

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

**Avaliação de Medidas de Resistência e Secreção de Insulina em
Pacientes HCV Positivos**

Adriana Fornari

Porto Alegre, 2008.

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Clínica Médica

**Avaliação de Medidas de Resistência e Secreção de Insulina em
Pacientes HCV Positivos**

Adriana Fornari

Orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Clínica Médica,
para obtenção do título de Mestre.**

Porto Alegre, 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pelo incentivo à pesquisa, pela oportunidade de participar deste Curso de Pós-Graduação e pela valorosa orientação neste projeto, que me proporcionou grande crescimento profissional.

Ao meu marido, Rogério L. Braun, pela compreensão e apoio durante a realização desta etapa.

Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu S. Cerski, pela colaboração e orientação na revisão de lâminas junto ao Serviço de Patologia.

Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, pela colaboração e disponibilização de seu ambulatório do Serviço de Gastroenterologia, o que muito facilitou a seleção de pacientes.

Ao Dr. Jonathas Stiff, pela incansável contribuição na seleção de pacientes do Serviço de Gastroenterologia.

Aos alunos de iniciação científica Lúcio Cardon e Otávio Magalhães, pela contribuição na coleta de dados para este trabalho.

À colega Dra. Márcia K. Puñales, pela ajuda técnica na conclusão deste trabalho.

Aos demais colegas que, de alguma maneira, me ajudaram na realização deste projeto.

Aos pacientes, pela disponibilidade, paciência e boa vontade com que participaram desta pesquisa.

DEDICATÓRIA

*Ao meu grande amor, Rogério, pelo incentivo,
compreensão e apoio em todas as etapas da minha vida.*

*À minha filha, Helena, que está chegando
para encher minha vida de felicidade.*

Este projeto recebeu financiamento do **Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association*

AG: Ácidos graxos

AGL: Ácidos graxos livres

ALT: Alanina aminotransferase

ATP: Adenosina trifosfato

CA: Cintura abdominal

DHGNA: Doença hepática gordurosa não-alcoólica

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMPT: Diabetes Mellitus pós-transplante

EHNA: Esteato-hepatite não alcoólica

GAD: Ácido glutâmico-decarboxilase

GJA: Glicemia de jejum alterada

GLUT: Facilitador do transporte de glicose

HBV: Vírus da hepatite B

HCV: Vírus da hepatite C

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida

HOMA: *Homeostasis Model Assessment*

IDF: *International Diabetes Federation*

IL-6: Interleucina-6

IMC: Índice de massa corporal

IRS: *Insulin receptor substrate*

ITG: Tolerância diminuída à glicose

JNK: Fator de transcrição celular

MAPK: Fator de migração e crescimento de células musculares lisas

NAT: Teste de Amplificação Nucléica

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

NFkB: Fator de transcrição celular que regula a resposta inflamatória

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAD: Pressão arterial diastólica

PAI: Inibidor do ativador do plasminogênio

PAS: Pressão arterial sistólica

PCR: Reação de cadeia da polimerase

PCR-US: Proteína C reativa ultra-sensível

PKC: Proteína quinase C

RI: Resistência à insulina

SAMIS: Serviço do Arquivo Médico e Informações em Saúde

SM: Síndrome metabólica

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TTG-75g: Teste oral de tolerância à glicose com 75g

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sinalização do receptor da insulina: fosforilação em tirosina..... | 23 |
| Figura 2. Metabolismo hepático do ácido graxo..... | 24 |
| Figura 3. Sinalização do receptor da insulina: ativação da fosforilação em serina/treonina..... | 27 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 6 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 HEPATITE PELO VÍRUS C..... | 18 |
| 2.1.1 Epidemiologia..... | 18 |
| 2.1.2 História natural da hepatite pelo vírus C..... | 18 |
| 2.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA GLICOSE | 20 |
| 2.3 RESISTÊNCIA À INSULINA..... | 22 |
| 2.3.1 Vias de sinalização da insulina..... | 22 |
| 2.3.2 Resistência insulínica..... | 25 |
| 2.3.3 Resistência à insulina e o fígado..... | 28 |
| 2.3.4 Avaliação de resistência à insulina..... | 29 |
| 2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE HEPATITE C E DIABETES MELLITUS..... | 32 |
| 2.4.1 Prevalência de DM em indivíduos infectados pelo HCV..... | 32 |
| 2.4.2 Prevalência de anticorpos anti-HCV na população com DM2..... | 33 |
| 2.4.3 Prevalência de anticorpos anti-HCV na população com DM1..... | 34 |
| 2.4.4 Principais mecanismos patogênicos..... | 34 |
| 2.5 OUTROS MECANISMOS PATOGÊNICOS DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA...39 | 39 |
| 2.5.1 Cirrose..... | 39 |
| 2.5.2 Pós-transplante..... | 39 |
| 2.5.3 Genótipos..... | 40 |
| 2.5.4 Sobrecarga de ferro..... | 41 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 42 |
| 4 OBJETIVOS..... | 43 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 44 |
| 6 ARTIGO (VERSÃO EM INGLÊS)..... | 49 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 74 |
| 8 ANEXO..... | 75 |

| | |
|---|----|
| 8.1 Entrevista | 76 |
| 8.2 Termo de consentimento informado A e B..... | 77 |

Aumento de Resistência e Secreção de Insulina em Pacientes com Hepatite C Crônica sem Tratamento Prévio e sem Diabetes

ADRIANA FORNARI, MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

RESUMO

Objetivo:

O objetivo do presente estudo é avaliar a resistência e a secreção de insulina em pacientes HCV positivos sem diagnóstico de diabetes e sem cirrose em comparação a voluntários saudáveis. Os objetivos secundários são analisar fatores virais que possam estar associados com resistência à insulina, como genótipo viral, fibrose e grau de esteatose hepática.

Material e métodos:

Neste estudo transversal com amostra de conveniência, 39 pacientes HCV positivos e 13 indivíduos HCV negativos foram avaliados quanto aos níveis de glicose, insulina e peptídeo-C em jejum e após 75 g de glicose oral. As amostras basais foram avaliadas para HOMA-RI, HOMA-peptídeo-C e HOMA-%B. Os critérios de exclusão foram cirrose clínica, neoplasia, co-infecção pelo HIV, tratamento prévio para HCV, glicemias prévias acima 126mg/dL, IMC > 35 ou o uso de drogas que poderiam alterar a resistência ou a secreção de insulina.

Resultados:

HOMA-RI foi maior no grupo positivo do que no negativo, respectivamente: mediana e percentis interquartílicos 2,4 (1,5-5,0) e 1,4 (0,7-2,3): $p = 0,007$; HOMA-peptídeo-C e HOMA-% β não diferiram entre os grupos. Entretanto, a insulina sérica em jejum foi maior no grupo positivo do que no negativo, respectivamente: mediana e percentis interquartílicos 2,0 (6,8-17,8) e 6,5 (3,4-10,9), $p = 0,009$. A média do peptídeo-C não diferiu entre os grupos. Os níveis de glicose, insulina e peptídeo-C e os resultados do HOMA-RI, HOMA-% β e HOMA-peptídeo-C não apresentaram diferença entre os genótipos 1 e 3. Os genótipos também foram semelhantes quanto ao grau de atividade histológica e esteatose; o genótipo 3 apresentou maior grau de fibrose comparado ao G1 (5/16 x 4/10), $p = 0,019$. A PCR-US mostrou associação positiva com os níveis de triglicerídeos (0,574, $p = 0,001$) entre os pacientes HCV positivos.

Conclusões:

Pacientes com hepatite C crônica sem cirrose têm maior resistência à insulina e maior secreção de insulina em jejum que indivíduos HCV negativos. A resistência insulínica, mais que a deficiência de secreção de insulina, parece ser determinante para o aumento da prevalência de diabetes entre pacientes HCV positivos. O genótipo não parece desenvolver um papel importante na resistência insulínica quando os pacientes são pareados para componentes da síndrome metabólica e grau de esteatose.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, Hepatite C, Resistência insulínica.

Increased Insulin Resistance and Insulin Secretion in non-Diabetic Patients with Naïve-Treatment Chronic Hepatitis C

ADRIANA FORNARI, MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

ABSTRACT

Objective:

The aim of the present study is to assess insulin resistance and insulin secretion in HCV-positive patients without diabetes diagnosis and without cirrhosis and to compare to healthy volunteers. Secondary objectives are to analyze factors that could be associated with insulin resistance, like viral genotype, and degree of hepatic fibrosis and steatosis.

Research design and methods:

In a cross-sectional study by sample of convenience, 39 HCV positive and 13 HCV negative subjects were assessed for glucose, insulin and C-peptide in fasting state and after oral 75g glucose tolerance. Fasting samples were then evaluated for HOMA-IR, HOMA-C-peptide and HOMA-%B. Excluding criteria were clinical cirrhosis, neoplasia, HIV co-infection, previous treatment for HCV, fasting plasma glucose levels equal or above 126mg/dL, BMI above 35 and drugs that could change insulin secretion or insulin resistance.

Results:

HOMA-IR was higher in HCV positive than in HCV negative group, respectively: median and interquartile ranges 2.4 (1.5-5.0) vs. 1.4 (0.7-2.3): $p=0.007$; HOMA-C-peptide and HOMA-% β did not differ between groups. However, fasting serum insulin was higher in HCV positive than in HCV negative patients, respectively: median serum and interquartile ranges 2 (6.8-17.8) vs. 6.5 (3.4-10.9), $p = 0.009$. Mean fasting C-peptide did not differ between groups. The increase of glucose, insulin and C-peptide at fasting state and after the glucose tolerance test were all similar. Results of HOMA-IR, HOMA-% β and HOMA-C-peptide were not difference between genotypes 1 and 3. Genotypes 1 and 3 were also similar in relation to the degree of histological steatosis and hepatitis activity. Genotype 3 presented higher degree of fibrosis compared to genotype 1 (5/16 vs. 4/10), $p=0.019$. C-reactive protein showed positive correlation with the levels of triglycerides (0.574, $p = 0.001$) among all HCV positive patients.

Conclusions:

Patients with chronic HCV hepatitis without cirrhosis present higher insulin resistance and fasting insulin secretion than HCV negative subjects. Insulin-resistance, rather than insulin deficiency, maybe an important determinant of increased prevalence of diabetes among HCV positive patients. Type of genotype does not seem to play an important role in insulin resistance when patients are well matched for components of metabolic syndrome and degree of steatosis.

Key words: Diabetes Mellitus, Hepatitis C virus, Insulin Resistance

1 INTRODUÇÃO

Recentes evidências sugerem que a hepatite crônica pelo vírus C (HCV) está associada com um aumento no risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). A prevalência de DM2 é maior em pacientes HCV positivos em comparação à população em geral ou a pacientes que apresentam outras doenças hepáticas crônicas, independente da presença de cirrose [2]. Além disso, a soropositividade para o HCV na população com DM2 também é maior [3].

Entretanto, a patogênese dessa associação não é completamente compreendida. A resistência à insulina e/ou redução na sua secreção parecem ter alguma influência no desenvolvimento de alterações no metabolismo da glicose em pacientes HCV positivos. A presença de cirrose, esteato-hepatite, síndrome metabólica ou uso de drogas que alteram a resistência ou a secreção de insulina também podem influenciar os resultados dos estudos, tornando mais confusa essa relação.

As evidências vão desde estudos transversais ou de caso-controle demonstrando aumento da prevalência de diabetes em pacientes HCV positivos [1, 2, 4-6] até estudos longitudinais tentando analisar o desenvolvimento de diabetes durante o seguimento de pacientes com hepatite C [7, 8].

A resistência à insulina (RI) exerce um papel primário no desenvolvimento de diabetes tipo 2. Diversos estudos longitudinais demonstram que a RI é o melhor preditor para o desenvolvimento de diabetes, precedendo seu início em 10 a 20 anos, em média [3, 9, 10]. Os fatores envolvidos no desenvolvimento de RI também têm sido associados com hepatite C e demonstrados através de métodos de medida de resistência insulínica, como o HOMA-RI ou *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico [11].

Pacientes com DM2 e hepatite C crônica também têm aumento de RI e hiperinsulinemia em jejum em relação a pacientes com DM2 sem hepatite C, como demonstrado em estudo recente realizado no HCPA. Nesse estudo, o aumento da RI não pode ser atribuído a fatores como síndrome metabólica, uma vez que os pacientes foram pareados para diversos fatores de risco relacionados à resistência insulínica [12].

A disfunção das células β também tem sido observada em alguns estudos, demonstrando que pacientes com hepatite C crônica podem apresentar também piora da secreção de insulina. Narita *et al* comprovaram diminuição da secreção aguda de insulina em pacientes HCV positivos através do índice insulinogênico [13]. Caronia *et al* também sugerem hiporresponsividade na secreção de insulina de primeira fase, sugerindo disfunção concomitante de células β [14]. A possível etiologia pode ser desde a presença do vírus infectando a célula β até fatores genéticos, mas permanece indeterminada [15, 16].

Em vista da forte associação entre infecção pelo HCV e desenvolvimento de diabetes, faz-se importante determinar através de quais mecanismos a infecção pelo HCV pode predispor ao desenvolvimento de Diabetes Mellitus.

O objetivo deste estudo é avaliar medidas de resistência e secreção de insulina em pacientes HCV positivos sem cirrose e sem diagnóstico de Diabetes Mellitus em comparação a voluntários saudáveis. Os objetivos secundários são analisar fatores virais que possam estar associados com o grau de resistência insulínica, como genótipo, severidade da fibrose hepática, grau de atividade e nível de esteatose hepática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEPATITE PELO VÍRUS C

2.1.1 Epidemiologia

A infecção pelo vírus da hepatite C é a maior causa de doença hepática crônica, afetando aproximadamente 3% da população mundial, ou seja, cerca de 170 milhões de pessoas [17]. É atualmente a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos e é responsável por 60% das hepatopatias crônicas.

Nos Estados Unidos a prevalência de anticorpos anti-HCV é de 1,8%, correspondendo a uma estimativa de 3,9 milhões de pessoas infectadas [18]. A prevalência tem permanecido constante, embora o pico da idade de infecção tenha aumentado [19]. 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 [18].

A incidência de novos casos de hepatite C tem diminuído em função da triagem sorológica para transfusão de hemoderivados desde 1990 [20]. Recentemente, após a introdução de mais um teste além do anti-HCV, o Teste de Amplificação Nucléica (NAT), que detecta material genético do vírus, o risco de contágio por transfusão diminuiu para próximo de zero [21]. Em usuários de drogas injetáveis a incidência também diminuiu significativamente, por razões ainda desconhecidas [20].

No Brasil, em doadores de sangue, a incidência da hepatite C é de cerca de 1,2%, com diferenças regionais (Portaria SAS-MS nº 863 de 4.11.02). Na região sul, a incidência é de 0,7%.

