fibrose hepática apresentam um aumento da insulina de jejum e uma diminuição da sensibilidade à insulina (159,160). No estudo de Lecube e col. pacientes HCV positivos sem fibrose também apresentaram resistência à insulina aumentada, quando comparados a pacientes com cirrose biliar primária com diferentes graus de fibrose hepática e com indivíduos saudáveis (161). A resistência à insulina tem sido descrita como um fator independente em prever a presença de fibrose hepática em pacientes HCV positivos. O HCV é capaz de causar um aumento de resistência à insulina, ainda antes do aparecimento de lesão mínima hepática (162) e parece ser um fator de risco

independente para uma resposta diminuída à terapia antiviral em pacientes com infecção crônica pelo HCV, em estudo realizado por Romero-Gómez e col. (163).

A Hiperinsulinemia também poderia explicar a resistência à insulina, através do estímulo direto para proliferação de células estelares hepáticas, aumentando a secreção de matriz extracelular (164). A hiperinsulinemia e hiperglicemia estimulam o fator de crescimento tecido conectivo, citocina envolvida na progressão de fibrose hepática e em outros tecidos (165,166).

Outros mecanismos também têm sido postulados para explicar a alta prevalência de diabetes em pacientes com infecção pelo HCV. A questão da auto-imunidade tem sido avaliada, e alguns estudos tem especulado que a infecção por HCV estaria associada a desordens imunológicas, como crioglobulinemia, glomerulonefrites, tireoidite e Síndrome de Sjögren (167-169), poderia desencadear em uma reação autoimune contra as células betas pancreáticas. Entretanto, estudos realizados avaliando a imunidade não encontraram associação entre infecção pelo HCV e auto-imunidade contra células beta pancreáticas (170-177).

Laskus e col. (178) documentaram a presença do vírus HCV nas células pancreáticas. Masini e col. (179) detectaram partículas semelhantes do vírus HCV nas células beta pancreáticas, nos doadores de sangue HCV positivos que foram comparados com pacientes anti-HCV negativos com hepatite crônica. Lecube e col. observaram um aumento de secreção de insulina através do HOMA-beta nos pacientes infectados pelo HCV. Por outro lado, as características clínicas do diabetes associado com a infecção pelo HCV são similares ao DM2 e não ao DM1 (180).

## 5 Avaliação da resistência à insulina

### Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

A medida do clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico é o padrão-ouro na avaliação da resistência à insulina. Permite examinar a sensibilidade tecidual à insulina, tanto em músculo como no fígado, bem como examinar a resposta da célula beta à glicose em situações de constância de glicemia e insulinemia. O clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico permite a mensuração da captação total de glicose em resposta a uma hiperinsulinemia fixa. A determinação da sensibilidade à insulina pelo clamp é baseada no conceito de que, em condições constantes nos níveis de glicemia e hiperinsulinemia, a quantidade de glicose consumida pelos tecidos seria igual à quantidade de glicose infundida durante um teste no qual a glicemia é mantida dentro de limites constantes e normais. O teste pressupõe a completa supressão da produção hepática de glicose, que também pode ser quantificada independentemente pela infusão concomitante de glicose marcada radiativamente. Em função de sua difícil e cara aplicação prática cada vez mais surgem medidas estimadas de resistência à insulina validadas a partir da sua determinação (181).

### Insulinemia de jejum

A dosagem de insulina de jejum tem sido apontada como um método simples para a avaliação da sensibilidade à insulina no organismo. 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(182). As desvantagens 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. Por outro lado, a insulinemia de jejum fornece uma boa avaliação da sensibilidade hepática à insulina.

#### HOMA-RI (Homeostatic Model Assesment)

Turner e col. desenvolveram um modelo matemático que prediz a sensibilidade à insulina pela simples medida da glicemia e da insulinemia de jejum. Dele se extraem dois índices ( HOMA-RI e HOMA beta ), que visam traduzir a sensibilidade à insulina e a capacidade secretória da célula beta. O modelo prediz insulinemia e glicemia para uma dada sensibilidade e capacidade de secreção de insulina. Na publicação original, os autores encontraram uma correlação positiva e altamente significativa entre a RI avaliada pelo HOMA e a pelo clamp (  $r=0,88$ ,  $p< 0,001$ ) através da fórmula matemática:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Glicemia ( nMol/L)} \times \text{Insulina ( mU/mL)} : 22,5$$

O HOMA-RI é um modelo matemático baseado em mecanismos fisiológicos, sendo que as informações podem ser usadas para estimar função da célula beta e sensibilidade à insulina através de uma fórmula, sem a necessidade de utilizar um computador.

O HOMA peptídeo C é uma versão computadorizada do HOMA 1, desenvolvido em Oxford, o qual permite determinar a sensibilidade à insulina (%S) e função da célula beta (%B) a partir de dosagens de glicose de jejum, e do peptídeo. O racional deriva do conceito de que o peptídeo C é secretado de forma equimolar com a insulina a partir da pró-insulina. Essa versão permite a avaliação da sensibilidade à insulina em situações onde a insulinemia pode estar sofrendo interferência de fatores externos como o uso de insulina exógena. Entretanto a sua validação nesta situação ainda necessita confirmação (183).

## **JUSIFICATIVA PARA O ESTUDO**

Considerando que aproximadamente 80% dos indivíduos positivos para HCV tornam-se cronicamente infectados, e que desses, aproximadamente 70% apresentarão alguma forma de progressão, há relevância suficiente para que se avalie secreção e resistência à insulina de pacientes com DM2, com e sem hepatite C, visto que DM2 e HCV estão associadas a complicações crônicas significativas. Existe a necessidade de avançar mais na compreensão dos mecanismos que regulam essa associação.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo Geral**

1. Avaliar a resistência e a secreção de insulina em jejum em pacientes com DM2 na presença do vírus da hepatite C.

### **Objetivos específicos:**

1. Avaliar o HOMA-RI em pacientes com DM2 com e sem Hepatite C
2. Avaliar o Peptídeo C basal em pacientes com DM2 com e sem Hepatite C
3. Avaliar níveis séricos de proteína C ultra-sensível e comparar com HOMA

## Reference List

1. Grimbert S, Valensi P, Levy-Marchal C, Perret G, Richardet JP, Raffoux C, Trinchet JC, Beaugrand M: High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. A case-control study. *Gastroenterol Clin Biol* 20:544-548, 1996
2. Knobler H, Schattner A: Association of hepatitis C and diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 135:141, 2001
3. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL: Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 133:592-599, 2000
4. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G: HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 50:1149-1154, 2003
5. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 29:1140-1149, 2006
6. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G: HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 50:1149-1154, 2003
7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30, S42-S47. 2007.
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053, 2004
9. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M: Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care* 27:1798-1811, 2004
10. Bonow RO, Gheorghide M: The diabetes epidemic: a national and global crisis. *Am J Med* 116 Suppl 5A:2S-10S, 2004
11. Lefebvre P, Pierson A: The global challenge of diabetes. *World Hosp Health Serv* 40:37-40, 42, 2004

12. Winer N, Sowers JR: Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol* 44:397-405, 2004
13. Malerbi DA, Franco LJ: Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 15:1509-1516, 1992
14. Torquato MT, Montenegro Junior RM, Viana LA, de Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, Bidurin C, Foss MC: Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (Sao Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* 121:224-230, 2003
15. Shulman GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176, 2000
16. Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI: Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:983-987, 1995
17. Executive summary of Third Report of the National Education Cholesterol Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol in Adults ( Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486-2497. 2001.
18. Grundy SM: Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol* 47:1093-1100, 2006
19. Burgering BM, Coffey PJ: Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376:599-602, 1995
20. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H: Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47:1281-1286, 1998
21. Bergman RN: New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. *Recent Prog Horm Res* 52:359-385, 1997
22. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93:2438-2446, 1994
23. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999
24. Goodyear LJ, Kahn BB: Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49:235-261, 1998

25. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, .: Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 333:343-347, 1995
26. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E: A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38:1213-1217, 1995
27. Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134:264-270, 1994
28. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
29. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668, 1996
30. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614, 1997
31. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003
32. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334, 2001
33. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-417, 2001
34. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA: High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:455-461, 2002
35. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI: Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-446, 2001

36. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312, 2001
37. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801, 2006
38. Harrison SA: Liver disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* 40:68-76, 2006
39. Mc Quillan, G, Alter, M, Moyer, L, and et al. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. 8A. 1996.
40. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS: The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341:556-562, 1999
41. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 47, (RR-19). 1998.
42. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS: The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341:556-562, 1999
43. Schuttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S: Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 355:41-42, 2000
44. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL: Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 29:908-914, 1999
45. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF: Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut* 45:613-617, 1999
46. Hoofnagle JH, Carithers RL, Jr., Shapiro C, Ascher N: Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 21:240-252, 1995
47. Fanning L, Kenny-Walsh E, Levis J, Choudhury KR, Cannon B, Sheehan M, Whelton M, Shanahan F: Natural fluctuations of hepatitis C viral load in a homogeneous patient population: a prospective study. *Hepatology* 31:225-229, 2000
48. Hoofnagle JH, Carithers RL, Jr., Shapiro C, Ascher N: Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 21:240-252, 1995

49. Marcellin P: Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 31 Suppl 1:9-16, 1999
50. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH: A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325:98-104, 1991
51. Gonzalez-Peralta RP, Qian K, She JY, Davis GL, Ohno T, Mizokami M, Lau JY: Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 49:242-247, 1996
52. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, .: Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12:671-675, 1990
53. Poynard T, Bedossa P, Opolon P: Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 349:825-832, 1997
54. Zarski JP, Mc HJ, Bronowicki JP, Sturm N, Garcia-Kennedy R, Hodaj E, Truta B, Wright T, Gish R: Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 38:307-314, 2003
55. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G: Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 112:463-472, 1997
56. Hu KQ, Tong MJ: The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 29:1311-1316, 1999
57. Sheiner PA: Hepatitis C after liver transplantation. *Semin Liver Dis* 20:201-209, 2000
58. Gray H, Wreghitt T, Stratton IM, Alexander GJ, Turner RC, O'Rahilly S: High prevalence of hepatitis C infection in Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes and abnormal liver function tests. *Diabet Med* 12:244-249, 1995
59. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999

60. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
61. Ozyilkan E, Arslan M: Increased prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 91:1480-1481, 1996
62. Rudoni S, Petit JM, Bour JB, Aho LS, Castaneda A, Vaillant G, Verges B, Brun JM: HCV infection and diabetes mellitus: influence of the use of finger stick devices on nosocomial transmission. *Diabetes Metab* 25:502-505, 1999
63. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
64. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
65. Sotiropoulos A, Peppas TA, Skliros E, Apostolou O, Kotsini V, Pappas SI: Low prevalence of hepatitis C virus infection in Greek diabetic patients. *Diabet Med* 16:250-252, 1999
66. Ozyilkan E, Erbas T, Simsek H, Telatar F, Kayhan B, Telatar H: Increased prevalence of hepatitis C virus antibodies in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 235:283-284, 1994
67. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
68. Gray H, Wreghitt T, Stratton IM, Alexander GJ, Turner RC, O'Rahilly S: High prevalence of hepatitis C infection in Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes and abnormal liver function tests. *Diabet Med* 12:244-249, 1995
69. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
70. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
71. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 29:1140-1149, 2006
72. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL: Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 133:592-599, 2000

73. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL: Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 133:592-599, 2000
74. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
75. Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P: Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 35:279-283, 2001
76. Rudoni S, Petit JM, Bour JB, Aho LS, Castaneda A, Vaillant G, Verges B, Brun JM: HCV infection and diabetes mellitus: influence of the use of finger stick devices on nosocomial transmission. *Diabetes Metab* 25:502-505, 1999
77. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
78. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
79. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
80. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
81. Ozyilkan E, Erbas T, Simsek H, Telatar F, Kayhan B, Telatar H: Increased prevalence of hepatitis C virus antibodies in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 235:283-284, 1994
82. Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P: Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 35:279-283, 2001
83. Rudoni S, Petit JM, Bour JB, Aho LS, Castaneda A, Vaillant G, Verges B, Brun JM: HCV infection and diabetes mellitus: influence of the use of finger stick devices on nosocomial transmission. *Diabetes Metab* 25:502-505, 1999
84. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001

85. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
86. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL: Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 133:592-599, 2000
87. Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P: Community-based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis severity status. *Am J Epidemiol* 158:1154-1160, 2003
88. Knobler H, Schattner A: Association of hepatitis C and diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 135:141, 2001
89. Cheinquer H, Genehr C, Berton D, Cheinquer N, Borges S, Fonseca A, Lunge V, and Ikuta N. Prevalência de diabetes mellitus em pacientes com hepatite crônica C. *Revista AMRIGS* , 68-71. 1998.
90. Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19:998-1000, 1996
91. Rudoni S, Petit JM, Bour JB, Aho LS, Castaneda A, Vaillant G, Verges B, Brun JM: HCV infection and diabetes mellitus: influence of the use of finger stick devices on nosocomial transmission. *Diabetes Metab* 25:502-505, 1999
92. Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P: Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 35:279-283, 2001
93. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
94. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
95. Wilson C: Hepatitis C infection and type 2 diabetes in American-Indian women. *Diabetes Care* 27:2116-2119, 2004
96. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
97. Chen LK, Hwang SJ, Tsai ST, Luo JC, Lee SD, Chang FY: Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 9:505-508, 2003
98. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001

99. Wilson C: Hepatitis C infection and type 2 diabetes in American-Indian women. *Diabetes Care* 27:2116-2119, 2004
100. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
101. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 29:1140-1149, 2006
102. Kruszynska YT, Home PD, McIntyre N: Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 14:103-111, 1991
103. Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ: Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 21:1135-1139, 1994
104. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
105. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
106. Ozyilkan E, Arslan M: Increased prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 91:1480-1481, 1996
107. Parolin MB, Zaina FE, Araujo MV, Kupka E, Coelho JC: Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Brazilian liver transplant candidates: negative association with HCV status. *Transplant Proc* 36:2774-2775, 2004
108. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
109. Thuluvath PJ, John PR: Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race. a case-control study. *Am J Gastroenterol* 98:438-441, 2003
110. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH: Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 32:209-217, 2000
111. del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM: Liver cirrhosis and diabetes mellitus. *J Hepatol* 24:645, 1996

112. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
113. Mangia A, Schiavone G, Lezzi G, Marmo R, Bruno F, Villani MR, Cascavilla I, Fantasia L, Andriulli A: HCV and diabetes mellitus: evidence for a negative association. *Am J Gastroenterol* 93:2363-2367, 1998
114. Parolin MB, Zaina FE, Araujo MV, Kupka E, Coelho JC: Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Brazilian liver transplant candidates: negative association with HCV status. *Transplant Proc* 36:2774-2775, 2004
115. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
116. Thuluvath PJ, John PR: Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race. a case-control study. *Am J Gastroenterol* 98:438-441, 2003
117. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH: Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 32:209-217, 2000
118. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 29:1140-1149, 2006
119. Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, Schoenfeld DA, Feng S, Chung RT, Tolkoff-Rubin N, Pascual M: Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients: risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality. *Transplantation* 72:1066-1072, 2001
120. Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, Wanless IR, Hemming AW, Croxford R, Greig PD, Lilly LB, Heathcote JE, Levy GA, Cattral MS: Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 32:87-90, 2000
121. Knobler H, Stagnaro-Green A, Wallenstein S, Schwartz M, Roman SH: Higher incidence of diabetes in liver transplant recipients with hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 26:30-33, 1998
122. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH: Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 32:209-217, 2000
123. Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, Schoenfeld DA, Feng S, Chung RT, Tolkoff-Rubin N, Pascual M: Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients: risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality. *Transplantation* 72:1066-1072, 2001

124. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH: Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 32:209-217, 2000
125. Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, Wanless IR, Hemming AW, Croxford R, Greig PD, Lilly LB, Heathcote JE, Levy GA, Cattral MS: Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 32:87-90, 2000
126. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
127. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
128. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL: Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 133:592-599, 2000
129. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F: Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 56:175-177, 2002
130. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S: Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 16:18-23, 2001
131. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K: Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126:840-848, 2004
132. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N: Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 38:1384-1392, 2003
133. Castera L, Hezode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D: Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 52:288-292, 2003
134. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guechot J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L: Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 54:1003-1008, 2005

135. Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Byth K, George J: Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 17:873-881, 2002
136. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334, 2001
137. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-417, 2001
138. Kallinowski B, Haseroth K, Marinos G, Hanck C, Stremmel W, Theilmann L, Singer MV, Rossol S: Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 111:269-277, 1998
139. Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A: Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol* 98:2751-2756, 2003
140. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668, 1996
141. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K: Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126:840-848, 2004
142. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K: Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126:840-848, 2004
143. Rotter V, Nagaev I, Smith U: Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-45784, 2003
144. Cotler SJ, Reddy KR, McCone J, Wolfe DL, Liu A, Craft TR, Ferris MW, Conrad AJ, Albrecht J, Morrissey M, Ganger DR, Rosenblate H, Blatt LM, Jensen DM, Taylor MW: An analysis of acute changes in interleukin-6 levels after treatment of hepatitis C with consensus interferon. *J Interferon Cytokine Res* 21:1011-1019, 2001
145. Malaguarnera M, Di F, I, Romeo MA, Restuccia S, Laurino A, Trovato BA: Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 32:211-215, 1997

146. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care* 29:1096-1101, 2006
147. Camma C, Bruno S, Di M, V, Di BD, Rumi M, Vinci M, Rebucci C, Cividini A, Pizzolanti G, Minola E, Mondelli MU, Colombo M, Pinzello G, Craxi A: Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 43:64-71, 2006
148. Ramalho F: Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res* 60:125-127, 2003
149. Abid K, Paziienza V, de GA, Rubbia-Brandt L, Conne B, Pugnale P, Rossi C, Mangia A, Negro F: An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *J Hepatol* 42:744-751, 2005
150. Castera L, Chouteau P, Hezode C, Zafrani ES, Dhumeaux D, Pawlotsky JM: Hepatitis C virus-induced hepatocellular steatosis. *Am J Gastroenterol* 100:711-715, 2005
151. Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male PJ, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F: Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* 53:406-412, 2004
152. Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Byth K, George J: Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 17:873-881, 2002
153. Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male PJ, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F: Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* 53:406-412, 2004
154. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G: Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33:1358-1364, 2001
155. Camma C, Bruno S, Di M, V, Di BD, Rumi M, Vinci M, Rebucci C, Cividini A, Pizzolanti G, Minola E, Mondelli MU, Colombo M, Pinzello G, Craxi A: Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 43:64-71, 2006
156. Camma C, Bruno S, Di M, V, Di BD, Rumi M, Vinci M, Rebucci C, Cividini A, Pizzolanti G, Minola E, Mondelli MU, Colombo M, Pinzello G, Craxi A: Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 43:64-71, 2006

157. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, Powell EE: Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 29:1215-1219, 1999
158. Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male PJ, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F: Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* 53:406-412, 2004
159. Konrad T, Zeuzem S, Toffolo G, Vicini P, Teuber G, Briem D, Lormann J, Lenz T, Herrmann G, Berger A, Cobelli C, Usadel K: Severity of HCV-induced liver damage alters glucose homeostasis in noncirrhotic patients with chronic HCV infection. *Digestion* 62:52-59, 2000
160. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care* 29:1096-1101, 2006
161. Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Byth K, George J: Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 17:873-881, 2002
162. Hui JM, Kench J, Farrell GC, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Byth K, George J: Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 17:873-881, 2002
163. Romero-Gomez M, Del M, V, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernandez-Rodriguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vazquez L, Munoz-De-Rueda P, Lopez-Serrano P, Gila A, Gutierrez ML, Perez C, Ruiz-Extremera A, Suarez E, Castillo J: Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128:636-641, 2005
164. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di SA, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F: Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 29:1743-1751, 1999
165. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P: Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 30:968-976, 1999
166. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P: High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 34:738-744, 2001

167. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum* 42:2204-2212, 1999
168. Gumber SC, Chopra S: Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med* 123:615-620, 1995
169. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G: HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 50:1149-1154, 2003
170. Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, Pedini B, Tositti G, Bosi E, de LF: Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care* 23:1177-1181, 2000
171. Harman-Boehm I, Zingman L, Hilzenrat N: No evidence for anti-islet autoimmunity in diabetes mellitus associated with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 30:342, 1999
172. Hieronimus S, Fredenrich A, Tran A, Benzaken S, Fenichel P: Antibodies to GAD in chronic hepatitis C patients. *Diabetes Care* 20:1044, 1997
173. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC: T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 4:231-239, 1998
174. Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A: Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 75:355-359, 2000
175. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
176. Piquer S, Hernandez C, Enriquez J, Ross A, Esteban JI, Genesca J, Bonifacio E, Puig-Domingo M, Simo R: Islet cell and thyroid antibody prevalence in patients with hepatitis C virus infection: effect of treatment with interferon. *J Lab Clin Med* 137:38-42, 2001
177. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R: UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 350:1288-1293, 1997
178. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J: Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency

- syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 28:1398-1401, 1998
179. Masini M, Campani D, Boggi U, Menicagli M, Funel N, Pollera M, Lupi R, Del GS, Bugliani M, Torri S, Del PS, Mosca F, Filipponi F, Marchetti P: Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care* 28:940-941, 2005
  180. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R: Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 29:1140-1149, 2006
  181. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 21:310-314, 1998
  182. 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* 22:507-513, 1973
  183. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27:1487-1495, 2004

## **Increased Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in Type 2 Diabetes Patients with Naïve-Treatment Chronic Hepatitis C Virus Infection.**

### **ABSTRACT:**

**OBJECTIVE:** To assess the level of insulin resistance and secretion in patients with Type 2 Diabetes (T2DM) with untreated infection by HCV.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS:** In a cross-sectional study 30 T2DM patients, 15 HCV-positive (A) and 15 HCV-negative (B), paired for age, sex and BMI were assessed for HOMA-IR, HOMA-C Peptide, HOMA-%B, fasting serum insulin (FSI) and C-peptide. Clinical cirrhosis, neoplasia, HIV co-infection, previous treatment for HCV/HBV infection, alcohol intake, use of insulin, thiazolidinediones and glucocorticoids were excluded. Patients remain 12h fasting and off metformin or glyburide before the study.

**RESULTS:** HOMA-IR was higher in A than in B respectively: mean $\pm$ SE 7.05 $\pm$ 2.11 vs. 3.62 $\pm$ 0.45: p=0.040; HOMA-C-peptide was higher in A than in B, respectively: 3.36 $\pm$ 0.43 vs. 1.96 $\pm$ 0.29 p=0.017. FSI was higher in A than in B, respectively 118.4 $\pm$ 24.1 pmol/L vs. 67.5 $\pm$ 7.71 pmol/L, p=0.029. Mean C-peptide was higher in A than in B, respectively: 1.215 $\pm$ 0.130 nmol/L vs. 0.813 $\pm$ 0.121nmol/l, p=0.032. Mean HOMA-%B was higher in A than in B, respectively: 50.5 $\pm$  8.7 and 28.7 $\pm$ 4.1, p=0.032, despite similar fasting plasma glucose, age, gender, BMI, abdominal circumference, HbA1c, lipid profile, frequency of metabolic syndrome, systolic blood pressure and family history of T2DM.

**CONCLUSIONS:** T2DM patients infected with hepatitis C virus present increased insulin resistance, and hyperinsulinemia which is independent of traditional determinants of insulin resistance.

Key words: Diabetes Mellitus, Hepatitis C virus, Insulin resistance.

Several reports have revealed both a high prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection among type 2 diabetic patients (T2DM) ( 1,2,3 ) and a high prevalence of T2DM in patients infected with HCV, when compared with other hepatic disorders ( 4,5,6 ). Cirrhotic patients with HCV infection are twice as likely to have T2DM than patients with hepatitis B virus infection (HBV) (3,7), and post-liver transplantation diabetes occurs more frequently among patients who undergo transplantation for HCV infection than for other conditions (8). Mechanisms involved in this association are still unclear, and have been generally linked to an increase in insulin resistance (9) which might contribute to progression to cirrhosis (10). However, data in studies *in vitro* have shown a decrease in the ability of beta-cell in secreting insulin when the pancreas is infected by the HCV (11) and even isolated cases of type 1 diabetes have been reported (12). The aim of the present study was to assess insulin resistance and insulin secretion in T2DM patients presenting with untreated chronic hepatitis C.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Patients:

We studied cross-sectionally 30 T2DM patients, 15 HCV-positive and 15 HCV-negative, paired for sex, age and body mass index (BMI). Medical records from 625 patients attending the Internal Medicine outpatient unit of Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), since January 2000 to June 2006, who were subjected to both an anti-HCV and HbA1c tests were first screened (figure 1). Of the 97 HCV positive patients, 37 who were between 18 and 79 years of age and had confirmed T2DM by the ADA 1996 criteria were invited to take part in the study. Exclusion criteria included: 1) previous treatment for HCV, HBV or HIV 2) current or past co-infection by HIV or HBV 3) evidence of cirrhosis (platelet number < 150.000/ $\mu$ L; prothrombin time <70% of control; total bilirubin levels >1.2mg/dL); 4) BMI above 36kg/m<sup>2</sup>; 5) use of glucocorticoid, thiazolidinediones, carbamazepine or insulin; 6) any history of alcoholic beverage consumption; and 7) patients unable to understand the informed consent form. Control group were screened from the outpatients who attended the same unit of the hospital and who had also confirmed ADA 1996 T2DM criteria and at least one non-reactive test to HCV. The sampling was performed consecutively, according to age, sex and BMI.

### Protocol

Patients attended the unit in the morning, after a 12 h fast and after a 12h interruption of the oral anti-diabetic medication. A consent form was read and signed, a questionnaire and physical examination, including weight, height, waist circumference, and arterial blood pressure measurement was performed by the same team member, and BMI was calculated [weight (kg) /height<sup>2</sup> (m)]. Waist circumference was measured on the navel level. Blood samples were then drawn for laboratory analysis. The research project and the questionnaire were approved by the Research Ethics Committee of the HCPA.

### Assays

All patients were subjected to a second HCV antibody test by chemoluminescence. Positive cases were also confirmed with qualitative polymerase chain reaction (PCR). Blood glycated hemoglobin (HPLC); serum total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, plasma glucose (enzymatic method); and ultra-sensitive C-reactive protein (nephelometry) were determined. Serum total insulin and C-peptide were assayed, respectively, by electrochemiluminescence and chemiluminescence. Insulin resistance was assessed by the mathematical model HOMA IR ( 23,25 ) using the formula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia}(\text{mmol/L}) \times \text{insulin} (\text{uU/mL}) / 22.5$$

HOMA-%B was calculated using with the formula:  

$$\text{HOMA-\%B} = (20 \times \text{fasting insulin} (\text{uU/mL}) / (\text{fasting glycemia}(\text{mmol/L}) - 3.5).$$

HOMA C-peptide was calculated using the mathematical model of Oxford, achieved by a computer calculation (13).

### Statistics

Sample size was calculated through a pilot sample. In order to obtain a 80% statistical power with a 0.05% alpha, the estimated number was 23 patients in each group. Due to the detection of a larger than expected difference between groups regarding insulin resistance, the number of the study was 15 patients in each group. Data were analyzed with the SPSS program version 14.0 and StatView. Analysis of categoric

variables was carried out through the chi-square test or the Fischer's exact test. Quantitative variables with normal distribution were analyzed by the Student's T test. The comparison between non-parametric variables was performed with the Mann-Whitney test.

## RESULTS:

Baseline characteristics of the study groups are shown in Table 1. Groups were similar in relation to age, sex, BMI, abdominal circumference, family history of T2DM; systolic blood pressure, diastolic blood pressure, fasting plasma glucose, HBA1c, and serum HDL cholesterol, total cholesterol, and triglycerides. In addition, we did not observe a significant difference between the groups for the presence of metabolic syndrome, in accordance with the NCEP/ATP III criteria. As regards the use of metformin, sulfonylurea and thiazide diuretics there was no statistically significant difference between the groups (Table 1). As expected, ALT levels were significantly higher in HCV positive patients.

Mean HOMA-IR was higher in patients infected with HCV ( $p = 0.040$ ). Mean $\pm$ SE for HCV positive and HCV negative patients were, respectively:  $7.05 \pm 2.11$  and  $3.62 \pm 0.45$ . (Figure 2). Mean HOMA C-peptide was also significantly higher in the HCV positive group than in the HCV negative group respectively  $3.6 \pm 0.39$  and  $2.45 \pm 0.36$   $p = 0.012$ , and QUIKI was decreased in the HCV positive compared to HCV negative, respectively  $0.301 \pm 0.006$  and  $0.321 \pm 0.005$ ,  $p = 0.027$ , thus confirming the presence of greater insulin resistance in the HCV-infected group. Baseline serum insulin was higher in HCV positive and HCV negative, respectively  $118.4 \pm 24.1$  pmol/L and  $67.5 \pm 7.71$  pmol/L,  $p = 0.029$ . Mean baseline C-peptide was increased in HCV positive patients when compared to HCV negative patients, respectively:  $1.215 \pm 0.130$  nmol/L and  $0.813 \pm 0.121$  nmol/l,  $p = 0.032$ ). Mean HOMA-%B was also higher in HCV positive than in HCV negative patients, respectively:  $50.5 \pm 8.7$  and  $28.7 \pm 4.1$ ,  $p = 0.032$ . Mean C-peptide/insulin ratio was similar in both groups, for HCV positive and negative patients respectively:  $0.013 \pm 0.001$  and  $0.014 \pm 0.002$   $p = 0.72$ , indicating no difference in the degradation of insulin between the groups (Figure 2).

When patients were analyzed for the daily dose of metformin or glyburide, there were no difference in mean HOMA-IR or HOMA-C-Peptide (Table 2).

