



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EFECTO DEL EJERCICIO EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y EL
PERFIL DE ADIPOCITOCINAS EN PACIENTES CON OBESIDAD Y CIRROSIS
SECUNDARIA A HEPATITIS C ACTIVA Y ERRADICADA - UN ESTUDIO DE
FACTIBILIDAD”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANDRÉS DUARTE ROJO

TUTOR: SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO D.F., ABRIL DE 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Introducción	1
Marco Teórico	3
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos	24
Material y Métodos	25
Resultados	
Tabla 1. Factores asociados con respuesta al tratamiento en hepatitis crónica por virus de Hepatitis C	32
Tabla 2 Factores asociados con progresión de la Hepatitis crónica por virus de Hepatitis C	32
Tabla 3. Criterios diagnósticos para el síndrome metabólico	33
Tabla 4. Puntos de corte de la circunferencia de la cintura para el síndrome metabólico, según los criterios IDF en relación a grupo étnico	33
Figura 1. Prevalencia de anomalías de la glucosa en un estudio de pacientes y controles en quienes se realizó una curva de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)	34
Referencias Bibliográficas	35
Anexos	42
<p>The course of Posttransplant Hepatitis C Infection: Comparative Impact of Donor and Recipient Source of the Favorable IL28B Genotype and Other Variables. <i>Andres Duarte Rojo</i>¹, <i>Bart J. Veldt</i>², <i>David D Goldstein</i>³, <i>Hans L Tillman</i>³, <i>Kimberly D Watt</i>¹, <i>Julie K. Heimbach</i>⁴, <i>John G McHutchinson</i>³, <i>John J Poterucha</i>¹, <i>Florencia Vargas-Vorakova</i>⁵ and <i>Michael R Charlton</i>^{1,6} <i>Transplantation</i> 2012;94:197-203</p>	
<p>A 24 –week dietary and physical activity lifestyle intervention reduces hepatic insulin resistance in the obese with chronic Hepatitis C . <i>Venessa Pattullo</i>^{1,3}, <i>Andres Duarte Rojo</i>^{1,4}, <i>Wael Soliman</i>^{1,4}, <i>Florencia Vargas Vorackova</i>⁵, <i>Sanjeev Sockalingam</i>⁶, <i>Ivan G. Fantus</i>⁷, <i>Johane Allard</i>¹ and <i>Jenny Heathcote</i>. <i>Liver International</i> 2012:1-10.</p>	
<p>Changes in peripheral blood monuclear cells glutamine synthetase mRNA after exercise in healthy volunteers:exploring an alternativa proposal for non hepatic ammonia metabolism. <i>Andres Duarte-Rojo</i>,* <i>Miguel Ángel Torres-Vega</i>, *<i>Hugo Villamil-Ramírez</i>, *<i>José Estradas</i>, *<i>Aarón Domínguez-López</i>, *<i>Fausto Sánchez-Muñoz</i>, *<i>Arturo Orea-Tejeda</i>, ** <i>Lilia Castillo-Martínez</i>,**<i>Ángel Miliar-García</i>, ***<i>Ricardo Ulises Macías-Rodríguez</i>, *<i>Aldo Torre-Delgadillo</i>. <i>Revista de Investigación Clínica</i> 2012</p>	
Conclusiones	43

INTRODUCCIÓN

Breve reseña de acontecimientos durante el Doctorado en Ciencias Médicas

Inicié el Doctorado en Ciencias Médicas en Mayo de 2009, bajo la tutoría de la Dra. Florencia Vargas Vorácková. En Julio de 2009 empecé una especialidad en Hepatología Clínica en la Universidad de Toronto, Toronto, Canadá. La oportunidad se dio para incursionar en el mundo de la hepatitis C con mi mentora clínica, E. Jenny Heathcote. Juntos hicimos una propuesta de tesis para estudiar cambios en la resistencia a la insulina en pacientes con cirrosis y hepatitis C, en relación con ejercicio e intervención nutricional. En Julio de 2010 inicié mi especialidad en Hepatología y Trasplante en la Clínica Mayo en Rochester, MN, EEUU. Allí escogí como mi mentor clínico a Michael R. Charlton para continuar mis estudios en hepatitis C, y durante mi año de especialidad clínica actualicé la cohorte de pacientes con trasplante hepático. En Julio de 2011 regresé a México y junto con la Dra. Vargas me dediqué a hacer el análisis y escribir las publicaciones que habíamos escogido para dar sustento a este grado, llegando a sus versiones finales hacia principios de 2012. A partir del lamentable fallecimiento de la Dra. Vargas, el Dr. Sergio Ponce de León Rosales aceptó el papel de tutor para este grado académico.

Importancia de los proyectos que a continuación se presentan

El virus de la hepatitis C (VHC) representa una de las causas más frecuentes de cirrosis y trasplante hepático a nivel mundial. Con tasas de respuesta a la terapia antiviral del orden de 15% a 35% en pacientes con cirrosis o postrasplantados, el conocimiento de los factores que modificaban esta respuesta era de vital importancia al momento del diseño del estudio en 2009. El proyecto de ejercicio e intervención nutricional en pacientes con resistencia a la insulina y cirrosis vislumbró desde su implementación la realización de un ensayo clínico aleatorizado que permitiese evaluar la mejoría a la respuesta antiviral con interferón pegilado (IFNpeg) y ribavirina (RBV), luego de que el estudio de factibilidad hubiese demostrado el beneficio en el perfil metabólico. Este ensayo clínico nunca se realizó como consecuencia de la aprobación de las nuevas

terapias antivirales, hacia 2011 y 2013, que logran la respuesta viral sostenida (RVS, un equivalente de erradicación viral) en >80% de pacientes, independientemente de los factores de pobre respuesta antiviral (ahora más bien históricos). No obstante, la información que se publicó en *Liver International* es muy relevante para los pacientes con VHC con o sin cirrosis, dado que confirma que el ejercicio y la intervención nutricional sí benefician el perfil metabólico a pesar de las diferencias en resistencia a la insulina esperadas como consecuencia de VHC o cirrosis. Además, se colaboró con el conocimiento de que el ejercicio es seguro en pacientes con cirrosis, algo de lo que existe muy poca evidencia en la literatura.

El descubrimiento de que polimorfismos de *IL28B* estaban implicados en la respuesta inmunológica contra el VHC en septiembre de 2009 revolucionó durante los años subsecuentes el conocimiento sobre la respuesta antiviral. Tal era el entusiasmo por la mejoría en la RVS cuando el donador hepático era homocigoto para el alelo C de rs12979860, que se pensó hacia 2010 y 2011 favorecer la colocación de donadores con esta variante genética a los pacientes con VHC por sobre cualquier otra etiología. El estudio publicado en *Transplantation* sumando la experiencia de la Clínica Mayo en VHC postrasplante permitió apropiadamente desalentar esta iniciativa, que pudiese haber resultado en mayor daño que beneficio, dado el incremento en mortalidad que se observó en aquellos pacientes que no lograban la RVS o erradicación viral. Asimismo, este estudio colaboró de manera grandemente significativa con el favorecimiento de la terapia doble antiviral (IFNpeg + RBV) en pacientes con genotipo CC de *IL28B* (homocigotos del alelo C) por sobre la terapia triple con inhibidor de proteasa (IFNpeg + RBV + boceprevir o telaprevir) que tenía graves efectos secundarios y se asociaba con una alta mortalidad no observada previamente en VHC postrasplante. Esta triple terapia está ahora ya en desuso y ha sido sustituida por nuevos tratamientos más exitosos, con menos efectos secundarios, y que se ven mínimamente afectados por los polimorfismos de *IL28B*.

MARCO TEÓRICO

La hepatitis C es una enfermedad prevalente que afecta alrededor de 180 millones de personas en el mundo, lo que representa alrededor del 3% de la población¹. En Norte América, se estima que 1-1.6% de la población de Canadá y Estados Unidos tienen anticuerpos contra el virus de hepatitis C (VHC), y en México se ha reportado una seroprevalencia similar del 1.4%²⁻⁴. Según la historia natural de la enfermedad alrededor de 55 a 85% de los pacientes expuestos al VHC continuarán con la infección (virémicos) y por lo tanto desarrollarán hepatitis C crónica (HC-VHC). El desenlace final de la HC-VHC es clínicamente relevante, dado que hasta 25% de los pacientes progresarán a cirrosis, con riesgo de descompensación y muerte, e incidencia anual de carcinoma hepatocelular de 1-3%². Como resultado de esta evolución, la HC-VHC constituye la causa principal de cirrosis y trasplante hepático en Norte América⁵.

El interferón pegilado y la ribavirina continúan siendo el estándar de oro en el tratamiento de la HC-VHC, pero con una eficacia limitada, dado que solamente ~55% de los pacientes logran una respuesta viral sostenida (RVS, que es el equivalente a erradicación del virus)⁶. Entre los diversos factores identificados como capaces de modificar la probabilidad de lograr una RVS, el genotipo parece ser el más importante. En los pacientes infectados con el genotipo 1 se logra RVS con tratamiento antiviral en 40-50% de los casos, en comparación con los genotipos 2 y 3 en quienes se logra la erradicación viral en 75-80% de los casos⁷. El genotipo 1 es el más común en Norte América, siendo identificado en 70-75% de los pacientes con HC-VHC^{7,8}, lo que significa que la mayor parte de la población infectada no logrará erradicar el virus con el tratamiento antiviral actual. Además, la probabilidad de éxito con el retratamiento de pacientes no respondedores es baja (16%)⁹. Es posible que este escenario cambie en el futuro debido al desarrollo de antivirales más potentes¹⁰ y al descubrimiento de polimorfismos genéticos involucrados en la resistencia al interferón¹¹.

En los pacientes no respondedores a un primer intento de tratamiento antiviral se pueden seguir dos abordajes: identificar y eliminar los factores predictores de no respuesta que sean modificables buscando ser exitosos en la administración de un nuevo tratamiento antiviral, o modificar los factores que predicen progresión de la enfermedad en caso de que no sea posible intentar erradicar el virus. Los factores asociados con falla en la respuesta antiviral o con progresión de la hepatitis crónica se muestran en las tablas 1 y 2. Como puede observarse diversas anormalidades metabólicas, *i.e.* diabetes mellitus tipo 2 [DMT2], obesidad, resistencia a la insulina [RI] y esteatosis hepática, son factores modificables relacionados tanto con la respuesta al tratamiento como con progresión de la enfermedad. Así, el cambio en el perfil metabólico en pacientes con HC-VHC puede impactar positivamente en su pronóstico.

Anormalidades metabólicas en hepatitis crónica por virus C

El síndrome metabólico es un constructo que agrupa diversas alteraciones asociadas con un riesgo elevado de padecer enfermedad cardiovascular y DMT2^{12,13}. Aunque se han desarrollado diversos criterios diagnósticos para su identificación (tablas 3 y 4), todos ellos evalúan esencialmente los mismos rasgos: hiperglucemia/hiperinsulinemia, adiposidad, dislipidemia, hipertensión arterial. Algunos autores también reconocen a la esteatosis hepática como un componente adicional del síndrome metabólico. La RI es el mecanismo fisiopatogénico que da coherencia y sentido a las manifestaciones y consecuencias del síndrome metabólico. Aunque ésta se identifica de mejor manera mediante la pinza euglicémica/hiperinsuliémica, el HOMA-IR (por sus siglas en inglés: Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance, y definido como $\text{insulina } [\mu\text{IU/mL}] \times \text{glucosa } [\text{mmol/L}] \text{ sanguíneas} / 22.5$) provee un subrogado muy útil y más fácil de obtener¹⁴. En los siguientes párrafos se describirá ampliamente la evidencia clínica que une a las anormalidades metabólicas con la infección por VHC.

Trastornos de la glucosa e infección por virus C

Las observaciones iniciales sobre los trastornos de la glucosa en VHC fueron hechas más de 30 años atrás, aunque la primera descripción sistemática fue publicada en 1994, describiendo la mayor frecuencia de DMT2 asociada a HC-VHC en relación a otras etiologías, en un grupo de cirróticos estudiados en un diseño transversal¹⁵. Análisis de la cohorte NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) arrojaron evidencia clara sobre la asociación entre VHC y DMT2 al demostrar entre 9822 individuos de población general que la presencia de anticuerpos contra VHC es un factor de riesgo independiente para DMT2, al igual que edad, etnia, índice de masa corporal (IMC) e historia familiar de diabetes¹⁶. En un subanálisis posterior se demostró que este efecto era sólo evidente en personas con viremia (RNA de VHC)¹⁷. Acorde al diseño este estudio no evaluó el efecto del daño hepático en la homeostasis de glucosa, dado que es bien conocido que la cirrosis *per se* puede afectar ésta (la llamada diabetes hepatógena)¹⁸, y es por tanto un confusor en la asociación entre HC-VHC y DMT2. Sin embargo, Lecube y cols, confirmaron en un grupo de 642 pacientes consecutivos con enfermedad hepática crónica que la presencia de cirrosis incrementa el riesgo de DMT2 en pacientes con (OR: 1.86, 95%CI: 1.21-2.86) y sin anti-VHC (OR: 2.26, 95%CI: 1.47-3.7)¹⁹. Más recientemente, un meta-análisis basado en 3 estudios prospectivos concluyó que el riesgo de padecer DMT2 es 67% más alto en quienes padecen infección por VHC que en la población general no infectada (HR=1.67, 95%CI: 1.28-2.06), y 80% más alta en relación a pacientes con otra enfermedad hepática como hepatitis B (OR=1.80, 95%CI: 1.2-1.4)²⁰. Por supuesto, este riesgo se ve modificado por factores concomitantes como edad, IMC y cirrosis²⁰, llegando a ser hasta 11 veces más alto en la población con un perfil diabetogénico (>50 años de edad y/o IMC>25-30 mg/kg²)²¹.

Dando coherencia a esta asociación, estudios epidemiológicos han observado de manera repetida que los pacientes con DMT2 tienen una alta prevalencia de infección por VHC. En dos estudios que evaluaron poblaciones étnicamente

diferentes la prevalencia de anticuerpos anti-VHC fue de 4.2% y 11.5% en el grupo con DMT2, en comparación con 1.6% y 2.5% en los grupos control, respectivamente^{22,23}. En un estudio de cohorte basado en una comunidad se encontró que la infección por VHC incrementa la probabilidad de desarrollar DMT2 (HR=1.7, 95%CI: 1.1 – 2.8), aunque el riesgo se vio modificado por la edad y el IMC²⁴.

Una publicación reciente reportó el cambio en la prevalencia de trastornos de la glucosa al reabordar el diagnóstico de DMT2 en pacientes con infección por VHC utilizando la curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO). El estudio, llevado a cabo en Taiwan incluyó 683 pacientes con HC-VHC, 37% de los cuales tenían fibrosis avanzada o cirrosis, y 515 controles pareados por sexo y edad. Como puede verse en la figura 1, la prevalencia de trastornos de la glucosa aumento de 40% a 73% con el uso de la CTGO²⁵. Estos resultados resaltan el hecho de que los trastornos de la glucosa se encuentran subdiagnosticados en pacientes con HC-VHC. Años antes, Lecube y cols habían llegado ya a una conclusión similar en una población de 50 pacientes caucásicos, dado que la prevalencia de alteraciones en la glucosa aumentó de 37% a 50% después de realizada la CTGO¹⁹.

En resumen, es evidente que la infección por VHC es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de trastornos de la glucosa, siendo el efecto más evidente en pacientes que presentan otros factores de riesgo. Además, la prevalencia de estos trastornos se encuentra subestimada dado que la mayoría de los estudios basan el diagnóstico en la glucosa plasmática en ayuno y sólo unos cuantos estudios emplean la CTGO.

Obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico en la infección por virus C

La obesidad, sea en relación a adiposidad global o central, es un factor de riesgo pivote para las anomalías metabólicas, y también ha sido reportada como

más prevalente en pacientes con HC-VHC. En un estudio llevado a cabo en la Clínica de Hígado del Toronto Western Hospital se describió que en una cohorte de 1118 pacientes con HC-VHC 29% presentaban obesidad, lo que representa una proporción notablemente mayor que la población canadiense pareada (15%), siendo la presencia de ARN VHC un predictor independiente de obesidad en el análisis multivariable (al igual que la edad)²⁶. Los datos del NHANES III también han sido usados para determinar la prevalencia de obesidad, síndrome metabólico (según los criterios del ATP III) o resistencia a la insulina en individuos positivos para anti-HCV. Inesperadamente, en 239 individuos con VHC ni el IMC, ni la frecuencia de síndrome metabólico fueron más altos, en comparación con 10,144 individuos sin VHC (IMC: 25y 26 kg/m², síndrome metabólico 17% y 13%, respectivamente), aunque el valor de HOMA-IR sí fue más alto (3.0 ± 0.2 vs 2.4 ± 0.05). La presencia del anticuerpo contra VHC resultó un predictor de RI, independientemente de otros factores de riesgo ya conocidos²⁷. Es importante señalar que el grupo con VHC era significativamente más joven que el grupo sin VHC, y en general que la mayoría de las cohortes publicadas de HC-VHC, lo que podría explicar el IMC tan bajo y la baja prevalencia de síndrome metabólico, dado que en estudios no controlados se han reportado prevalencias de 26-61%. Además, esto hace resaltar que en presencia de VHC el HOMA-IR fue más alto a pesar de un IMC más bajo^{28,29}. La asociación entre RI y anti-VHC se ha visto reforzada con la correlación positiva entre la carga viral (ARN VHC) y el HOMA-IR ($r=0.368$, $p=0.02$), inclusive después de ajustar un modelo multivariable a edad, género y cantidad de tejido adiposo visceral³⁰.

Así, parece ser que los pacientes con HC-VHC tienen proclividad a la obesidad, y es claro que la RI ocurre en asociación al VHC inclusive en individuos sin sobrepeso, y antes de que se haga manifiesto el síndrome metabólico. La relación dosis-dependiente entre la viremia y la RI (ARN VHC y HOMA-IR) estrechan aún más esta asociación. Con la evidencia publicada no se puede saber si el síndrome metabólico es más común en pacientes con VHC.

Trastornos metabólicos y erradicación viral

Las anomalías de la glucosa pueden afectar adversamente la tasa de éxito de la terapia antiviral en pacientes con HC-VHC, dado que la RVS se ha observado en 23-44% de los pacientes con intolerancia a la glucosa o DMT2, en comparación con 46-59% de aquéllos con euglucemia^{31,32}. La obesidad también afecta el desenlace de la terapia antiviral, como se demostró en 174 pacientes con HC-VHC tratados en el Toronto Western Hospital, observando que ésta se asociaba con 4 veces menor éxito y que el efecto era independiente de otros factores³³. Estos resultados han sido confirmados en al menos otra población³⁴, y otros autores identificaron la presencia del síndrome metabólico como un factor independiente de falla al tratamiento²⁸. Sin embargo, la evidencia más contundente sobre el efecto adverso de los trastornos metabólicos ha sido identificada en relación a la RI. En un estudio que incluyó a 159 pacientes que recibieron terapia antiviral, la frecuencia de RVS disminuyó en relación con el incremento en el HOMA-IR: 60%, 40% y 20% para HOMA-IR <2, 2-4 y >4, respectivamente³⁵. Asimismo, un estudio multicéntrico con 401 pacientes identificó que niveles elevados de HOMA-IR predecían independientemente la falla al tratamiento antiviral, y el efecto era evidente tanto en afro-americanos como en caucásicos³⁶. De manera más reciente dos estudios realizados en Japón y Taiwan confirmaron el impacto negativo de la RI en la erradicación viral^{37,38}.

Los estudios de tratamiento antiviral han servido para poner en evidencia la relación dependiente que existe entre la viremia y la RI. Así, se ha demostrado que la RI desaparece después de la terapia antiviral exitosa³⁹. Inclusive, Romero-Gomez y cols demostraron que los pacientes que eliminaron el ARN VHC de la sangre mostraron mejoría en el HOMA-IR, efecto que se revirtió en quienes sufrieron recaída de la infección por VHC³⁵. Petta y cols también observaron que la proporción de pacientes con HOMA-IR por debajo de 2.7 se incrementó durante la terapia antiviral y mientras el ARN HCV se mantenía

negativo, pero durante el seguimiento sólo los que lograron una RVS mantuvieron un HOMA-IR bajo⁴⁰.