2.1.2 História natural

O HCV é transmitido pelo sangue através de uso de drogas e exposição ocupacional [20]. Na fase aguda, o período médio de incubação é de 7 a 8 semanas. A hepatite C é uma doença inicialmente silenciosa na maioria dos indivíduos infectados, mas podem ocorrer sintomas similares aos de outras formas de hepatites virais agudas, incluindo mal-estar, náusea e dor no quadrante superior direito [22].

O HCV afeta principalmente o fígado, mas diversos tecidos podem estar envolvidos, resultando em um amplo espectro de manifestações extra-hepáticas, entre elas o Diabetes Mellitus [23, 24]. A maioria das infecções torna-se crônica, sendo uma causa comum de hepatite crônica, cirrose e transplante hepático nos EUA. O espectro da doença varia amplamente. Diversos estudos sugerem que 3 a 20% dos pacientes cronicamente infectados irão desenvolver cirrose em um período de 20 anos [20]. A idade na época da infecção, o uso de álcool e a presença de co-infecções, como pelo vírus da hepatite B (HBV) e da imunodeficiência adquirida (HIV), aceleram a evolução para doença hepática avançada [20].

O HCV é classificado dentro de seis principais genótipos. Os genótipos não parecem influenciar na apresentação ou na severidade da doença, mas têm sido identificados como o principal preditor de resposta à terapia antiviral com interferon [25].

Para se avaliar a prevalência dos genótipos do HCV em Porto Alegre, o plasma de 100 pacientes HCV positivos foi avaliado. Três genótipos (1, 2 e 3) foram demonstrados, sendo a maior prevalência o HCV tipo 1 (55%), seguido pelo tipo 3 (37%) e tipo 2 (8%). Em contraste com a maioria dos estudos publicados a respeito da região sul do Brasil, houve uma prevalência alta de genótipo 3 [26].

Mais recentemente, Silva *et al* realizaram um estudo envolvendo 1544 pacientes que viviam em estados da região sul do Brasil. Este estudo foi o maior já realizado nessa região e demonstrou, através de PCR (Reação de Cadeia da Polimerase), uma prevalência de 53.9% de genótipo 1, 5.4% de genótipo 2 e 40.7% de genótipo 3. Essas frequências foram similares às previamente encontradas, indicando ausência de modificações substanciais na última década [27].

2.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA GLICOSE E SÍNDROME METABÓLICA

Diabetes é uma condição primariamente definida por hiperglicemia resultante de uma deficiência relativa ou absoluta da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, associada ou não à resistência à ação da insulina. Ele é associado com redução da qualidade e da expectativa de vida, significativa morbidade devido a complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e aumento do risco de complicações macrovasculares (doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica) [28, 29].

A IDF estima que mais do que 245 milhões de pessoas ao redor do mundo tenham diabetes. Acredita-se que dentro de 20 anos essa população irá aumentar para 380 milhões. A cada ano mais de 7 milhões de pessoas desenvolvem diabetes [30].

A vasta maioria dos casos corresponde a duas categorias etiopatogênicas. O diabetes tipo 1, que causa deficiência absoluta de insulina por destruição auto-imune das células β pancreáticas, corresponde a 5-10% dos casos. O diabetes tipo 2, que é causado por uma combinação de resistência à ação da insulina e inadequada resposta compensatória de insulina, corresponde a 90-95% dos casos existentes de DM [29].

No quadro evolutivo para o DM, podem ocorrer estágios intermediários denominados tolerância à glicose diminuída (ITG) e glicemia de jejum alterada (GJA). Nessas categorias, o grau de hiperglicemia já é suficiente para causar alterações funcionais e patológicas em vários tecidos alvo, mas sem sintomas clínicos. Essas alterações podem estar presentes por um longo período antes do diagnóstico de diabetes e podem ser detectadas por uma medida de glicose plasmática em jejum ou após um teste oral de tolerância à glicose (TTG-75g) [29]. A presença de uma dessas condições estabelece maior risco de progressão não só para o desenvolvimento do diabetes, mas também de doenças cardiovasculares.

O diagnóstico das alterações no metabolismo da glicose pode ser feito através da glicemia de jejum ou do TTG-75g, de acordo com a tabela abaixo [29]:

Critérios para o diagnóstico de diabetes [29]:

| | Normal | PréDM | DM |
|--|--------|---------------|-----------|
| Glicemia de jejum (mg/dl) | <100 | 100-125 (GJA) | 126 ou +* |
| Glicemia 2h após 75g de glicose oral (mg/dL) | <140 | 140-199 (ITG) | 200 ou + |
| Glicemia casual + sintomas | | | 200 ou + |

* Após 8h de jejum

A síndrome metabólica (SM) consiste em uma constelação de fatores que implicam em risco elevado para doenças cardiovasculares, tais como obesidade abdominal, resistência insulínica, intolerância à glicose ou diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial. A presença de três ou mais dessas manifestações caracteriza a síndrome metabólica ou síndrome de resistência insulínica. Os critérios utilizados para definir a SM podem variar de acordo com diferentes definições, sendo as mais utilizadas as do *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III), da *World Health Organization* (WHO) e da *International Diabetes Federation* (IDF) [31, 32].

2.3 RESISTÊNCIA À INSULINA

2.3.1 Vias de sinalização da insulina

A insulina presente na circulação liga-se ao seu receptor específico nos órgãos-alvo, uma proteína com atividade quinase intrínseca composta por 2 subunidades alfa e 2 subunidades beta, que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade alfa inibe a atividade tirosina quinase da subunidade beta. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina (figura 1), que recrutam moléculas sinalizadoras intracelulares, como os substratos do receptor da insulina (IRS) [33]. Essas e outras proteínas adaptadoras iniciam uma complexa cascata de reações de fosforilação e desfosforilação que irá resultar em extensivos efeitos metabólicos e mitogênicos [34].

A fosfatidilinositol-3' quinase (PI3K) é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina. A ativação da via da (PI3K) estimula a translocação de transportadores de glicose (GLUT4) dos depósitos intracelulares para a superfície celular, evento crucial para que haja captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo [35] e seu armazenamento como glicogênio, além do bloqueio da glicogenólise e da gliconeogênese [36].

Os ácidos graxos que chegam ao fígado são provenientes de três fontes principais: da dieta, absorvidos ao longo do intestino delgado e carreados como quilomícrons através da veia porta; da hidrólise da gordura dos tecidos adiposos periféricos através da ação de uma lipase insulina-sensível; da transformação de aminoácidos e hidratos de carbono no interior do fígado [37].

Uma vez nos hepatócitos, esses ácidos graxos poderão sofrer dois tipos de transformação: β -oxidação ao nível das mitocôndrias e dos peroxissomas, para fornecimento de energia, com formação de gás carbônico, água e corpos cetônicos, ou esterificação para formar triglicérides, os quais irão compor as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) juntamente com o colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas. Em condições normais, o fígado não acumula gordura no interior do hepatócito, pois o VLDL formado é secretado para a corrente sangüínea (figura 2) [37].

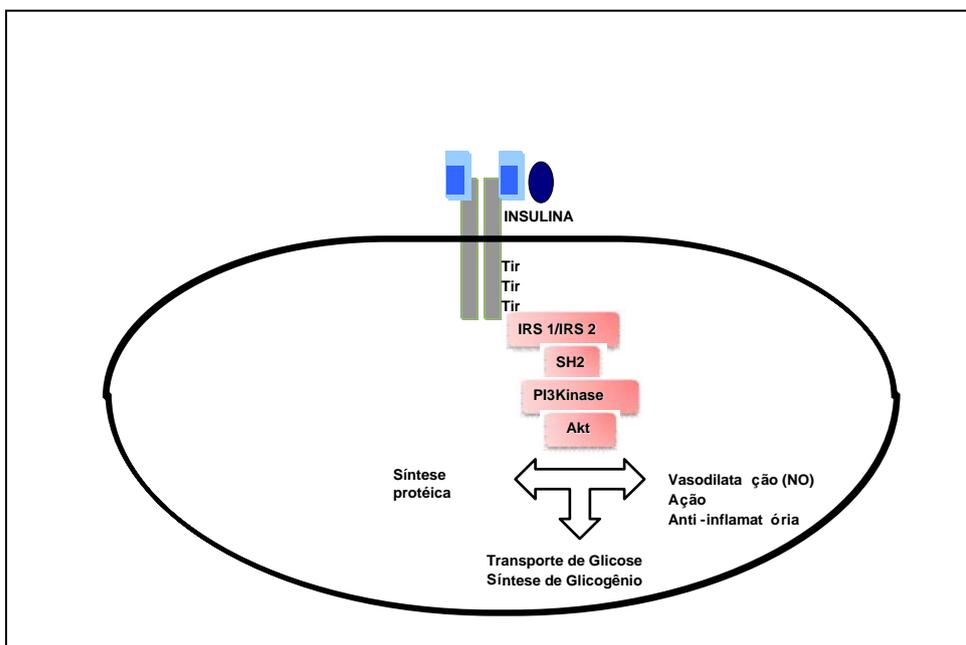


Figura 1. Sinalização do receptor da insulina: fosforilação em tirosina.

Fonte: autoria própria

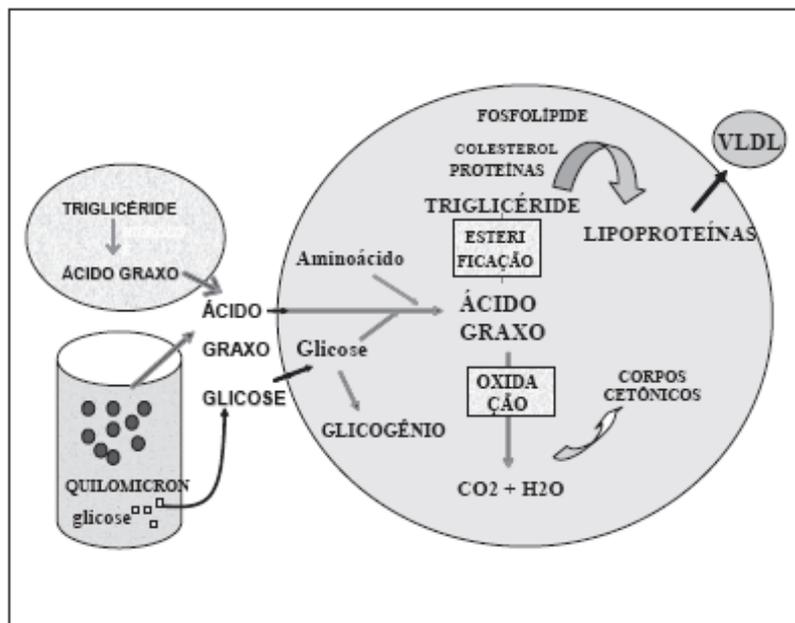


Figura 2: metabolismo hepático do ácido graxo

Fonte: referência [37]

2.3.2 Resistência insulínica

A resistência à insulina (RI) é definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração desse hormônio. Estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos que apresentam RI têm chance maior de desenvolver DM2, além de alguns tipos de dislipidemia, hipertensão arterial, esteato-hepatite não alcoólica, doenças neurodegenerativas e algumas neoplasias, como mama, pâncreas e cólon [38]. Ela é o maior achado da síndrome metabólica e surge como consequência da inabilidade da insulina em induzir seu efeito no metabolismo da glicose, requerendo uma quantidade anormalmente elevada de insulina para prevenir a hiperglicemia. Assim, a resistência insulínica depende da secreção de insulina e da sensibilidade à insulina, ou seja, a secreção aumenta quando a sensibilidade diminui. No curso do DM2, observamos precocemente o aumento da concentração de insulina, bem como em pacientes que não são obesos ou diabéticos, mas apresentam outros componentes da síndrome metabólica [36].

A RI é caracterizada por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal da insulina, com redução da concentração e da atividade quinase do receptor de insulina, da concentração e da fosforilação dos IRS-1 e 2, da atividade da PI3K, da translocação dos transportadores de glicose e da atividade das enzimas intracelulares [34]. Isso pode ocorrer em paralelo à manutenção da ativação normal da via mitogênica, representada pela MAP quinase [39].

Fatores genéticos e adquiridos podem influenciar a sensibilidade à insulina. A síndrome de resistência à insulina e o diabetes tipo 2 são poligênicos e podem envolver polimorfismos em vários genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias de sinalização da insulina, na secreção de insulina e no metabolismo intermediário [40].

O tecido adiposo desempenha papel fundamental na resistência à insulina. Neste tecido, a RI causa inibição da lipase lipoprotéica insulino-sensível, o que aumenta o influxo de ácidos graxos para a circulação e daí para o fígado. Nele, como a β -oxidação e a liberação de triglicéride na forma de VLDL estão inibidas pela hiperinsulinemia, esses ácidos graxos em excesso serão convertidos em triglicérides que se acumularão no fígado, levando ao quadro de esteatose hepática relacionada à síndrome de resistência insulínica [37].

A presença de níveis elevados de AGL circulantes, provenientes da lipólise, também está associada à redução na fosforilação insulino-estimulada do IRS-1 em tirosina e na sua associação com a PI3K [41]. A consequência é a inibição da captação de glicose, da síntese de glicogênio e também da maior produção hepática de glicose.

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que, na obesidade e no DM2, vários tecidos sensíveis à insulina, particularmente o adiposo, exibem um estado de inflamação crônica de baixo grau. A expressão aberrante de uma citocina inflamatória na obesidade, o TNF- α , contribui para o desenvolvimento da RI e pode representar uma das ligações entre inflamação, obesidade e RI [42].

O TNF- α causa resistência à insulina, ativando o fator de transcrição celular (JNK), que promove a fosforilação em serina do IRS-1 [43]. O JNK atua sobre NF- κ B, 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- κ B que promove o aumento intracelular de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento [44].

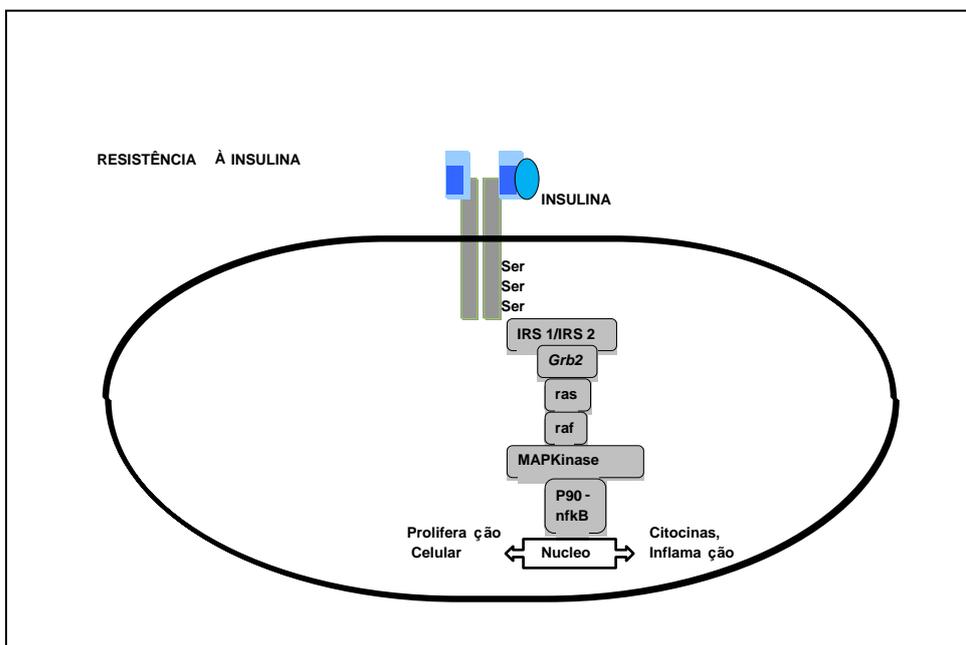


Figura 3. Sinalização do receptor da insulina: ativação da fosforilação em serina/treonina

Fonte: autoria própria

2.3.3 Resistência à insulina e o fígado

O termo doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) tem sido adotado para classificar um espectro de desordens hepáticas gordurosas metabólicas, particularmente quando a histologia é indefinida [45].