We did not observe a correlation between ALT and the ultra-sensitive C-reactive protein ( $r = 0.297$ ,  $p = 0.15$ ) (Data not shown).

### **CONCLUSIONS:**

In this study we provide evidence that T2DM patients with untreated chronic hepatitis C, when carefully matched for age, BMI, abdominal circumference, fasting plasma glucose, HbA1c, serum lipid profile, frequency of metabolic syndrome, arterial blood pressure and use of oral anti-diabetic agents, have a higher degree of insulin resistance when compared to T2DM patients without HCV infection. On the other hand, these patients also present fasting hyperinsulinemia rather than insulin deficiency, which is due to insulin hypersecretion rather than to a decrease in hepatic insulin degradation. Although some studies have reported increased insulin resistance in non-diabetic patients infected with HCV (9,14), we did not find similar studies including only T2DM patients.

Mechanisms in which HCV can induce insulin resistance are not completely known, but seems to be independent of BMI or liver fibrosis stage (9) and is more severe in non-cirrhotic HCV infection than in patients with other hepatobiliary diseases. In patients with chronic hepatitis C and chronic hepatitis B, matched by age, sex, BMI and liver fibrosis stage, HOMA IR index was found higher in hepatitis C (14). In fact, in a transgenic animal model, HCV core protein has been found able to induce insulin resistance, steatosis and T2DM (14). The chief mechanism seems to be the overproduction of TNF-alpha. It phosphorylates serine residues of the insulin-receptor substrates 1 and 2 and enhances the production of suppressor of cytokines (SOC3). The SOC3 substance inhibits the phosphorylation of Akt and PI3K, thus promoting interferences in the GLUT-4 transactivation. Overproduction of TNF-alpha has frequently been seen in patients with chronic hepatitis C (15), and correlates to accelerated fibrosis progression. The risk for the development of insulin resistance and further appearance of DM is also greater in patients with higher TNF-alpha production. These finding strongly suggest that increased insulin resistance is the chief mechanism in which chronic HCV can lead to hyperglycemia in high risk populations and are indicative that a direct effect of HCV may induce insulin-resistance.

The concomitant presence of cirrhosis is also an important issue. Liver fibrosis progression has been considered for long-time responsible for the appearance of

insulin resistance and T2DM in patients with chronic liver diseases. Cirrhosis can produce insulin resistance through mechanisms that are not well known yet, possibly associated to hyperinsulinemia, which would directly stimulate hepatic cells to proliferate and increase the production of growth factors involved in the generation of fibrosis and extracellular matrix (10). Insulin resistance can also promote liver fibrosis through increase in steatosis and hyperleptinemia (16), and increase in TNF-alpha production associated to impaired expression of PPAR receptors (17). Although mild fibrosis could only be identified by liver biopsy, in the present study, we excluded the presence of advanced cirrhosis by the absence of clinical, and biochemical evidences of advanced liver disease.

Approximately 40% of patients with HCV infection display symptoms of some extra-hepatic manifestation during the illness (18), and isolated cases of type 1 diabetes have been reported (12). The presence of HCV infection in pancreatic  $\beta$ -cells of human subjects has been described in a study using immunochemistry and electron microscopy (11). The positive staining was present in about 40% of the examined cells and the presence of morphological cell changes, including alterations in the shape, in the integrity of mitochondria as well as in the function of islet cell, including reduced *in vitro* glucose-stimulated insulin release, was observed. These results raised the possibility of a direct cytopathic action by the HCV virus. In the present study we found increased mean serum fasting insulin, HOMA-%B and C-peptide levels in patients with HCV, compared to non-infected patients, indicating a relatively preserved  $\beta$ -cell function, although the response to glucose stimulus was not assessed.

In liver cirrhosis, hyperinsulinemia has been reported to be related to decreased hepatic insulin extraction by liver dysfunction rather than to pancreatic hypersecretion. More than 50% of insulin is degraded in the liver at first pass, whereas C-peptide is degraded in the kidney (7, 19). By this way, simultaneous measurements of C-peptide and insulin could indicate a decrease in insulin degrading in the presence of cirrhosis. In the present study, C-peptide/Insulin relation was unchanged in both groups thus confirming the presence of insulin hypersecretion rather than abnormal insulin degradation, making the possibility of cirrhosis in this set of patients unlikely.

Recent evidence suggested that insulin-resistance induced by HCV might be reversible after interferon-alpha treatment in non-diabetic patients (20). Sustained responders improved HOMA IR, HOMA-%B and the hepatic expression of

IRS1-2 in comparison to pre-treatment values and this effect did not seem to occur in non-responders or relapsers. Focus in treating insulin-resistance in HCV patients may have implications on the HCV outcomes once sustained virologic response to hepatitis C with peg-interferon- $\alpha$ -2a is worse in patients with increased BMI (21) and insulin resistance (22,25). Thus ameliorating insulin resistance might lead to a better response to interferon.

In conclusion, this study shows that T2DM patients with chronic untreated hepatitis C are more insulin resistant than non-HCV infected patients. Further studies are needed to address the question of reversibility of insulin-resistance in T2DM patients with HCV.

**Acknowledgments-** This study was supported by a grant-in-aid from the "Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos" (FIPE) from the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA).

**Table 1.** Baseline characteristic of patients. Data are mean  $\pm$  SE, except for gender, family history of T2DM, frequency of metabolic syndrome, metformin use, glyburide use and thiazide diuretic use where frequency was used. BMI: body mass index, ALT: alanine transaminase; CRP: C-reactive protein.

Characteristics	HCV Positive	HCV Negative	p
Age (years)	61.3 $\pm$ 2.6	60.0 $\pm$ 1.8	0.681
Gender (M/F)	6/9	6/9	0.990
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28.4 $\pm$ 1.2	28.9 $\pm$ 0.7	0.726
Abdominal circumference (cm)	98.8 $\pm$ 3.1	98.5 $\pm$ 1.4	0.938
Systolic blood pressure (mmHg)	142.1 $\pm$ 4.9	136.6 $\pm$ 3.2	0.354
Diastolic blood pressure (mmHg)	88.5 $\pm$ 2.8	87.5 $\pm$ 2.5	0.781
Family history of T2DM (frequency)	7/15	9/15	0.412
Glycated hemoglobin (%)	6.99 $\pm$ 0.42	6.81 $\pm$ 0.25	0.715
Fasting plasma glucose (mmol/L)	7.73 $\pm$ 0.67	7.33 $\pm$ 0.39	0.608
HDL Cholesterol (mmol/L)	1.37 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.09	0.496
Total cholesterol (mmol/L)	4.59 $\pm$ 0.23	4.93 $\pm$ 0.27	0.350
Triglycerides (mmol/L)	1.90 $\pm$ 0.29	2.16 $\pm$ 0.51	0.670
ALT (U/L)	60.5 $\pm$ 10.6	24.1 $\pm$ 3.5	0.005
CRP (mg/dL)	6.13 $\pm$ 2.59	2.69 $\pm$ 0.74	0.214
Serum albumin (g/dL)	4.35 $\pm$ 0.11	4.31 $\pm$ 0.06	0.771
Prothrombin Time (min)	13.1 $\pm$ 0.62	13.0 $\pm$ 0.27	0.836
Total Bilirubin (mg/dL)	2.85 $\pm$ 0.84	1.86 $\pm$ 0.75	0.415
Metabolic syndrome (frequency )	6/15	8/15	0.853
Use of metformin (frequency)	7/15	12/15	0.052
Median daily dose of metformin (mg/kg)	22.0 $\pm$ 13.1	25.8 $\pm$ 10.1	0.498
Use of glyburide (frequency)	7/15	8/15	0.990
Median daily dose of glyburide (mg/kg)	0.15 $\pm$ 0.34	0,08 $\pm$ 0.04	0.470
Use of thiazide diuretic (frequency)	4/15	8/15	0.264

**Table 2.** Measurements of insulin resistance and insulin secretion variables in relation to recent use of Metformin (A) and Glyburide (B).

A	Metformin	No Metformin	p
n	19	11	-
HOMA-IR	5.81 ± 1.7	4.51 ± 0.5	0.58
HOMA-C-peptide	2.56 ± 0.45	2.78 ± 0.24	0.73
HOMA-%B	88.4 ± 15.9	107.5 ± 26.4	0.59
C-peptide (nmol/L)	0.93 ± 0.14	1.12 ± 0.10	0.27
Insulin (pmol/L)	93.6 ± 19.8	91.2 ± 13.2	0.37
B	Glyburide	No Glyburide	p
n	14	16	-
HOMA-IR	6.5 ± 2.3	4.3 ± 0.57	0.59
HOMA-C-peptide	2.71 ± 0.41	2.62 ± 0.40	0.88
HOMA-%B	90.9 ± 22.0	99.3 ± 17.8	0.53
C-peptide (nmol/L)	1.07 ± 0.14	0.96 ± 0.06	0.59
Insulin (pmol/L)	103.2 ± 25.8	83.4 ± 10.2	0.90