Resulta interesante que el desenlace de la terapia antiviral también afecta el pronóstico metabólico de los pacientes, dado que a qué los que no erradican el virus quedan con mayor riesgo para desarrollar DMT2 o intolerancia a la glucosa. Esto ha sido evidenciado en 3 de 4 reportes sobre el seguimiento después de la terapia antiviral.^{31,41-43} En el estudio de Romero-Gomez y cols, la RVS redujo a la mitad el riesgo futuro de padecer trastornos de la glucosa en 734 pacientes de España observados durante un promedio de 27 meses³¹. El estudio más grande, de Arase y cols, incluyó 2842 pacientes con un seguimiento promedio de 6.4 años, encontrando que la falla en la erradicación viral conlleva un riesgo de casi 3 veces para el desarrollo de DMT2 (HR=2.78, 95%CI: 1.75-4.41)⁴³. En ambos estudios el riesgo fue independiente de otros factores como edad, nivel de glucosa previo al tratamiento y fibrosis hepática^{31,43}.

En conclusión, los trastornos metabólicos, y en especial los de la homeostasis de la glucosa se interrelacionan notablemente con la HC-VHC, dado que una condición puede afectar el desenlace de la otra, lo que impacta profundamente el pronóstico de los pacientes tanto desde el punto de vista hepático como desde el endocrino. Los procesos fisiopatológicos subyacentes a ambas enfermedades también parecen muy relacionados entre sí, como lo evidencian la interdependencia entre los grados de viremia y de RI.

Trastornos metabólicos y progresión de la hepatitis crónica por virus C

Estudios transversales han demostrado que los niveles de insulina plasmática se incrementan en relación con un estadio de fibrosis más avanzado en la biopsia hepática⁴⁴, y en el caso de la RI según HOMA-IR, la relación se mantiene en modelos multivariados ajustados para posibles confusores⁴⁵⁻⁴⁷. Dado el diseño, no queda claro si este hallazgo es una simple asociación o implica causalidad. En otras palabras, si la anomalía metabólica ocasiona progresión de la

fibrosis y viceversa. Sin embargo, un estudio investigó la posible causalidad al realizar biopsias seriadas: Everhart y cols, evaluaron 737 pacientes con biopsias basales, a 1.5 y 3.5 años de seguimiento, documentando progresión de la enfermedad de acuerdo a un desenlace compuesto que incluía el avance en el estadio de la fibrosis. En su análisis multivariable mostraron que el incremento en un quintil de HOMA-IR al inicio del estudio se asociaba con un aumento de 25% en el riesgo de progresión de la enfermedad (HR=1.25, 95%CI: 1.08-1.45)⁴⁸. Estos resultados parecen suficientemente robustos para decir que la RI acelera la progresión de la HC-VHC. La presencia de DMT2y obesidad también se han asociado con fibrosis avanzada en estudios transversales⁴⁷, pero la evidencia prospectiva que confirmen su papel en la progresión de la enfermedad es menos clara^{48,49}.

El carcinoma hepatocelular representa el estadio último de la HC-VHC. En un estudio multicéntrico prospectivo que estudio pacientes con fibrosis avanzada por HC-VHC (la mayoría de ellos provenientes del Toronto Western Hospital), se pudo demostrar que la DMT2 incrementa el riesgo de hepatocarcinoma en presencia de cirrosis (HR=3.28, 95%CI: 1.35-7.97) después de 4 años de seguimiento⁵⁰. Un estudio de cohorte reciente confirmó que los pacientes con VHC que presentan DMT2 tienen el riesgo más alto de hepatocarcinoma. Después de 8 años de seguimiento se observaron 17 casos de hepatocarcinoma en 132 individuos con DMT2 (13%), en comparación con 45 casos en el grupo de 850 personas sin DMT2(5%, p=0.001). El riesgo fue independiente de otros factores concomitantes (HR=3.1, 95%CI: 1.7-5.4), aunque no se reportó el estadio de la fibrosis⁵¹. Otro estudio prospectivo con pacientes diagnosticados mediante CTGO (todos los demás estudios utilizaron glucemia en ayuno) observó que el mayor riesgo de hepatocarcinoma en relación con DMT2 persiste tanto en quienes presentan fibrosis avanzada como en quienes no. Estos mismos autores no pudieron evidenciar riesgo incrementado en aquéllos con intolerancia a la glucosa⁵². Por último, según el análisis de una base de datos que incluye todos los centros de hemodiálisis de EEUU, la DMT2 fue identificada

como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de hepatocarcinoma en quienes padecían infección por VHC⁵³.

Según la evidencia prospectiva recién expuesta se puede concluir que la RI y/o la DMT2 aceleran el ritmo de progresión de la HC-VHC. Esto ocurre tanto en estadios iniciales de la enfermedad, o bien, en la progresión de fibrosis a cirrosis y sus complicaciones; como en estadios tardíos de la enfermedad, o bien, en la progresión a hepatocarcinoma.

Efecto de las anomalías metabólicas después del trasplante hepático

El período después del trasplante hepático se caracteriza por la reinfección universal del nuevo injerto lo que lleva a la enfermedad a su estado basal y lo convierte en una especie de modelo para evaluar *de novo* la relación entre el virus y las alteraciones metabólicas. Además, debido a la inmunosupresión los desenlaces clínicos ocurren en un período de tiempo más corto⁵⁴. En un estudio realizado en el Toronto General Hospital se demostró que la alta prevalencia de DMT2 que ocurre en pacientes con VHC se mantiene después del trasplante hepático, inclusive a 5 años de seguimiento⁵⁵. Un meta-análisis reciente reveló que el riesgo de padecer DMT2 por primera vez después del trasplante hepático en pacientes con VHC, es casi 2.5 veces más alto que en pacientes sin VHC (HR=2.46, 95%CI: 1.4-4.2). Tomando en cuenta los reportes más apropiados (n=3), la prevalencia de DMT2 persistente fue de 34% en pacientes con VHC, en comparación con 21% en los que no padecían VHC (HR=1.39, 95%CI: 1.1-1.8)²⁶. Un escenario clínico similar ha sido descrito en pacientes no-cirróticos sometidos a trasplante renal⁵⁶.

Delgado-Borrego y cols demostraron prospectivamente que los pacientes con CH-VHC sometidos a trasplante hepático (n=14) desarrollan un mayor grado de RI que un grupo pareado de pacientes trasplantados por otra enfermedad hepática (n=20). En el análisis multivariable se observó que la infección por VHC se asoció con 77% mayor riesgo de RI, y que el incremento en los niveles de

ARN VHC aceleró el riesgo para desarrollar HOMA-IR elevado (HR=5.2, 95%CI: 1.2-22.7). Además, durante el primer año de seguimiento la presencia de VHC se asoció con un riesgo de 5 veces el del grupo control para desarrollo de DMT2⁵⁷. Otro reporte reciente con seguimiento de 160 pacientes mediante biopsias seriadas, pudo establecer que la RI es un factor independiente que predice el desarrollo de fibrosis avanzada en el injerto hepático (HR=2.01, 95%CI: 1.1-3.91)⁵⁰.

Los estudios arriba mencionados agregan evidencia para establecer que existe una relación definitiva entre las anormalidades metabólicas y el VHC, tomando en cuenta el período post-trasplante. En éste también existe una relación dosis-dependiente entre el ARN VHC y la RI, así como interdependencia de las dos entidades que sugiere causalidad: el VHC incrementa el riesgo de anormalidades metabólicas, y la RI acelera la progresión de la CH-VHC en el injerto. Esto pudiera generar un círculo vicioso que en el período post-trasplante es más notable y dañino para el paciente por la inmunosupresión.

Esteatosis y anormalidades en los lípidos en la hepatitis crónica por virus C

Como ya se ha mencionado, la esteatosis es considerada el componente hepático del síndrome metabólico⁵⁸, y de acuerdo a algunas publicaciones se presenta en hasta 50% de pacientes con HC-VHC, un porcentaje notoriamente más alto que el de la población general ($\approx 25-30\%$)⁵⁹. Se acepta ampliamente que la esteatosis se asocia con RI en pacientes con VHC⁶⁰, e inclusive un estudio de diseño transversal demostró que la carga viral (ARN VHC) se correlaciona con el grado de esteatosis ($r=0.4$, $p=0.001$)³⁵. En una cohorte de 450 pacientes con VHC se pudo observar que 16% presentaban esteatosis avanzada ($>30\%$ según biopsia), siendo de 36% entre los obesos. Según el análisis multivariable de este estudio los predictores de esteatosis fueron: fibrosis avanzada (OR=3.96, 95%CI: 1.9-8.4), obesidad (OR=2.9, 95%CI: 1.68-5.01) genotipo 3 (OR=2.5, 95%CI: 1.1-5.8), y la presencia de múltiples comorbilidades metabólicas (OR=2.44, 95%CI: 1.2-4.9)⁶¹. La identificación de la

esteatosis parece ser relevante dado que se le reconoce como un factor predictor de falla al tratamiento antiviral en algunos ensayos clínicos^{38,60,62,63}, aunque no de manera consistente^{28,33,35,36}. Al menos un estudio evidenció reversión de esteatosis después de lograr RVS con tratamiento antiviral⁶². La relación entre esteatosis y progresión de la enfermedad es difícil de establecer, dado que ésta se ve modificada por el hecho de que el depósito de grasa en el hígado disminuye con la progresión de fibrosis avanzada a cirrosis⁶⁴.

Los lípidos también parecen tener un papel muy importante en la HC-VHC, inclusive en lo referente a su ciclo de vida, como se verá más adelante. En pacientes con HC-VHC se ha demostrado que los niveles de colesterol total, colesterol-LDL y colesterol-HDL se encuentran disminuidos cuando se comparan con controles sanos pareados⁶⁵. Inclusive, los niveles elevados de colesterol, colesterol-LDL y apolipoproteína-B predicen la respuesta al tratamiento antiviral^{40,66,67}, y tanto los de colesterol como los de apolipoproteína-B se ven incrementados después de la erradicación viral^{68,69}. Por otra parte, la esteatosis hepática se relaciona con altos niveles circulantes de triglicéridos^{36,62} pero con determinaciones de colesterol y apolipoproteína-B bajas^{62,70}. Cabe señalar que aunque la mayoría de los hallazgos aquí descritos son más prominentes en el genotipo 3, el perfil esteatogénico del genotipo 1 es a su vez bien reconocido.

La esteatosis ocurre más frecuentemente en HC-VHC que en cualquier otra enfermedad hepática, lo que se relaciona con la carga viral, la obesidad y la RI, además de que el VHC *per se* es capaz de generar anomalías en el perfil de lípidos. La esteatosis también parece tener utilidad pronóstica en relación a la respuesta a la terapia antiviral, y algunas alteraciones lipídicas revierten con la RVS. Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos se han asociado con la esteatosis y pudiera ser que un subgrupo de pacientes se presenten con ésta en vez de las anomalías en los lípidos circulantes, como producto de las alteraciones en las vías del metabolismo de lípidos (ver más adelante). Esto

último alteraría la manera en que el síndrome metabólico deba ser definido en pacientes con VHC.

Mecanismos moleculares de las alteraciones metabólicas en CH-VHC

Ciclo de vida del VHC

El VHC circula por la sangre como una partícula "lipo-viral" dada su asociación con las β -lipoproteínas (lipoproteínas de muy baja y de baja densidad, VLDL y LDL respectivamente, ambas asociadas con apolipoproteína B-100) infectando a los hepatocitos. El mecanismo por el cual entra a los hepatocitos no ha sido esclarecido en su totalidad, pero es evidente que va íntimamente ligado a la maquinaria de lípidos y pudiera involucrar la interacción con los receptores de LDL y/o de lipoproteínas de alta densidad (HDL)⁷¹. La fusión entre las membranas viral y celular permiten la entrada al hepatocito, liberando el genoma compuesto por una ARN de cadena simple, desde el endosoma de inclusión hacia el citoplasma. Este ARN cumple una triple función: se traduce directamente en las proteínas virales (funcionando como ARNm después de unirse a la subunidad ribosomal), se replica para dar lugar al genoma de los viriones en producción y se empaca en algún virión naciente. El producto de la traducción del ARN viral da lugar a una gran poliproteína que se escinde en 10 proteínas virales, conocidas como estructurales (core, E1 y E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Estas proteínas cumplen funciones diversas y complejas que permiten completar el ciclo de vida viral⁷². La salida del virus del hepatocito es a través de la vía secretora del retículo endoplásmico, y se sabe que el ensamblaje y liberación virales requieren su interacción con la apolipoproteína E (presente en VLDL y sus remanentes)⁷³.

Mecanismos del virus C para inducir anomalías en el metabolismo del hospedero

La vía por la cual el VHC induce RI y anomalías en la glucosa y lípidos es compleja, y se ve afectada por condiciones concomitantes que alteran el metabolismo hepático como son la obesidad y el daño por fibrosis, estatois y

cirrosis. En un estudio recientemente publicado por Vanni y cols, se informó sobre 14 pacientes con HC-VHC – sin cirrosis o cualquiera de los componentes del síndrome metabólico – y 7 controles sanos pareados que fueron estudiados por medio de la pinza euglicémica/hiperinsulinémica y calorimetría. En comparación con los controles, los pacientes presentaron producción basal de glucosa endógena incrementada (en un 20%) e incremento de 3 veces en el índice de RI hepática, de acuerdo a la capacidad reducida de la insulina para suprimir la gluconeogénesis. Durante el estado basal, los niveles de glicerol libre en plasma se encontraron disminuidos (30%) y los de β -hidroxibutarato incrementados (4 veces), mientras que la habilidad de la insulina para suprimir la oxidación de lípidos estaba francamente reducida. La sensibilidad periférica a la glucosa fue baja (25%) y esto se pudo explicar casi en su totalidad por el defecto en la oxidación de la glucosa. La expresión hepática del supresor de citocinas 3 (SOCS-3), TNF- α e IL-8 se encontró incrementada en los pacientes, y el primer marcador fue el que mejor correlacionó con el defecto en la sensibilidad hepática a la insulina ($r=0.68$, $p<0.05$). Estos hallazgos fueron independientes del genotipo (se estudiaron genotipos 1 y 3) y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa no se vieron afectadas en la presencia de esteatosis⁷⁴. Por lo tanto, la infección por VHC se asocia con anomalías en el metabolismo de glucosa y lípidos que se manifiestan como RI hepática y sistémica. Los mecanismos moleculares por los cuales acontecen estas alteraciones se describirán brevemente en los siguientes párrafos.

La interacción entre la proteína core y los substratos del receptor de insulina (IRS1 e IRS2) parece ser primordial en las alteraciones del metabolismo hepático. En pacientes con HC-VHC la detección de la proteína core en el suero se asocia con niveles elevados de insulina plasmática en ayuno y de HOMA-IR, así como con menor expresión de IRS1 e IRS2 en el hígado⁷⁵. Inclusive, la erradicación de la viremia conlleva un incremento de 3 veces en los niveles de IRS1 e IRS2³⁹. La manera como la proteína core del VHC afecta los IRS y la

señalización de la insulina es aún materia de debate, pero se han propuesto los siguientes mecanismos:

1. Unión reducida entre el receptor de insulina y el IRS1 – lo que se traduce en menor actividad del receptor – en presencia de VHC, tal como ha sido observado en experimentos con biopsias humanas expuestas a insulina (la mayoría de ellas con genotipo 1). El defecto ocurre a causa de una menor fosforilación de la tirosina de IRS1, por una señalización inefectiva de PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), que también afecta la activación de la vía de Akt (fosfo-proteína quinasa B) que controla la gluconeogenesis y glucogenólisis⁷⁶. Dado el hecho de que los pacientes con VHC tienen niveles incrementados de TNF- α y sus receptores⁷⁷⁻⁸⁰ y que TNF- α es conocido por causar fosforilación de la serina de IRS1/2 y bloquear así la unión con el receptor de insulina (y por ende su activación mediante la fosforilación de la tirosina), se ha especulado que esta citocina es la responsable de la alteración en la señalización de la insulina. Esto ha sido fundamentado por otro modelo experimental en el que se demostró que la sensibilidad a la insulina se puede restablecer con la administración de compuestos anti-TNF- α ⁸¹.
2. En modelos experimentales de infección por VHC o transfección de la proteína core (genotipo 1) se ha podido demostrar esta última estimula la producción de SOCS-3, lo que ocasiona ubiquitinación y degradación proteosomal de IRS1 e IRS2. Además, a través de SOCS-3, la proteína core es capaz de inhibir la fosforilación inducida por insulina de los segundos mensajeros PI3K y Akt, lo que inhibe la glucólisis y la captación de glucosa por el hepatocito (transactivación del transportador de glucosa GLUT-4)⁷⁵. También se ha encontrado que TNF- α puede inducir SOCS-3, lo que potenciaría esta vía de inhibición⁸². En pacientes con HC-VHC la inducción tanto de SOCS-3 como de TNF- α , es todavía mayor en presencia de sobrepeso y obesidad³⁴.
3. En una publicación más reciente utilizando el modelo de transfección del core de VHC con genotipos 1 y 3 se pudo evidenciar que ambos reducen

la expresión de IRS1, aunque el genotipo 1 lo hace al al incrementar la proteína mTOR (la vía de la rapamicina) con la consecuente fosforilación de la serina, mientras que el genotipo 3 actúa deprimiendo al receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ). Este estudio confirmó el bloqueo en la vía de Akt así como la degradación proteosomal de IRS1, aunque el papel de SOCS sólo pudo ser atribuido al genotipo 3 (SOCS-7)⁸³.

Otras interacciones entre el virus y el hospedero que pudieran también ser relevantes para la RI son:

- Las proteínas NS5A y NS5B activan al receptor toll-like 4 y la vía de NF κ B incrementando así la producción de TNF- α e IL-6, y promoviendo así la RI⁸⁴.
- Las vías de PPAR γ y TNF- α son afectadas por el VHC, lo que pudiese estar implicado en las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos^{83,85-87}.
- El perfil de adipocinas cambia en pacientes con HC-VHC, aunque no existe algún hallazgo consistente en lo referente a las determinaciones séricas de leptina y adiponectina⁸⁸. Sin embargo, se sabe que sus niveles correlacionan con el HOMA-IR⁷⁹, y que la determinación de adiponectina se eleva después de la erradicación del virus⁸⁹.
- Existe evidencia indirecta que señala que los niveles incrementados de hierro en los hepatocitos interfieren con la señalización de la insulina y dificultan la extracción hepática de insulina⁹⁰. Asimismo, los niveles de hepcidina (la hormona derivada del hígado que controla la homeostasis del hierro) se encuentran deprimidos en pacientes con HC-VHC pero recuperan sus valores normales después de lograrse una RVS⁹¹.
- En un modelo transgénico de ratón expresando todas las proteínas de VHC se observó inducción de esteatosis hepatocelular en asociación con: triglicéridos plasmáticos bajos debido a un defecto en su secreción (reducción en la actividad de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos [MTP]); e incremento en la síntesis de triglicéridos *de novo* como

resultado de la transcripción aumentada de enzimas lipogénicas (ATP citrato- liasa [ACL], sintasa de ácidos grasos [FAS], desaturasa de esteatoil-CoA 1 [SCD1]) en relación con activación de la proteína ligadora regulada por esteroil 1c (SREBP1c)⁹².

Efectos metabólicos no hepáticos del VHC

- Una publicación ha brindado evidencia de que el VHC es capaz de invadir la célula beta de los islotes de Langerhans, causando anomalías en la estructura mitocondrial, así como una reducción *in vitro* en la liberación de insulina estimulada por glucosa⁹³.
- Al promover la progresión a cirrosis y la disfunción hepática el VHC incrementa el cortocircuito portosistémico de insulina y reduce su extracción hepática, lo que genera hiperinsulinemia⁹⁴.
- La hiperglucagonemia también ha sido descrita en la cirrosis como resultado del cortocircuito portosistémico⁹⁵.
- Los pacientes con cirrosis hepática presentan un defecto en el almacenamiento de glucógeno en el músculo esquelético⁹⁴, posiblemente por el menor efecto inductor de glucógeno sintasa mediado por insulina⁹⁶.