Casos de doença hepática gordurosa com inflamação, parecendo esteato-hepatite mas ocorrendo em não-etilistas, já foram descritos há 30 anos atrás. Desde o início da caracterização da DHGNA, sua associação com RI já era sugerida, sendo cada vez mais freqüente a demonstração da sua importância no estabelecimento e progressão da doença [37].

Além de levar à esteatose, a RI está associada às formas mais avançadas da DHGNA. Os indivíduos com esteatohepatite não-alcóolica (EHNA), a qual caracteriza-se por esteatose hepática, hepatite lobular e níveis de alanina aminotransferase (ALT) elevados, apresentam níveis de resistência insulínica superiores aos observados nos pacientes com formas menos avançadas da doença [37, 46].

A DHGNA geralmente é assintomática, mas pode causar sintomas não específicos e que não parecem estar relacionados à severidade da doença. Testes hepáticos também não discriminam entre esteatose, EHNA e cirrose. Na avaliação conjunta da DHGNA estão incluídos perfil lipídico e glicose em jejum ou teste de tolerância à glicose. A dosagem da insulina sérica também pode ter valor no diagnóstico, pois a maioria dos casos de DHGNA já apresenta altos níveis de insulina ao diagnóstico. Os níveis de peptídeo-C também refletem maior secreção de insulina pancreática [45].

Exames de imagem podem demonstrar dados sugestivos de esteatose, como aumento de ecogenicidade hepática à ultrassonografia ou aumento da radioluscência à tomografia computadorizada. Entretanto, nenhum exame de imagem pode distinguir entre EHNA e esteatose. O único exame que pode confirmar a presença ou ausência de EHNA em uma pessoa com achados de DHGNA é a biópsia hepática, a qual é considerada o “padrão ouro” para avaliar a severidade da fibrose [45].

Estudos em humanos têm demonstrado que defeitos mitocondriais podem ser a causa primária de esteatose por causar prejuízo na β -oxidação dos ácidos graxos [47]. Tais defeitos possivelmente têm base genética e são desencadeados

por fatores ambientais, como ácidos graxos saturados. Uma vez instalada, a esteatose pode causar resistência insulínica hepática. Inversamente, a patogênese da EHNA parece estar relacionada com a presença de RI periférica e ela está usualmente associada com outros achados da síndrome metabólica. A resistência insulínica poderia aumentar a injúria celular e a inflamação nos hepatócitos, que acontece quando sua capacidade de armazenar gordura é excedida, ocorrendo lipotoxicidade dos ácidos graxos [45]. Assim, a esteatose parece ser o “primeiro impacto” para o desenvolvimento da EHNA, mas o “segundo impacto”, que é a presença de RI periférica, é necessário para causar dano celular e inflamação.

Na hepatite C crônica a esteatose é freqüentemente encontrada e tem sido atribuída maior gravidade à doença hepática na sua presença. Sua prevalência pode variar de 30 a 70%, sendo mais freqüente em pacientes com genótipo 3. Nos portadores desse genótipo, a presença de esteatose está associada à carga viral mais elevada e tende a regredir com a erradicação viral. Esses fatos sugerem que em tais casos a esteatose decorra da ação citopática direta do vírus. Nos pacientes com genótipo não-3, ao contrário, a esteatose tende a persistir após o tratamento e está mais associada a fatores relacionados ao hospedeiro, como alcoolismo, hipotireoidismo e, principalmente, com características de síndrome metabólica, tais como obesidade central, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, redução do HDL colesterol e diabetes ou intolerância à glicose [36, 37].

2.3.4 Avaliação de resistência e secreção de insulina

Há diversos métodos para se avaliar a RI, porém, a maioria é difícil de se realizar na prática clínica :

- *clamp* de glicose (*clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico);
- teste de tolerância endovenosa à glicose (modelo mínimo de Bergman);
- teste de tolerância oral à glicose (TTG-75g);
- teste de tolerância à insulina (KITT);
- Matsuda
- *Homeostasis model assessment* (HOMA)

A medida do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico é o “padrão ouro” na avaliação da resistência à insulina. Permite examinar a sensibilidade tecidual à

insulina, tanto no 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 [38].

A determinação da sensibilidade à insulina pelo *clamp* é baseada no conceito de que, mantendo-se constantes os níveis de 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 [38, 48].

Stern *et al.* realizaram um estudo com dados do *clamp* euglicêmico, considerado método padrão-ouro, em diferentes populações. Foram avaliados 2321 resultados de *clamp*, sendo 2138 em indivíduos não-diabéticos. Isso permitiu a definição de critérios clinicamente viáveis de RI, utilizando o IMC e o HOMA-RI ou os níveis de lípides séricos e história familiar de DM [38].

O método mais amplamente utilizado é o *índice Homeostasis Model Assessment- insulin resistance* (HOMA-RI). É um método simples, que só utiliza as dosagens basais de insulina e glicose. É calculado através da fórmula glicemia de jejum (mmol/l = mg/dl / 18) x insulinemia de jejum (μ U/ml) / 22,5 [49]. O estudo BRAMS (*Brazilian Metabolic Syndrome Study*), que avaliou 372 pessoas sem diabetes, obteve o valor de referência de $1,66 \pm 0,81$ para o HOMA-RI. De acordo com esse estudo, valores acima de 2,71 devem ser considerados anormais [50], ou seja, em pacientes obesos ou com síndrome metabólica espera-se encontrar valores elevados para o HOMA-RI.

O HOMA também é utilizado para se avaliar a função das células β através da fórmula $20 \times$ insulinemia de jejum (μ U/ml) / glicemia de jejum (mmol/l) – 3,5. Entretanto, os dados sobre a função da célula β não podem ser avaliados isoladamente, pois pode-se concluir erroneamente que um indivíduo magro, com diminuição da secreção de insulina por apresentar alta sensibilidade à insulina,

apresenta falência de secreção pancreática. Assim, a função da célula β sempre deve ser interpretada juntamente com a medida da sensibilidade à insulina [49].

2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE HEPATITE C E DIABETES MELLITUS

2.4.1 Prevalência de DM em indivíduos infectados pelo HCV

Estudos recentes têm demonstrado uma forte associação entre infecção pelo vírus da hepatite C e diabetes mellitus tipo 2. A prevalência varia desde 4,9% a 34,6% [1, 4, 5]. Apesar dessa alta prevalência de DM2, o mesmo não ocorre com o DM tipo 1 [2, 51]. A frequência da associação entre hepatite C e DM2 também é mais alta do que a observada em pacientes com outras doenças hepáticas crônicas, como hepatite B [6, 52], doença hepática alcoólica, cirrose biliar primária [2] e do que na população geral.

Não está ainda muito bem definida qual a relação temporal da infecção pelo HCV com o desenvolvimento de diabetes [53]. Em 73% dos casos, a infecção pelo HCV precede o diagnóstico de DM, como relatado por Knobler *et al* [1]. Há diversos relatos de surgimento de diabetes em torno de 10 a 20 anos após a provável causa de infecção pelo HCV, como transfusão de sangue prévia.

Em um estudo de coorte em Taiwan, 4958 pessoas com 40 anos de idade ou mais foram acompanhadas durante sete anos. Desses, 3486 pessoas eram soronegativas, 812 eram anti-HCV positivo, 116 eram co-infectadas pelos vírus da hepatite B e C e 544 apresentavam hepatite B. A incidência cumulativa de diabetes foi significativamente maior em pessoas HCV positivas ou co-infectadas, com sobrepeso ou obesidade e idade mais avançada. Quanto mais jovem a pessoa com infecção pelo HCV, maior é o risco de ela vir a desenvolver diabetes. Assim, os autores sugerem que o rastreamento para DM deveria ser mais precoce em pessoas HCV positivas [7].

A relação entre hepatite C e DM2 foi estudada no nosso meio por Cheinquer *et al* em 140 pacientes HCV positivos, tendo sido observados 12% de casos de DM2. No grupo com diabetes, 93% apresentaram cirrose comparativamente a 47% dos pacientes sem diabetes. A associação hepatite C e diabetes neste estudo foi um achado particularmente associado à presença de cirrose e à idade acima de 50 anos. Neste estudo não foi avaliada a prevalência de pacientes com tolerância diminuída à glicose ou com glicose de jejum alterada, o que, teoricamente, poderia estar associado a uma fase mais precoce da doença hepática [54].

Em função da alta prevalência de DM ou intolerância à glicose em pacientes HCV positivos, sugere-se que eles sejam considerados grupo de risco para o

desenvolvimento de diabetes. De acordo com os critérios diagnósticos recomendados pelo *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes*, o rastreamento deve ser feito com a glicemia de jejum [29]. Entretanto, para alguns grupos de alto risco, recomenda-se realizar o TTG-75g para se fazer o diagnóstico. Em um estudo realizado com 50 pacientes HCV negativos e 50 pacientes HCV positivos, controlados para sexo, idade e índice de massa corpórea (IMC), ambos os grupos foram submetidos ao TTG-75g. Os resultados demonstraram 18% de novos casos de diabetes e 30% de intolerância à glicose, achados significativamente mais elevados que em pacientes HCV negativos (quatro e 18%, respectivamente), sugerindo ser o TTG-75g o melhor exame para rastreamento de DM em pacientes HCV positivos [55].

2.4.2 Prevalência de anticorpos anti-HCV na população com DM2

Recentemente, diversos relatos de uma alta prevalência de hepatite C em pacientes com diabetes tipo 2 têm sido publicados, a maioria nas populações ocidentais. Isso sugere que o diabetes pode ser considerado um fator de risco para se adquirir infecção pelo HCV e, possivelmente, tenha uma relação etiológica com o HCV. Pacientes com DM apresentam maior índice de infecção por vírus C do que a população geral [2]. A prevalência de anticorpos anti-HCV na população com DM2 varia entre 1,78 e 12,1% [56, 57].

A consequência clínica dessa alta prevalência de infecção pelo HCV na população com DM2 é que elevações médias nos níveis de transaminases séricas não devem ser automaticamente atribuídas à doença hepática gordurosa; assim, todos os pacientes com DM2 e função hepática anormal devem ser testados quanto à infecção pelo HCV [56].

A maior prevalência de HCV na população com diabetes também não está relacionada com os principais fatores de risco associados à soropositividade para o HCV [56, 58]. Também não se observa maior prevalência de infecção pelo vírus da hepatite B, que apresenta os mesmos fatores epidemiológicos de transmissão que o HCV, na presença de DM [57].

Entretanto, há relatos que demonstram não haver maior prevalência de HCV na população com DM2 [59, 60]. Em estudo realizado na Grécia, a prevalência de HCV em pacientes com DM2 foi de apenas 1,65% [60]. Em outro estudo, 90

pacientes com diabetes foram comparados com 90 pacientes sem diabetes quanto à prevalência de DM2. Os resultados demonstraram que nenhum dos pacientes com diabetes apresentou teste positivo para HCV, enquanto 1,1% do grupo controle apresentou anti-HCV positivo [59].

No Brasil, um estudo de caso-controle foi conduzido para comparar 206 pacientes com DM2 com 206 pacientes sem alterações no metabolismo da glicose. Todos os pacientes consultavam no hospital da Universidade Federal do Mato Grosso, em Cuiabá, e foram entrevistados entre abril e outubro de 2005. Não houve diferença na prevalência de anti-HCV entre os grupos: três diabéticos (1,4%) foram confirmados positivos pra hepatite C, enquanto entre os controles somente dois (1%) foram confirmados [61]. Assim, estudos multicêntricos se fazem necessários para estimar melhor essa prevalência e esclarecer essa associação [60, 62].

2.4.3 Prevalência de anticorpos anti-HCV na população com DM1

Embora a literatura seja escassa para a essa associação, a prevalência de anti-HCV em indivíduos com DM1 não excede o índice de prevalência esperado para a população geral, em contraste com o DM2. Em um estudo realizado na Itália com 187 crianças e adolescentes com DM1, todos foram testados para anticorpos anti-HCV e nenhum foi positivo, indicando que essa infecção é rara entre pacientes com DM1 e sugerindo que o vírus não desenvolve nenhum papel na patogênese da doença [51].

2.4 4 Principais mecanismos patogênicos

Apesar de haver diversos estudos revisando essa associação epidemiológica, os mecanismos patogênicos envolvidos com o desenvolvimento de DM em pacientes com infecção pelo HCV não são bem conhecidos, embora ambos resistência insulínica e piora na secreção de insulina têm sido considerados por desenvolverem um importante papel no surgimento do DM [13, 14].

A presença de fatores de risco adicionais, como obesidade, idade ou cirrose torna complexo o estabelecimento de uma relação causa-efeito e uma definição da patogênese dessa associação. Porém, a questão central gira em torno da capacidade do vírus em promover resistência insulínica ou de reduzir a capacidade de secreção de insulina da célula beta pancreática.

A RI tem sido demonstrada estar associada com hepatite C em diversos estudos [3, 55, 63]. Os principais fatores envolvidos são resistência insulínica hepática e muscular. Os ácidos graxos livres promovem fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 em serina nos miócitos que apresentam depósitos de gordura, inibindo a fosfatidilinositol-3' quinase e bloqueando a translocação de GLUT-4. Assim, a captação de glicose fica prejudicada nessas células. Nos hepatócitos, ocorre diminuição da síntese de glicogênio, com liberação de glicose para a circulação [36].

As hipóteses para o desenvolvimento de RI em pacientes com hepatite crônica pelo HCV variam. Acredita-se que possa ser causada pelo próprio dano hepático e que possa estar relacionada com o grau de fibrose [64]. A fibrose hepática tem sido considerada responsável pelo desenvolvimento de resistência insulínica e diabetes tipo 2 em pacientes com doença hepática crônica.

Konrad *et al* analisaram a tolerância à glicose utilizando o “*minimal modeling*” para avaliar a secreção de insulina de primeira e segunda fase entre pacientes HCV positivos e negativos. Também avaliaram sua relação com o grau de fibrose hepática. Os pacientes HCV positivos eram mais resistentes à insulina, a qual apresentava relação com o estágio de fibrose [65]. A RI também pode contribuir para a progressão da fibrose na hepatite C crônica [3].