Figure 1

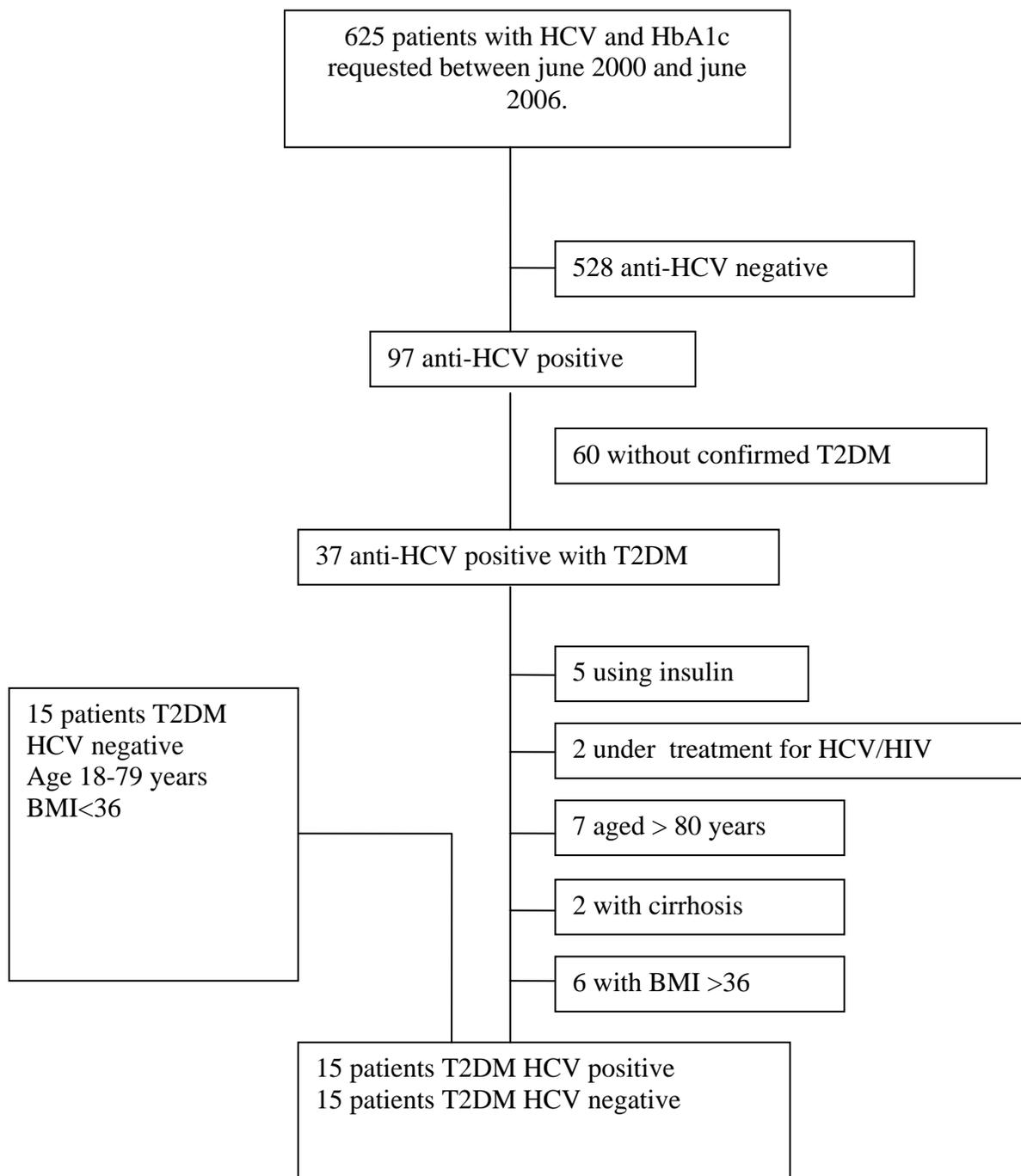
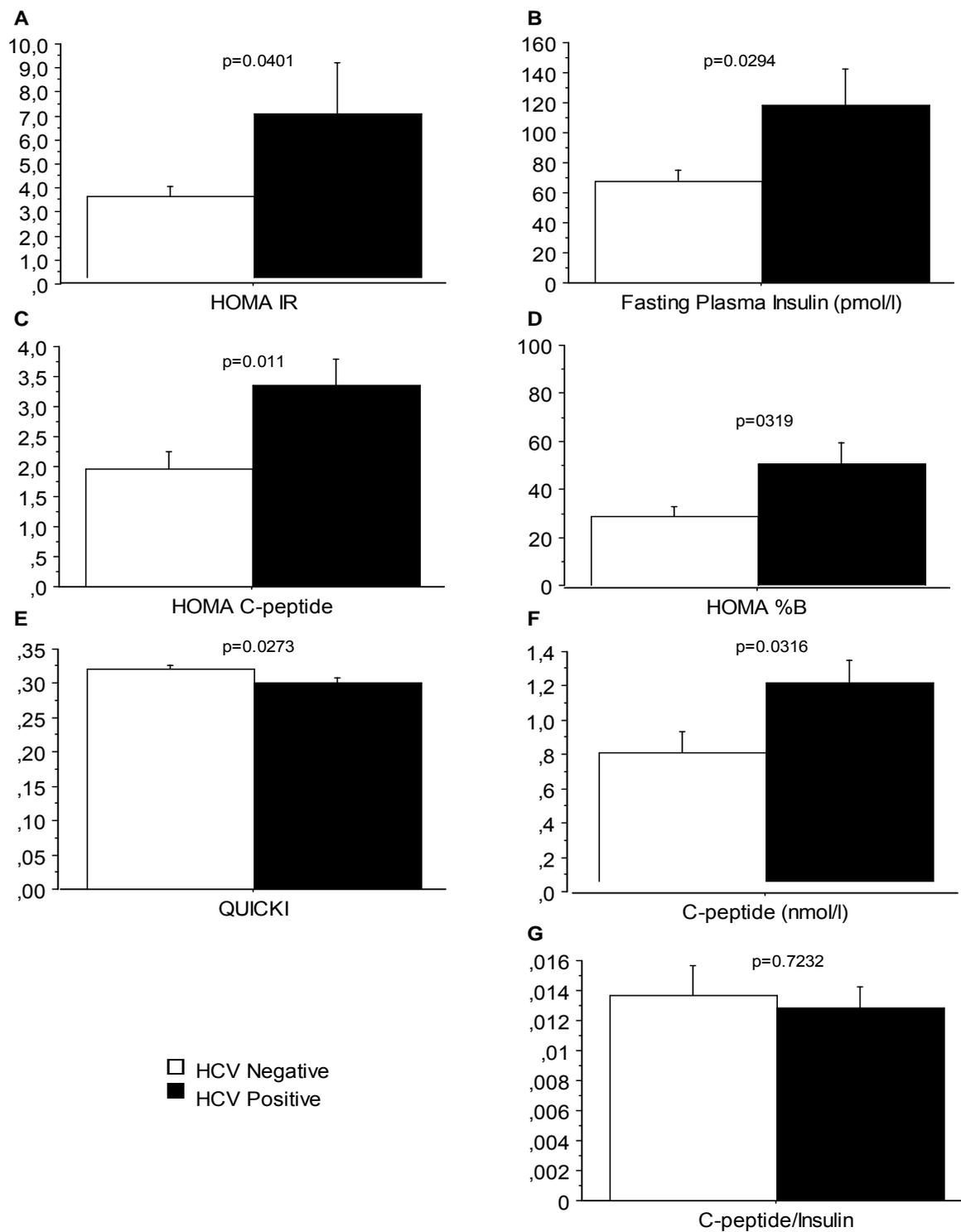


Figure 2



Insulin resistance assessed by HOMA-IR(A), HOMA C-peptide(C) and QUICKI(E), and insulin secretion assessed by fasting serum insulin(B), HOMA-%B(D) and fasting C-peptide (F), and C-peptide/insulin ration(G) in patients with type 2 diabetes with chronic HCV infection(black bars) and no HCV infection (white bars).

Data are Mean  $\pm$  Standart Error

**References:**

1. Gray H, Wreghitt T, Stratton MI, et al: High prevalence of hepatitis C infection in Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes and abnormal liver function test: *Diabet Med* 12:244-249, 1995
2. Simó R, Hernandez C, Genesca J, et al: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19: 998-1000, 1996
3. Mason AI, Lau JY, Hoang N, et al: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
4. Allison MED, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ: Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 21:1135-1139, 1994.
5. Fraser GM, Harmen I, Meller N, Niv Y, Porath A: Diabetes mellitus is associated with chronic hepatitis C but not chronic hepatitis B infection. *Isr J Med Sci* 32:526-530, 1996
6. Grimbert S, Valensi P, Levy-Marchal C, Perret G, et al: High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 20: 544-548, 1996
7. Romero-Gomez M. Insulin resistance and Hepatitis C: *J Gastroenterol* 12 (44): 7075-7080, 2006

8. Al Dosary AA, Ramji AS, Elliott TG, et al: Post-liver transplantation diabetes mellitus: an association with hepatitis C. *Liver Transpl.* 8: 356-361, 2002
9. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R.: Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case control study. *Diabetes Care* 29:1096-1101, 2006
10. Hui JM, Sud A, Farrel GC, et al: insulin resistance is associated with chronic hepatitis C and virus infection fibrosis progression. *Gastroenterology* 125:(6)1695-1704, 2003
11. Masini M, Campani D, Boggi U, et al: Hepatitis C Virus Infection and Human Pancreatic B-cell Dysfunction. *Diabetes Care* 28(4): 940-941, 2005
12. Chen LK, Chou YC, Tsai ST, Hwang SJ, Lee SD: Hepatitis C virus infection-related type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 22: 340-343, 2005
13. HOMA: homeostasis model assessment: [article online] <http://www.dtu.ox.ac.uk/index.php>. Accessed 4 April 2007
14. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, et al: Hepatitis C virus down-regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Citokine Signaling 3. *Am J Pathol* 165: 1499-1508, 2004
15. Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P: Community based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis status. *Am J Epidemiol* 158: 1154-1160, 2003
16. Romero-Gomez M, Castellano-Megias VM, Grande L, Irlles JA, Cruz M, Nogales MC, Alcon JC, Robles A. Serum leptin levels correlate with hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 98:1135-1141, 2003

17. Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H: Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G722-G729, 2004.
18. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, et al: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
19. Kruszynka YT, Home PD, McIntyre N: Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 14 103-111, 1991
20. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, et al: Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 102:570-576, 2007
21. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenak J, et al: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 343(23) 1666-1672, 2000
22. Romero-Gomez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, et al: Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128(3):636-641, 2005
23. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27(6) 1487-1495, 2004
24. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN: The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixture population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract* 72(2)219-20, 2006

## AUMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA E HIPERINSULINEMIA EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 COM HEPATITE VIRAL C NÃO TRATADA.

### RESUMO:

**OBJETIVO:** Acessar o nível de resistência e secreção de insulina em pacientes portadores de diabetes tipo 2 (DM2) com hepatite viral C (HCV) não tratada.