La información arriba expuesta señala que la proteína core juega un papel primordial en la fisiopatología de la RI inducida por VHC, al interrumpir la señalización de IRS, e inducir señales inflamatorias (*i.e.* TNF- α) y anti-inflamatorias (*i.e.* SOCS). Pero ésta también ofrece una explicación para la menor respuesta a la terapia con interferon- α en la RI, dado que la expresión de la proteína SOCS-3 en el hígado es un factor independiente de la respuesta al estándar actual de tratamiento y sus niveles de ARNm se correlacionan con TNF- α . Inclusive SOCS-3 es un inhibidor bien reconocido de la respuesta inmunológica estimulada por interferón⁹⁷, y por la interacción entre SOCS-3 y TNF- α este último podría actuar como un co-factor de resistencia al interferón al potenciar la inducción viral de SOCS-3.

En conclusión, se ha brindado evidencia de que los mecanismos que regulan el ciclo de vida viral están intrínsecamente relacionados con los que producen la RI, lo que da sustento biológico a la información epidemiológica ya expuesta. Por supuesto, esta interacción es tan esencial para el VHC que algunos autores reconocen a las anormalidades metabólicas como una manera de escape del virus, que le asegura su permanencia en el hospedero al mejorar su ciclo de vida y le brinda un mecanismo para evadir la respuesta antiviral⁹⁸.

Intervenciones para disminuir la RI y trastornos metabólicos asociados con VHC

En general, la mejoría en el perfil metabólico se puede lograr mediante el uso de drogas sensibilizadoras de insulina, así como con ejercicio y dieta⁵⁸. La metformina y la pioglitazona son dos drogas hipoglicémicas que se han utilizado en ensayos clínicos de HC-VHC para reducir la RI y mejorar la respuesta a la terapia antiviral. El mecanismo de acción principal de la primera es inhibir la liberación de glucosa desde el hígado, mientras que la segunda es un agonista de PPAR γ . En el estudio de Romero-Gomez *et al*, 123 pacientes con genotipo 1 y HOMA-IR >2 fueron aleatorizados a recibir interferon-pegilado- α y ribavirina + metformina (n=64) o placebo (n=59). En el análisis por intención de tratar la tasa de RVS fue de 53% vs 42% (p=NS), mientras que por protocolo fue de 67% y 49% (p=0.06), respectivamente. El análisis por protocolo excluyó 22 pacientes que no se adherieron a la terapia antiviral o sensibilizadora de insulina. No se observaron diferencias en el peso entre los brazos de estudio, aunque el grupo con metformina mostró una mayor reducción en el HOMA-IR en relación con el grupo con placebo (4.3 ± 2.2 a 2.6 ± 1.7 vs 4.6 ± 2.7 a 3.8 ± 2.1 , p=0.001, respectivamente). La RI al inicio del estudio no se asoció con no respuesta al tratamiento antiviral en el análisis multivariable⁹⁹. El otro reporte informó los resultados de 97 pacientes con HC-VHC genotipo 4 que fueron aleatorizados a recibir el estándar de la terapia antiviral y pioglitazona o placebo. En quienes recibieron el agente sensibilizador de insulina, el 60% logró una RVS en comparación con 39% en el grupo placebo (p=0.04). El HOMA-IR fue el único

predictor de respuesta al tratamiento antiviral en este ensayo. La terapia con pioglitazona fue bien tolerada y no se asoció con incremento en el peso corporal¹⁰⁰.

Los efectos del ejercicio y la dieta en el peso y la RI, así como en otros subrogados de daño hepático, han sido evaluados por Hickman *et al.* En su primera publicación, este grupo pudo demostrar reducción moderada en el peso (pérdida promedio: 5.9 kg) en 19 pacientes virémicos con HC-VHC y esteatosis que fueron sometidos a un régimen de 12 semanas de ejercicio y restricción dietética. Estos cambios fueron acompañados por mejoría en el HOMA-IR (de 4.2 ± 3.3 a 2.5 ± 1.1 , $p=0.03$) y disminución en los niveles de ALT. En 10 pacientes que contaban con biopsias antes y después del estudio se pudo observar una mejoría significativa en el grado de esteatosis (en 9/10), así como reducción en el grado de fibrosis (en 5/9) y en el número de células estelares activadas. Sin embargo, sólo 4 de estos pacientes presentaban fibrosis avanzada o cirrosis en la biopsia basal (puntaje de Knodell de 5 ó 6)¹⁰¹. En su segunda publicación realizaron un seguimiento más largo y demostraron que la pérdida de peso condicionaba mejoría en la calidad de vida, y que los pacientes que lograron mantener la pérdida en el peso eran aquéllos que no excedieron el nivel de ejercicio más allá de sus capacidades ¹⁰². En ninguna de estas publicaciones los autores especificaron cuál era el régimen de ejercicio. Otro ensayo incluyó 17 pacientes con HC-VHC en una rutina de "breathwalk" (caminata con un patrón respiratorio sincronizado y episodios de meditación) en sesiones de 1 hora, 3 veces por semana durante un total de 6 meses. Nueve pacientes eran obesos, 5 tenían cirrosis y 3 presentaban DMT2. A pesar de que no se logró pérdida en el peso al final del estudio, los niveles de ARN VHC, ALT, bilirrubina y triglicéridos se redujeron significativamente, mientras que el estado de ánimo mejoró. No se documentó el cambio en los niveles de HOMA-IR¹⁰³.

Una revisión sistemática de Cochrane reveló que las maniobras para la pérdida de peso se benefician de una intervención psicológica del tipo conductual o

cognitivo-conductual para potenciar el efecto del ejercicio y la dieta¹⁰⁴. El beneficio de un abordaje multidisciplinario que incluya ejercicio, dieta y terapia conductual ha sido demostrado en una revisión sistemática de estudios de modificación en el estilo de vida para el manejo de enfermedad por hígado graso no alcohólico¹⁰⁵. En el Toronto Western Hospital recién se finalizó un ensayo clínico de ejercicio, dieta y consejo conductual en 13 pacientes con obesidad, HC-VHC (12 virémicos) en estadio no cirrótico y resistencia a la insulina (HOMA-IR >2.1), con duración de 24 semanas. De manera preliminar podemos decir que 67% de estos pacientes perdieron la RI, mostrándose una reducción en el nivel de HOMA-IR de 3.7 ± 1.4 a 1.9 ± 0.9 ($p=0.02$), en asociación con una pérdida significativa de peso de 8.7 ± 3.9 kg.

Como acaba de exponerse, el estudio de pioglitazona en el genotipo 4 de VHC representa la prueba de que si se mejora la resistencia a la insulina se puede impactar positivamente en la eficacia de la terapia antiviral. Sin embargo este genotipo es muy infrecuente en Norte América (en México representa <1% de casos) y no existe evidencia del efecto en el genotipo 1. Esto, aunado al pobre beneficio observado con metformina limitarían el uso de los sensibilizadores de insulina en el campo clínico. Es claro que estos agentes sólo modifican algunas de las piezas del rompecabezas de la RI. En contraparte, ejercicio y dieta (más aún si son potenciados por terapia conductual) deben brindar un mayor impacto en las vías metabólicas afectadas por el VHC dado que éstos mejoran una amplia gama de anormalidades asociadas con la RI (incluyendo esteatosis, anormalidades en el perfil de lípidos y resistencia periférica) y pueden también reducir el estado de inflamación y estrés oxidativo a nivel sistémico en el largo plazo. El desarrollo de ensayos clínicos que evalúen el efecto combinado de ejercicio y dieta como modificadores metabólicos, y terapia antiviral es ampliamente esperado.

Seguridad y otros beneficios del ejercicio en cirrosis

La actividad física en cirrosis se encuentra habitualmente muy limitada en respuesta a dos escenarios: cambios en el estilo de vida como consecuencia del deterioro global y progresivo, con pérdida de la coordinación de movimientos y masa muscular; y la falta de su recomendación por parte de quienes están a cargo de los pacientes, con base en el riesgo teórico de encefalopatía hepática y sangrado variceal ante el esfuerzo^{106,107}. A la fecha, no existe ningún estudio publicado que evalúe la seguridad de un programa de entrenamiento físico en pacientes con cirrosis, por lo que este riesgo no puede ser confirmado o rechazado. Si diariamente se incrementa la distancia o tiempo de caminar, se genera un entrenamiento físico que causa mínimo esfuerzo con un consumo máximo de oxígeno bajo a moderado (VO_{2max} de 35-50%)¹⁰⁸ y que por lo tanto debe ser seguro. Esta estrategia es asequible para cualquier paciente, lo que debe hacer posible mantenerla a largo plazo. Aunque esta intensidad en la actividad física puede incrementar el gradiente de presión portal (lo que conferiría teóricamente un riesgo incrementado de sangrado variceal), el efecto hemodinámico puede ser abatido con el uso concomitante de β -bloqueadores no selectivos¹⁰⁹. Así, este tipo de entrenamiento físico no debe ser deletéreo para paciente alguno con cirrosis, pues los que tengan riesgo incrementado de sangrado ya contarán con la profilaxis apropiada. En lo que se refiere al riesgo elevado de padecer encefalopatía hepática, éste es anecdótico, y aunque el ejercicio sí puede incrementar los niveles de amoníaco, en nuestro ensayo clínico de ejercicio en pacientes con encefalopatía hepática no hemos observado exacerbación alguna con entrenamiento físico a intensidades de VO_{2max} 60-70%.

Otros beneficios que el entrenamiento físico puede proporcionar a los pacientes con cirrosis son: mejoría generalizada en la actividad cardiopulmonar y el estado hemodinámico; disminución en el tono simpático (al favorecer la actividad vagal), lo que puede reducir la absorción de sal y agua; aceleración del tránsito intestinal, lo que puede reducir la translocación bacteriana¹¹⁰; mejoría en el estado de ánimo y autoestima¹¹¹. Finalmente, una mejor condición física según

lo evaluado en la prueba de 6 minutos de caminata predice mayor supervivencia en pacientes con cirrosis^{112,113}.

JUSTIFICACIÓN

En resumen, la infección por VHC causa un sinnúmero de anomalías en el metabolismo de glucosa y lípidos, mismas que se asocian con mal pronóstico. Estas alteraciones derivan de la actividad viral y benefician el ciclo viral de varias maneras. Ejercicio y dieta, potenciados por una intervención conductual pueden considerar modificaciones en el estilo de vida, lo que impacta positivamente en las anomalías metabólicas causadas por el virus, en paralelo con la calidad de vida. Puede preverse que estos cambios lleven a una terapia antiviral más efectiva, incrementando además su tolerancia¹¹⁴. Como un primer paso es necesario documentar si los pacientes con HC-VHC y RI pueden sobrellevar de manera segura un programa para modificar su estilo de vida, y que éste es realmente efectivo en mejorar las alteraciones metabólicas y la calidad de vida. La primera etapa, dedicada exclusivamente a pacientes con obesidad y sin cirrosis ha finalizado con excelentes resultados. En esta segunda etapa, buscaremos incluir pacientes en estadio cirrótico, evaluando a la vez el papel de la viremia (ARN VHC) en los cambios metabólicos. Así, el trabajo actual buscará comparar el efecto en pacientes virémicos con el de no virémicos (con y sin antecedente de RVS, respectivamente).

HIPÓTESIS

Las anomalías metabólicas en pacientes obesos con cirrosis debida a HC-VHC y resistencia a la insulina pueden mejorar con un programa que incluya ejercicio, dieta y terapia conductual durante 24 semanas, pero esta mejoría es más evidente en pacientes con respuesta viral sostenida que en pacientes virémicos.

OBJETIVOS

Primario:

Mejorar los niveles de HOMA-IR en pacientes obesos con cirrosis debida a HC-VHC y resistencia a la insulina mediante un programa de ejercicio, dieta y terapia conductual, con duración de 24 semanas.

Secundarios:

En pacientes obesos con cirrosis debida a HC-VHC y resistencia a la insulina, un programa de ejercicio, dieta y terapia conductual con duración de 24 semanas logrará:

- a) Incrementar los niveles de adiponectina a la vez que disminuye los de leptina, IL-6, y receptores 1 y 2 de TNF- α .
- b) Disminuir el peso y otros indicadores de adiposidad (*i.e.* IMC, circunferencia de la cintura, razón cintura/cadera).
- c) Incrementar el índice de sensibilidad a la insulina.
- d) Mejorar el perfil de lípidos (\downarrow triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol-LDL; \uparrow colesterol-HDL).
- e) Recuperar la calidad de vida y reducir la fatiga.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental, longitudinal y prospectivo (ensayo clínico no controlado) que evaluará la eficacia de un tratamiento. Existirá un componente comparativo (pacientes virémicos contra no virémicos) que evaluará un mecanismo fisiopatogénico.

Pacientes

Los pacientes serán reclutados de la Clínica de Hígado del Toronto Western Hospital. Esta clínica es un centro de referencia de hepatología en Ontario, Canadá, y actualmente brinda atención a más de 2000 pacientes activos con HC-VHC.

Criterios de inclusión

1. Edad entre 18-65 años.
2. HC-VHC genotipo 1.
3. Cirrosis demostrada por biopsia (Laennec estadio = 4).
 - a. Laennec 3 con evidencia de hipertensión portal.
4. Obesidad (definido como IMC $>30 \text{ kg/m}^2$).
5. Resistencia a la insulina (definido como HOMA-IR ≥ 2.1).

Criterios de exclusión

1. Diagnóstico previo de DMT2 que requiera tratamiento farmacológico.
2. Uso de metformina, tiazolidinedionas, estatinas o fibratos.
3. Tratamiento antiviral activo o que haya concluido en los últimos 6 meses.
4. Co-infección viral (hepatitis B, virus de inmunodeficiencia humano).
5. Coexistencia de otra enfermedad hepática (excepto hígado graso).
6. Alcoholismo activo.
7. Várices esofágicas grandes o gástricas en la última endoscopia.
8. Hepatocarcinoma.
9. Falla cardíaca o enfermedad coronaria.

10. Hipertensión pulmonar grave o síndrome hepatopulmonar.
11. Enfermedad pulmonar crónica limitación funcional.
12. Inhabilidad para consentir el estudio y seguir con sus requerimientos.

Grupos de estudio

- Grupo A: pacientes virémicos (recaída o no respuesta previa).
- Grupo B: pacientes no virémicos (RVS previa).

Cálculo del tamaño de muestra

En el estudio ya concluido en pacientes obesos, no cirróticos y con RI, se observó que el HOMA-IR disminuyó 50% (basal: 3.7 ± 1.4 , fin de tratamiento: 1.9 ± 0.9 ; $p=0.002$), y casi 70% de los pacientes perdieron la RI. No existe motivo para pensar que en el grupo de pacientes con cirrosis el efecto deba ser menor. Por lo tanto, con base en esta información el tamaño de muestra se puede calcular con la siguiente fórmula¹¹⁵:

$$n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / \Delta^2, n = (1.96 + 1.28)^2 (1.86)^2 / (1.85)^2, n = 10.6$$

Considerando la pérdida de 2 individuos por grupo, se incluirá un total de 12 pacientes por grupo, permitiendo detectar una diferencia de 50% en el HOMA-IR antes y después de la intervención con un error alfa 5% y poder de 90%. Este número de pacientes se encuentra dentro de las capacidades de la Clínica de Hígado y el entorno temporal del estudio.

Escrutinio para resistencia a la insulina

La prueba de HOMA-IR se realizará por la mañana y después de un ayuno estándar de 12 horas. Los niveles plasmáticos de glucosa e insulina serán medidos por triplicado, con 5 minutos entre cada toma, considerando la naturaleza pulsátil de la secreción de insulina. El promedio de las tres mediciones servirá para el cálculo de HOMA-IR según la siguiente fórmula = $\text{insulina (mUI/L)} \times \text{glucosa (mmol)} / 22.5$. Se diagnosticará RI en los pacientes

con HOMA \geq 2.1. Este punto de corte representa la percentila 75 de la población local, a partir del cual existe riesgo de diabetes^{116,117}.

Descripción de las maniobras

Ejercicio

El nivel de actividad física basal se evaluará mediante el uso de un podómetro durante 3 días mientras los pacientes realizan sus actividades cotidianas. Además, el gasto energético diario será calculado con la ecuación de Harris-Benedict (para el gasto basal) y con el Cuestionario de Actividad Física de Paffenbarger y el Compendio de Actividad Física (para el gasto energético asociado a la actividad física)¹¹⁸⁻¹²⁰.

Se extenderá una prescripción de ejercicio que dependerá de la actividad basal del paciente, ya que ésta consistirá en incrementar la actividad diaria en al menos 3000 pasos o lograr 10,000 pasos totales, de tal manera que se realice el objetivo que requiera mayor esfuerzo físico. Durante el período de estudio cada paciente tendrá que utilizar el podómetro y completar un diario donde se lleve registro del tipo de actividad cotidiana y la cuenta diaria de pasos para poder monitorizar el apego al tratamiento. En cada sesión se revisará este diario para poder actualizar el gasto energético.

Dieta

Los participantes deberán hacer un recuento alimentario de los últimos 3 días para determinar los hábitos dietéticos basales y calcular la ingesta calórica. Para estimar los tamaños de las raciones los participantes recibirán una tarjeta con porciones alimentarias visuales en 2 dimensiones (2D Food Portion Visual chart; Nutrition Consulting Enterprises, Framingham, MA), la cuál ha sido validada para hombres y mujeres entre 20 y 70 años de edad (Millen, B. y J. L. Morgan, 1996). Una semana después se revisará el recuento alimentario en presencia de un experto en nutrición verificando que no haya omisión de alimentos o bebidas y que el tamaño de las raciones sea apropiado. El contenido dietético se analizará

utilizando el programa Diet Analysis Plus Version 7.0.1 (Thomson Wadsworth, Stamford, CT, USA).

La prescripción dietética será provista al inicio del estudio y será individualizada según los hábitos dietéticos y preferencias de cada paciente, con las siguientes modificaciones:

- Alta en alimentos con índice glicémico bajo y en fibra¹²¹.
- Baja en grasa y colesterol.
- Con déficit de 500 kCal, tomando como referencia el consumo energético basal.

La adherencia a la terapia dietética se reforzará en cada sesión y será evaluada mediante recuentos de alimentos de 3 días en las semanas 12 y 24. Asimismo, se evaluará la composición de ácidos grasos en los eritrocitos como un parámetro más objetivo de adherencia dietética.

Terapia cognitiva

La teoría de la modificación del comportamiento será aplicada siguiendo un formato de preguntas y guías que el investigador y participantes resolverán en cada sesión, lo que permitirá reforzar/reprobar conductas apropiadas de manera individual. Esto alentará la motivación interna y facilitará cambio o adaptación en el comportamiento hacia hábitos de actividad física y dieta que sean más apropiados para los objetivos del estudio, respetando las rutinas y costumbres de cada paciente. Para identificar algún posible trastorno del ánimo que pueda interferir con el protocolo, antes de iniciar éste se aplicarán los siguientes cuestionarios: la Escala de Depresión Montgomery-Asberg (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale, MADRS) y la Escala de Depresión del Centro de Estudios Epidemiológicos (Centre for Epidemiologic Studies Depression Scale, CES-D).

Seguimiento

El estudio cubrirá un total de 26 semanas. Durante las primeras dos se realizarán las sesiones de escrutinio y se definirá la actividad física y hábito dietético basales. Éstas no serán contadas como parte del período de intervención (semanas -2 y -1). La fase de intervención constará de 24 semanas, combinando una primera etapa de 12 semanas con seguimiento intensivo cara a cara, y una segunda etapa en la que el seguimiento se realizará por vía telefónica, culminando con una última sesión presencial:

- Fase intensiva con sesiones cara a cara en las semanas 0, 2, 4, 8, 12.
- Fase de mantenimiento con sesiones telefónicas en las semanas 14, 16, 18, 20, 22.
- Sesión final cara a cara (fin de la intervención) en la semana 24.

En cada sesión presencial se llevará a cabo una visita clínica regular con intención de dar seguimiento a la condición médica de cada paciente. En éstas se realizarán estudios de laboratorio o imagenología habituales (química sanguínea, hematología y coagulación, pruebas de función hepática, ultrasonido hepático, etc.) según la necesidad individual y el criterio del investigador.

Variables

Todas las siguientes determinaciones serán realizadas en las semanas 0,12 y 24.

Adipocitocinas

Se medirán adiponectina, leptina, IL-6 y los receptores 1 y 2 de TNF- α , siguiendo las instrucciones de estuches comerciales.

Antropometría

Además de peso y altura, se obtendrán las circunferencias de la cintura y cadera, así como pliegues cutáneos, para evaluar cualquier posible cambio en la composición corporal.