Entretanto, Hui *et al* analisaram 260 pacientes HCV positivos quanto ao HOMA-RI em relação a controles saudáveis, mesmo em estágios 0 ou 1 de fibrose hepática. Esse estudo concluiu que o vírus C pode induzir resistência insulínica independentemente da severidade da doença hepática [3].

A esteatose hepática é mais freqüentemente associada com HCV que HBV e ocorre em mais que 50% dos pacientes com hepatite C crônica [66], especialmente associada ao genótipo 3 [67]. A esteatose pode diminuir a ação da insulina no fígado, favorecendo a produção hepática de glicose [68, 69], além de também favorecer o desenvolvimento de fibrose hepática [64].

A presença de esteatose e esteato-hepatite também pode contribuir para a inflamação hepática e confundir a avaliação de resistência insulínica. Estudos sugerem que existem mecanismos diferentes para o desenvolvimento de esteatose de acordo com o genótipo viral. No genótipo 3, a esteatose é consequência de

lesão citopática direta do vírus, induzindo reação inflamatória, enquanto no genótipo 1 ela está associada com a presença de síndrome metabólica [70].

A própria resistência insulínica é fator de risco para desenvolvimento de esteatose moderada a severa. Isso tem relevância clínica, uma vez que ela está associada com a evolução da fibrose e hipo-responsividade à terapia anti-viral [66].

Diversos relatos também têm demonstrado um aumento nos níveis séricos de TNF- α ou de seus receptores em pacientes infectados pelo HCV [71-73]. O aumento na expressão de receptores de superfície de TNF- α (TNFR1 e TNFR2), principalmente relacionados com o dano hepatocelular e o grau de inflamação hepática, confirmam essa relação. [73]. Esse aumento na produção de TNF- α pode ser responsável pela fosforilação em serina do IRS-1 e 2, prejudicando a sinalização intracelular da insulina e bloqueando a translocação de GLUT-4. Além disso, a exagerada produção de TNF- α em pacientes com hepatite C crônica tem sido relacionada com mais altos níveis de fibrose e piora da resposta à terapia antiviral com interferon- α por ser uma citocina pro-inflamatória e pró-fibrogênica. Porém, os níveis de TNF- α correlacionam-se com os níveis de insulina em jejum e índices de resistência insulínica, como o HOMA-RI, independente do estágio da fibrose [74].

A deficiência de secreção de insulina também pode estar envolvida no desenvolvimento de DM em pacientes HCV positivos. A disfunção da célula β em pacientes HCV positivos tem sido observada em alguns casos, que demonstraram níveis mais baixos de HOMA-% β [14]. Narita *et al* avaliaram 131 pacientes com hepatite C quanto a medidas de resistência e secreção de insulina. Foi encontrado um alto índice de intolerância à glicose (27,5%) após o TTG-75g. Os pacientes com intolerância à glicose apresentaram não somente níveis mais elevados de HOMA-RI como também medidas de secreção de insulina (índice insulinogênico e Delta-Peptídeo C 30) mais baixas que em pacientes com tolerância normal à glicose [13]. Nesse estudo, foi demonstrado que os níveis basais de secreção estavam normais; porém, a secreção de primeira fase é que pareceu estar diminuída [13].

Entretanto, outros estudos demonstram aumento do HOMA-% β na hepatite C crônica [63]. Em estudo recente, Oliveira *et al* avaliaram 15 pacientes HCV positivos e 15 negativos pareados por sexo, idade e IMC quanto a medidas de resistência e secreção de insulina. Todos os pacientes apresentavam DM2. Os

achados demonstraram que pacientes com DM2 e HCV têm aumento de RI em relação a pacientes com DM2 sem hepatite C. Nesse estudo, o aumento da RI não pode ser atribuído a fatores como síndrome metabólica, uma vez que os pacientes foram pareados para diversos fatores de risco relacionados à resistência insulínica [12]. Também foram encontrados valores médios mais elevados para HOMA-% β . Nesse estudo, os pacientes estavam usando sulfoniluréia, o que pode ter influenciado a secreção de insulina pelas células β [12]. Em outro estudo realizado com 92 pacientes infectados pelo HCV, tanto HOMA-RI quanto HOMA-% β estavam elevados, principalmente quando associados com cirrose [63].

Há diversas possíveis causas para se tentar explicar essa disfunção, como fatores genéticos ou virais [13]. Em pacientes com hepatite C crônica que receberam peginterferon e ribavirina, a resistência insulínica, medida pelo HOMA-RI, diminuiu durante ou ao final da terapia. Já os não-respondedores não apresentaram modificação em relação aos valores basais. Tais dados suportam a hipótese de que existe uma conexão entre a replicação viral e a resistência insulínica, bem como que o HOMA diminui após a erradicação viral [75, 76].

De acordo com dados disponíveis na literatura, a infecção pelo HCV parece estar fortemente associada com outras desordens imunológicas [24, 77, 78]. Assim, também poderia estar associado com destruição auto-imune das células beta pancreáticas, levando ao diabetes. O gatilho para o processo auto-imune poderia ser a semelhança molecular de algumas porções de aminoácidos do HCV com anticorpos anti-GAD (ácido glutâmico-decarboxilase), um dos principais antígenos das ilhotas pancreáticas [79]. Entretanto, a presença de anti-GAD em pacientes HCV positivos não parece ser um achado freqüente [80], nem mesmo entre pacientes que apresentam diabetes [57].

A prevalência de anticorpos contra outros antígenos das células beta pancreáticas também não estava aumentada em um estudo que comparou pacientes HCV positivos com e sem diabetes com controles pareados por sexo e idade [81]. Assim, os dados disponíveis não parecem apresentar evidências significativas da associação entre HCV e auto-imunidade contra as células beta.

Embora o HCV seja um vírus hepatotrópico, sua presença tem sido identificada em diferentes tecidos extra-pancreáticos, como rins, pulmões, testículos e também no pâncreas [82].

Em um estudo recente, Masini *et al* demonstraram a presença de infecção pelo HCV nas células beta pancreáticas de humanos. Eles sugerem que a presença do vírus nas ilhotas exerce uma ação citopática que causa alterações morfológicas e funcionais nas células. Essa ação pode explicar, em parte, a associação entre HCV e diabetes, especialmente em indivíduos predispostos [15].

2.5 OUTROS MECANISMOS PATOGÊNICOS DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA

2.5.1 Cirrose

A hiperinsulinemia na cirrose hepática pode estar relacionada com a diminuição da degradação de insulina como resultado da disfunção hepática. Quando pacientes com cirrose e infectados pelo HCV são avaliados, a prevalência de diabetes tipo 2 é mais alta que a relatada em pacientes com hepatite crônica, variando de 19,6 a 50% [55, 57, 83, 84]. Entretanto, as diferenças entre pacientes anti-HCV positivos e negativos não estão presentes. Embora pacientes com cirrose de outra etiologia que não doença hepática colestática tenham mais alta prevalência de diabetes que pacientes com hepatite crônica, não há diferença significativa entre cirróticos com ou sem infecção pelo HCV [55, 83, 84].

A prevalência de DM ou intolerância à glicose (IGT) também é mais alta em pacientes com doença hepática em estágio mais avançado que naqueles com alterações histológicas em estágio inicial [8, 85]. Assim, a doença hepática avançada parece ser um fator diabetogênico independente da infecção pelo HCV [83, 86].

2.5.2 Pós-transplante

DM pós-transplante (DMPT) é uma condição médica comum que vem apresentando significativo aumento no transcorrer da última década [87]. Diversos fatores de risco têm sido associados com seu desenvolvimento, como os próprios fatores de risco para DM apresentados pelo receptor, o uso de agentes imunossupressores [88] ou a presença do HCV [89].

A prevalência de DMPT em pacientes em pós-transplante hepático infectados pelo HCV varia de 40 a 64%, a qual é significativamente mais alta que a prevalência relatada em pacientes transplantados por outras causas de falência hepática [90]. A presença do HCV também parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de diabetes após transplante. Mesmo pacientes sem diabetes já demonstram aumento em medidas de resistência insulínica, como o HOMA-IR, conforme demonstrado por Delgado-Borrego *et al* em estudo transversal com pacientes em pós-transplante hepático que comparou 39 pacientes HCV positivos com 60 HCV negativos. Nesse estudo, a infecção pelo HCV foi associada com um aumento de 35% na RI [91].

Em pacientes que realizaram transplante renal, a infecção pelo HCV também tem sido identificada como fator de risco independente para o desenvolvimento de DMPT [92]. Esses dados reforçam a hipótese de que o HCV está relacionado com o desenvolvimento de diabetes e que essa associação pode contribuir substancialmente com o pior prognóstico apresentado por pacientes HCV positivos após transplante de fígado ou rim [93].

2.5.3 Genótipos

A relação entre diabetes tipo 2 e HCV permanece controversa. Há relatos de que não existe diferença na distribuição de diferentes genótipos do vírus da hepatite C entre pacientes com e sem diabetes [83]. Também não foi considerado fator associado com desenvolvimento de DM ou resistência à insulina em pacientes com HCV, de acordo com Petit *et al* [58].

Já em um estudo de caso-controle de 45 pacientes HCV positivos sem cirrose, 15 (33%) apresentaram critérios diagnósticos para diabetes. Quando os pacientes com e sem diabetes foram comparados, encontrou-se que história familiar positiva para diabetes, genótipo 1b e dano hepático mais severo estavam significativamente associados com DM [1].

Entretanto, existem diferenças entre os mecanismos com que os diferentes genótipos virais podem induzir resistência insulínica. O genótipo 3, por ser mais esteatogênico [70], pode colaborar para a progressão da fibrose e o desenvolvimento de resistência insulínica [67]. O genótipo 1 depende mais da presença de fatores de risco para síndrome metabólica para desenvolver esteatose [70] e resistência insulínica. Este está associado com evolução da fibrose pela presença de esteatose, hiperleptinemia, aumento de TNF- α e diminuição da expressão de receptores PPAR-gama [36].

A resposta à terapia anti-viral também difere entre os genótipos. Em pacientes com genótipo 1, a resistência à insulina diminui a resposta sustentada ao interferon e aumenta o risco de esteatose e progressão da fibrose [94]. Entretanto, o impacto em outros genótipos parece ser menos importante.

2.5.4 Sobrecarga de ferro

O aumento dos níveis séricos de ferritina está associado com resistência insulínica e aumento do risco de diabetes tipo 2 [95, 96]. Como pacientes HCV positivos também apresentam maiores níveis de ferritina sérica, postula-se que as reservas aumentadas de ferro apresentem ligação entre HCV e diabetes [97, 98].

O provável mecanismo seria que os depósitos hepáticos de ferro poderiam interferir na capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose [99]. Como a maioria dos estudos apresenta diversos fatores de confusão, fica difícil avaliar qual a real relação da ferritina nessa associação. Quando esses fatores são levados em consideração, apenas os pacientes HCV positivos com diabetes apresentam maiores níveis de ferritina, sugerindo que apenas o DM esteja relacionado com o aumento dos seus níveis [58, 100].

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que tanto a Hepatite C quanto alterações no metabolismo da glicose são patologias altamente prevalentes em nosso meio e que sua associação pode piorar o prognóstico de ambas, existe a necessidade de se avançar mais na compreensão dos mecanismos que regulam essa associação para que possamos intervir precocemente.

O rastreamento de alterações no metabolismo da glicose em pacientes HCV positivos, como realizado no presente estudo, pode colaborar para a prevenção do desenvolvimento de Diabetes Mellitus nessa população, bem como minimizar o dano hepático, que é mais severo em pacientes com pior controle glicêmico.

4 OBJETIVOS

Objetivo geral:

1. Avaliar a resistência e a secreção de insulina em pacientes HCV positivos sem diagnóstico de diabetes e sem cirrose em comparação a voluntários saudáveis.

Objetivos secundários:

1. Analisar fatores virais que possam estar associados com resistência à insulina, como genótipo viral.

2. Avaliar se os graus de fibrose e esteatose hepáticas estão associados com maior resistência insulínica.

5 REFERÊNCIAS

1. Knobler, H., et al., *Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection*. *Mayo Clin Proc*, 2000. 75(4): p. 355-9.
2. Bahtiyar, G., et al., *Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights*. *Curr Diab Rep*, 2004. 4(3): p. 194-8.
3. Hui, J.M., et al., *Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]*. *Gastroenterology*, 2003. 125(6): p. 1695-704.
4. Chen, L.K., et al., *Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C*. *World J Gastroenterol*, 2003. 9(3): p. 505-8.
5. Grimbert, S., et al., *High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. A case-control study*. *Gastroenterol Clin Biol*, 1996. 20(6-7): p. 544-8.
6. Arao, M., et al., *Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus*. *J Gastroenterol*, 2003. 38(4): p. 355-60.
7. Wang, C.S., et al., *Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes in a community-based longitudinal study*. *Am J Epidemiol*, 2007. 166(2): p. 196-203.
8. Zein, C.O., et al., *Chronic hepatitis C and type II diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study*. *Am J Gastroenterol*, 2005. 100(1): p. 48-55.
9. Warram, J.H., et al., *Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents*. *Ann Intern Med*, 1990. 113(12): p. 909-15.
10. Martin, B.C., et al., *Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study*. *Lancet*, 1992. 340(8825): p. 925-9.
11. Yazicioglu, G., et al., *Insulin resistance in chronic hepatitis C*. *Int J Clin Pract*, 2004. 58(11): p. 1020-2.
12. Oliveira, B.R., et al., *Increased insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007.
13. Narita, R., et al., *Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*, 2004. 41(1): p. 132-8.
14. Caronia, S., et al., *Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 1999. 30(4): p. 1059-63.
15. Masini, M., et al., *Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction*. *Diabetes Care*, 2005. 28(4): p. 940-1.
16. Kosaka, K., et al., *Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin-dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Diabet Med*, 1996. 13(9 Suppl 6): p. S109-19.
17. *Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium*. *J Viral Hepat*, 1999. 6(1): p. 35-47.
18. Alter, M.J., et al., *The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994*. *N Engl J Med*, 1999. 341(8): p. 556-62.
19. Rustgi, V.K., *The epidemiology of hepatitis C infection in the United States*. *J Gastroenterol*, 2007. 42(7): p. 513-21.
20. *NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002*. *NIH Consens State Sci Statements*, 2002. 19(3): p. 1-46.
21. Schuttler, C.G., et al., *Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA*. *Lancet*, 2000. 355(9197): p. 41-2.
22. Villano, S.A., et al., *Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection*. *Hepatology*, 1999. 29(3): p. 908-14.
23. Alberti, A., L. Chemello, and L. Benvegno, *Natural history of hepatitis C*. *J Hepatol*, 1999. 31 Suppl 1: p. 17-24.
24. Mason, A. and S. Nair, *Is type II diabetes another extrahepatic manifestation of HCV infection?* *Am J Gastroenterol*, 2003. 98(2): p. 243-6.