**DESENHO E MÉTODO:** Em estudo transversal com 30 pacientes DM2, 15 HCV positivos (A) e 15 HCV negativos (B), pareados por idade, sexo, e índice de massa corporal (IMC) foram avaliados HOMA-IR, HOMA-peptídeo C, HOMA-%B, insulina de jejum e peptídeo-C. Cirrose clínica, neoplasia, co-infecção, tratamento prévio para infecção por HCV/HBV, ingestão de álcool, uso de insulina, tiazolodionas e glicocorticóide foram excluídos. Os pacientes ficaram 12h em jejum e sem uso de metformina e sulfoniluréia antes do estudo.

**RESULTADOS:** O HOMA-IR foi maior em A do que em B respectivamente: média  $\pm$  DP  $7.05 \pm 2.11$  vs  $3.62 \pm 0,45$ ;  $p=0.04$ . HOMA peptídeo C foi maior em A do que em B, respectivamente:  $3.36 \pm 0.43$  vs  $1.96 \pm 0.29$   $p=0.017$ . Insulinemia de jejum foi maior em A do que em B, respectivamente:  $118.4 \pm 24.1$  pmol/L vs  $67.5 \pm 7.71$  pmol/L,  $p=0.029$ . Peptídeo C médio foi maior em A do que em B, respectivamente:  $1.215 \pm 0.130$  nmol/L vs  $0.813 \pm 0.121$  nmol/L,  $p=0.032$ . Média HOMA-%B foi maior em A do que em B, respectivamente:  $50.5 \pm 8.7$  e  $28.7 \pm 4.1$ ,  $p=0.032$ , apesar dos pacientes se apresentarem similares em relação à glicemia jejum, idade sexo, IMC (índice de massa corporal), medidas de circunferência abdominal, hemoglobina glicada (HbA1c), perfil lipídico, frequência de síndrome metabólica, pressão sistólica e história familiar de DM2.

**CONCLUSÃO:** Pacientes portadores de DM2 com HCV apresentaram aumento de resistência à insulina, e hiperinsulinemia que foram independentes dos determinantes tradicionais de resistência à insulina.

Palavras-chaves: Diabetes Mellitus, hepatite viral C, resistência à insulina.

Muitos estudos têm demonstrado uma alta prevalência de hepatite viral C (HCV) entre os pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2(DM2)(1,2,3), e uma alta prevalência de DM2 em pacientes com HCV, quando comparados com outras desordens hepáticas(4,5,6). Pacientes com cirrose hepática infectados pelo vírus C apresentaram 2 vezes mais DM2 que os pacientes com hepatite viral B (HBV) (3,7), assim como DM2 pós-transplante foi detectada mais frequentemente entre pacientes que foram submetidos a transplante hepático, portadores do vírus C do que por outras patologias (8). Os mecanismos envolvidos nesta associação não estão esclarecidos, e têm sido relacionados com a resistência à insulina (9) que pode contribuir para a progressão da cirrose (10). Todavia, estudos *in vitro* têm demonstrado uma diminuição da habilidade da célula beta em secretar insulina, quando o pâncreas está infectado pelo HCV(11) e também um caso isolado de diabetes mellitus tipo1(DM1) foi reportado (12).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a secreção e resistência à insulina em pacientes DM2 portadores crônicos de HCV não tratada.

Método:

Pacientes:

Em estudo transversal, foram avaliados 30 pacientes portadores de DM2, 15 HCV positivos e 15 HCV negativos, pareados para sexo, idade e IMC. Inicialmente, 625 pacientes consultantes no ambulatório de Medicina Interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de janeiro de 2000 a junho de 2006 submetidos aos exames de anti-HCV e a hemoglobina glicada (HbA1c), foram selecionados a partir da revisão dos prontuários médicos, (Figura1). Dos 97 pacientes anti-HCV positivos, 37 com idade entre 18 e 79 anos, que tiveram o diagnóstico de DM2 confirmado pelos critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA) 1996, foram convidados a participar do estudo.

Os critérios de exclusão foram: 1) tratamento prévio para HCV, HBV ou HIV; 2) co-infecção para HIV ou HBV; 3) evidência de cirrose (contagem de plaquetas < 150.000/ $\mu$ L; tempo de protrombina <70% do controle; níveis de bilirrubina total > 1.2mg/dL); 4) IMC acima de 36kg/m<sup>2</sup>; 5) uso de glicocorticóide, tiazolodiona, carbamazepina ou insulina; 6) história de consumo de álcool e 7) pacientes incapazes de entender o consentimento informado.

O grupo controle foi selecionado a partir de pacientes consecutivos, consultantes no ambulatório de Medicina Interna do HCPA, com o diagnóstico de DM2 confirmado pelos critérios da ADA 1996 e pelo menos um teste não reativo para anti-HCV.

### Protocolo

Os pacientes compareceram no ambulatório pela manhã, após 12h de jejum e de interrupção da medicação. Após leitura e assinatura do Consentimento Esclarecido e Informado responderam a um questionário. O exame físico incluindo peso, altura, medida da circunferência abdominal e medidas da pressão arterial, foi realizado após por um médico e estudante de medicina previamente treinados.

O IMC foi calculado pelo [peso(Kg)/altura<sup>2</sup>(m)].

A medida da circunferência abdominal foi realizada na altura da cicatriz umbilical.

Após, foram colhidas amostras para a realização de exames laboratoriais.

Esse projeto de pesquisa, assim como o questionário aplicado foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA.

### Exames laboratoriais

Todos os pacientes foram submetidos a um segundo teste de pesquisa de anticorpos para HCV pelo método de quimioluminescência. Resultados reagentes foram confirmados por Polymerase Chain Reaction (PCR) qualitativo. Hemoglobina glicada (HbA1c) foi realizada pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC), colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeos e glicose plasmática pelo método enzimático e a dosagem de proteína C ultra-sensível por nefelometria. Insulina total e peptídeo C foram realizados respectivamente, por eletroquimioluminescência e quimioluminescência.

A resistência à insulina foi calculada por modelo matemático HOMA-IR (23,25) utilizando a fórmula abaixo:

HOMA IR

$\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulina (uU/mL)} / 22.5$

HOMA %B foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$(20 \times \text{glicemia de jejum (uU/mL)}) / (\text{glicemia de jejum (mmol/L)} - 3.5)$

HOMA Peptídeo C foi calculado utilizando o modelo matemático informatizado de Oxford.

### Estatística

O tamanho da amostra foi calculado a partir de uma amostra piloto. Para obter um poder estatístico de 80% e um alfa de 0,05% o número estimado, em cada grupo, foi de 23 pacientes. Devido à detecção de diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à resistência a insulina, o número de pacientes estudados em cada

grupo foi 15. Os dados foram analisados pelo programa SPSS versão 14 Stat View. A análise das variáveis categóricas foi realizada pelo teste qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Variáveis quantitativas com distribuição normal foram analisadas pelo teste t de Student. A comparação entre as variáveis não paramétricas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

#### Resultados:

As características básicas dos grupos estudados estão descritas na tabela 1. Os grupos se mostraram similares em relação à idade, sexo, IMC, medidas da circunferência abdominal, história familiar de DM2, mediadas da pressão sistólica e diastólica, glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1C), colesterol HDL, colesterol total e triglicerídeos. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a presença de síndrome metabólica de acordo com os critérios do NCEP/ATP. A respeito do uso de metformina, sulfoniluréia e diuréticos também não foi observada diferença entre os grupos. Como esperado, os níveis de ALT se mostraram estatisticamente mais elevados no grupo de pacientes HCV positivos.

A média do HOMA-IR foi maior nos pacientes infectados com HCV ( $p=0,04$ ). A média  $\pm$  SE para os pacientes HCV positivos e HCV negativos foi respectivamente:  $7,05 \pm 2,11$  e  $3,62 \pm 0,45$  (Figura 2). A média HOMA peptídeo C foi significativamente maior no grupo HCV positivo em relação ao grupo HCV negativo respectivamente  $3,6 \pm 0,39$  e  $2,45 \pm 0,36$   $p=0,012$ , e QUIKI foi menor nos pacientes HCV positivos comparados com os pacientes HCV negativos, respectivamente  $0,301 \pm 0,006$  e  $0,321 \pm 0,005$ ,  $p=0,027$ , confirmando a presença de uma maior resistência à insulina no grupo infectado com HCV. A insulina basal foi maior no grupo HCV positivo do que nos pacientes HCV negativos, respectivamente  $118,4 \pm 24,1$  pmol/L e  $67,5 \pm 7,71$  pmol/L,  $p=0,029$ . A média basal do peptídeo-C se mostrou aumentada nos pacientes HCV positivos quando comparados com os pacientes HCV negativos, respectivamente:  $1,215 \pm 0,130$  nmol/L e  $0,813 \pm 0,121$  nmol/L,  $p=0,032$ . A média do HOMA-%B foi maior no grupo HCV positivo do que nos pacientes HCV negativos, respectivamente:  $50,5 \pm 8,7$  e  $28,7 \pm 4,1$ ,  $p=0,032$ . A média da relação peptídeo C/insulina foi similar nos dois grupos, para os pacientes HCV

positivos e HCV negativos respectivamente:  $0,013 \pm 0,001$  e  $0,014 \pm 0,002$   $p=0,72$ , indicando não haver diferença na degradação da insulina entre os dois grupos (Figura 2).

Quando os pacientes foram analisados em relação à dose diária de metformina ou sulfoniluréia, não foi detectada diferença entre a média do HOMA-IR e HOMA-Peptídeo-C (Tabela2).

Não foi observada correlação entre ALT e a proteína C ultra-sensível ( $r=0,297, p=0,15$ ).

#### Conclusões:

Neste estudo tivemos evidências que pacientes com DM2, portadores de HCV crônica não tratada, pareados por idade, IMC, medidas da circunferência abdominal, pressão arterial e uso de hipoglicemiantes orais apresentaram maior grau de resistência à insulina, quando comparados com pacientes diabéticos sem infecção por HCV. Apresentaram hiperinsulinemia ao invés de deficiência à insulina devido à hipersecreção de insulina e não devido à diminuição de degradação hepática. Apesar de alguns estudos terem reportado aumento de resistência à insulina em pacientes não diabéticos infectados pelo HCV (9,14), não encontramos resultados similares neste estudo, pois foram incluídos somente pacientes diabéticos.