Índice de sensibilidad a la insulina

Se realizará una CTGO después de un período nocturno de ayuno estándar de 10 horas. Después de colocar un catéter intravenoso se obtendrá una muestra basal posterior a lo cual el paciente deberá tomar un líquido con 75 g de glucosa, seguido de tomas de muestras a intervalos de 30, 60, 90 y 120 minutos desde la toma de la glucosa. El índice de sensibilidad a la insulina (ISI) será obtenido de la CTGO de la siguiente manera: $10,000/\text{raíz cuadrada de [glucosa en ayuno} \times \text{insulina en ayuno]} \times [\text{promedio de glucosa} \times \text{promedio de insulina durante la CTGO}]$. El ISI tiene buena correlación ($r = 0.73$, $P < 0.001$) con la tasa de consumo global de glucosa durante la pinza euglicémica/hiperinsulinémica con insulina¹²².

Perfil de lípidos

El perfil de lípidos considerará las siguientes mediciones: ácidos grasos libres en plasma, triglicéridos, colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL. Como ya se ha mencionado, también se estudiará el cambio en la composición de ácidos grasos de los eritrocitos, siguiendo los lineamientos de una técnica estándar.

Calidad de vida y fatiga

Los cuestionarios SF-36 y CLDQ (por sus siglas en inglés: Short-Form 36 y Chronic Liver Disease Questionnaire) serán utilizados para evaluar los cambios en la calidad de vida. El SF-36 es bien conocido y se adecua a los objetivos generales de este estudio. El CLDQ por su parte permitirá identificar cambios en algunos aspectos de la vida de los pacientes con cirrosis que puedan afectar el sentido global de bienestar (calambres musculares, distensión abdominal, comezón, expectativa de trasplante hepático) y que no están incluidos en el SF-36¹²³. También se administrarán dos cuestionarios de fatiga: la Escala del Impacto de la Fatiga y el Índice de Evaluación de la Fatiga (Fatigue Impact Scale and Fatigue Assessment Index Questionnaires).

Análisis Estadístico

Los resultados se describirán utilizando medianas con intervalos intercuartilares o proporciones, según sea el caso. Los análisis de pruebas de hipótesis se llevarán a cabo con estadística no paramétrica. En el caso de los cambios en cada grupo se utilizarán las pruebas de rangos señalados de Wilcoxon y de Friedman, mientras que los cambios entre grupos serán evaluados con la U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. Para las proporciones se construirán tablas de contingencia que serán analizadas con la prueba de Chi-cuadrada o de Fisher, según corresponda.

Tabla 1. Factores asociados con respuesta al tratamiento en hepatitis crónica por virus de hepatitis C.

Factores no modificables	Factores potencialmente modificables
Genotipo viral	Adherencia al tratamiento
Carga viral	Esteatosis (NAFLD)
Edad	Obesidad
Raza	Resistencia a la insulina
Nivel de ALT	Diabetes mellitus tipo 2
Cirrosis	
Polimorfismo de IL28B	
Otros factores genéticos del hospedero	

ALT: alanino aminotransferasa. NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease (enfermedad por hígado graso).

Tabla 2. Factores asociados con progresión de la hepatitis crónica por virus de hepatitis C.

Factores no modificables	Factores potencialmente modificables
Edad de adquisición de la infección	Consumo de alcohol
Duración de la infección	Co-infección con VHB o VIH
Sexo masculino	Co-infestación con esquistosomiasis
Raza	Tabaquismo
Grado de actividad en la biopsia	Uso diario de marihuana
Factores genéticos del hospedero	Sobrecarga de hierro
	Esteatosis (NAFLD)
	Obesidad
	Resistencia a la insulina
	Diabetes mellitus tipo 2

ALT: alanino aminotransferasa. NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease (enfermedad por hígado graso). VHB: virus de la hepatitis B, VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

Tabla 3. Criterios diagnósticos para el síndrome metabólico.

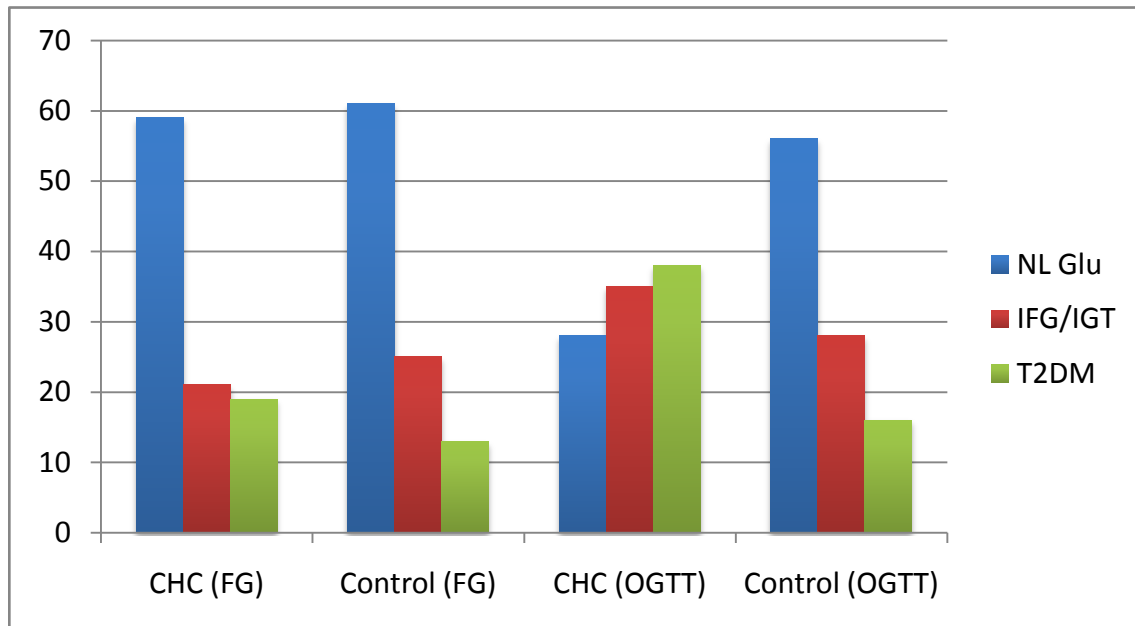
Rasgo	WHO	ATPIII (NCEP)	IDF
Hiperglucemia	IG: Glu 140-200 mg/dL después de CTGO, o DMT2	GAA: ≥ 5.6 mmol/L	GAA: ≥ 5.6 mmol/L, o DMT2
Hiperinsulinemia (RI)	Insulina o HOMA >75 percentila	NE	NE
Adiposidad	IMC > 30 kg/m ² or RCC >0.85 (M), >0.90 (H)	CC >88 (M), >102 (H)	IMC > 30 kg/m ² , o CC \uparrow según grupo étnico
Dislipidemia	TG ≥ 1.7 y/o col-HDL <0.9 (M), <1 (H) mmol/L	TG ≥ 1.7 o col-HDL <1.03 (M), <1.29 (H) mmol/L	TG ≥ 1.7 o col-HDL <1.03 (M), <1.29 (H) mmol/L
Presión arterial	$>140/90$ mmHg	$>130/85$ mmHg	$>130/85$ mmHg
Otro	Microalbuminuria	NE	NE

WHO: World Health Organization. ATPIII: Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program (NCEP). IDF: International Diabetes Federation. RI: resistencia a la insulina. IG: Intolerancia a la glucosa. Glu: Glucosa. GAA: Glucosa anormal en ayuno. CTGO: curva de tolerancia a la glucosa oral. HOMA: Homeostasis Model Assessment. IMC: Índice de masa corporal. RCC: razón cintura/cadera. CC: circunferencia de la cintura. M: Mujer. H: Hombre. TG: triglicéridos. col-HDL: colesterol-HDL. NE No evaluado.

Tabla 4. Puntos de corte de la circunferencia de la cintura para el síndrome metabólico, según los criterios IDF en relación a grupo étnico.

Grupo étnico	Género	Puntos de corte
Europeo	Mujer	≥ 80 cm
	Hombre	≥ 94 cm
Sudasiático	Mujer	≥ 80 cm
	Hombre	≥ 90 cm
Chino	Mujer	≥ 80 cm
	Hombre	≥ 90 cm
Japonés	Mujer	≥ 90
	Hombre	≥ 85
Etnia Sud/Centro Americana		Usar Sudasiático
Africanos Subsaharianos		Usar Europeo
Mediterráneos el Este y el Medio Este		Usar Europeo

Figura 1. Prevalencia de anomalías de la glucosa en un estudio de pacientes y controles en quienes se realizó una curva de tolerancia a la glucosa oral (OGTT).



CHC: hepatitis crónica por hepatitis C. FG: glucosa en ayuno. NL Glu: glucosa normal.
IFG/IGT: Glucosa anormal en ayuno/intolerancia a la glucosa.
T2DM: Diabetes mellitus tipo 2.

REFERENCIAS

1. www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/
2. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009a;49:1335-1374.
3. Sherman M, Shafran S, Burak K, et al. Management of chronic hepatitis C: consensus guidelines. *Can J Gastroenterol*. 2007b;21 Suppl C:25C-34C.
4. Dehesa-Violante M, Nuñez-Nateras R. Epidemiology of hepatitis virus B and C. *Arch Med Res*. 2007c;38:606-611.
5. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology*. 2008b;134:1699-1714.
6. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005c;436:967-972.
7. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2006d;355:2444-2451.
8. Dehesa-Violante M, Bosques-Padilla F, Kershenobich-Stalnikowitz D, Mexican Study Group of Pegasys. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Mexican patients. *Rev Gastroenterol Mex*. 2007e;72:344-348.
9. Cammà C, Cabibbo G, Bronte F, et al. Retreatment with pegylated interferon plus ribavirin of chronic hepatitis C non-responders to interferon plus ribavirin: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2009f;51:675-681.
10. Heathcote EJ. Antiviral therapy: chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2007g;14 Suppl 1:82-88.
11. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009h;461:399-401.
12. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, et al. The metabolic syndrome: a concept hard to define. *Arch Med Res*. 2005i;36:223-231.
13. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006j;23:469-480.
14. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000k;23:57-63.
15. Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol*. 1994l;21:1135-1139.
16. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med*. 2000m;133:592-599.
17. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowsky MS, Straghddee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Hepatology* 2001;55(6):1554.
18. Petrides AS, DeFronzo RA. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *J Hepatol*. 1989n;8:107-114.
19. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, Simó R. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care*. 2004o;27:1171-1175.
20. White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2008p;49:831-844.

21. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, et al. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology*. 2003q;38:50-56.
22. Simó R, Hernández C, Genescà J, Jardí R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1996r;19:998-1000.
23. Mason AL, Lau JY, Hoang N, et al. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1999s;29:328-333.
24. Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P. Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes in a community-based longitudinal study. *Am J Epidemiol*. 2007t;166:196-203.
25. Huang JF, Yu ML, Dai CY, et al. Reappraisal of the characteristics of glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol*. 2008u;103:1933-1940.
26. Chen T, Jia H, Li J, Chen X, Zhou H, Tian H. New onset diabetes mellitus after liver transplantation and hepatitis C virus infection: meta-analysis of clinical studies. *Transpl Int*. 2009p;22:408-415.
27. Shaheen M, Echeverry D, Oblad MG, Montoya MI, Teklehaimanot S, Akhtar AJ. Hepatitis C, metabolic syndrome, and inflammatory markers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [NHANES III]. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007q;75:320-326.
28. Hanouneh IA, Feldstein AE, Lopez R, et al. Clinical significance of metabolic syndrome in the setting of chronic hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008r;6:584-589.
29. Grigorescu M, Radu C, Crişan D, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance and adiponectin level in patients with chronic hepatitis C. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2008s;17:147-154.
30. Yoneda M, Saito S, Ikeda T, et al. Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients. *J Viral Hepat*. 2007t;14:600-607.
31. Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2008u;48:721-727.
32. Elgouhari HM, Zein CO, Hanouneh I, Feldstein AE, Zein NN. Diabetes Mellitus Is Associated with Impaired Response to Antiviral Therapy in Chronic Hepatitis C Infection. *Dig Dis Sci*. 2009v.
33. Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003w;38:639-644.
34. Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, et al. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut*. 2006x;55:529-535.
35. Romero-Gómez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005s;128:636-641.
36. Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007t;45:80-87.
37. Dai CY, Huang JF, Hsieh MY, et al. Insulin resistance predicts response to peginterferon-alpha/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2009u;50:712-718.

38. Grasso A, Malfatti F, De Leo P, et al. Insulin resistance predicts rapid virological response in non-diabetic, non-cirrhotic genotype 1 HCV patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. *J Hepatol.* 2009v;51:984-990.
39. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, et al. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol.* 2007w;102:570-576.
40. Petta S, Cammà C, Di Marco V, et al. Time course of insulin resistance during antiviral therapy in non-diabetic, non-cirrhotic patients with genotype 1 HCV infection. *Antivir Ther.* 2009t;14:631-639.
41. Simó R, Lecube A, Genescà J, Esteban JI, Hernández C. Sustained virological response correlates with reduction in the incidence of glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Diabetes Care.* 2006u;29:2462-2466.
42. Giordanino C, Bugianesi E, Smedile A, et al. Incidence of type 2 diabetes mellitus and glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection by response to treatment: results of a cohort study. *Am J Gastroenterol.* 2008v;103:2481-2487.
43. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, et al. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009w;49:739-744.
44. Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, et al. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *J Hepatol.* 2003x;39:1042-1048.
45. Hui JM, Sud A, Farrell GC, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology.* 2003y;125:1695-1704.
46. Cua IH, Hui JM, Kench JG, George J. Genotype-specific interactions of insulin resistance, steatosis, and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008z;48:723-731.
47. Hu SX, Kyulo NL, Xia VW, Hillebrand DJ, Hu KQ. Factors associated with hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study of a large cohort of U.S. patients. *J Clin Gastroenterol.* 2009aa;43:758-764.
48. Everhart JE, Lok AS, Kim HY, et al. Weight-related effects on disease progression in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Gastroenterology.* 2009ab;137:549-557.
49. Ortiz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol.* 2002ab;97:2408-2414.
50. Veldt BJ, Poterucha JJ, Watt KD, et al. Insulin resistance, serum adipokines and risk of fibrosis progression in patients transplanted for hepatitis C. *Am J Transplant.* 2009ac;9:1406-1413.
51. Wang CS, Yao WJ, Chang TT, Wang ST, Chou P. The impact of type 2 diabetes on the development of hepatocellular carcinoma in different viral hepatitis statuses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009ad;18:2054-2060.
52. Konishi I, Hiasa Y, Shigematsu S, et al. Diabetes pattern on the 75 g oral glucose tolerance test is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus. *Liver Int.* 2009ae;29:1194-1201.
53. Henderson WA, Shankar R, Gill JM, et al. Hepatitis C progressing to hepatocellular carcinoma: the HCV dialysis patient in dilemma. *J Viral Hepat.* 2009af.
54. McCashland TM. Management of liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009ag;14:221-224.
55. Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, et al. Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology.* 2000ah;32:87-90.
56. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Kanwal F, Dulai G. Post-transplant diabetes mellitus and HCV seropositive status after renal transplantation: meta-analysis of clinical studies. *Am J Transplant.* 2005q;5:2433-2440.

57. Delgado-Borrego A, Liu YS, Jordan SH, et al. Prospective study of liver transplant recipients with HCV infection: evidence for a causal relationship between HCV and insulin resistance. *Liver Transpl.* 2008r;14:193-201.
58. Duarte-Rojo A, Herrera MF, Robles-Díaz G. [Obesity and its implication in gastroenterological diseases]. *Rev Gastroenterol Mex.* 2006ad;71 Suppl 2:11-27.
59. Negro F, Sanyal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int.* 2009ae;29 Suppl 2:26-37.
60. Cammà C, Bruno S, Di Marco V, et al. Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2006af;43:64-71.
61. Hayman AV, Sofair AN, Manos MM, et al. Prevalence and predictors of hepatic steatosis in adults with newly diagnosed chronic liver disease due to hepatitis C. *Medicine (Baltimore).* 2009t;88:302-306.
62. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology.* 2003u;38:75-85.
63. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2009ag;361:580-593.
64. Lok AS, Everhart JE, Chung RT, et al. Evolution of hepatic steatosis in patients with advanced hepatitis C: results from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) trial. *Hepatology.* 2009v;49:1828-1837.
65. Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ, et al. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *J Viral Hepat.* 2006w;13:56-61.
66. Gopal K, Johnson TC, Gopal S, et al. Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology.* 2006x;44:335-340.
67. Economou M, Milionis H, Filis S, et al. Baseline cholesterol is associated with the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008y;23:586-591.
68. Hofer H, Bankl HC, Wrba F, et al. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol.* 2002u;97:2880-2885.
69. Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouillères O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001v;34:428-434.
70. Petit JM, Benichou M, Duvillard L, et al. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol.* 2003v;98:1150-1154.
71. Perrault M, Pécheur EI. The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J.* 2009w;423:303-314.
72. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005x;436:933-938.
73. Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology.* 2009y.
74. Vanni E, Abate ML, Gentilcore E, et al. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009z;50:697-706.
75. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol.* 2004aa;165:1499-1508.
76. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology.* 2003x;38:1384-1392.

77. Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol.* 2003y;98:2751-2756.
78. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care.* 2006z;29:1096-1101.
79. Cua IH, Hui JM, Bandara P, et al. Insulin resistance and liver injury in hepatitis C is not associated with virus-specific changes in adipocytokines. *Hepatology.* 2007aa;46:66-73.
80. Eguchi Y, Mizuta T, Ishibashi E, et al. Hepatitis C virus infection enhances insulin resistance induced by visceral fat accumulation. *Liver Int.* 2009ab;29:213-220.
81. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2004ac;126:840-848.
82. Hong F, Nguyen VA, Gao B. Tumor necrosis factor alpha attenuates interferon alpha signaling in the liver: involvement of SOCS3 and SHP2 and implication in resistance to interferon therapy. *FASEB J.* 2001ab;15:1595-1597.
83. Paziienza V, Clément S, Pugnale P, et al. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology.* 2007y;45:1164-1171.
84. Choi SH, Park KJ, Ahn BY, Jung G, Lai MM, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Mol Cell Biol.* 2006z;26:3048-3059.
85. Dharancy S, Malapel M, Perlemuter G, et al. Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2005aa;128:334-342.
86. de Gottardi A, Paziienza V, Pugnale P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006ab;23:107-114.
87. Kim KH, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ, Cheong J. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007z;355:883-888.
88. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology.* 2009aa;50:957-969.
89. Lo Iacono O, Venezia G, Petta S, et al. The impact of insulin resistance, serum adipocytokines and visceral obesity on steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007ab;25:1181-1191.
90. Lecube A, Hernández C, Simó R. Glucose abnormalities in non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C virus infection: the role of iron overload. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009ac;25:403-410.
91. Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, et al. Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatol.* 2008ad;49:702-710.
92. Lerat H, Kammoun HL, Hainault I, et al. Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2009ae;284:33466-33474.
93. Masini M, Campani D, Boggi U, et al. Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care.* 2005af;28:940-941.
94. Müller MJ, Willmann O, Rieger A, et al. Mechanism of insulin resistance associated with liver cirrhosis. *Gastroenterology.* 1992ag;102:2033-2041.
95. Sherwin R, Joshi P, Hendler R, Felig P, Conn HO. Hyperglucagonemia in Laennec's cirrhosis. The role of portal-systemic shunting. *N Engl J Med.* 1974ah;290:239-242.