25. Bowden, D.S. and M.D. Berzsenyi, *Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role*. *Future Microbiol*, 2006. 1: p. 103-12.
26. Krug, L.P., et al., *Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil*. *Braz J Med Biol Res*, 1996. 29(12): p. 1629-32.
27. Silva, C.M., et al., *High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007. 102(7): p. 867-70.
28. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. *Diabet Med*, 1998. 15(7): p. 539-53.
29. *Position statements & ADA statements*. *Diabetes Care*, 2006. 29 Suppl 1: p. S75-7.
30. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1047-53.
31. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. *Jama*, 2001. 285(19): p. 2486-97.
32. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. *Diabet Med*, 2006. 23(5): p. 469-80.
33. White, M.F., et al., *A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor*. *J Biol Chem*, 1988. 263(6): p. 2969-80.
34. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2000. 106(2): p. 165-9.
35. Folli, F., et al., *Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat*. *J Biol Chem*, 1992. 267(31): p. 22171-7.
36. Romero-Gomez, M., *Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non-response*. *Rev Esp Enferm Dig*, 2006. 98(8): p. 605-15.
37. Parise, E.R. and A.C. Oliveira, *[Insulin resistance in chronic hepatitis C]*. *Arq Gastroenterol*, 2007. 44(2): p. 178-84.
38. Stern, S.E., et al., *Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements*. *Diabetes*, 2005. 54(2): p. 333-9.
39. Cusi, K., et al., *Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle*. *J Clin Invest*, 2000. 105(3): p. 311-20.
40. Taylor, S.I., et al., *Mutations in the insulin receptor gene in genetic forms of insulin resistance*. *Recent Prog Horm Res*, 1990. 46: p. 185-213; discussion 213-7.
41. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2000. 106(2): p. 171-6.
42. Duncan, B.B. and M.I. Schmidt, *Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome*. *Sao Paulo Med J*, 2001. 119(3): p. 122-7.
43. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance*. *Science*, 1996. 271(5249): p. 665-8.
44. Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine, *Inflammation and insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1793-801.
45. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. *Hepatology*, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S99-S112.
46. Nannipieri, M., et al., *Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study*. *Diabetes Care*, 2005. 28(7): p. 1757-62.
47. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. *Science*, 2003. 300(5622): p. 1140-2.
48. *Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association*. *Diabetes Care*, 1998. 21(2): p. 310-4.
49. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling*. *Diabetes Care*, 2004. 27(6): p. 1487-95.

50. Geloneze, B., et al., *The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006. 72(2): p. 219-20.
51. Cerutti, F., et al., *Anti-HCV antibodies in a population of insulin-dependent diabetic children and adolescents*. *Diabetes Care*, 1999. 22(9): p. 1587-8.
52. Akbar, D.H., A.M. Siddique, and M.M. Ahmed, *Prevalence of Type-2 diabetes in patients with hepatitis C and B virus infection in Jeddah, Saudi Arabia*. *Med Princ Pract*, 2002. 11(2): p. 82-5.
53. Mehta, S.H., et al., *Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes*. *Hepatology*, 2003. 38(1): p. 50-6.
54. Cheinquer H, G.C., Berton D, Cheinquer N, Borges S, Fonseca A, Lunge V, Ikuta N, *Prevalência de diabetes mellitus em pacientes com hepatite crônica C*. *Revista AMRIGS*, 1998: p. 68-71.
55. Lecube, A., et al., *High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury*. *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1171-5.
56. Simo, R., et al., *High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients*. *Diabetes Care*, 1996. 19(9): p. 998-1000.
57. Mason, A.L., et al., *Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 1999. 29(2): p. 328-33.
58. Petit, J.M., et al., *Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C*. *J Hepatol*, 2001. 35(2): p. 279-83.
59. Balogun, W.O., et al., *Low prevalence of hepatitis-C viral seropositivity among patients with type-2 diabetes mellitus in a tertiary hospital*. *J Natl Med Assoc*, 2006. 98(11): p. 1805-8.
60. Sotiropoulos, A., et al., *Low prevalence of hepatitis C virus infection in Greek diabetic patients*. *Diabet Med*, 1999. 16(3): p. 250-2.
61. Costa, L.M., et al., *Hepatitis C as a risk factor for diabetes type 2: lack of evidence in a hospital in central-west Brazil*. *Braz J Infect Dis*, 2008. 12(1): p. 24-6.
62. Lecube, A., et al., *Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis*. *Diabetes Care*, 2006. 29(5): p. 1140-9.
63. Furutani, M., et al., *Insulin resistance/beta-cell function and serum ferritin level in non-diabetic patients with hepatitis C virus infection*. *Liver Int*, 2003. 23(4): p. 294-9.
64. Petit, J.M., et al., *Apolipoprotein-AII Concentrations are Associated With Liver Steatosis in Patients With Chronic Hepatitis C*. *Dig Dis Sci*, 2007.
65. Konrad, T., et al., *Severity of HCV-induced liver damage alters glucose homeostasis in noncirrhotic patients with chronic HCV infection*. *Digestion*, 2000. 62(1): p. 52-9.
66. Camma, C., et al., *Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2006. 43(1): p. 64-71.
67. Rubbia-Brandt, L., et al., *Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way*. *Gut*, 2004. 53(3): p. 406-12.
68. Castera, L., et al., *Hepatitis C virus-induced hepatocellular steatosis*. *Am J Gastroenterol*, 2005. 100(3): p. 711-5.
69. Castera, L., *Steatosis, insulin resistance and fibrosis progression in chronic hepatitis C*. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006. 52(2): p. 125-34.
70. Hui, J.M., et al., *Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002. 17(8): p. 873-81.
71. Itoh, Y., et al., *Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection*. *Am J Gastroenterol*, 1999. 94(5): p. 1332-40.
72. Nelson, D.R., et al., *Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection*. *Dig Dis Sci*, 1997. 42(12): p. 2487-94.
73. Knobler, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association*. *Am J Gastroenterol*, 2003. 98(12): p. 2751-6.
74. Maeno, T., et al., *Mechanisms of increased insulin resistance in non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. 18(12): p. 1358-63.

75. Ito, Y., et al., *Effects of long-term interferon-alpha treatment on glucose tolerance in patients with chronic hepatitis C*. *J Hepatol*, 1999. 31(2): p. 215-20.
76. Tai, T.Y., et al., *Interferon-alpha reduces insulin resistance and beta-cell secretion in responders among patients with chronic hepatitis B and C*. *J Endocrinol*, 2003. 178(3): p. 457-65.
77. Gumber, S.C. and S. Chopra, *Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations*. *Ann Intern Med*, 1995. 123(8): p. 615-20.
78. Sene, D., et al., [*Update in Hepatitis C virus associated extrahepatic manifestations*]. *Rev Med Interne*, 2007. 28(6): p. 388-93.
79. Honeyman, M.C., N.L. Stone, and L.C. Harrison, *T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents*. *Mol Med*, 1998. 4(4): p. 231-9.
80. Hieronimus, S., et al., *Antibodies to GAD in chronic hepatitis C patients*. *Diabetes Care*, 1997. 20(6): p. 1044.
81. Piquer, S., et al., *Islet cell and thyroid antibody prevalence in patients with hepatitis C virus infection: effect of treatment with interferon*. *J Lab Clin Med*, 2001. 137(1): p. 38-42.
82. Laskus, T., et al., *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*, 1998. 28(5): p. 1398-401.
83. Zein, N.N., et al., *Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease*. *J Hepatol*, 2000. 32(2): p. 209-17.
84. Parolin, M.B., et al., *Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Brazilian liver transplant candidates: negative association with HCV status*. *Transplant Proc*, 2004. 36(9): p. 2774-5.
85. Alavian, S.M., et al., *Prevalence and determinants of diabetes mellitus among Iranian patients with chronic liver disease*. *BMC Endocr Disord*, 2004. 4(1): p. 4.
86. Lecube, A., et al., *Glucose Abnormalities Are an Independent Risk Factor for Nonresponse to Antiviral Treatment in Chronic Hepatitis C*. *Am J Gastroenterol*, 2007.
87. Cosio, F.G., et al., *Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years*. *Kidney Int*, 2001. 59(2): p. 732-7.
88. Baid, S., et al., *Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients: risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality*. *Transplantation*, 2001. 72(6): p. 1066-72.
89. AlDosary, A.A., et al., *Post-liver transplantation diabetes mellitus: an association with hepatitis C*. *Liver Transpl*, 2002. 8(4): p. 356-61.
90. Parolin, M.B., et al., *Prevalence of new-onset diabetes mellitus in Brazilian liver transplant recipients: association with HCV infection*. *Transplant Proc*, 2004. 36(9): p. 2776-7.
91. Delgado-Borrego, A., et al., *Hepatitis C virus is independently associated with increased insulin resistance after liver transplantation*. *Transplantation*, 2004. 77(5): p. 703-10.
92. GURSOY, M., et al., *Impact of HCV infection on development of posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients*. *Transplant Proc*, 2000. 32(3): p. 561-2.
93. Abbott, K.C., et al., *Impact of diabetes and hepatitis after kidney transplantation on patients who are affected by hepatitis C virus*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(12): p. 3166-74.
94. Romero-Gomez, M., et al., *Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients*. *Gastroenterology*, 2005. 128(3): p. 636-41.
95. Salonen, J.T., et al., *Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study*. *Bmj*, 1998. 317(7160): p. 727.
96. Jiang, R., et al., *Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women*. *Jama*, 2004. 291(6): p. 711-7.
97. Di Bisceglie, A.M., et al., *Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis*. *Gastroenterology*, 1992. 102(6): p. 2108-13.
98. Farinati, F., et al., *Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis*. *J Hepatol*, 1995. 22(4): p. 449-56.

99. Mendler, M.H., et al., *Insulin resistance-associated hepatic iron overload. Gastroenterology*, 1999. 117(5): p. 1155-63.
100. Lecube, A., et al., *Diabetes is the main factor accounting for the high ferritin levels detected in chronic hepatitis C virus infection. Diabetes Care*, 2004. 27(11): p. 2669-75.

6 ARTIGO (VERSÃO EM INGLÊS)

Increased Insulin Resistance and Insulin Secretion in non-Diabetic Treatment-Naïve Patients with Chronic Hepatitis C

ADRIANA FORNARI, MD ^{1 2}

MARCELLO C. BERTOLUCI, MD, PHD ^{1 2 3}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - UFRGS
2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
3. Internal Medicine Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Abstract

Objective:

The aim of the present study was to assess insulin resistance and insulin secretion in HCV-positive patients without diabetes diagnosis and without cirrhosis and to compare them to the ones of healthy volunteers. Secondary objectives were to analyze factors that could be associated with insulin resistance, like viral genotype and degree of hepatic fibrosis and steatosis.

Research design and methods:

In a cross-sectional study by sample of convenience, 39 HCV positive and 13 HCV negative subjects were assessed for glucose, insulin and C-peptide in fasting state and after oral 75g glucose tolerance. Fasting samples were then evaluated for HOMA-IR, HOMA-C-peptide and HOMA-%B. Excluding criteria were clinical cirrhosis, neoplasia, HIV co-infection, previous treatment for HCV, fasting plasma glucose levels equal or above 126mg/dL, BMI above 35 and drugs that could change insulin secretion or insulin resistance.

Results:

HOMA-IR was higher in the HCV-positive than in the HCV-negative group, respectively: median and interquartile ranges 2.4 (1.5-5.0) vs. 1.4 (0.7-2.3): $p=0.007$; HOMA-C-peptide and HOMA-% β did not differ between the groups. However, fasting serum insulin was higher in HCV-positive than in HCV-negative patients, respectively: median serum and interquartile ranges 2 (6.8-17.8) vs. 6.5 (3.4-10.9), $p = 0.009$; mean fasting C-peptide did not differ between the groups. The increase of glucose, insulin and C-peptide in fasting state and after the glucose tolerance test were all similar. Results of HOMA-IR, HOMA-% β and HOMA-C-peptide were not different between genotypes 1 and 3, which were also similar in relation to the degree of histological steatosis and hepatitis activity. Genotype 3 presented a higher degree of fibrosis compared to genotype 1 (5/16 vs. 4/10), $p=0.019$. C-reactive protein presented a positive correlation with the levels of triglycerides (0.574, $p = 0.001$) among all HCV-positive patients.

Conclusions:

Patients with chronic HCV without cirrhosis present higher insulin resistance and fasting insulin secretion than HCV negative subjects. Insulin resistance, rather than insulin deficiency may be an important agent of increased prevalence of

diabetes among HCV-positive patients. Type of genotype does not seem to play an important role in insulin resistance when patients are well matched for components of metabolic syndrome and degree of steatosis.

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

Abbreviations used on this paper: HCV: hepatitis C virus; DM2: type 2 diabetes mellitus; BMI: body mass index; HOMA: homeostasis model assessment; IR: insulin resistance; OGTT: oral glucose tolerance test; CRP: ultra-sensitive C-reactive protein; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; G1: genotype 1; G3: genotype 3; IDF: International Diabetes Federation.

Introduction

Recent evidence suggests that chronic hepatitis C virus (HCV) infection is associated with an increased risk of type 2 diabetes development. Type 2 diabetes is more frequent among patients with chronic C hepatitis when they are compared to those with other liver diseases and to the general population, regardless of whether cirrhosis is present or not. Moreover, the HCV seropositivity among patients with DM2 is higher than in general population [1-3]. However, the pathogenesis of this association is not completely understood. In view of the strong association between HCV infection and the development of diabetes mellitus, it is important to determine if HCV infection can predispose the development of diabetes.

Insulin resistance and insulin deficiency have both been proposed to explain the association of type 2 DM and chronic C hepatitis [4-8]. The presence of cirrhosis, steatohepatitis, metabolic syndrome and the use of many drugs have frequently caused confusion over the analysis of the presence of insulin resistance in chronic hepatitis C patients. In a recent work of our group, we demonstrated that patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C, compared to patients with type 2 diabetes without hepatitis C, present increased insulin resistance and hyperinsulinemia at fasting state. This increment was independent of determinants of insulin resistance because patients were paired by age, BMI, abdominal circumference, frequency of metabolic syndrome, serum lipid profile, HbA1c and use of oral anti-diabetic agents[9].

The β -cell dysfunction has also been observed in some patients with chronic C hepatitis [5, 7, 10]. Possible etiology for impaired insulin secretory function in these patients has been associated with the presence of the HCV virus infecting the pancreas, but the real etiology is still unknown [5, 11]. Nonetheless, some studies also demonstrate that HOMA-% β and fasting C-peptide levels are not consistently decreased in HCV-positive patients with glucose intolerance, leaving the question open. [5].

It remains to be clarified if insulin resistance or deficiency is present before the beginning of type 2 diabetes in patients with chronic hepatitis C, as well as what are the potential risk factors that would impact in the course of diabetes.