Os mecanismos que o HCV pode induzir à resistência a insulina não está completamente entendido, mas parece ser independente do IMC ou do estágio de fibrose hepática(9) e é mais severo em pacientes HCV não cirróticos do que em pacientes com outras doenças hepatobiliares. Nos pacientes com HCV crônica e hepatite B (HBV) crônica, pareados para idade, sexo, IMC, graus de fibrose hepática, índice HOMA-IR foi maior em pacientes com HCV (14). Em estudo com animal transgênico, HCV se mostrou capaz de induzir resistência à insulina, estatose e DM2(14). O principal mecanismo parece ser a produção aumentada do Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa. TNF alfa fosforila os resíduos de serina dos substratos receptores de insulina (IRS) 1 e 2 aumentando a produção do supressora de citocinas (SOC3). O SOC3 inibe a fosforilação de Akt e PI3K, promovendo interferência na transativação do transportador de glicose (GLUT-4). A hiper-produção do TNF-alfa freqüentemente tem sido observada em

pacientes com HCV crônica (15), e tem sido correlacionada com a progressão da fibrose. O risco de resistência à insulina e aparecimento de DM2 é maior em pacientes com maior produção de TNF-alfa. Esses achados reforçam a sugestão de que o aumento da resistência à insulina é o principal mecanismo no qual HCV crônica pode levar à hiperglicemia em população de risco e são indicativos que o HCV por efeito direto, pode induzir a resistência à insulina.

A presença concomitante de cirrose é também uma questão importante. A progressão da fibrose hepática foi considerada por muito tempo responsável pelo aparecimento da resistência à insulina e DM2 em pacientes com doenças hepáticas crônicas. A cirrose pode produzir resistência à insulina através de mecanismos não muito compreendidos ainda, possivelmente associados à hiperinsulinemia, que pode diretamente estimular a proliferação de células hepáticas e aumentar a produção de fator de crescimento envolvido na geração de fibrose e matriz extracelular (10). A resistência à insulina pode promover a fibrose hepática também através do aumento de esteatose e ao aumento da leptina (16), e aumentar a produção de TNF-alfa associada à alteração na expressão dos receptores PPAR (17). Apesar da fibrose em grau leve poder ser identificada somente através de biópsia hepática, no presente estudo, excluímos a presença de fibrose avançada pela ausência de evidências clínicas e bioquímicas de doença hepática avançada.

Aproximadamente 40% dos pacientes com infecção pelo HCV apresentam sintomas de alguma manifestação extra-hepática (18), e um caso isolado de diabetes mellitus tipo 1(DM1) foi reportado(12). A presença de infecção pelo HCV nas células beta-pancreáticas foi descrita em pacientes em estudo utilizando microscopia eletrônica e imunoquímica (11). Uma coloração positiva foi encontrada em aproximadamente 40% das células examinadas e a presença de alterações morfológicas incluindo na forma, na integridade da mitocôndria, assim como na função celular, incluindo a observação da redução *in vitro*, da liberação de insulina estimulada pela glicose. Esses resultados levantaram a possibilidade de ação direta citoplasmática pelo HCV. No presente estudo, foi encontrado um aumento da insulinemia basal, do HOMA-%B e dos níveis de peptídeo-C, em pacientes com HCV, quando comparados com os pacientes não infectados, indicando uma preservação relativa da função de célula beta, apesar da resposta ao estímulo à glicose não ter sido acessado.

Na cirrose hepática, foi reportado que a hiperinsulinemia estaria relacionada à diminuição de extração hepática de insulina devido à disfunção do fígado assim como devido à hipersecreção pancreática. Mais do que 50% de insulina é degradada pelo fígado, enquanto que o peptídeo-C é degradado pelo rim(7,19). Por isso, medidas simultâneas de insulina e peptídeo-C podem indicar uma diminuição na degradação de insulina na presença de cirrose. No presente estudo, a relação peptídeo-C/insulina não apresentou diferenças em ambos os grupos confirmando a presença de hipersecreção de insulina ao invés de uma degradação anormal, confirmando ser pouco provável a presença de cirrose nestes pacientes.

Evidências recentes sugerem que a resistência à insulina induzida pelo HCV possa ser reversível após o tratamento com interferon-alfa em pacientes não diabéticos (20). Pacientes que apresentam uma resposta sustentada melhoram HOMA IR, HOMA-%B e a expressão hepática de IRS1-2 em comparação a valores pré-tratamento, e este efeito não parece ocorrer em pacientes que não respondem ao tratamento ou naqueles que apresentam reincidência da doença. Foco em tratar resistência à insulina em pacientes com HCV poderá apresentar implicações na evolução da hepatite, uma vez que uma resposta virológica sustentada à hepatite C com peg-interferon-alfa-2a é pior em pacientes com aumento do IMC (21) e resistência à insulina (22,25). A melhora da resistência à insulina pode levar a uma melhor resposta ao interferon.

Em conclusão, este estudo mostrou que pacientes DM2 com hepatite C crônica não tratada são mais resistentes à insulina do que pacientes não HCV infectados. Outros estudos são necessários para responder sobre a reversibilidade da resistência à insulina em pacientes DM2 com HCV.

Agradecimentos - Este estudo foi subsidiado em grande parte pelo Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

**Table 1.** Características basais dos pacientes. Médias  $\pm$  erro padrão, exceto para gênero, história familiar de DM2, frequência de síndrome metabólica, uso de metformina, uso de sulfoniluréia e tiazídicos. IMC: índice de massa corporal, ALT: alaninaminotransferase; PCR-US : proteína C reativa ultra-sensível.

<b>Características</b>	<b>HCV Positivo</b>	<b>HCV Negativo</b>	<b>p</b>
Idade (anos)	61.3 $\pm$ 2.6	60.0 $\pm$ 1.8	0.681
Gênero (M/F)	6/9	6/9	0.990
IMC(Kg/m <sup>2</sup> )	28.4 $\pm$ 1.2	28.9 $\pm$ 0.7	0.726
Circunferência abdominal (cm)	98.8 $\pm$ 3.1	98.5 $\pm$ 1.4	0.938
Pressão arterial sistólica (mmHg)	142.1 $\pm$ 4.9	136.6 $\pm$ 3.2	0.354
Pressão arterial diastólica (mmHg)	88.5 $\pm$ 2.8	87.5 $\pm$ 2.5	0.781
História familiar de DM2 (frequência)	7/15	9/15	0.412
Hemoglobina glicada (%)	6.99 $\pm$ 0.42	6.81 $\pm$ 0.25	0.715
Glicemia de jejum (mmol/L)	7.73 $\pm$ 0.67	7.33 $\pm$ 0.39	0.608
HDL colesterol (mmol/L)	1.37 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.09	0.496
Colesterol total (mmol/L)	4.59 $\pm$ 0.23	4.93 $\pm$ 0.27	0.350
Triglicerídeos (mmol/L)	1.90 $\pm$ 0.29	2.16 $\pm$ 0.51	0.670
ALT (U/L)	60.5 $\pm$ 10.6	24.1 $\pm$ 3.5	0.005
PCR-US (mg/dL)	6.13 $\pm$ 2.59	2.69 $\pm$ 0.74	0.214
Albumina (g/dL)	4.35 $\pm$ 0.11	4.31 $\pm$ 0.06	0.771
Tempo de protrombina (min)	13.1 $\pm$ 0.62	13.0 $\pm$ 0.27	0.836
Bilirrubina (mg/dL)	2.85 $\pm$ 0.84	1.86 $\pm$ 0.75	0.415
Síndrome Metabólica (frequência )	6/15	8/15	0.853
Uso de metformina (frequência)	7/15	12/15	0.052
Dose média diária/metformina (mg/kg)	22.0 $\pm$ 13.1	25.8 $\pm$ 10.1	0.498
Uso de sulfoniluréia (frequência)	7/15	8/15	0.990
Dose média diária/sulfoniluréia (mg/kg)	0.15 $\pm$ 0.34	0,08 $\pm$ 0.04	0.470
Uso de tiazídicos(frequência)	4/15	8/15	0.264

**Tabela 2** Medidas de resistência e secreção de insulina variáveis em relação ao uso recente de Metformina (A) e Sulfoniluréia (B).

A	Metformina	Metformina	p
n	19	11	-
HOMA-IR	5.81 ± 1.7	4.51 ± 0.5	0.58
HOMA-C-peptide	2.56 ± 0.45	2.78 ± 0.24	0.73
HOMA-%B	88.4 ± 15.9	107.5 ± 26.4	0.59
PeptídeoC (nmol/L)	0.93 ± 0.14	1.12 ± 0.10	0.27
Insulina (pmol/L)	93.6 ± 19.8	91.2 ± 13.2	0.37
B	Sulfoniluréia	Sem sulfoniluréia	p
n	14	16	-
HOMA-IR	6.5 ± 2.3	4.3 ± 0.57	0.59
HOMA-peptídeo C	2.71 ± 0.41	2.62 ± 0.40	0.88
HOMA-%B	90.9 ± 22.0	99.3 ± 17.8	0.53
PeptídeoC (nmol/L)	1.07 ± 0.14	0.96 ± 0.06	0.59
Insulina (pmol/L)	103.2 ± 25.8	83.4 ± 10.2	0.90