96. Kruszynska Y, Williams N, Perry M, Home P. The relationship between insulin sensitivity and skeletal muscle enzyme activities in hepatic cirrhosis. *Hepatology*. 1988ah;8:1615-1619.
97. Gale M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 2005ai;436:939-945.
98. Del Campo JA, Romero-Gómez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus? *World J Gastroenterol*. 2009aj;15:5014-5019.
99. Romero-Gómez M, Diago M, Andrade RJ, et al. Treatment of insulin resistance with metformin in naïve genotype 1 chronic hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology*. 2009ae;50:1702-1708.
100. Khattab M, Emad M, Abdelaleem A, et al. Pioglitazone improves virological response to peginterferon alpha-2b/ribavirin combination therapy in hepatitis C genotype 4 patients with insulin resistance. *Liver Int*. 2009af.
101. Hickman IJ, Clouston AD, Macdonald GA, et al. Effect of weight reduction on liver histology and biochemistry in patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2002ag;51:89-94.
102. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut*. 2004ah;53:413-419.
103. Vázquez-Vandyck M, Roman S, Vázquez JL, et al. Effect of Breathwalk on body composition, metabolic and mood state in chronic hepatitis C patients with insulin resistance syndrome. *World J Gastroenterol*. 2007ai;13:6213-6218.
104. Shaw K, O'Rourke P, Del Mar C, Kenardy J. Psychological interventions for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005aj;CD003818.
105. Bellentani S, Dalle Grave R, Suppini A, Marchesini G, Fatty Liver Italian Network. Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease: The need for a multidisciplinary approach. *Hepatology*. 2008ak;47:746-754.
106. Secchi GC, Rezzonico A, Azzolini F, Gervasini N. [Observations on the increase of blood ammonia after muscular exercise in patients with hepatic cirrhosis]. *Arch Ital Mal Appar Dig*. 1966al;33:215-219.
107. García-Pagán JC, Santos C, Barberá JA, et al. Physical exercise increases portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology*. 1996am;111:1300-1306.
108. Lazzer S, Boirie Y, Bitar A, Petit I, Meyer M, Vermorel M. Relationship between percentage of VO₂max and type of physical activity in obese and non-obese adolescents. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005an;45:13-19.
109. Bandi JC, García-Pagán JC, Escorsell A, et al. Effects of propranolol on the hepatic hemodynamic response to physical exercise in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1998ao;28:677-682.
110. Oetlé GJ. Effect of moderate exercise on bowel habit. *Gut*. 1991ap;32:941-944.
111. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Exercise physiology. Energy, nutrition and human performance. Fifth edition. Lippincott William & Wilkins. Philadelphia 2001.
112. Alameri HF, Sanai FM, Al Dukhayil M, et al. Six Minute Walk Test to assess functional capacity in chronic liver disease patients. *World J Gastroenterol*. 2007ar;13:3996-4001.
113. García-Juárez I, Morales-Blanhir J, Rosas-Romero R, López-Méndez E, Duarte-Rojo A, Torre A, Uribe M. Caminata de 6 min como valor pronóstico en pacientes con cirrosis hepática. *Rev Gastroenterol Mex* 2009;74(Suppl 2):55.
114. Payen JL, Pillard F, Mascarell V, Rivière D, Couzigou P, Kharlov N. Is physical activity possible and beneficial for patients with hepatitis C receiving pegylated interferon and ribavirin therapy? *Gastroenterol Clin Biol*. 2009at;33:8-14.

115. Stolley PD, Strom BL. Sample size calculations for clinical pharmacology studies. *Clin Pharmacol Ther.* 1986au;39:489-490.
116. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985av;28:412-419.
117. Radikova Z, Koska J, Huckova M, et al. Insulin sensitivity indices: a proposal of cut-off points for simple identification of insulin-resistant subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006aw;114:249-256.
118. Roza AM, Shizgal HM. The Harris Benedict equation reevaluated: resting energy requirements and the body cell mass. *Am J Clin Nutr.* 1984ax;40:168-182.
119. Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med.* 1986ay;314:605-613.
120. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc.* 2000az;32:S498-S504.
121. Foster-Powell K, Holt SH, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr.* 2002ba;76:5-56.
122. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1999bb;22:1462-1470.
123. Younossi ZM, Guyatt G, Kiwi M, Boparai N, King D. Development of a disease specific questionnaire to measure health related quality of life in patients with chronic liver disease. *Gut.* 1999bd;45:295-300.

ANEXOS

Producción Científica

CLINICAL STUDIES

A 24-week dietary and physical activity lifestyle intervention reduces hepatic insulin resistance in the obese with chronic hepatitis C

Venessa Pattullo^{1,2}, Andres Duarte-Rojo^{1,3}, Wael Soliman^{1,4}, Florencia Vargas-Vorackova⁵, Sanjeev Sockalingam⁶, Ivan G. Fantus⁷, Johane Allard¹ and Jenny Heathcote¹

1 Department of Medicine, University Health Network, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

2 Sydney Medical School, University of Sydney, Sydney, Australia

3 Division of Gastroenterology and Hepatology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA

4 University of Minia, Minya, Egypt

5 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ, México, DF, México

6 Department of Psychiatry, University Health Network, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

7 Department of Medicine, Mt Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Keywords

behaviour modification – diet – exercise – hepatitis C – insulin resistance – obesity

Abbreviations

AUC, area under the curve; BMI, body mass index; BMR, basal metabolic rate; BP, blood pressure; CES-D, Centre for Epidemiological Studies Depression scale; CHC, chronic hepatitis C; C-Pep, c-peptide; FFA, free fatty acids; FIS, fatigue impact scale; FPG, fasting plasma glucose; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HOMA-IR, homeostasis model of assessment for insulin resistance; IR, insulin resistance; ISI, insulin sensitivity index; MADRS, Montgomery-Asberg Depression rating scale; MUFA, monounsaturated fatty acid; OGTT, oral glucose tolerance test; PAL, physical activity level; PA, physical activity; SVR, sustained virological response; WC, waist circumference; WHR, waist-to-hip ratio.

Correspondence

Dr Jenny Heathcote, Toronto Western Hospital, 399 Bathurst St. 6B Fell Rm 154, Toronto, M5T 2S8 ON, Canada
Tel: +1 416 603 5800 x 2350
Fax: +1 416 603 6281
e-mail: jenny.heathcote@utoronto.ca

Received 17 July 2012

Accepted 28 October 2012

DOI:10.1111/liv.12041

Abstract

Background/Aims: Obesity- and virus-mediated insulin resistance (IR) are associated with adverse hepatic and metabolic outcomes in chronic hepatitis C (CHC). This study evaluates the tolerability and effects of a dietary and physical activity (PA) intervention in obese patients with insulin-resistant CHC. **Methods:** Obese patients (body mass index, BMI ≥ 30 kg/m²) with CHC were recruited prospectively. Non-diabetic patients with IR (homeostasis model assessment of IR, HOMA-IR >2.0) proceeded to a 24-week lifestyle intervention comprising pedometer monitored increase in PA (≥ 10 000 steps/day) and an individualised dietary plan. **Results:** Ten non-cirrhotic and six cirrhotic patients [age 52 ± 8.5 years, BMI 35.9 (31.46–38.21) kg/m²] were recruited, of whom all 16 (100%) completed the 24-week protocol. Increase in PA from 6853 (2440–9533) to 10 697 (7959–13566) steps/day ($P = 0.001$) and reduction in caloric intake from 2263 (1805.4–2697.0) to 1281 (1099.5–1856.3) kcal/day (equivalent to reduction of median 33% (25.3–49.8%), $P < 0.001$) were achieved. These behaviour changes led to a BMI reduction to 31.21 (28.72–36.10) ($P < 0.001$) and the HOMA-IR fell from 3.62 (2.75–4.87) to 2.08 (1.82–3.59) ($P = 0.002$). The hepatic insulin sensitivity index (ISI) improved significantly, but the skeletal muscle ISI did not. At week 24, 8/16 (50%) patients were no longer insulin-resistant ($P = 0.008$). **Conclusions:** This 24-week intervention reduced BMI and reversed IR in significant proportion of patients. Such adjunctive therapy may improve hepatic and metabolic status in obese insulin-resistant CHC.

The hepatitis C virus (HCV) chronically infects an estimated 170 million worldwide (1). Untreated, chronic hepatitis C (CHC) is associated with significant long-term clinical consequences including cirrhosis, liver failure and hepatocellular cancer. CHC is the

leading indication for liver transplantation in North America (2).

Obesity (body mass index, BMI ≥ 30) is a prevalent health hazard worldwide, and is no less amongst patients with CHC. In a Canadian tertiary referral unit,

28.8% of patients with CHC were obese, over double the national prevalence at the time (3). There is clear epidemiological and molecular evidence linking obesity to insulin resistance (IR); however, CHC itself is also associated with the virus-mediated metabolic manifestations of IR and type 2 diabetes (4–6) occurring independently of BMI (7). High serum HCV RNA levels are associated with IR (8) and HCV core and NS5A proteins have been shown to directly mediate IR in chronically infected individuals (9, 10). Combination therapy with pegylated interferon and ribavirin may reverse glucose abnormalities and IR in CHC if viral clearance is achieved (11, 12). Paradoxically, the greater the degree of IR, the lower the likelihood of treatment-induced viral clearance (11–13).

The influences of obesity and IR on treatment and survival outcomes in CHC are independent of each other. Obesity is a potentially modifiable host factor which, like IR, is independently associated with non-response to antiviral therapy (14). Furthermore, obesity and IR contribute to morbidity and mortality from incident type 2 diabetes, vascular complications, more rapid progression of liver disease and increased risk for the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (7, 15–17). In the liver transplant setting, IR is associated with more rapid fibrosis progression and higher morbidity and mortality have been demonstrated in those who are obese (18, 19).

Improving IR and/or reducing BMI prior to, or as an adjunct to, antiviral therapy has the potential to improve both response to treatment and the hepatic and metabolic outcomes in CHC. Therefore, the present study was designed to determine the tolerability, safety and effect of a dietary and physical activity (PA) lifestyle intervention aimed at reversing IR specifically in a 'high risk' cohort of obese insulin-resistant patients with CHC.

Methods

Patients aged ≤ 65 years with a diagnosis of CHC were recruited prospectively from the liver clinic at Toronto Western Hospital. Obese patients ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) were eligible for inclusion. From November 2009 to June 2010, patients were recruited from liver clinic attendants and the liver clinic database. Non-cirrhotic patients had either a liver biopsy showing a Metavir fibrosis stage 0–2 and/or a current Fibrotest <0.6 (20), without evidence of portal hypertension or hepatic decompensation. Cirrhotic patients had biopsy-proven cirrhosis (Metavir stage 4). Exclusion criteria (Table S1) included concomitant liver diseases, factors affecting glucose/lipid metabolism (e.g. diabetes mellitus, genotype 3 infection), and medical conditions precluding physical training or potentially compromising safety.

Patients without exclusion criteria were eligible to proceed to screening for IR with homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR). After a

12-h overnight fast, an intravenous cannula was inserted to facilitate repeated venous blood sampling. Because of the pulsatile nature of insulin secretion, three fasting blood samples to assay insulin and glucose were collected at 5 min intervals (21). HOMA-IR was calculated by the equation: $\text{HOMA-IR} = (\text{mean fasting insulin (mIU/L)} \times \text{mean fasting glucose (mmol/L)})/22.5$.

Patients with IR (defined as $\text{HOMA-IR} >2.0$) were eligible for inclusion. This cut-off value was selected as it represents the 75th percentile of HOMA-IR in the general population of Ontario, Canada, above which individuals may be defined as insulin-resistant (22). Furthermore, HOMA-IR of 2.0 has also been demonstrated in clinical studies to be a cut-off, below which genotype 1 patients with CHC treated with pegylated interferon and ribavirin have the highest rate of sustained virological response (11).

A 3-pronged lifestyle intervention was delivered over a period of 12 weeks (face-to-face visits at baseline week 0, 2, 4, 8 and 12) followed by a maintenance phase from week 12 to 22 (fortnightly telephone contact) with the final evaluation of endpoints at week 24. No antiviral therapy was administered during the lifestyle intervention.

Physical activity

Baseline PA was measured with pedometers (Digiwalker SW-700, Yamax, Tokyo, Japan) for 3 days (2 weekdays and 1 weekend day) while patients undertook their usual daily activities. Baseline daily energy expenditure was estimated with use of the Paffenbarger Physical Activity Questionnaire (23). Each participant was recommended a PA target of an increment in activity of at least 3000 steps per day above the average daily baseline activity, aiming for an absolute level of over 10 000 steps per day through a gradual increase in both incidental and intentional PA. The level of 10 000 steps per day was selected as this has been suggested as a minimum level of 'adequate' PA in healthy adults (24). It was anticipated in planning the study that most patients enrolling would have low levels of PA, potentially in the sedentary range; therefore, an increment of 3000 steps per day was appropriate so as to bring the PA to a level of at least 10 000 steps per day. Participants were provided a diary to record daily step counts. See Data S1.

Nutrition plan

To assess dietary habits and calculate caloric and macronutrient intake, the same dietician instructed all participants on how to record a prospective 3-day food record (2 weekdays and 1 weekend day). Participants used the 2D Food Portion Visual chart (Nutrition Consulting Enterprises, Framingham, MA, USA) to estimate portion sizes when recording their 3-day food records. Food records were analysed with Diet Analysis Plus Ver-

sion 8.0.1 (Thomson Wadsworth, Stamford, CT, USA) supplemented by published nutritional information on common commercial foods' Internet websites. Individualised nutritional plans were designed to both lose weight (0.5–1 kg/week) and improve IR. This comprised a 500 kcal deficit of their baseline basal metabolic rate [calculated with the weight-adjusted Harris Benedict Equation (25, 26)] multiplied by a physical activity level of 1.5 due to the planned increase in PA, with a macronutrient composition of 20–30% fat, 20–30% protein and 50% carbohydrate (see Data S1). Cirrhotic patients' protein intake was recommended at a level of at least 1.2 g/kg adjusted body weight/day (27).

Behaviour therapy

Individually tailored behavioural therapy was administered at each contact to facilitate behaviour change (see Data S1).

Outcome measures

HOMA-IR was the primary outcome and was measured at weeks 0, 12, and 24. Response to the lifestyle intervention was defined as achieving a HOMA-IR ≤ 2.0 at week 24. Secondary outcomes also measured at baseline, week 12 and week 24 included pedometer count (average steps/day) and calculated energy expenditure [Paffenbarger physical activity questionnaire (23)]; daily caloric intake and dietary composition [carbohydrate, protein and fat intake (% dietary intake); monounsaturated, polyunsaturated, saturated and 'other' fat intake (g/day); n-6 and n-3 fatty acids (g/day); cholesterol (mg/day)]; Hepatic insulin sensitivity index (ISI), skeletal muscle ISI and other parameters of glucose homeostasis derived from the 2-h oral glucose tolerance test (2h-OGTT, see Data S1, supplementary methods – *outcome measures*) (28); anthropometry [BMI (kg/m^2) (29), waist circumference (WC, in cm), body fat (%) calculated from skin fold thickness measurements using the methods of Durnin and Wormsley (30); blood pressure; biochemistry (liver enzymes, bilirubin and albumin (performed using automated procedures at the Toronto Medical Laboratories)]; lipids (cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides); adipocytokines (adiponectin, leptin, TNF α , IL-6, resistin and TGF β) (Signosis human cytokine ELISA kits, Signosis, CA, USA); fatigue and mood according to specific questionnaires [Fatigue Impact Scale (FIS) (31), Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D) (32), Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale, (MADRS) (33)].

Insulin was assayed using the automated system AxSym MEIA (Abbott Diagnostics, IL, USA). Glucose was assayed using the Bayer Advia 1650 system (Bayer, Germany). Blood samples were assayed for glucose and insulin on the day of collection without being frozen prior.

This study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in *a priori* approval by the Research Ethics Board of the University Health Network. Written informed consent was obtained from all participants.

Statistical analysis

Continuous variables are summarised as median (interquartile range). Non-parametric comparisons were made with Friedman and Wilcoxon signed-rank tests. McNemar's test was used for categorical data. Analyses were performed using PASW v18.0.0.0 (IBM, Chicago, USA) and figures drawn with Microsoft Excel for Mac 2008 v12.3.3 (Microsoft, WA, USA).

Results

Patient recruitment is illustrated in Figure 1. The prevalence of obesity in patients with CHC who attended clinic or were identified through the liver clinic database was 17.5% (572/3276). The prevalence of IR in obese patients with CHC who proceeded to screening with HOMA-IR was 52% (11/21) amongst non-cirrhotics and 100% (10/10) amongst cirrhotics ($P = 0.01$). Of these, 10 non-cirrhotic and 6 cirrhotic patients who were both obese and insulin-resistant proceeded to the 24-week lifestyle intervention.

The individual characteristics of the 16 participants are presented in Table 1. The mean age of participants was 52 ± 8.5 years and 9/16 (56%) were female. Median BMI was 35.9 (31.46–38.21). Although the baseline HOMA-IR in cirrhotics was numerically higher than that of non-cirrhotics, there was no significant difference [4.7 (2.64–5.55) vs. 3.4 (2.72–3.91), $P = 0.329$]. Ten of the 13 patients who had a liver biopsy demonstrated some degree of hepatic steatosis, but none showed the histological appearances of steatohepatitis. Amongst the six cirrhotic patients, five were Child-Pugh class A, and one was categorised Child-Pugh class B.

Adherence to the study protocol was excellent; all 16 patients completed the 24-week protocol.

Change in HOMA-IR, physical activity and dietary intake

Figure 2A shows the improvement in HOMA-IR during the study. A significant reduction in HOMA-IR was observed from 3.62 (2.75–4.87) at week 0 to 2.08 (1.82–3.59) at week 24 ($P < 0.001$). Eight of 16 participants (50%) lost their IR at week 24 (HOMA-IR ≤ 2.0 , the primary outcome), $P = 0.008$. This represented 7/10 (70%) non-cirrhotic patients ($P = 0.016$), but only 1/6 (17%) cirrhotic patient ($P = 1.0$). Although a trend to higher rate of IR loss in the non-cirrhotic participants was observed, this was not statistically different between the non-cirrhotic and cirrhotic participants ($P = 0.11$).

A significant increase in PA (steps/day) was observed over the 24-week study period, Figure 2B. Energy

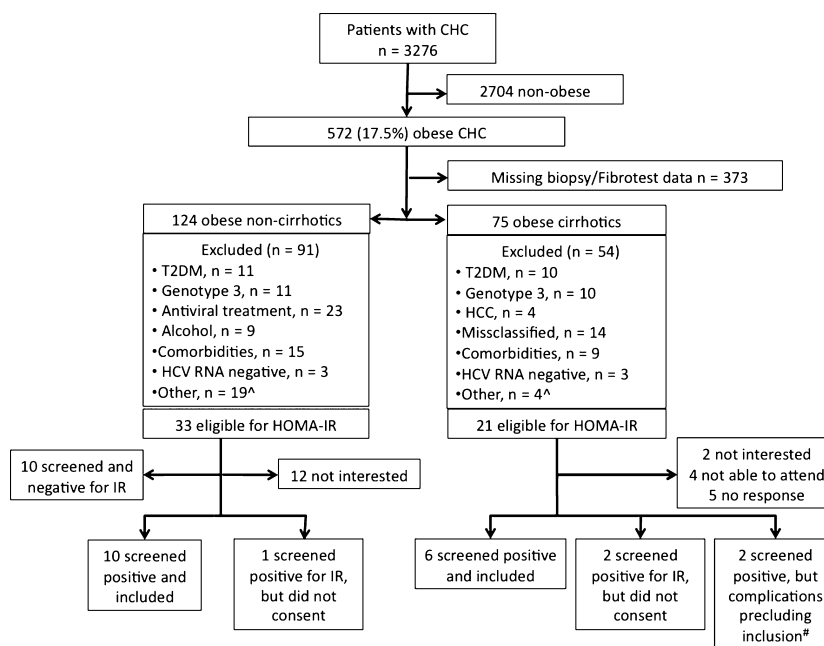


Fig. 1. Recruitment flowchart. ^Other reasons for exclusion: age > 65, disability precluding physical activity, insufficient English language, genotype not available, HCV RNA negative, acute HCV. #Complications precluding inclusion: recurrent hepatic encephalopathy, severe depression.

expenditure, caloric intake and diet composition are presented in Table 2. Significant reduction in caloric intake [median 33% (25.3–49.8%)] was observed after 24 weeks. The reduction in caloric intake was attributed to significant reductions in the absolute caloric intake of all three food groups (carbohydrate, protein and fat), although notably this represented a significant increase in the proportionate intake of protein. Focusing specifically on the six cirrhotic patients (Table 3), protein intake (% daily caloric intake) increased significantly from 15% (14.25–17.25) at baseline to 22.5% (21–23) week 24 ($P = 0.022$) ensuring that protein intake (g/day) remained relatively stable in spite of the overall decrease in caloric intake; 84 g/day (79.75–87.5) at week 0 to 78 g/day (70–92) at week 24, $P = 1.0$. It was noted that self-reported caloric and protein intake (g/kg/day) fell short of the protocol recommendations; the discrepancy between protocol recommendation and self-reported intakes was consistent over the 24-week intervention despite repeated dietary education and counselling at week 12.