Materials and Methods

Case selection

In this cross-sectional study were selected by convenience sampling 39 patients HCV positive and 13 HCV negative subjects. The flux of the sampling is represented in Figure 1. Initially, we performed a review of medical records of patients attending the Internal Medicine outpatient unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), who were tested for HCV since January 2000 to December 2005.

The criteria for inclusion in the group under study were patients aged between 20 and 70 years, BMI <35, fasting blood glucose <126 mg/dL without using medication for DM, serology confirmed positive for HCV and no prior treatment or clinic cirrhosis. For the control group, we selected patients who had anti-HCV negative, aged between 20 and 70 years, BMI <35 and fasting blood glucose <100 mg/dL without medication for DM. None of the patients that were included in the study used to ingest alcohol. We excluded patients with clinic cirrhosis (clinical ascites or jaundice, hyperbilirubinemia, hypoalbuminemia, platelet count <150.000, prothrombin time <70%), neoplasm, co-infection with HIV or HBV, patients in treatment for HCV, exceeding prior fasting blood glucose > 126 mg/dL, BMI > 35 or use of drugs to change the insulin resistance or secretion.

Twenty-six HCV positive patients and 36 HCV negative were qualified and invited to participate in the study through telephone contact. Among the positives, 4 patients did not accepted to participate in the study, 9 were not found, 1 mentioned already present DM, 1 had already done prior treatment for HCV, 1 had HIV co-infection and 2 had clinic cirrhosis. Also, were included in the study 32 patients who had inclusion criteria, selected during consultations at the ambulatory of Internal Medicine (6 patients), at the ambulatory of Gastroenterology (19 patients) or in particular office (7 patients), totalizing 40 patients.

Twenty-nine patients were submitted to liver biopsy during the study period. One patient was excluded due to cirrhosis by histopathological examination and glucose level after OGTT > 200 mg/dL. The final sample of patients had 39 of them included in the study.

In the control group, 3 patients did not accepted to participate in the study, 24 have not been located, 2 had DM and 2 had BMI > 35. Two patients with fasting

glucose > 100 mg/dL were excluded. Ten healthy volunteers outside the HCPA with confirmed negative anti-HCV were included in the study, totalizing 13 control subjects.

Clinical Assessment

Patients and controls subjects were attended in the Research Laboratory of HCPA after 12 hours overnight fasting. A consent form was read and signed by the patients and control subjects. After that, a questionnaire was performed to confirm that the patients did not have any exclusion criteria. Alcohol intake and family history were assessed on interviews. The physical examination included weight, height, waist circumference and arterial blood pressure measurement; the BMI was calculated by the equation [weight (Kg)/ height² (m)]; the waist circumference was measured on the navel level; metabolic syndrome was classified using up IDF and NCEP-ATP III criteria [12]; the venous blood samples in fasting and 2 hours after 75g of oral glucose were collected for laboratory analysis.

When the exams were ready, we called the patients to inform them of the results. The research project and the questionnaire were approved by the Research Ethics Committee of the HCPA.

Laboratory Assessment

All patients and control group subjects were submitted to HCV antibody test by ELISA III immunoassay. The positive cases were also confirmed with qualitative polymerase chain reaction (PCR).

After overnight fasting, baseline samples were drawn for determination of plasma glucose, insulin, C-peptide, serum total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and ultra-sensitive C-reactive protein (CRP). Plasma glucose, insulin and C-peptide were also drawn after glucose overload. The methods, equipments and reference values are described in appendix 1.

The insulin resistance was determined by the homeostasis model assessment (HOMA) method by using the following equations [13, 14]:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / 22,5$$

$$\text{HOMA-C-peptide} = \text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting C-peptide (ng/mL)} / 22,5$$

The insulin secretion was determined by HOMA-% β [14], using the following equation:

$$\text{HOMA-%}\beta = (20 \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / [\text{fasting glucose (mmol/L)} - 3,5])$$

Histopathology

The majority of the patients were submitted to a hepatic biopsy. Data of 29 patients who underwent liver biopsy were taken through medical register review. The coloration used in the anatomopathological examination was hematoxiline eosine. We quantified liver fibrosis using METAVIR criteria. The METAVIR fibrosis criteria counted: F0, no fibrosis; F1, discrete; F2, moderate; F3, serious; and F4, cirrhosis.

The degree of necroinflammatory activity was scored by METAVIR as follows: A0, no activity; A1, minimal; A2, moderate; and A3, serious. Steatosis was staged by review of 19 liver tissue specimen at the Patology Service of HCPA that were counted and classified into 5 classes according to the proportion of affected hepatocytes: class 0, absent; class 1, < 5%; class 2, 5 – 33%; class 3, 33 – 66%; and class 4, > 66%.

Statistical analysis

The sample size was calculated from a pilot sample. In order to obtain an 80% statistical power with a 0.05% alpha, the estimated number had 18 patients in each group. We detected a difference, larger than we expected, between the groups regarding insulin resistance with 13 HCV negative. Then, we continued to collect data from HCV positive patients trying to observe different genotype-specific or related to the degree of histopathological changes.

Data were analyzed in SPSS version 14.0 program and presented as means \pm standard deviation (SD) or median and interquartile ranges in parentheses. Categorical variables were compared by chi-square test or Fischer's exact test; continuous variables between positive and negative groups were analyzed by Student's *t*-test and genotypes 1, 2 and 3 were performed using one-way ANOVA. Nonparametric tests of Mann-Whitney or Kruskal-Wallis were used according to the

distribution pattern of the data of each variable. Correlation coefficients were calculated by Spearman or Pearson rank correlation analysis. All statistical tests performed were two-sided and the level of significance was 0.05.

Results

Clinical characteristics and laboratory baseline of positive and negative groups were demonstrated in Table 1. The groups were similar regarding gender, family history of DM2, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, total cholesterol, HDL and triglycerides. The age tended to be higher in the positive group. We did not notice a significant difference between the groups relating to the presence of metabolic syndrome, according to the criteria of the IDF and NCEP ATP-III. As expected, we found significant differences between the groups concerning levels of ALT and AST. The levels of ultra-sensitive C-reactive protein were higher in the positive group (2.71 ± 4.59) than in the negative group (0.61 ± 0.26), $p = 0.05$.

Only one patient in the positive group was deleted by diagnosis of DM after oral glucose tolerance test (OGTT) was completed. Among the patients that were included, 9 had fasting blood glucose between 100 and 126 mg/dL, and five patients, all of which were in fasting glucose < 100 mg/dL, had blood glucose 2 hours after the OGTT between 140 and 200 mg/dL. One patient presented changes both in fasting and after 75g of glucose loading, totalizing 15 patients (38.5%) which impaired fasting glucose (IFG) or impaired glucose tolerance (IGT).

To assess the influence of HCV infection in IR, we analyzed measures of insulin resistance and secretion between positive and negative groups (Table 2). Serum levels of fasting glucose were higher among HCV-positive than in HCV-negative patients, and the mean \pm SD were, respectively, 85.1 ± 6.9 and 92.8 ± 13.9 , $p = 0.007$. The basal insulin was also higher in the positive group than in the control group, and median and interquartiles ranges between groups were 11.2 (6.8-17.8) and 6.5 (3.4-10.9), respectively, $p = 0.009$. C-peptide baseline presented a tendency to be higher in the positive group (2.4 ± 1.4) than in the negative group (1.8 ± 1.5).

The mean HOMA-IR value was higher in HCV-positive patients ($p = 0.007$). The median and interquartiles ranges of positive and negative groups were,

respectively, 2.4 (1.5-5.0) and 1.4 (0.7-2.3). We have not found a significant difference in reference to HOMA-% β and HOMA-C-peptide between groups (Table 2). The growth of glucose levels, insulin and C-peptide 2 hours after the intake of 75g of glucose did not differ significantly between groups, as it is shown in Table 3.

On the isolated analysis of the positive group were included 19 patients with genotype 1 (G1) and 12 patients with genotype 3 (G3), and those with genotype 2 on the basis of the small size of the sample were excluded. The results, as it is shown in Table 4, display that G1 and G3 presented similarity concerning sex, age, family history of DM2, presence of metabolic syndrome, alcohol intake, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, total cholesterol, HDL and triglycerides, ALT, AST and CRP (see Table 4). When measures of insulin resistance and secretion of patients with G1 compared to those with G3 were analyzed, differences in baseline levels of glucose, insulin and C-peptide or in the results of HOMA-IR, HOMA-% β and HOMA-C-peptide (see Table 2) were not found.

Among the HCV-positive patients, 29 underwent liver biopsy. The degree of activity (A) and the stage of fibrosis (F) were described by METAVIR classification. The score of activity of patients with genotype 1 was of 13/16 of them A 0-1 and 3/16 A 2-3; and in those with genotype 3 was of 9/10 patients A 0-1 and 1/10 of them A2-3. The stage of fibrosis in genotype 1 patients was of 11/16 F 0-1 and 5/16 F 2-3; in genotype 3 patients was of 6/10 of them F 0-1 and 4/10 F 2-3, $p = 0.019$. The results concerning nineteen liver tissue specimen that were reviewed in the service of Pathology were: steatosis degree in genotype 1 patients was of 10/11 in class 0-1 and 1/11 in class 2-3; in genotype 3, 4/5 patients were in class 0-1 and 1/5 in class 2-3. There was no difference between genotypes (see Table 5).

The CRP showed positive association with the levels of triglycerides (0.574, $p = 0.001$) among HCV patients. This correlation presented no difference between genotypes 1 and 3. Any other association with other variables of the metabolic syndrome such as glucose, BMI, waist circumference, HDL or systolic and diastolic blood pressure was not found (see Figure 2).

Discussion

In this study, 39 untreated HCV-infected patients without a history of diabetes or cirrhosis were compared to 13 healthy individuals with respect to insulin

resistance and secretion. Patients were matched by BMI and were similar for sex, family history of DM, metabolic syndrome, alcohol intake and anthropometric predictors of IR, namely, waist circumference and arterial blood pressure, although a tendency in older individuals in the HCV-positive group was seen; a higher degree of insulin resistance by HOMA-IR as well as higher fasting insulin secretion in HCV-positive patients was noticed.

In the present study, the finding of 38,5% HCV-positive patients with some glucose abnormalities (impaired fasting glucose (IFG) and/or impaired glucose tolerance (IGT)) was higher than it is usually found in literature (30%) [16]. In five cases (14,3%), altered OTTG presented normal fasting glucose levels, suggesting that it should be adopted as a primary screening test for diabetes in HCV-infected patients with chronic C hepatitis. [16].

Insulin resistance is the major feature of the metabolic syndrome and it is determined by insulin sensitivity. In chronic hepatitis C, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus are more often seen than in healthy controls or chronic hepatitis B subjects [5, 6, 10, 17]. HOMA β -cell and HOMA-IR have been widely used in several studies to demonstrate this association [4, 8, 9]. Mechanisms in which HCV can induce insulin resistance are not completely known, but they seem to have a relation with several factors, such as: age, metabolic syndrome, viral genotype, fibrosis stage, cirrhosis, drugs that could change insulin resistance or other hepatobiliary diseases [4, 16].

The presence of risk factors for metabolic syndrome such as BMI, waist circumference, low HDL, high triglycerides or high blood pressure can confuse the results. Our study groups were matched for metabolic syndrome criteria according to IDF and NCEP ATP-III, demonstrating that the increase in HOMA-IR could not be attributed to the presence of metabolic syndrome.

The temporal relationship between HCV infection and insulin resistance has been demonstrated in some community cohort studies [18]. Prospective longitudinal studies show that the likely cause of HCV infection precedes DM in average by 10 to 20 years. The risk of developing diabetes for people with HCV infection increases with age; therefore, the younger the patient is infected, higher is the risk of developing diabetes[18]. In the present study, age was not statistically different

between groups, but HCV-positive patients tended to be older than HCV-negative ones. This may have had some influence on our results, if a longer exposure to the virus would happen. Although the duration of HCV infection was not determined, this finding did not seem to have had a great impact, because the age difference between the groups was too small in the setting of two chronic diseases.

The degree of liver fibrosis is an independent precedent for diabetes [19]. The risk of diabetes is known to be increased in patients with advanced liver cirrhosis due to any cause, including hepatitis C [20]. Cirrhotic patients also have a high prevalence of DM and impaired fasting glucose; mechanisms to explain this association are not clear, but hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance contribute to the development of DM in these patients [10].

Mechanisms in which insulin resistance develops in HCV-infected patients is diverse and may vary depending on the HCV genotype; in patients infected with genotype 1, insulin resistance usually causes fibrosis through the presence of steatosis, hyperleptinemia, increased TNF-alpha production and impaired expression of PPARg [21]. In genotype 3 subjects, the mechanism is developed by cytopathic lesion induced by virus. Then, hepatic fibrosis correlates with insulin resistance better in genotype 3 than in genotype 1, because G3 requires a higher degree of fibrosis to develop the same metabolic changes that G1 in lower stages [4].

In the present study, cirrhosis was excluded through clinical examination, laboratory findings and through liver biopsy, although 10 patients were not subjected to liver biopsy. When fibrosis on the biopsies of HCV positive group were studied, using METAVIR criteria, there was a slight increased frequency of moderate fibrosis in HCV Genotype 3 patients than in HCV Genotype 1 patients which was not captured by the ISHAK criteria, but advanced fibrosis were not included on the analysis. Interestingly, on the 2 cases excluded for advanced cirrhosis (F4) detected by biopsy, HOMA-RI was not increased. By this way, we can conclude that the presence of cirrhosis is unlikely to impact the rise of insulin resistance found in HCV-positive patients.

The presence of steatosis and steatohepatitis is a major factor which deserves especial attention, for it can contribute to liver inflammation and cirrhosis and also confuse the evaluation of insulin resistance. There are conflicting data

regarding the relationship between hepatitis C virus genotypes and insulin resistance. Studies suggest that in HCV virus genotype 3 patients, steatosis is a consequence of cytopathic lesion induced by the virus and its inflammatory reaction, whereas in HCV genotype 1 patients, which are not steatogenic per se, when steatosis occurs it is probably related to the metabolic syndrome, in which free fatty acids are accumulated in the hepatocyte, that is regulated by insulin action.

The etiology of hepatic steatosis is different between patients genotype 3 and those with non-genotype 3 [4, 22, 23]. Two main types are described: (1) "viral steatosis" induced by the virus, especially in genotype 3, which probably inhibits the "Microsomal Triglyceride Transfer Protein", leading to triglyceride accumulation within hepatocytes [24]; (2) "metabolic steatosis", which is a feature of the metabolic syndrome and insulin resistance that induces intrahepatic triglyceride accumulation due to excess flux of free fatty acids from increased adipose tissue lipolysis [24, 25].

In the present study, differences between insulin resistance or insulin secretion in genotypes 1 and 3 were not found. Previous studies have shown increased insulin resistance in patients infected by HCV genotype 1 [21, 26]. It could be argued that the samples studied were small. However, there was no tendency which indicated that increasing the samples would change results. Indeed, when the biopsies were analyzed, neither HCV genotype 1 nor HCV genotype 3 sub-groups were different concerning the presence of steatosis, which was moderate in only 1 patient of each group. So, we can say that our genotype 1 patients were relatively free from steatosis, which can explain why increased HOMA-IR was not found in that group. It is more likely that, when both groups were matched for components of metabolic syndrome, the impact of these variables were attenuated symmetrically.