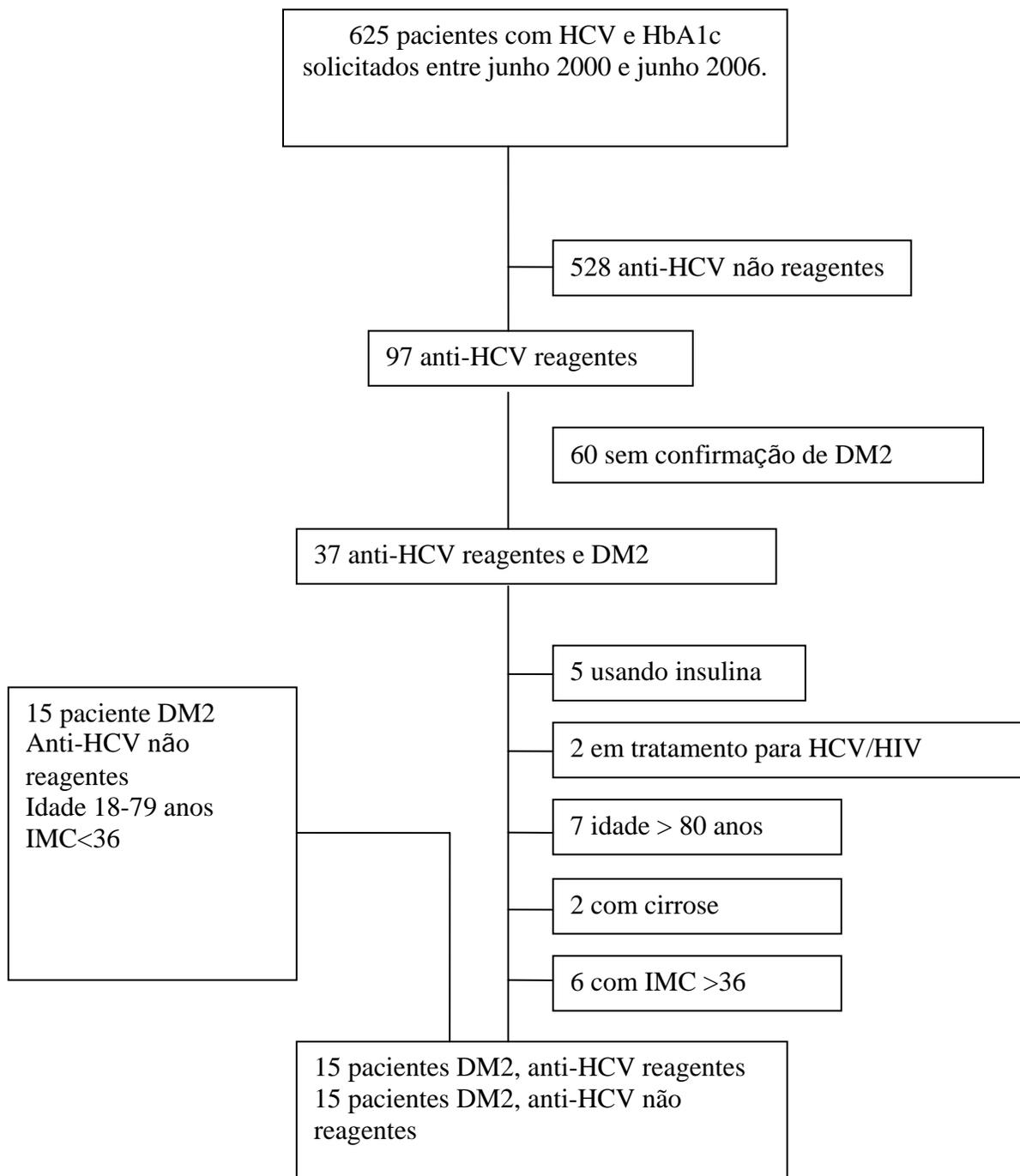
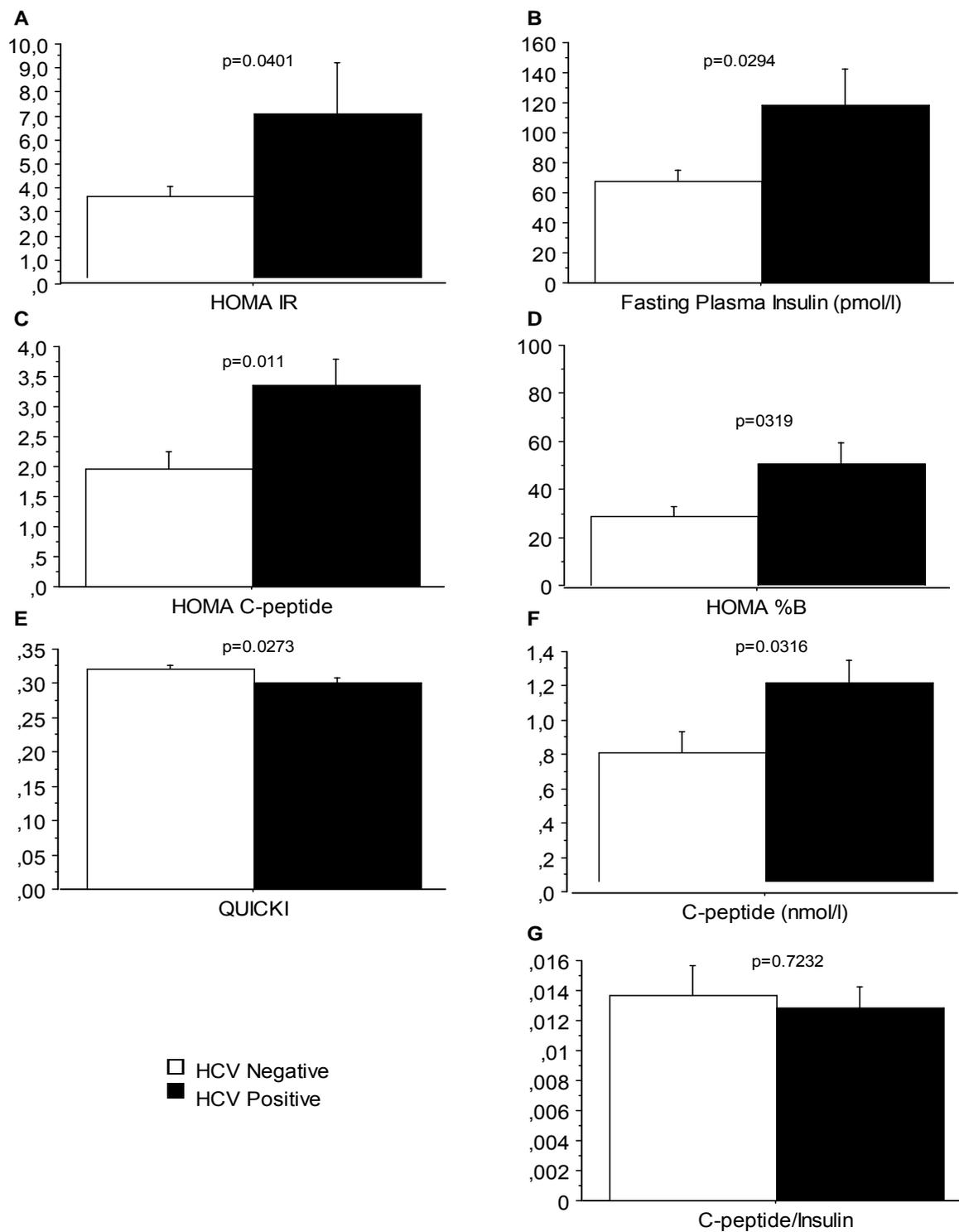


Figure 2



**References:**

1. Gray H, Wreghitt T, Stratton MI, et al: High prevalence of hepatitis C infection in Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes and abnormal liver function test. *Diabet Med* 12:244-249, 1995
2. Simó R, Hernandez C, Genesca J, et al: High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 19: 998-1000, 1996
3. Mason AI, Lau JY, Hoang N, et al: Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 29:328-333, 1999
4. Allison MED, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ: Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 21:1135-1139, 1994.
5. Fraser GM, Harmen I, Meller N, Niv Y, Porath A: Diabetes mellitus is associated with chronic hepatitis C but not chronic hepatitis B infection. *Isr J Med Sci* 32:526-530, 1996
6. Grimbart S, Valensi P, Levy-Marchal C, Perret G, et al: High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 20: 544-548, 1996
7. Romero-Gomez M. Insulin resistance and Hepatitis C: *J Gastroenterol* 12 (44): 7075-7080, 2006
8. Al Dosary AA, Ramji AS, Elliott TG, et al: Post-liver transplantation diabetes mellitus: an association with hepatitis C. *Liver Transpl.* 8: 356-361, 2002

9. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R.: Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case control study. *Diabetes Care* 29:1096-1101, 2006
10. Hui JM, Sud A, Farrel GC, et al: insulin resistance is associated with chronic hepatitis C and virus infection fibrosis progression. *Gastroenterology* 125:(6)1695-1704, 2003
11. Masini M, Campani D, Boggi U, et al: Hepatitis C Virus Infection and Human Pancreatic B-cell Dysfunction. *Diabetes Care* 28(4): 940-941, 2005
12. Chen LK, Chou YC, Tsai ST, Hwang SJ, Lee SD: Hepatitis C virus infection-related type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 22: 340-343, 2005
13. HOMA: homeostasis model assessment: [article online] <http://www.dtu.ox.ac.uk/index.php>. Accessed 4 April 2007
14. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, et al: Hepatitis C virus down-regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Citokine Signaling 3. *Am J Pathol* 165: 1499-1508, 2004
15. Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P: Community based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis status. *Am J Epidemiol* 158: 1154-1160, 2003
16. Romero-Gomez M, Castellano-Megias VM, Grande L, Irlles JA, Cruz M, Nogales MC, Alcon JC, Robles A. Serum leptin levels correlate with hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 98:1135-1141, 2003

17. Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H: Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G722-G729, 2004.
18. Lecube A, Hernandez C, Genesca J, et al: High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 27:1171-1175, 2004
19. Kruszynka YT, Home PD, McIntyre N: Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 14 103-111, 1991
20. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, et al: Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 102:570-576, 2007
21. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenak J, et al: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 343(23) 1666-1672, 2000
22. Romero-Gomez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, et al: Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128(3):636-641, 2005
23. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27(6) 1487-1495, 2004
24. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN: The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixture population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract* 72(2)219-20, 2006