The magnitude of change in PA and dietary intake over the 24-week intervention was not significantly different between the cirrhotic and non-cirrhotic patients (data not shown).

Influence of the intervention on secondary outcome measures

Insulin and glucose homeostasis. Significant reductions in both fasting glucose and insulin and improved

responses to oral glucose challenge were observed (Table 4). The area under the curve for insulin and glucose during the 2h-OGTT fell significantly. Moreover, a site-specific improvement in IR was observed; the hepatic ISI index calculated from the 2h-OGTT was improved significantly; however, the skeletal muscle ISI remained unchanged across the group.

The fasting c-peptide:insulin ratios were not significantly changed over the course of the intervention (nor in the cirrhotics when analysed separately, data not shown), highlighting that the reductions in insulin levels over the course of the intervention resulted from reduced insulin secretion rather than increased clearance/degradation of insulin.

Anthropometry and features of the metabolic syndrome

The median weight loss achieved at 24 weeks was 6.5 kg (2.25–9.8 kg), equivalent to 6.4% (2.62–9.98%) of body weight and corresponding with significant reductions in median BMI and in body fat (%) (Table 4). Although cirrhotic patients had significantly lower body fat (%) at baseline [40.9% (37.7–44.7) vs. 51.5% (50.0–53.7) for non-cirrhotics, $P = 0.017$], there was no difference between the groups in the magnitude of reduction in BMI or body fat (%) observed at week 24 ($P = 1.0$). Two cirrhotic patients gained weight over the 24-weeks, but achieved overall falls in percentage body fat; neither patient had ascites.

Waist circumference was reduced significantly by 8.5 cm (4.85–15.50). Other features of the metabolic

Table 1. Individual patient characteristics at baseline for patients initiating the HCV lifestyle intervention

Patient	Age	Gender	Antiviral treatment history	Genotype	BMI (kg/m ²)	Obesity class*	Waist circumference (cm)	Metabolic syndrome	ALT (IU/ml)	Liver biopsy				
										Fibrosis stage (Metavir)	Hepatic steatosis (%)	Child-Pugh score	MELD score	HOMA-IR
1	57	F	Naïve	1	37.7	II	114	Yes	41	1	20	—	—	2.99
2	28	M	Relapser	1	30.2	I	111	No	63	—	—	—	—	3.54
3	49	F	Naïve	4	30.3	I	96	No	109	2	0	—	—	4.44
4	57	F	Naïve	1	31.4	I	102	No	107	1	1	—	—	3.23
5	61	M	NR	1	36.7	II	129	No	24	2	0	—	—	2.83
6	59	M	Naïve	1	39.1	II	123	Yes	124	1	10	—	—	7.27
7	50	F	NR	1	32.0	I	92	Yes	67	—	—	—	—	3.73
8	56	F	Naïve	1	38.4	II	124	Yes	91	—	—	—	—	3.70
9	44	F	Naïve	1	39.5	II	119	No	34	1	1	—	—	2.29
10	50	F	NR	1	32.2	I	91	No	39	2	0	—	—	2.39
11	57	F	NR	1	35.9	II	112	No	64	4	5	—	—	2.72
12	49	M	Naïve	1	31.5	I	97	No	62	4	<5	B8	A5	2.41
13	48	M	NR	1	40.1	III	129	No	224	4	10	A6	A6	5.01
14	53	F	NR	1	36.7	II	123	No	145	4	20	A5	A5	5.83
15	54	M	NR	1	31	I	113	No	228	4	<5	A5	A5	5.46
16	65	M	Naïve	1	36	II	129	Yes	22	4	30	A5	A5	4.35

*Obesity class as defined by the World Health Organisation: Class I, BMI 30–34.9 kg/m²; Class II, BMI 35–39.9 kg/m²; Class III, BMI ≥ 40 kg/m². NR, non-responder; SVR, sustained virological response. Three patients without liver biopsy were classified as non-cirrhotic for the absence of clinical features of cirrhosis or portal hypertension and Fibrotest <0.6.

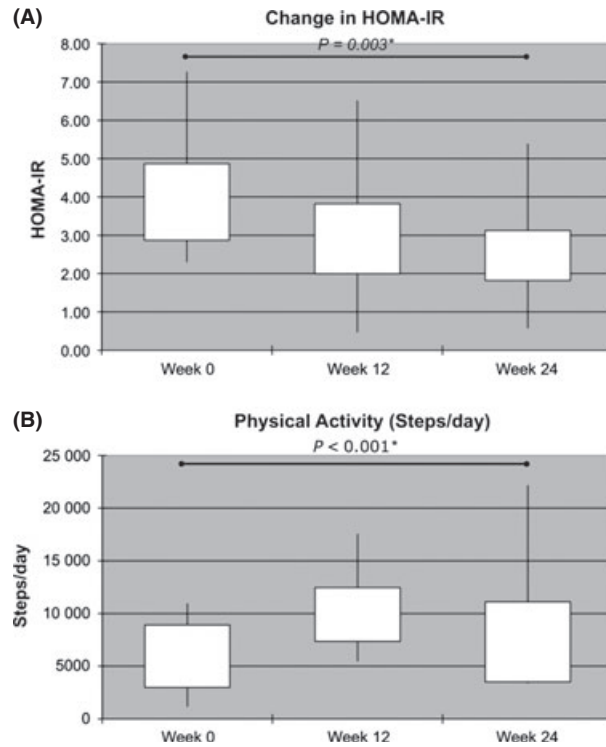


Fig. 2. (A) HOMA-IR over 24 weeks. *P*-value is for the difference across the 3 time points (Friedman test). *Pairwise comparison week 0–24, *P* < 0.05. (B) Physical activity (steps/day) over 24-weeks. *P*-value is for the difference across the 3 time points (Friedman test). *Pairwise comparison week 0–24, *P* < 0.05.

syndrome (blood pressure, serum lipids) were not significantly reduced in this cohort.

Biochemistry. ALT, AST, and γ GT levels all fell significantly with the intervention.

Adipocytokines. In keeping with the expected change associated with weight loss, a significant reduction in serum leptin was observed between week 0 and week 24, with a corresponding significant increase in adiponectin level. Levels of TNF α , resistin, TGF β and IL6 were relatively stable during over the 24-week intervention.

Fatigue, mood and quality of life. The 24-week lifestyle intervention led to overall improvement in median fatigue score as measured by the FIS (Table 5). The median clinician-rated mood score measured by the MADRS improved across the entire group. Notably, the median values of FIS in the cirrhotic cohort were higher than in the non-cirrhotic group (*P* < 0.05 at all time points, data not shown) and cirrhotic patients also demonstrated poorer mood than non-cirrhotics (*P* < 0.05 at each time point, data not shown).

Safety

During the study, no complications occurred in the non-cirrhotic group. One patient with cirrhosis (baseline Child-Pugh B, MELD 13) developed clinical ascites

Table 2. Physical activity, caloric intake and diet composition during the lifestyle intervention

Intervention	Week 0	Week 12	Week 24	P-value
Physical activity				
Energy expenditure (kcal/day, calculated from Paffenbarger Physical Activity Questionnaire)	127 (78.5–254.5)	189 (147–639.2)	446 (262.3–567.7)	<0.001*†
Caloric intake and dietary composition				
Energy intake (kcal/day)	2263 (1805.4–2697.0)	1580 (1334.9–1765.5)	1281 (1099.5–1856.3)	<0.001†
Carbohydrate (%)	50.5 (45–56)	49 (44–53.5)	47.5 (42–54.25)	0.961
Protein (%)	15 (14–18)	19 (17–21)	20.5 (17–23)	<0.001†
Fat (%)	34 (27.25–42.5)	33 (26.5–37.75)	34 (24–36)	0.551
MUFA (%)	11.5 (8.25–13.75)	11.5 (8.5–15.25)	10 (8.5–14)	0.127
PUFA (%)	7.5 (4.25–9.00)	6.5 (5–8.75)	7 (4–9.5)	0.663
Saturated fat (%)	11 (7–13.5)	9.5 (8.25–11)	9 (5.5–10)	0.779
n-3 FA (g/day)	1.08 (0.498–1.625)	0.86 (0.392–1.589)	0.54 (0.393–2.030)	0.526
n-6 FA (g/day)	11.94 (5.670–18.568)	8.38 (4.813–12.523)	8.50 (3.063–12.100)	0.223
Other fats (%)	5 (4–7)	4 (3–7.75)	4 (3–6)	0.083
Cholesterol (mg)/day	284 (174.7–435.4)	177 (129.3–271.7)	178 (87.4–230.5)	0.071

*Comparison between weeks 0 and 12 significant at a $P < 0.05$ level.

†Comparison between weeks 0 and 24 significant at a $P < 0.05$ level.

P-values listed for Friedman test. Pairwise comparisons performed with Wilcoxon rank signed test.

Table 3. Protocol recommended and self-reported dietary intake for cirrhotic patients

Dietary intakes	Protocol recommendations	Self-reported dietary intake			P*
		Baseline	Week 12	Week 24	
Energy intake (kcal/day)	1946 (1815–2094)	2302 (1910–2426)	1607 (1344–1768)	1348 (1286–1602)	0.074
Energy intake (kcal/kg AW/day)	24.3 (22.11–25.3)	27.5 (23.1–30.5)	20.7 (17.0–22.2)	17.1 (16.4–19.8)	0.050
Protein (%)	20–30%	15 (14.25–17.25)	18 (17–19)	22.5 (21–23)	0.022
Protein (g/kg AW/day)	1.2	1.03 (0.95–1.09)	0.98 (0.85–1.07)	0.93 (0.87–1.09)	1.000
Protein (g/day)	99 (95.2–99.5)	84 (80–88)	79.5 (64–87)	78 (70–92)	1.000

*P-value for change in measured value across three timepoints by Friedman's test.

AW, adjusted body weight.

by week 4 associated with infectious diarrhoea. This responded to diuretics, and the patient continued the study.

Discussion

In this population of obese and insulin-resistant patients with CHC, a 24-week lifestyle intervention led to increased PA and reduced caloric intake resulting in significant weight loss and improved indices of IR. Both the administration and acceptability of this programme were feasible with adherence of 100%. As both IR and obesity independently contribute to adverse hepatic and metabolic outcomes in CHC, such an intervention should be considered as part of the management of obese patients with CHC. In addition to the improvement in metabolic and anthropometric endpoints, improvements in fatigue levels and mood were also observed, highlighting the non-metabolic/non-hepatic benefits of the lifestyle intervention.

Loss of IR (the primary outcome, HOMA-IR ≤ 2.0 at week 24) was achieved by 50% of participants. However, the lifestyle intervention had variable effects on insulin and glucose homeostasis at the target sites of insulin activity; the liver and skeletal muscle. The effects of a dietary and PA intervention on these specific insulin target sites have not been previously reported. In distinction to previous studies of diet and exercise in CHC (34–36), we have observed improvement of the *hepatic* ISI but not the *skeletal muscle* ISI as measured by the dynamic responses to oral glucose challenge. Although we did not employ the gold standard euglycaemic insulin clamp technique to measure hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity, these were derived from the 2h-OGTT. It has been reported that these techniques have moderate correlation with the euglycaemic insulin clamp technique ($R = 0.64$ and 0.78 respectively, $P < 0.0001$ for both correlations) (28). Hepatic ISI calculated from the 2h-OGTT correlated more strongly with the clamp technique than other indirect measures of insulin sensitivity (28).

Table 4. Secondary outcomes during the lifestyle intervention

Outcome measure	Week 0	Week 12	Week 24	P-value
Measures of insulin and glucose homeostasis				
Fasting glucose (mmol/L)	5.3 (4.80–5.74)	5.1 (4.80–5.28)	4.9 (4.38–5.35)	0.007‡
Fasting insulin (mIU/L)	15.3 (11.59–19.89)	12.70 (9.17–16.53)	10.17 (8.15–15.53)	0.01‡
OGTT-AUC Insulin (h mIU/L)	172.7 (138.25–224.50)	171.1 (128.04–213.75)	115.9 (91.74–156.57)	0.003†‡
OGTT-AUC Glucose (h mmol/L)	16.1 (14.16–19.50)	15.4 (13.40–16.17)	14.5 (13.00–15.75)	0.011‡
Hepatic ISI¶ (mmol mIU h ² /L ²)	76.3 (51.768–102.37)	78.7 (59.25–104.96)	53.5 (35.32–72.92)	0.009†‡
Skeletal muscle ISI	0.42 (0.21–0.645)	0.73 (0.348–0.968)	0.75 (0.49–1.28)	0.607
C-Pep (pmol/L)	1127 (902–1456)	1033 (943–1268)	966 (749–1075)	0.003‡
C-Pep:insulin ratio	9.6 (8.17–14.44)	11.2 (8.7–16.8)	12.6 (9.45–16.7)	0.208
HbA1C (%)	5.5 (5.13–5.98)	–	5.5 (5.05–5.95)	1.00
Anthropometry and features of the metabolic syndrome				
Weight (kg)	98.3 (88.65–108.45)	91.6 (80.3–105.05)	90.1 (77.45–105.33)	<0.001*‡
BMI (kg/m ²)	35.9 (31.46–38.21)	31.9 (30.16–35.75)	31.21 (28.72–36.10)	<0.001*‡
Body fat (%)	50 (40.9–52.3)	49 (39.0–51.4)	48 (39.3–49.9)	0.007‡
Waist circumference (cm)	113.5 (98.25–123.75)	104.3 (99.13–116.75)	102.5 (95.88–111.5)	<0.001*‡
Systolic BP (mmHg)	120 (115.3–129.2)	119 (110–124.3)	120 (115.8–124.4)	0.211
Diastolic BP (mmHg)	80 (70–80)	72 (70–75)	70 (70–79)	0.084
Serum lipids				
Cholesterol (mmol/L)	4.1 (3.48–4.6)	3.8 (3.51–4.46)	3.5 (3.34–4.47)	0.269
HDL-C (mmol/L)	1.15 (1.000–1.358)	1.20 (0.923–1.335)	1.16 (0.993–1.305)	0.56
LDL-C (mmol/L)	2.24 (1.865–2.823)	2.33 (1.988–2.598)	2.12 (1.728–2.828)	0.779
Triglycerides (mmol/L)	1.13 (0.918–1.322)	0.98 (0.765–1.188)	0.98 (0.823–1.06)	0.087
Serum FFA (μmol/L)	589 (463.5–725.75)	584 (484–772.25)	655 (452.25–940.25)	0.444
Serum biochemistry				
ALT (U/L)	65.5 (39.5–120.25)	62.5 (39.25–123)	55 (38.75–96)	0.021
AST (U/L)	56 (35–100.5)	51 (41.75–109)	47 (35.25–81)	0.008†
GGT (U/L)	64.5 (45.25–85.75)	50 (33.5–73)	42 (28–65.5)	0.003‡
ALP (U/L)	84.5 (66.25–97)	80.5 (58–86)	77 (59.25–91.75)	0.18
Bilirubin (μmol/L)	10.5 (7.5–14.75)	14 (9.25–15)	12 (9.25–15)	0.112
Albumin (g/L)	40.5 (38.25–42.75)	40 (38.25–42.00)	39.5 (37.25–41.75)	0.061
Adipocytokines				
Adiponectin (μg/ml)	0.88 (0.559–20.700)	0.76 (0.639–14.806)	3.69 (0.738–14.719)	0.047‡
Leptin (ng/ml)	12.03 (8.060–30.341)	12.42 (5.560–25.982)	10.70 (5.145–22.354)	0.028‡
TNFα (pg/ml)	86.5 (14.52–166.47)	79.0 (13.31–107.68)	84.9 (11.63–225.42)	0.461
IL6 (pg/ml)	0.619 (0.617–2.474)	0.619 (0.617–1.306)	0.620 (0.618–2.315)	0.083
Resistin (pg/ml)	1.81 × 10 ⁴ (1.10 × 10 ⁴ –2.94 × 10 ⁴)	1.21 × 10 ⁴ (7.28 × 10 ⁴ –1.75 × 10 ⁴)	1.21 × 10 ⁴ (9.99 × 10 ³ –2.73 × 10 ⁴)	0.009*†
TGFβ (pg/ml)	2.17 (2.17–14.90)	2.17 (2.17–15.05)	2.17 (2.17–20.58)	0.646

*Comparison between weeks 0 and 12 significant at a $P < 0.05$ level.

†Comparison between weeks 12 and 24 significant at a $P < 0.05$ level.

‡Comparison between weeks 0 and 24 significant at a $P < 0.05$ level.

¶Hepatic ISI derived from the 2h-OGTT correlates with hepatic IR index calculated from the euglycemic insulin clamp ($R = 0.64$, $P < 0.0001$) *ref.* Abdul-Ghani MA *et al.* Diabetes Care 2007;30:89–94.

P-values listed for Friedmans test. Pairwise comparisons performed with Wilcoxon rank signed test.

Table 5. Fatigue and mood scores during the lifestyle intervention

Outcome measure	Week 0	Week 12	Week 24	P-value
FIS (score/160)	49 (9.25–85.75)	23.5 (3–63.75)	22.5 (8.75–60.75)	0.006†
CES-D (score/60)	10.5 (7.25–19.5)	6 (1.26–16.00)	8.5 (2.25–23.5)	0.199
MADRS (score/10)	6 (2.5–10)	2 (0–8.5)	2 (0–4)	<0.001*†

*Comparison between weeks 0 and 12 significant at a $P < 0.05$ level.

†Comparison between weeks 0 and 24 significant at a $P < 0.05$ level.

CES-D, Center for Epidemiologic Studies Depression Scale; FIS, Fatigue Impact Scale; MADRS, Montgomery-Asberg Depression Rating Scale. A higher score indicates a higher level of fatigue (for FIS) or poorer mood (for CES-D and MADRS).

Insulin resistance in CHC may be virus-mediated, and in obese individuals, likely to have a substantial host-mediated component. The IR in CHC was initially

presumed to be all hepatic until Milner *et al.* reported that the IR in non-obese normoglycemic males with CHC is predominantly skeletal muscle (peripheral) in

origin (37). The same authors interpreted the report of Vanni *et al.* to indicate that approximately 80% of the IR in their patients with CHC was peripheral in origin (37, 38). The virus' persistent influence on skeletal muscle IR in this cohort of viremic patients would explain the lack of improvement in skeletal muscle ISI despite dietary and exercise measures.

The improvements in hepatic ISI in the presence of persistent viremia is consistent with an improvement in the host-mediated component of hepatic IR. Proposed mechanisms for this improvement in host-mediated hepatic IR include the participants' absolute reductions in carbohydrate and fat intake (potentially reducing both fatty acid influx to the liver and de novo lipogenesis) and exercise-induced increase in intrahepatic β -oxidation of fatty acids. The corresponding reduction in serum γ GT observed at week 24 may reflect improved intrahepatic lipid homeostasis.

The superior metabolic (rate of loss of IR) and non-metabolic (fatigue and mood) outcomes in the non-cirrhotic patients suggest that lifestyle intervention should be considered in early stage disease. Cirrhosis (independent of viral or host metabolic factors) may contribute to IR and T2DM in part due to hyperinsulinaemia and reduced hepatic uptake of glucose. Cirrhotic patients in the present study had a higher baseline HOMA-IR, but lesser degree of body fat than non-cirrhotics, suggesting that there was a greater contribution of underlying cirrhosis to the IR more so than host body fat. This may explain why the cirrhotic cohort had a lesser response to the lifestyle intervention. Cirrhosis may also lead to impaired insulin degradation, thereby being associated with increased serum insulin levels (and therefore higher HOMA-IR); as c-peptide:insulin ratios did not change with the intervention, there is no suggestion that impaired insulin degradation in the cirrhotics was a contributing factor.

The non-metabolic benefits to the intervention are also apparent. Although the present study was unblinded, the discordance between the change in MADRS and CES-D score over time probably reflects the superior sensitivity of the MADRS to detect clinically significant changes in mood as compared with the CES-D, which serves a screening tool for mood disturbance (32, 33). By introducing such a lifestyle intervention in obese insulin-resistant patients with CHC with early stage disease, perhaps greater benefits may be obtained, and morbidities associated with cirrhosis potentially minimised or prevented. The metabolic and anthropometric benefits achieved in cirrhotic patients still justify lifestyle intervention in those with later stage disease, the benefit being to potentially reduce the risk of HCC and liver transplant-related morbidity (16–19).