Another important concern in the present study was the potential presence of drugs causing insulin resistance. No patient in our study made use of drugs that could alter the secretion of insulin or its resistance, because their use was exclusion criteria. Besides, the patients had never used interferon before. Alcohol intake was similar between groups, but it was not quantified.

A number of studies showed that a high concentration of ultra-sensitive C-reactive protein is an independent risk factor for the development of a cardiovascular disease in a healthy person. It is generally accepted the relation between CRP and inflammation, which plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis

[27]. The pathogenesis of IR in chronic hepatitis C virus infection remains undetermined, although studies to assess its relationship with inflammatory activity have been developed to try explaining this question [17, 28, 29]. According to the literature, the CRP levels are higher in HCV-positive patients, and it can be associated with a higher degree of inflammatory activity in these patients, but we don't know if that is a cause or a consequence of insulin resistance.

The higher levels of CRP also presented an association with serum triglycerides. It is believed that the inflammation is associated with the metabolic context. We hoped that this relationship might have been influenced by G1 due to its greater association with metabolic syndrome, but we did not find differences between G1 and G3.

Although insulin resistance is a major problem in HCV-positive patients with glucose intolerance, there is a function for β -cell dysfunction in the etiology of glucose intolerance [5]. There are many probable causes for impaired insulin secretory function in these patients, including genetic [11] and viral factors. During the acute phase of viral hepatitis, an additional impairment of β -cell function can occur by viral influence, while in advanced stages of liver fibrosis the β -cell dysfunction does not seem to be important [5].

The β -cell dysfunction in HCV-positive patients has been observed in some cases [7, 10] and presented by lower levels of HOMA- β . In this study, the HOMA- β and C-peptide levels were similar in positive and negative groups, showing that the baseline secretion was preserved. In the same manner, the increase of glucose, insulin and C-peptide levels after glucose intake was similar in both groups, showing that the 2 hours secretion was also preserved. It can be concluded that the insulin secretion was normal, but there are studies showing that the problem happens in the early phase insulin secretion, which is impaired in these patients. Narita et al, using the insulinogenic index, a marker of early insulin secretion, proved that the acute insulin response was reduced in HCV-positive patients [5].

However, there are evidences showing that HOMA- β and C-peptide are not consistently decreased in HCV-positive patients and not even in patients with glucose intolerance. Other studies have found increase of HOMA- β and baseline C-peptide associated with HCV infection [8, 9]. In HCV-positive patients and DM, mean HOMA- β and baseline C-peptide were increased when compared to HCV-

negative patients and DM, but, in this case, the patients were using sulfonylurea, a drug that could change insulin secretion [9].

Recent evidences suggested that insulin resistance by HCV might be reversible after interferon- α treatment in non-diabetic patients because the clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic insulin receptor substrate (IRS) 1/2 expression [30]. Furthermore, viral clearance is associated with the resolution of hepatic steatosis in genotype 3 patients [31]. The management of obesity and metabolic syndrome in patients with chronic hepatitis C may be important to improve the efficacy of antiviral therapy [31]. Thus, early recognition and treatment of both conditions can prevent hepatic damage as far as the development of DM [32].

Conclusions

This study shows that non-diabetic and untreated HCV-positive patients without cirrhosis are more insulin resistant than healthy subjects paired for BMI, while their insulin secretion is preserved and increased.

Insulin resistance, rather than insulin deficiency, may be an important determinant of the increasing prevalence of diabetes among HCV-positive patients. Differences in genotypes do not seem to play an important role in insulin resistance when patients are well matched for BMI and when there is presence of steatosis.

Acknowledgments

This study was supported by a grant-in-aid from the “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos” (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Appendix 1. Reference values

- Fasting glucose: 60 to 100 mg/dL, IFG: between 100 – 126 mg/dL, enzymatic method, equipment: Modular - Roche
- Fasting Serum Insulin: 2.6 to 24.9 μ U/mL, chemiluminescence, equipment: E 170-Roche
- Fasting C-peptide: 1.1 to 5.0 ng/mL, chemiluminescence, equipment: Immulite - DPC
- Total cholesterol: <200 mg/dL (normal), 200 -239 mg/dL (neighbouring), > 240 mg/dL (high), enzymatic method, equipment: Modular - Roche
- HDL cholesterol: > 60 mg/dL (low risk), 35 to 60 mg/dL (moderate risk), <35 mg/dL (high risk), enzymatic method, equipment: Modular - Roche
- Triglycerides: <150 mg/dL (normal), 150-200 mg/dL (neighbouring), 201-499 mg/dL (high), > 500 mg / dL (very high), enzymatic method, equipment: Modular - Roche
- AST (Aspartate aminotransferase): 15 to 40 U/L, kinetic UV, equipment: Modular - Roche
- ALT (Alanine aminotransferase): 10 to 40 U/L, kinetic UV, equipment: Modular - Roche
- Ultra-sensitive C-reactive protein: <1.0 mg/L (low risk), 1.0 mg/L to 3.0 mg/L (moderate risk), > 3.0 mg/L (high risk), nephelometry, equipment: Nefelômetro
- OGTT: normal: 120 min <140mg/dL, IGT: 120 min between 140-200 mg/dL, enzymatic UV – Hexokinase, equipment: Modular - Roche
- HOMA-IR: $1,66 \pm 0,81$

References

1. Knobler, H., et al., *Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection*. Mayo Clin Proc, 2000. **75**(4): p. 355-9.
2. Grimbert, S., et al., *High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. A case-control study*. Gastroenterol Clin Biol, 1996. **20**(6-7): p. 544-8.
3. Mehta, S.H., et al., *Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 592-9.
4. Hui, J.M., et al., *Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1695-704.
5. Narita, R., et al., *Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2004. **41**(1): p. 132-8.
6. Caronia, S., et al., *Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 1999. **30**(4): p. 1059-63.
7. Masini, M., et al., *Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction*. Diabetes Care, 2005. **28**(4): p. 940-1.
8. Furutani, M., et al., *Insulin resistance/beta-cell function and serum ferritin level in non-diabetic patients with hepatitis C virus infection*. Liver Int, 2003. **23**(4): p. 294-9.
9. Oliveira, B.R., et al., *Increased insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C*. Diabetes Res Clin Pract, 2007.
10. Lecube, A., et al., *High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1171-5.
11. Kosaka, K., et al., *Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin-dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabet Med, 1996. **13**(9 Suppl 6): p. S109-19.
12. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. Jama, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
13. Geloneze, B., et al., *The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study*. Diabetes Res Clin Pract, 2006. **72**(2): p. 219-20.
14. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling*. Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1487-95.
15. Ishak, K., et al., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. J Hepatol, 1995. **22**(6): p. 696-9.
16. Lecube, A., et al., *Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis*. Diabetes Care, 2006. **29**(5): p. 1140-9.
17. Romero-Gomez, M., *Insulin resistance and hepatitis C*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(44): p. 7075-80.

18. Wang, C.S., et al., *Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes in a community-based longitudinal study*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(2): p. 196-203.
19. Friedenber, F., et al., *The impact of diabetes and obesity on liver histology in patients with hepatitis C*. Diabetes Obes Metab, 2003. **5**(3): p. 150-5.
20. Zein, N.N., et al., *Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 209-17.
21. Romero-Gomez, M., *Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non-response*. Rev Esp Enferm Dig, 2006. **98**(8): p. 605-15.
22. Hui, J.M., et al., *Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(8): p. 873-81.
23. Rubbia-Brandt, L., et al., *Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way*. Gut, 2004. **53**(3): p. 406-12.
24. Moucari, R., P. Marcellin, and T. Asselah, [*Steatosis during chronic hepatitis C: the role of insulin resistance and viral factors*]. Gastroenterol Clin Biol, 2007. **31**(8-9 Pt 1): p. 643-54.
25. Hezode, C., et al., *Different mechanisms of steatosis in hepatitis C virus genotypes 1 and 3 infections*. J Viral Hepat, 2004. **11**(5): p. 455-8.
26. Camma, C., et al., *Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 64-71.
27. Nurkic, J., M. Nurkic, and M. Nurkic, [*High sensitivity C reactive protein and lipid status as a risk factors for coronary disease*]. Med Arh, 2007. **61**(3): p. 138-41.
28. Itoh, Y., et al., *Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(5): p. 1332-40.
29. Nelson, D.R., et al., *Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(12): p. 2487-94.
30. Kawaguchi, T., et al., *Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(3): p. 570-6.
31. Bondini, S. and Z.M. Younossi, *Non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C infection*. Minerva Gastroenterol Dietol, 2006. **52**(2): p. 135-43.
32. Bell, D.S. and E. Allbright, *The multifaceted associations of hepatobiliary disease and diabetes*. Endocr Pract, 2007. **13**(3): p. 300-12.

Figure 1. Design of the study

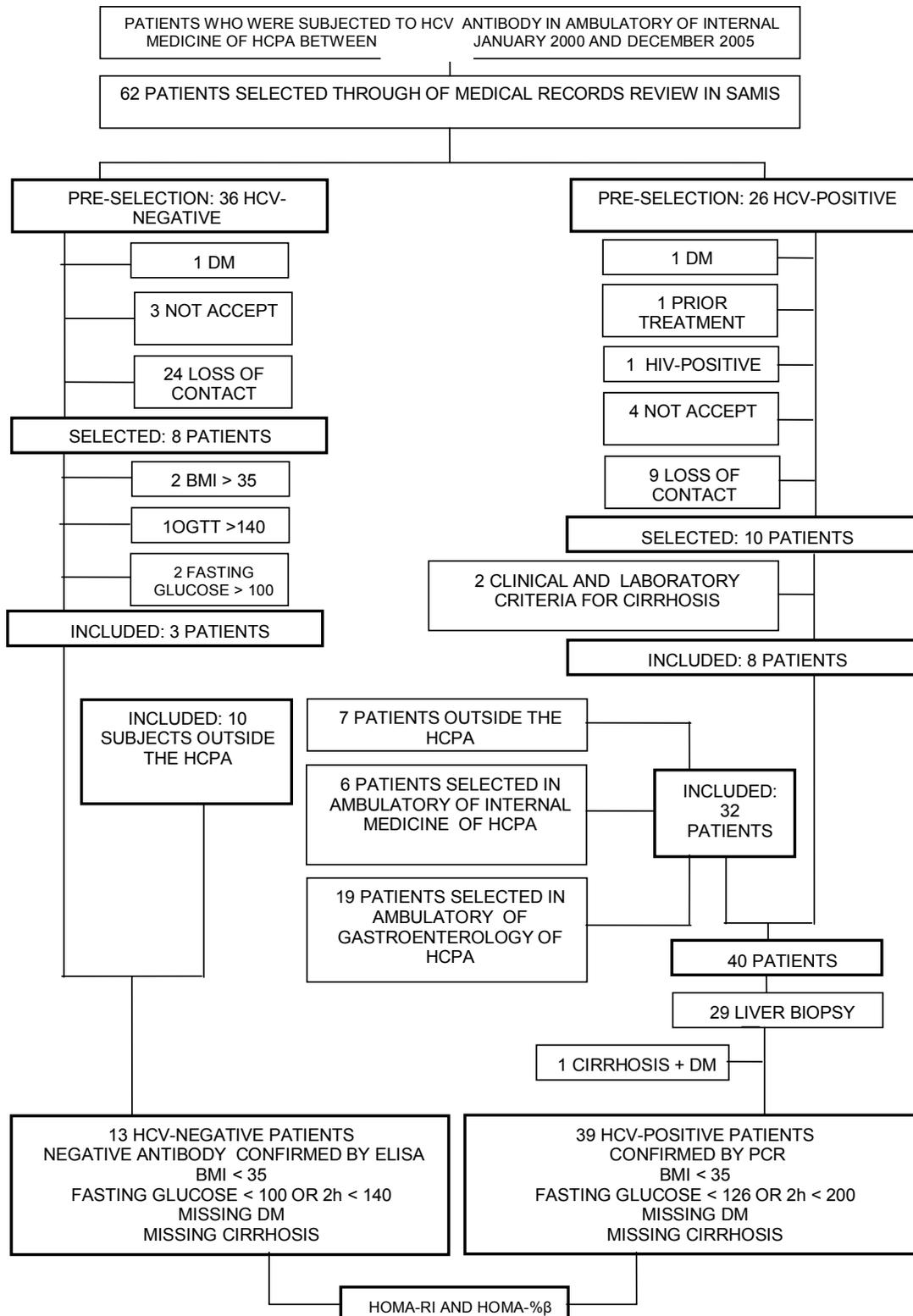


Table 1. Clinical and biochemical baseline characteristic of the patients. Data are presented as mean \pm SD, except for gender, family history, alcohol consumption and the presence of metabolic syndrome, in which frequency was used. BMI: body mass index; AST: aspartate aminotransferase ALT: alanine aminotransferase; CRP: ultra-sensitive C-reactive protein.

| Characteristic | HCV- | HCV- | <i>P</i> |
|---------------------------------|------------------|------------------|----------|
| | negative | positive | |
| | n=13 | n=39 | |
| Age (years) | 43,8 \pm 14,9 | 51,9 \pm 12,3 | 0,057 |
| Gender (M/F) | 6/7 | 11/28 | 0,309 |
| Family history of DM2 | 7/13 | 16/39 | 0,525 |
| Metabolic syndrome IDF | 3/13 | 14/39 | 0,253 |
| Metabolic syndrome NCEP-ATP III | 1/13 | 10/39 | 0,253 |
| Alcohol intake | 0 | 6/39 | 0,317 |
| BMI (Kg/m ²) | 26,1 \pm 3,8 | 26,8 \pm 4,4 | 0,616 |
| Waist circumference (cm) | 89,4 \pm 9,6 | 92,5 \pm 11,9 | 0,398 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 119,2 \pm 19,9 | 126,7 \pm 21,8 | 0,282 |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 77,3 \pm 12,7 | 82,2 \pm 12,6 | 0,234 |
| Fasting plasma glucose (mg/dL) | 85,1 \pm 6,9 | 92,9 \pm 12,1 | 0,007 |
| HDL cholesterol (mg/dL) | 56,5 \pm 21,8 | 59,5 \pm 22,9 | 0,685 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 179,5 \pm 48,0 | 175,2 \pm 40,7 | 0,763 |
| Triglycerides (mg/dL) | 87,8 \pm 31,3 | 104,5 \pm 49,8 | 0,270 |
| ALT (U/L) | 28,4 \pm 18,1 | 71,4 \pm 51,8 | 0,000 |
| AST (U/L) | 30,4 \pm 11,2 | 68,6 \pm 48,1 | 0,000 |
| CRP (mg/L) | 0,6 \pm 0,3 | 2,7 \pm 4,6 | 0,050 |

Table 2. Measurements of insulin resistance and insulin secretion. Data are mean \pm SD for glucose and C-peptide and are mean and interquartile ranges for insulin and HOMA.

| Characteristic | HCV-negative | HCV-positive | | | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | | Genotypes | | | |
| | | G1 | G2 | G3 | Full group |
| Glucose (mg/dL) | 85,1 \pm 6,9 (n=13) | 93,6 \pm 10,9 (n=19) | 80,0 \pm 13,4 (n=3) | 94,1 \pm 13,9 (n=12) | 92,8 \pm 12,1 * (n=39) |
| Insulin (μ U/mL) | 6,5(3,4-10,9) (n=13) | 9,5(6,7-15,6) (n=19) | 10,3(5,9-43,3) (n=3) | 10,5(7,2-18,1) (n=12) | 11,2(6,8-17,8) * (n=39) |
| C-peptide (ng/mL) | 1,8 \pm 1,5 (n=13) | 2,7 \pm 1,5 (n=15) | 1,0 \pm 0,1 (n=2) | 2,5 \pm 1,4 (n=12) | 2,4 \pm 1,4 (n=34) |
| HOMA-IR | 1,4(0,7-2,3) * (n=13) | 2,0 (1,5-3,9) (n=19) | 1,8(1,1-10,2) (n=3) | 2,1(1,5-4,9) (n=12) | 2,4(1,5-5,0) * (n=39) |
| HOMA-% β | 97,3 (55,9-183,0) (n=13) | 101,7 (71,3-185,2) (n=19) | 481,2 (169,4-687,3) (n=3) | 147,0 (106,3-184,3) (n=12) | 154,2 (95,6-185,6) (n=39) |
| HOMA-C-peptide | 0,4 \pm 0,3 (n=13) | 0,6 \pm 0,3 (n=16) | 0,2 \pm 0,0 (n=2) | 0,6 \pm 0,4 (n=12) | 0,6 \pm 0,3 (n=35) |

* $P < 0,001$ is related to HCV negative group.