Our study, in spite of the relatively small sample size, demonstrates the significant effects of a lifestyle intervention in a 'high-risk' group of obese *and* insulin-resistant subjects with CHC. The effects of a PA intervention in a 'low-risk' group of patients with CHC (non-obese

patients who were not all insulin-resistant) have recently been reported (36). However, the *absolute* benefits of the metabolic and anthropometric improvements observed in the latter 'low-risk' cohort are questionable. The overall weight loss achieved in the present study was less than 10%; as little as 7% weight loss over 12 weeks has been shown to improve liver histology in patients with CHC (34, 35). We did not correlate our findings with histology, but as IR and obesity are associated with fibrosis progression (7, 15), the metabolic and anthropometric improvements achieved by the present study are likely to improve liver histology if maintained (35).

The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) guidelines on enteral nutrition for patients with cirrhosis recommended a daily caloric intake of 35–40 kcal/kg body weight per day (27), but this does not address *obese* cirrhotic patients and their need for weight loss. As the cirrhotic participants recruited to the study were all obese, adhering to the ESPEN guidelines regarding caloric intake based on the baseline measured weight would have led to weight maintenance. This was not the aim of the study, as maintenance of an obese body weight places the cirrhotic patient at risk of hepatic and metabolic morbidity and mortality.

The present intervention is short-term (24-weeks) as we recognise that prolonged caloric deficits may be detrimental to cirrhotic patients. The median reported caloric intake at the end of the intervention was approximately 1300 kcal/day, lower than the study protocol recommendations (Table 3). One explanation is that the participants exceeded the protocol recommendations; counselling at the week 12 visit included encouraging patients to *increase* their caloric intakes towards the protocol recommendations so as to have enough energy to carry out their exercise and usual activities. Underreporting of dietary intake may have also contributed to the low median caloric intake observed. It has been shown previously that underestimation of energy intake of approximately 20% is common and can reach up to 50% in obese subjects (39, 40).

While uptake (enrolment) amongst those eligible for the present study was around 50%, the completion rate amongst participants was 100%. Adherence to lifestyle intervention and the maintenance of behaviour changes in this cohort of patients with CHC were important considerations in the design of this present lifestyle intervention. A Cochrane systematic review confirmed that greater weight reduction is achieved when behaviour therapy is combined with a diet/exercise approach compared with diet/exercise alone (41). The highest efficacy is attained when there is frequent clinical contact, but the benefits of lifestyle interventions appear to plateau at 1 year (41). The incorporation of such behaviour techniques in the present study probably maximised the completion rate of the intervention and therefore its effects.

An alternative to a lifestyle intervention to manage insulin and glucose homeostasis is pharmacotherapy with primary hepatic insulin sensitizers (metformin), and peripheral sensitizers (e.g. pioglitazone). One advantage of the lifestyle intervention over pharmacotherapy is the lack of side effects (e.g. weight gain with pioglitazone). No safety concerns have been uncovered by our study; all patients were able to tolerate both the diet and the increase in PA, which led to an increase in well-being. The only observed complication (ascites in one cirrhotic patient) could not be ascribed to the intervention.

The exclusion of genotype 3 patients from the present study was made in view of the potential confounding effects of genotype 3 HCV infection on the metabolic outcomes being observed in our study. Genotype 3 HCV is recognised to induce hepatic steatosis independent of BMI (42). This is in contrast to non-genotype 3 HCV-infected patients in whom the steatosis grade was strongly influenced by BMI and associated with IR (42). Any recommendations arising from our study are therefore only applicable to genotype 1 (the majority of participants in the present study).

Treatment response to protease-inhibitor-based triple antiviral therapy for genotype 1 CHC, which has become the new therapeutic standard of care, does not appear to be influenced by IR or BMI (43). However, IR and obesity remain important management considerations for patients with CHC who have contraindications to therapy, those who fail to respond and non-genotype 1 patients who receive pegylated interferon and ribavirin. Lifestyle interventions remain relevant in these latter cases because of the potential to reduce both morbidity and mortality related to fibrosis progression, HCC and possibly even liver transplant outcomes.

In summary, this 24-week lifestyle intervention was both feasible and effective in improving IR and BMI in obese patients with insulin-resistant CHC. Future research should focus on whether the implementation of this intervention prior to antiviral therapy enhances the virological response. It will be important to determine the degree to which body weight influences the incidence of type 2 diabetes in CHC, vascular complications and hepatic outcomes such as cirrhosis and HCC in CHC.

Acknowledgements

The authors acknowledge the contributions of Ms Gail Fernandes (dietary instruction and diet analysis) and Dr Badr Aljarallah (assistance in data collection).

Financial support: Study funded by the Canadian Institute for Health Research and The Krembil Foundation. Venessa Pattullo received scholarship funding from the National Health and Medical Research Council of Australia and the University Health Network, Toronto, Canada. Andres Duarte-Rojo received scholarship funding from the American College of

Gastroenterology International Training Grant, USA; and Instituto de Ciencia y Tecnologia del Distrito Federal, Mexico.

No conflicts of interest exist in relation to this study.

References

1. Hepatitis C—global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 1999; **74**: 425–7.
2. Charlton M. Hepatitis C infection in liver transplantation. *Am J Transplant* 2001; **1**: 197–203.
3. Chen W, Wong T, Tomlinson G, Krahn M, Heathcote EJ. Prevalence and predictors of obesity among individuals with positive hepatitis C antibody in a tertiary referral clinic. *J Hepatol* 2008; **49**: 711–7.
4. Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 1994; **21**: 1135–9.
5. Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, *et al.* Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 2000; **32**: 87–90.
6. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, *et al.* Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; **38**: 50–6.
7. Hui JM, Sud A, Farrell GC, *et al.* Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1695–704.
8. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, *et al.* Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008; **134**: 416–23.
9. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; **38**: 1384–92.
10. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, *et al.* Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; **126**: 840–8.
11. Romero-Gomez M, Del Mar Vioria M, Andrade RJ, *et al.* Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; **128**: 636–41.
12. Romero-Gomez M, Fernandez-Rodriguez CM, Andrade RJ, *et al.* Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; **48**: 721–7.
13. Poustchi H, Negro F, Hui J, *et al.* Insulin resistance and response to therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotypes 2 and 3. *J Hepatol* 2008; **48**: 28–34.
14. Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; **38**: 639–44.
15. Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 2408–14.
16. Ohki T, Tateishi R, Sato T, *et al.* Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 459–64.

17. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2008; **47**: 1856–62.
18. Veldt BJ, Poterucha JJ, Watt KD, et al. Insulin resistance, serum adipokines and risk of fibrosis progression in patients transplanted for hepatitis C. *Am J Transplant* 2009; **9**: 1406–13.
19. Dick AAS, Spitzer AL, Seifert CF, et al. Liver transplantation at the extremes of the body mass index. *Liver Transpl* 2009; **15**: 968–77.
20. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; **128**: 343–50.
21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–9.
22. Alberti KG, Zimmet PZ. 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**: 539–53.
23. Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med* 1986; **314**: 605–13.
24. Tudor-Locke C, Bassett DR Jr. How many steps/day are enough? Preliminary pedometer indices for public health. *Sports Med* 2004; **34**: 1–8.
25. Harris JA, Benedict FG. *A Biometric Study of Basal Metabolism in Man*. Washington, DC: Carnegie Institute of Washington, 1919.
26. Frankenfield DC, Rowe WA, Smith JS, Cooney RN. Validation of several established equations for resting metabolic rate in obese and nonobese people. *J Am Diet Assoc* 2003; **103**: 1152–9.
27. Plauth M, Cabre E, Riggio O, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: liver disease. *Clin Nutr* 2006; **25**: 285–94.
28. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2007; **30**: 89–94.
29. WHO. Obesity: preventing and managing a global epidemic. Geneva: World Health Organization, 2000 Report on a WHO Consultation in Obesity, Geneva 3–5 June, 1997. WHO/NUT/NCD/98.1. Technical Report Series Number 894.
30. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; **32**: 77–97.
31. Hassoun Z, Willems B, Deslauriers J, Nguyen BN, Huet PM. Assessment of fatigue in patients with chronic hepatitis C using the Fatigue Impact Scale. *Dig Dis Sci* 2002; **47**: 2674–81.
32. Clark CH, Mahoney JS, Clark DJ, Eriksen LR. Screening for depression in a hepatitis C population: the reliability and validity of the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D). *J Adv Nurs* 2002; **40**: 361–9.
33. Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 1979; **134**: 382–9.
34. Hickman IJ, Clouston AD, Macdonald GA, et al. Effect of weight reduction on liver histology and biochemistry in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2002; **51**: 89–94.
35. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; **53**: 413–9.
36. Konishi I, Hiasa Y, Tokumoto Y, et al. Aerobic exercise improves insulin resistance and decreases body fat and serum levels of leptin in patients with hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2011; **41**: 928–35.
37. Milner KL, van der Poorten D, Trenell M, et al. Chronic hepatitis C is associated with peripheral rather than hepatic insulin resistance. *Gastroenterology* 2010; **138**: 932–41 e931–933.
38. Vanni E, Abate ML, Gentilcore E, et al. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; **50**: 697–706.
39. Black AE, Prentice AM, Goldberg GR, et al. Measurements of total energy expenditure provide insights into the validity of dietary measurements of energy intake. *J Am Diet Assoc* 1993; **93**: 572–9.
40. Hill RJ, Davies PS. The validity of self-reported energy intake as determined using the doubly labelled water technique. *Br J Nutr* 2001; **85**: 415–30.
41. Shaw K, O'Rourke P, Del Mar C, Kenardy J. Psychological interventions for overweight or obesity. Cochrane Database of Systematic Reviews 2005; Art. No.: CD003818.
42. Hui JM, Kench J, Farrell GC, et al. Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; **17**: 873–81.
43. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; **54**: 1433–44.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Exclusion criteria.

Data S1. Lifestyle intervention.

The Course of Posttransplant Hepatitis C Infection: Comparative Impact of Donor and Recipient Source of the Favorable *IL28B* Genotype and Other Variables

Andres Duarte-Rojo,¹ Bart J. Veldt,² David D. Goldstein,³ Hans L. Tillman,³ Kymberly D. Watt,¹ Julie K. Heimbach,⁴ John G. McHutchison,³ John J. Poterucha,¹ Florencia Vargas-Vorackova,⁵ and Michael R. Charlton^{1,6}

Background and Aims. The *IL28B* genotype has been linked to sustained virological response (SVR) in hepatitis C virus (HCV). Its role on disease biology and progression is less clear. We characterized the effects of *IL28B* genotype on HCV recurrence, allograft histology, rate of SVR, and survival after liver transplantation (LT) in HCV.

Methods. Consecutive patients who underwent LT with HCV were studied. The rs12979860 genotype from both the donor and recipient was determined. Measured endpoints included histologic HCV recurrence (inflammatory grade and fibrosis stage), acute cellular rejection, SVR, retransplantation, and death.

Results. The study cohort comprised 272 consecutive LT in 255 patients. C-allele frequency was 56% in recipients and 70% in donors ($P < 0.001$). Recipient *IL28B* CC genotype was associated with lower alanine aminotransferase levels and viral load at recurrence and a lower frequency of F of 2 or higher on liver biopsy at 1 year after LT, when compared with the non-CC genotype ($P = 0.012$). The opposite was observed in LT with donor CC genotype ($P = 0.003$). Both recipient and donor CC genotype favored SVR, and when the two of them occurred together, the SVR rate reached 90%. Survival analysis after 5.5 years of follow-up showed a higher rate of progression to cirrhosis (hazard ratio, 5.96; 95% confidence interval, 1.29–27.6), liver-related death, or retransplantation among liver transplant recipients with a CC genotype donor.

Conclusions. The *IL28B* genotype is predictive not only of SVR but also of the histologic diagnosis of posttransplant hepatitis C, with donor CC genotype favoring inflammation and fibrosis, and adverse outcomes during long-term follow-up. A favorable effect of donor CC genotype is manifest only after antiviral therapy.

Keywords: Acute cellular rejection, Fibrosis, Histologic grade, Interferon λ , Survival, Sustained virological response. (*Transplantation* 2012;94: 197–203)

Hepatitis C virus (HCV) is the most common chronic blood-borne infection in the United States and affects 130 to 170 million people worldwide (1). Decompensated cirrhosis due to chronic hepatitis C (CHC) continues to be the leading indication for liver transplantation (LT). Viral eradication by means of sustained virological response (SVR)

with pegylated interferon and ribavirin is known to improve clinical outcomes in the long term (2, 3).

Genome-wide studies have demonstrated a strong association between allelic variations in the *IL28B* gene and viral eradication. Patients who are homozygous for the favorable allele are more likely to spontaneously eradicate the

This work has been supported by Public Health Service Grant RO1 DK069757-01 from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases and Grant RR00585 from the General Clinical Research Center.

D.B.G. is a consultant for Schering Plough and GlaxoSmithKline and has patent *IL28B* findings and patent ITPA findings filed. J.G.M. is an employee and stock shareholder of Gilead Sciences. H.L.T. is a consultant for Novartis; is an employee of Abbott; has received grant and research support from Vertex, Novartis, Merck, Synexis, Anadys, Abbott, Idera, and Medtronic; has received speaking and teaching fees from Roche and Salix; and is a stock shareholder of Abbott. All other authors declare no funding or conflicts of interest.

¹ Division of Gastroenterology and Hepatology, Mayo Clinic, Rochester, MN.

² Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

³ Duke Clinical Research Institute, Duke University Medical Center, Durham, NC.

⁴ Division of Transplantation Surgery, Mayo Clinic, Rochester, MN.

⁵ Epidemiology Unit, Division of Gastroenterology, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico.

⁶ Address correspondence to: Michael R. Charlton, M.D., Division of Gastroenterology and Hepatology, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN. E-mail: charlton.michael@mayo.edu

A.D.-R. participated in data collection, assembly, and analysis and writing of the article. B.J.V. participated in data collection and analysis and correction of the article. D.D.G., H.L.T., and J.G.M. participated in genetic analysis and correction of the article. K.D.W. and J.K.H. assisted in the study design and in the preparation of the article. J.J.P. assisted in the study design, the data analysis, and correction of the article. F.V.-V. supervised the statistical analysis and participated in correcting the article. M.R.C. planned the study and participated in data collection and analysis and in preparation of the final article.

Received 23 December 2011. Revision requested 20 January 2012.

Accepted 6 March 2012.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/12/9402-0197

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182547551

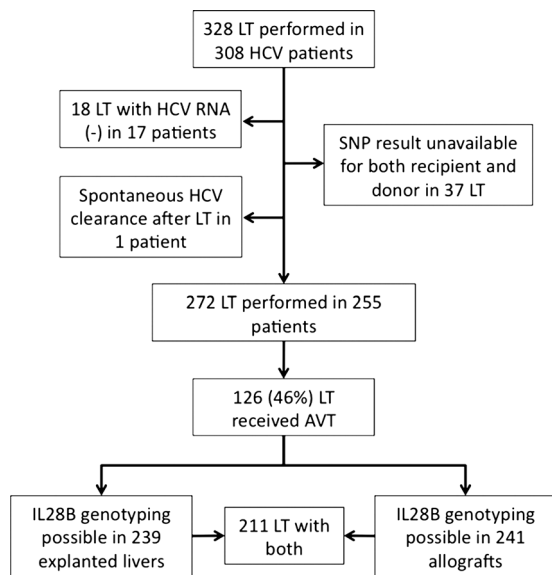


FIGURE 1. Variation in inflammatory grade in fibrosis stage recipient or donor *IL28B* genotype.

virus after acute infection and to achieve of SVR after treatment with peginterferon and ribavirin (4–8). Although the mechanism of action is unknown, the described single-nucleotide polymorphisms (SNPs) involve the lambda interferons (IFN- λ)—a family of type III IFN with antiviral activity (4). The study of CHC disease biology and factors that affect progression after LT is important because one third of patients develop cirrhosis, die, or require retransplantation owing to the recurrence of HCV by the fifth postoperative year (9, 10–13).

Understanding the relative impact of donor and recipient *IL28B* genotype on post-LT outcomes may yield insights into virus-host interactions and mechanisms applicable to both the transplant and nontransplant setting. Reports of the association between *IL28B* genotype and posttransplant CHC (14–18) have largely confirmed what has been observed in the nontransplant setting with regard to the effect of *IL28B* on SVR after antiviral treatment (AVT). Data regarding the effect of *IL28B* genotype on the clinical progression of specific facets of recurrence of HCV and the overall impact on survival are scarce. In the present study, we characterized the effect of *IL28B* genotypes on HCV recurrence, as measured by allograft histology, the rate of SVR, and patient and graft survival.

RESULTS

A total of 328 LT were performed in 308 patients with CHC. *IL28B* genotype could not be determined in 37 LT (mostly because of DNA unavailability), 17 patients demonstrated negative HCV RNA at the time of LT. One patient experienced spontaneous clearance of HCV RNA after LT—this patient demonstrated a CT genotype and received a CC allograft. The final cohort thus consisted of 272 LT performed in 255 patients with CHC (Fig. 1). *IL28B* genotyping was successful in 239 explanted livers (recipients, R-*IL28B*) and 241 allografts (donors, D-*IL28B*). Donor DNA was extracted from back table biopsies obtained before implan-

tation. A total of 126 liver transplant recipients (46%) received post-LT AVT.

The distribution of *IL28B* genotypes differed between recipients (R-*IL28B*: CC 31%, CT 49%, and TT 20%; n=239) and donors (D-*IL28B*: CC 52%, CT 37%, and TT 11%; n=241); the difference being significant for the comparison of CC genotype against non-CC ($P<0.001$). R-*IL28B* did not deviate from the genotype distribution expected under the Hardy-Weinberg equilibrium (C-allele frequency=0.558; χ^2 test, $P=0.83$), but there was a trend for deviation from equilibrium in D-*IL28B* (C-allele frequency=0.701; χ^2 test, $P=0.09$). Baseline characteristics for the 239 LT with *IL28B* genotyping are shown in Table 1. Viral genotypes were not distributed evenly across the different R-*IL28B*, with a predominance of genotype 1 in TT and CT.

Hepatitis C Recurrence and Allograft Histology

Fibrosing cholestatic hepatitis was identified in 12 LT involving 11 patients. Nine of these died. There was no association or notable trend for association between either D-*IL28B* or R-*IL28B* and fibrosing cholestatic HCV.

Histologic features of recurrence of HCV were apparent in 232 LT (91%) after a median follow-up of 2.6 years (range, 1.1–5.7 years). Patients with the R-CC genotype demonstrated a longer time to recurrence of HCV when compared with R-nonCC genotype, 4.6 months (range, 3.7–13 months) versus 4.1 months (range, 2.4–6.9 months), respectively, $P=0.006$ (Table 2). No significant relationship was found with D-CC. Patients with R-CC presented with lower levels of alanine aminotransferase (ALT) and viral load and higher albumin when compared with their R-nonCC counterparts, whereas the opposite effect was observed for ALT and viral load for D-CC versus D-nonCC. In the multivariate analysis, only a trend for the effect of R-CC on time to recurrence remained ($P=0.06$).

The frequency of patients developing significant fibrosis ($F\geq 2$) on protocol biopsies was 8% (n=232), 32% (n=217), 53% (n=158), 61% (n=97), and 75% (n=63) at 4 months at 1, 3, 5, and more than 5 years after transplant, respectively. The frequency of inflammatory grade 2 or higher in serial biopsies was 23% (n=224), 53% (n=210), 50% (n=155), 55% (n=94), and 48% (n=61) at the same time points. The 1-year time point was used to explore the effect of *IL28B* on HCV histologic stage and grade (Fig. 2). A higher proportion of patients with R-nonCC and D-CC had progressed to F of 2 or higher by the first year after LT, and this was paralleled by more inflammatory activities in D-CC. Analysis of results with patients censored at initiation of antiviral therapy (AVT) yielded similar results.

A total of 113 recipients (43%) demonstrated at least one episode of acute cellular rejection (ACR) during follow-up. The proportion of patients having at least one episode of ACR according to *IL28B* genotype is shown in Figure 2. There was a numerically higher rate of ACR in both R-nonCC (46% vs. 35%, $P=0.12$) and D-CC (48% vs. 38%, $P=0.12$), although differences did not reach statistical significance.