Table 3. Results of oral glucose tolerance test

| Characteristic | HCV-negative | | | HCV-positive | | | P* |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|
| | Basal | 120' | Δ | Basal | 120' | Δ | |
| Plasma glucose (mg/dL) | 87,1 \pm 7,2 (n=9) | 108,2 \pm 35,3 (n=9) | 21,1 \pm 28,1 (n=9) | 92,5 \pm 11,9 (n=35) | 117,1 \pm 26,7 (n=35) | 24,6 \pm 14,7 (n=35) | 0,75 6 |
| Plasma insulin (μ U/mL) | 6,4 \pm 2,4 (n=5) | 33,1 \pm 21,5 (n=5) | 26,7 \pm 19,0 (n=5) | 15,2 \pm 12,1 (n=16) | 51,5 \pm 39,4 (n=16) | 36,3 \pm 27,3 (n=16) | 0,56 7 |
| C-peptideo (ng/mL) | 2,3 \pm 1,7 (n=8) | 8,6 \pm 8,3 (n=8) | 6,2 \pm 6,6 (n=8) | 2,3 \pm 1,4 (n=27) | 8,5 \pm 2,9 (n=27) | 6,1 \pm 1,4 (n=27) | 0,95 2 |

*P value was related to the comparison between T test and delta (Δ) in both groups.

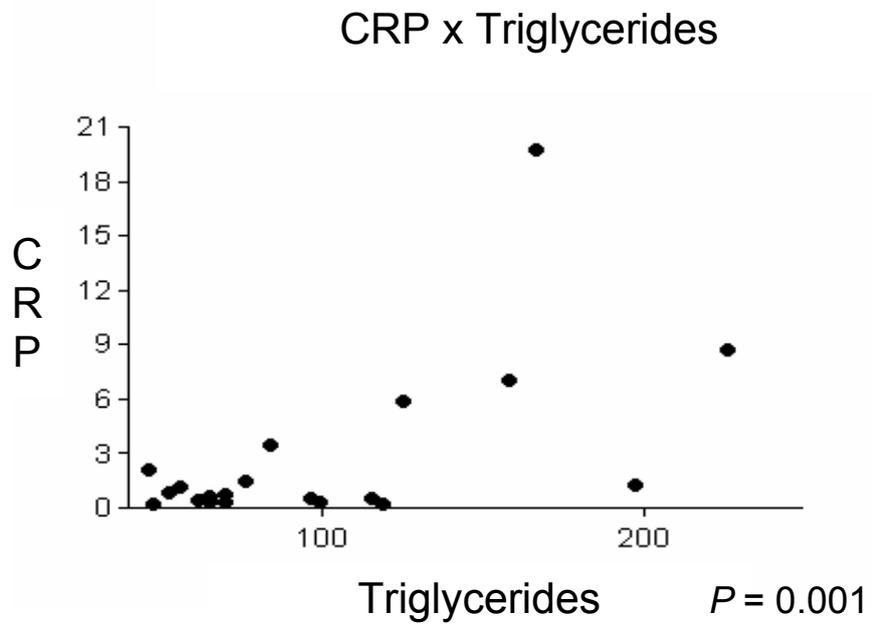
Table 4. Clinical and biochemical baseline characteristic of genotypes 1 and 3. Data are presented as mean \pm SD, except for gender, family history, alcohol consumption and the presence of metabolic syndrome, in which frequency was used. BMI: body mass index; AST: aspartate aminotransferase ALT: alanine aminotransferase; CRP: ultra-sensitive C-reactive protein.

| Characteristic | Genotype 1 | Genotype 3 | <i>P</i> |
|---------------------------------|------------------|------------------|----------|
| | n=19 | n=12 | |
| Age (years) | 54,3 \pm 10,8 | 50,2 \pm 14,0 | 0,408 |
| Gender (M/F) | 4/15 | 4/8 | 0,676 |
| Family history of DM2 | 8/19 | 3/12 | 0,567 |
| Metabolic syndrome IDF | 7/19 | 5/12 | 1,000 |
| Metabolic syndrome NCEP-ATP III | 4/19 | 4/12 | 0,676 |
| Alcohol intake | 3/19 | 2/12 | 1,000 |
| BMI (Kg/m ²) | 26,2 \pm 3,9 | 27,2 \pm 4,9 | 0,553 |
| Waist circumference (cm) | 91,3 \pm 11,6 | 93,0 \pm 12,2 | 0,707 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 124,2 \pm 16,8 | 130,0 \pm 28,6 | 0,482 |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 79,7 \pm 10,33 | 84,2 \pm 15,0 | 0,383 |
| HDL cholesterol (mg/dL) | 64,4 \pm 26,6 | 56,1 \pm 19,7 | 0,342 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 183,1 \pm 31,5 | 175,5 \pm 47,3 | 0,633 |
| Triglycerides (mg/dL) | 99,3 \pm 38,8 | 96,1 \pm 52,6 | 0,857 |
| ALT (U/L) | 66,3 \pm 45,1 | 71,3 \pm 54,6 | 0,806 |
| AST (U/L) | 60,2 \pm 33,6 | 83,7 \pm 67,9 | 0,304 |
| CRP (mg/L) | 2,3 \pm 5,5 | 3,1 \pm 3,2 | 0,722 |

Table 5. Analysis of liver biopsies of the HCV-positive patients according to genotype. Data are presented in frequency. The degree of activity METAVIR is divided into 0 to 1: absent - minimum, 2 to 3: moderate - serious. The stage of fibrosis METAVIR is divided into 0 to 1: absent - discreet, 2 to 3: moderate - serious. The degree of steatosis is divided into 0 -1: absent a <5%, 2 to 3: 2-33% to 33-66%.

| Characteristic | HCV-positive | | | | P |
|------------------|--------------|-------|------------|-------|-------|
| | Genotype 1 | | Genotype 3 | | |
| | 0 - 1 | 2 - 3 | 0 - 1 | 2 - 3 | |
| Activity METAVIR | 13/16 | 3/16 | 9/10 | 1/10 | 0,700 |
| Fibrosis METAVIR | 11/16 | 5/16 | 6/10 | 4/10 | 0,019 |
| Fibrosis ISHAK | 6/14 | 8/14 | 5/7 | 2/7 | 0,145 |
| Steatosis | 10/11 | 1/11 | 4/5 | 1/5 | 0,813 |

Figure 2. Association between ultra-sensitive C-reactive protein and triglycerides in HCV-positive patients.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar da extensiva literatura sobre os mecanismos que regulam a associação de Hepatite C e DM, os resultados ainda não são conclusivos. Além disso, há poucos estudos revisando as implicações clínicas dessa associação.

Avaliações sobre quanto o tratamento da Hepatite C pode melhorar o quadro metabólico após o *clearance* viral podem ser importantes na prevenção de alterações no metabolismo da glicose nesses pacientes.

Da mesma forma, o tratamento da resistência insulínica pode ser potencialmente útil na melhora da eficácia à terapia anti-viral, principalmente em genótipos mais resistentes, como o genótipo 1.

8 ANEXO
8.1 Entrevista

Medidas de resistência e secreção de insulina

FIPE 05-131
PROTOCOLO DE ENTREVISTA

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

| | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> CIRROSE | <input type="checkbox"/> QUIMIOTERAPIA NOS ÚLTIMOS 24 MESES |
| <input type="checkbox"/> TRATAMENTO ATUAL P/ HEPATITE C | <input type="checkbox"/> GLICEMIAS PRÉVIAS > 126 mg/dl |
| <input type="checkbox"/> TRATAMENTO ANTI-VIRAL P/ HIV | <input type="checkbox"/> ICC DESCOMPENSADA |
| <input type="checkbox"/> NEOPLASIA CONHECIDA | <input type="checkbox"/> GESTAÇÃO |

| | | |
|-----------|---|---------------------------------------|
| NOME: | SEXO: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F | HCV POSITIVO <input type="checkbox"/> |
| ENDEREÇO: | IDADE: | HCV NEGATIVO <input type="checkbox"/> |
| CIDADE: | TELEFONE: | HCPA Nº: |

| | |
|---|---|
| DIABETES? | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |
| MEDICAÇÃO P/ DM? (METFORMINA, GLIBENCLAMIDA, GLITAZONAS, INSULINA) | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |
| FAMILIARES EM 1º GRAU C/ DM? | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |
| DIABETES GESTACIONAL PRÉVIO? (SE APLICÁVEL) | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |
| MEDICAÇÕES EM USO? | <input type="checkbox"/> CORTICÓIDE <input type="checkbox"/> ANTIRETROVIRAIS <input type="checkbox"/> LÍTIO <input type="checkbox"/> CARBAMAZEPINA <input type="checkbox"/> CICLOSPORINA |
| USO DE ÁLCOOL? | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |
| FEBRE OU INFECÇÃO NAS ÚLTIMAS 24h? | <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE |

Medidas de resistência e secreção de insulina

FIPE 05-131
PROTOCOLO DE EXAMES

| | | | | | | | |
|-----------------|--------|------|-------------------------|------|---------------|-------------|--------------|
| PESO | ALTURA | IMC | TESTE C/ 75g | DATA | BASAL HORA | 60' HORA | 120' HORA |
| CA | PA 1 | PA 2 | | | | | |
| | DATA | HORA | GLICOSE | | | | |
| ÚLTIMA REFEIÇÃO | | | INSULINA | | | | |
| | | | PEPTÍDEO C | | | | |
| | | | HOMA r | | | | |

| | | | | | |
|--------------------------------|------|-----------|---------------------|------|-----------|
| | DATA | RESULTADO | | DATA | RESULTADO |
| TGO/TGP/GGT | | / / | ANTI-HCV (ELISA) | | |
| COLESTEROL TOTAL/ HDL / LDL | | / / | PCR | | |
| TRIGLICERÍDEOS | | | GENÓTIPO | | |
| FERRITINA | | | BIÓPSIA | | |
| PROTEÍNA C REATIVA US | | | PEÇA Nº | | |
| Hb A1C | | | | | |

8.2 Termo de consentimento esclarecido A e B

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO - A

Você está participando de um projeto de pesquisa que visa estudar a associação de Hepatite C com diabetes. Por razões não conhecidas a Hepatite C é mais freqüente em pacientes com diabetes, e este estudo visa tentar determinar os mecanismos pelos quais isto ocorre.

Se você foi selecionado para participar é porque você consulta no HCPA e já realizou teste para Hepatite C, o qual foi positivo.

A participação é simples. Você responderá a um questionário durante uma entrevista médica especial, quando também será examinado para ver sua pressão arterial, peso, altura e cintura abdominal. Posteriormente, irá se submeter a duas coletas de sangue, uma em jejum de 12 horas e outra 2 horas após ingerir 75g de glicose. Este teste é feito para detecção de diabetes e não causa nenhum risco à sua saúde. As coletas são através da veia do braço, o que pode lhe causar um pequeno desconforto pela picada da agulha. O material utilizado é descartável, portanto, não há nenhum risco de transmissão de doenças.

Os dados coletados são confidenciais e seu nome não será divulgado em nenhum momento deste estudo.

A responsabilidade deste projeto é do Professor Dr. Marcello Bertoluci, que desde já coloca-se à disposição para tirar todas as dúvidas na zona 16, entre 14 e 16h, diariamente, ou pelo telefone 21018246.

Eu.....estou ciente das características deste estudo e estou de pleno acordo em participar, por livre e espontânea vontade. Estou ciente que deverei realizar duas coletas de sangue, uma em jejum de 12h e outra após ingerir 75g de glicose, e que terei que responder ao questionário.

Porto Alegre, de.....de

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO – B

Estamos desenvolvendo um estudo no ambulatório de Medicina Interna, na Zona 16, regularmente freqüentado pelo senhor (a), e necessitamos a presença de voluntários para controle comparativo.

Você foi selecionado para participar porque você consulta no ambulatório de Medicina Interna e também por apresentar idade entre 30 e 60 anos, **não** ter hepatite C e **não** ser diabético.

A participação é simples. Você responderá a um questionário durante uma consulta médica especial, quando também será examinado para ver sua pressão arterial, peso, altura e cintura abdominal. Posteriormente irá submeter-se a duas coletas de sangue, uma em jejum e a outra após ingerir 75g de glicose. Este teste é realizado para detecção de diabetes e não causa nenhum risco à sua saúde. As coletas são através da veia do braço, o que pode lhe causar um pequeno desconforto pela picada da agulha. O material utilizado é descartável, portanto, não há nenhum risco de transmissão de doenças.

Os dados coletados são confidenciais e seu nome não será divulgado em nenhum momento deste estudo.

A responsabilidade deste projeto é do Professor Dr. Marcello Bertoluci, que desde já coloca-se à disposição para tirar todas as dúvidas diariamente, entre 14 e 16h, na zona 16 ou pelo telefone 21018246.

Eu.....estou ciente das características deste estudo e estou de pleno acordo em participar, por livre e espontânea vontade. Estou ciente que deverei realizar duas coletas de sangue, e que terei que participar da consulta agendada.

Porto Alegre, de.....de.....