Multivariate analysis assessing the magnitude of the effect of *IL28B* on clinically relevant fibrosis at 1 year is shown in Table 3. Both R- and D-CC genotypes were independently associated with progression to F of 2 or higher at 1 year after LT, the former being protective and the latter being predictive of

TABLE 1. Baseline characteristics (before LT) according to recipient *IL28B* genotype

Characteristics	CC (n=74)	CT (n=116)	TT (n=49)	P
Age, mean (SD), y	52 (8)	51 (8)	53 (9)	0.48
Male, n (%)	47 (64)	87 (75)	33 (67)	0.22
Donor age, mean (SD), y	43 (18)	43 (17)	41 (16)	0.86
HCV genotype, n (%)				
G1	33 (56)	73 (79)	40 (92)	<0.001
G2	10 (17)	9 (10)	2 (4)	
G3	15 (25)	5 (5)	1 (2)	
G4	0	6 (6)	1 (2)	
G6	1 (2)	0	0	
MELD, median (interquartile range)	14 (12–25)	15 (11–21)	16 (11–21)	0.96
Platelets, billion/L, median (interquartile range)	60 (44–80)	69 (52–95)	74 (51–98)	0.047
Sodium, mEq/L, median (interquartile range)	136 (134–139)	136 (132–138)	136 (132–139)	0.54
Albumin, g/dL, median (interquartile range)	3.1 (2.8–3.5)	3.1 (2.8–3.5)	2.9 (2.5–3.2)	0.03
ALT, IU/L, median (interquartile range)	63 (41–104)	73 (46–140)	71 (52–102)	0.19
Iothalamate Cl, mL/min/1.73m ² mean (SD)	82 (37)	76 (33)	79 (31)	0.52
CMV mismatch, n (%)	15 (23)	22 (22)	6 (14)	0.48
Type 2 diabetes mellitus, n (%)	6 (8)	22 (20)	4 (9)	0.049
Donor <i>IL28B</i> , n (%)				
CC	37 (56)	56 (55)	19 (44)	0.41
CT	26 (39)	36 (35)	18 (42)	
TT	3 (5)	10 (10)	6 (14)	

MELD, model for end-stage liver disease.

increased risk. Variables that were predictive in univariate but not multivariate models of fibrosis progression were recipient age at LT, age of the donor, gender, steroid boluses for treated ACR, cytomegalovirus (CMV) infection, steatohepatitis at 4 months, targeted calcineurin inhibitor levels during the first year after LT, viral genotype, and viral load at recurrence (in quartiles).

SVR

A total of 120 liver transplant recipients -without fibrosing cholestatic hepatitis- (46%) received at least one dose of AVT. Distribution of genotypes was as follows: genotype 1, 76%; genotype 2, 12%; genotype 3, 8%; and genotype 4, 3%; genotype was unknown in two patients. Of all the treated patients, 39% achieved SVR, 42% demonstrated no response, and 10% experienced either a breakthrough or a relapse. At the time of the analysis, 12 patients were still undergoing AVT. SVR varied significantly with R-*IL28B*, with the greatest

response among patients who received liver transplants with recipient CC genotype, intermediate for CT, and low for TT (Fig. 3). A similar pattern was observed for D-*IL28B* genotypes. When both R- and D-*IL28B* genotypes were grouped together in CC–nonCC pairs, an additive effect was observed, with SVR reaching 90% among the 10 patients who received liver transplants bearing both R-CC and D-CC. A multivariate analysis confirmed the independence of the effect of *IL28B* on SVR and the greater effect of viral genotype (Table 4). Donor age also affected SVR, with a decrease of 4% for each older year. Importantly, the use of either tacrolimus or cyclosporine did not influence SVR. Variables that were predictive in univariate but not multivariate models of SVR were recipient age at LT, gender, ALT level at recurrence, body mass index, treated ACR, CMV infection, use of either tacrolimus or cyclosporine, targeted calcineurin inhibitor levels during the first year after LT, viral load before AVT, duration of treatment, clinically relevant fibrosis at 1 year,

TABLE 2. Recurrence of HCV infection after LT

	R- <i>IL28B</i>			D- <i>IL28B</i>		
	CC	nonCC	P	CC	nonCC	P
Time to recurrence, mo	4.6 (3.7–13)	4.1 (2.4–6.9)	0.006	4.1 (3–6.4)	4.2 (3.1–10)	0.36
ALT, U/dL	95 (49–220)	162 (76–279)	0.026	140 (85–309)	102 (54–229)	0.012
Albumin, g/dL	4 (3.6–4.4)	3.8 (3.5–4.2)	0.043	3.8 (3.6–4.2)	3.9 (3.6–4.3)	0.51
Bilirubin, mg/dL	0.9 (0.5–1.4)	0.9 (0.6–1.5)	0.55	0.9 (0.6–1.6)	0.9 (0.7–1.6)	0.77
Tacrolimus, ng/mL	8.5 (6.8–11.3)	8.9 (6.9–12.6)	0.42	9.3 (7.2–12.9)	8.7 (6.3–11.4)	0.09
Viral load, log ₁₀ IU/mL	6.0 (5.4–6.6)	6.7 (6.0–6.9)	<0.001	6.8 (6.5–7)	6.1 (5.4–6.6)	<0.001

Values are medians (interquartile range).

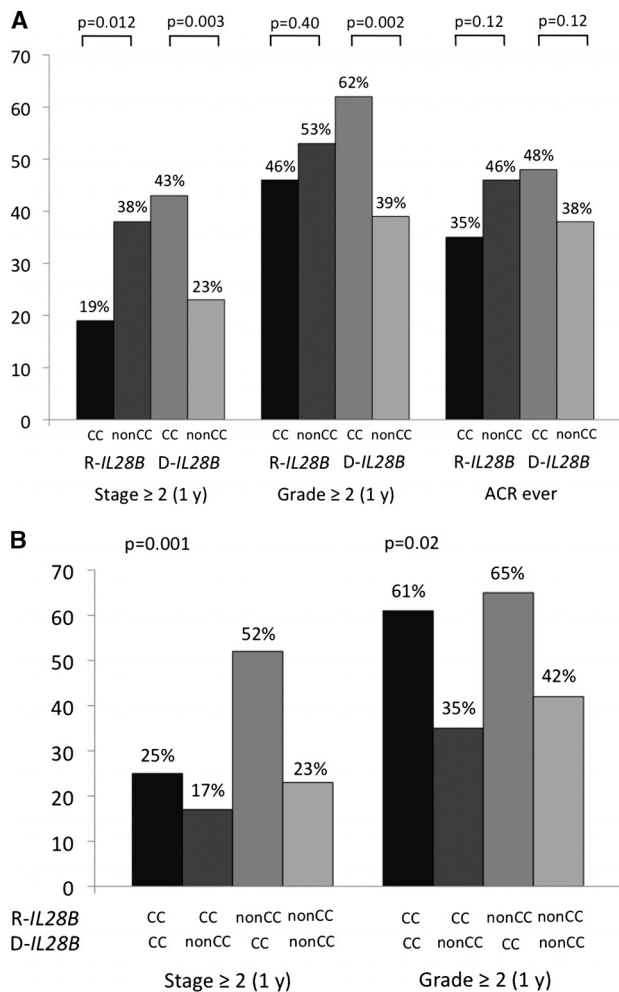


FIGURE 2. A, variation in fibrosis stage, inflammatory grade and acute cellular rejection according to recipient and donor *IL28B* genotype. B, combined effect on fibrosis and inflammation according to recipient and donor *IL28B* CC/non-CC pairs.

TABLE 3. Multivariable analysis for fibrosis progression

Model/covariables	OR (95% CI)	P
Bivariate		
R-CC	0.39 (0.18–0.82)	0.014
D-CC	2.5 (1.35–4.73)	0.004
Multivariate		
R-CC and D-nonCC	0.52 (0.14–1.88)	0.32
D-CC and R-nonCC	3.01 (1.29–7.09)	0.011
R-CC and D-CC	0.74 (0.22–2.38)	0.61
MELD	1.002 (1.000–1.003)	0.028
ALT recurrence	1.05 (1.00–1.10)	0.030

Variables excluded from final multivariate model were age at LT, age of the donor, gender, steroid boluses for early ACR, CMV infection, steatohepatitis at 4 months, targeted calcineurin inhibitor levels during the first year after LT, viral genotype, and viral load at recurrence (in quartiles).

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

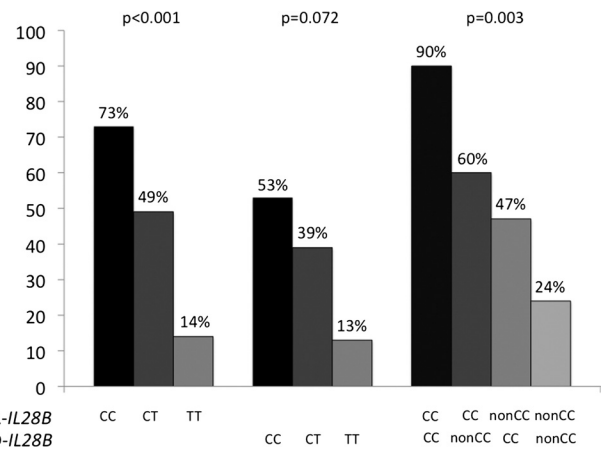


FIGURE 3. Sustained virological response according to *IL28B* genotypes.

and use of erythropoietin or colony-stimulating factor during AVT.

Survival Analysis

After a median follow-up of 5.5 years (range, 2.2–9 years), there were 53 deaths (23%), 32 of which were liver-related deaths (14%), 10 retransplantations (4%), and 29 (12%) allografts progressing to F4. Although there was no relationship between the *IL28B* genotypes and death, liver-related death or retransplantation (data not shown), it was noted that the R-*IL28B* genotypes were associated with progression to F4, and this significance persisted when combined in a composite endpoint with liver-related death and retransplantation. This combined endpoint was observed in 82 patients (35%). Because it was presumed that the beneficial effect of *IL28B* polymorphisms on the SVR rate could affect their association with the composite endpoint, further analyses were performed after censoring treated patients on the day AVT was started. With this approach (censoring on day of initiation of AVT), the association between R-*IL28B* and the composite endpoint was lost, although it was now observed with D-*IL28B* (Fig 4). To assess the magnitude of the effect regression models were built, and because of colinearity

TABLE 4. Multivariable analysis for SVR

Model/covariables	OR (95% CI)	P
Bivariate		
R- <i>IL28B</i>	3.90 (1.93–7.89)	<0.001
D- <i>IL28B</i>	2.14 (1.08–4.21)	0.028
R-CC/D-CC pairs	2.57 (1.49–4.42)	0.001
Multivariate		
R-CC/D-CC pairs	2.43 (1.28–4.61)	0.006
Donor age	0.96 (0.93–0.99)	0.026
HCV genotype	10.25 (1.89–55.49)	0.007

Genotype was introduced as G1/4 versus G2/3.

Variables excluded from final multivariate model were age at LT, gender, ALT level at recurrence, body mass index, steroid boluses for ACR, CMV infection, use of either tacrolimus or cyclosporine, targeted calcineurin inhibitor levels during the first year after LT, viral load before AVT, duration of treatment, clinically relevant fibrosis at 1 year, and use of erythropoietin or colony-stimulating factor during AVT.

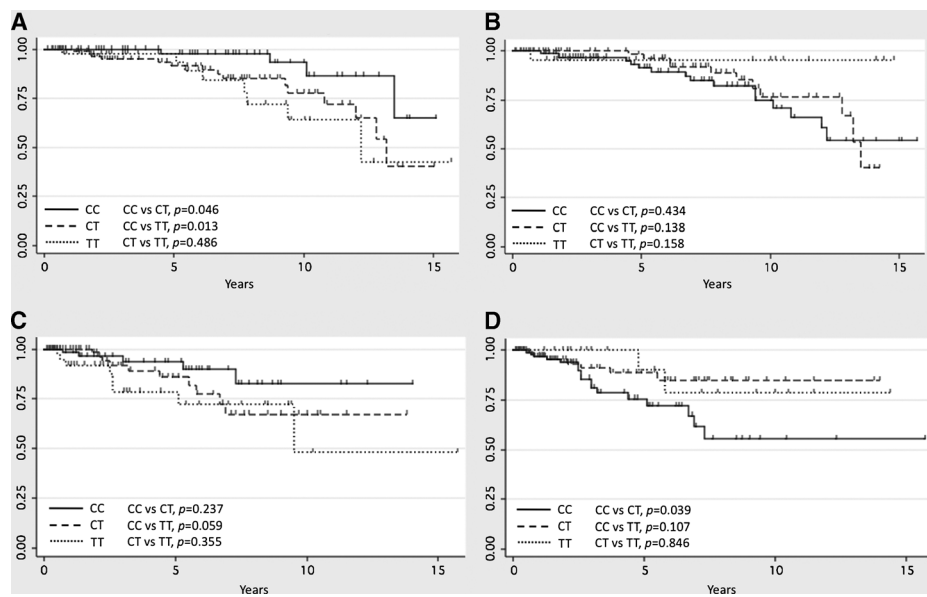


FIGURE 4. Kaplan-Meier curves for survival free from cirrhosis according to recipient (A) and donor (B) *IL28B* genotypes and for the composite endpoint (liver-related death and allograft failure) according to recipient (C) and donor (D) *IL28B* genotype. In C and D, patients who received AVT were censored at the beginning of treatment.

between the CT and TT genotypes, these were grouped as non-CC and compared with CC for both R-*IL28B* and D-*IL28B*. Results of the univariable and multivariable models are shown in Table 5. Only D-CC was independently associated with an increased risk of an adverse outcome (progression to cirrhosis, liver-related death, or retransplantation). The time of anhepatic phase before LT and CMV infection during follow-up was also associated with an increased risk of adverse outcome.

DISCUSSION

The persistence of liver disease related to HCV infection as the most common indication for LT and recurrence of HCV infection as the most common cause of posttransplant graft loss and mortality has resulted in a high level of interest in factors that affect posttransplant outcomes. This study of predictors of key outcomes after LT for HCV infection has several potentially important new observations.

A central aspect of our current analysis is that the predictive usefulness of *IL28B* genotype for SVR is independent of other known predictors of response, including viral genotype. We observed that the relative predictive usefulness of the *IL28B* genotype for SVR, although highly significant, is one quarter that of the HCV genotype. Our study also confirms the association of both R-*IL28B* and D-*IL28B* CC genotypes with SVR in a larger and more complete cohort than reported previously (14–18). It is important to consider how our findings compare with those of others. Our findings are, superficially, in contrast to those of Coto-Llerena et al. (18) who reported that, although recipients with a CC genotype demonstrated a higher frequency of SVR when compared with non-CC recipients, a significant difference was not observed when the donor genotype was assessed (41% and 28%, respectively, $P=0.179$). The magnitude of the effect of donor CC genotype is, however, similar to that observed in our study, suggesting the lack of significance may be based on

power. Two other studies have noted a positive association between the D-*IL28B* favorable genotype and successful AVT (14, 17). On balance, in magnitude and direction of effect, both recipient and donor *IL28B* genotypes seem to influence the frequency of SVR, with the response being enhanced when both R- and D- have the favorable genotype.

The mechanism through which the *IL28B* SNP genotype influences response to AVT is yet to be determined and merits some consideration. IFN- λ 3, the product of *IL28B* gene, belongs to the type III interferon family, causing induction of interferon-stimulated genes (ISGs), maturation and differentiation of dendritic cells, modulation of T_H1 and T_H2 immune responses, and inhibition of Treg cells (19–22). Thus, IFN- λ 3 is a proinflammatory cytokine, linking innate and adaptive immune responses (23). Favorable *IL28B* SNPs are associated with decreased levels of intrahepatic ISG (24, 25). Lower pretreatment ISG levels are predictive of ultimate SVR in the nontransplant setting (26).

TABLE 5. Multivariable analysis for survival

Model/covariables	HR (95% CI)	P
Bivariate		
R-CC	0.45 (0.17–1.23)	0.12
D-CC	2.59 (1.15–5.83)	0.02
Multivariate		
D-CC	5.96 (1.29–27.6)	0.02
Anhepatic	1.02 (1.00–1.04)	0.014
CMV	3.44 (0.87–13.6)	0.078

Duration of the anhepatic phase was introduced in minutes.

CMV infection was introduced as a dichotomous variable.

Variables excluded from the final multivariate model were age at LT, age of the donor, race, gender, time to HCV recurrence, postoperative biliary and vascular complications, diabetes mellitus, and targeted calcineurin inhibitors levels during the first year after LT.

HR, hazard ratio.

A further potentially important aspect of our study is the differential predictivity of donor and recipient *IL28B* genotype for key clinical and histologic outcomes. We observed that recipients with a CC genotype have relatively slower histologic recurrence, with decreased ALT levels and viral load when compared with non-CC genotype, with the opposite association for donor CC genotype. Others have reported a significantly lower ALT and viral load in association with recipient CC genotype and significantly higher ALT among CC genotype donors (15–17). The clinical relevance of this paradoxical influence of *IL28B* CC genotype according to origin was evident when assessing the histologic data at 1 year after LT, when it was seen that recipient CC genotype was associated with lesser degrees of fibrosis than non-CC recipients, and the converse for donors. The survival analysis was consistent with histologic results, with a negative association of donor CC genotype with progression to cirrhosis, liver-related death, and retransplantation. Because of the suggestion of proinflammatory roles for the CC genotype, we explored associations of *IL28B* with risk for ACR. Although a higher frequency of ACR was seen in association with donor CC, the difference was not statistically significant. Although ACR was predictive of fibrosis in univariate modeling, its usefulness was lost in the multivariate analysis. It is possible, however, that an independent effect of ACR on propensity for more advanced fibrosis would be seen in a larger study and that part of the risk for more advanced fibrosis associated with donor CC and recipient non-CC genotype is conferred through an increased risk of ACR.

Taken together, these results suggest that a more aggressive course of recurrence of HCV is associated with a donor CC genotype in patients who do not receive AVT. The overall superior posttransplant outcomes associated with donor CC genotype occur by virtue of greater frequency of attainment of SVR during AVT. Because of a substantially increased risk of more severe histologic recurrence and greater likelihood of responding favorably to AVT, it is particularly important that AVT is administered when possible to patients who receive an allograft from a donor with a CC *IL28B* genotype.

Studies of variation in fibrosis progression with *IL28B* genotype have been inconsistent. In the nontransplant setting, Marabita et al. (27) found no significant difference in the frequency of advanced fibrosis between CC, CT, and TT genotypes (26%, 25%, and 15%, $P=0.46$). A study including patients with HCV/human immunodeficiency virus coinfection observed a higher rate of cirrhosis in CC when compared with CT/TT (24% and 13%, $P=0.01$) (28). It is possible that the effect of *IL28B* on liver fibrosis is only observed in populations with accelerated fibrosis such as human immunodeficiency virus coinfection or LT. Two studies in patients who underwent LT have examined the possibility of associations of *IL28B* genotype and histologic outcomes. Eurich et al. (16), in a study in which only recipient *IL28B* genotype was determined, did not find significant differences in fibrosis progression between genotypes. Similarly, Lange et al. (17) did not observe associations with either recipient or donor *IL28B* genotype and cirrhosis. The authors noted, however, that they lacked power to detect a meaningful difference in histologic outcomes. There are other important differences between our present study and those of Eurich et al. and Lange et al. in

design (biopsies being or not mandatory at every time point during follow-up), patient numbers (91 transplants in the study by Lange et al. vs. 272 in our study), *IL28B* genotyping method (rs8099917 vs. rs12979860), approach to AVT, and prevalence of other risk factors for fibrosis. In the study by Eurich et al., *IL28B* genotyping was performed only in recipients, making an interaction between donor and recipients *IL28B* genotype impossible to examine (the interaction was very important in our analysis).

The basis for a fibrosing phenotype in association with recipient and donor *IL28B* genotypes cannot, of course, be determined from our study. Greater expression of *IL28B* messenger RNA has been documented in both explanted and allograft livers with the favorable antiviral genotype (14). Persistence of CC genotype donor dendritic and lymphocytic cells within the allograft could theoretically create an immunologic environment favoring inflammation and fibrogenesis in the absence of viral eradication.

There are several limitations to our study, including the fact that it was not possible, for example, to characterize the *IL28B* genotype in 27% of our patients. There were, however, no baseline differences between patients who underwent LT with and without available *IL28B* genotype. In addition, the distribution of *IL28B* genotypes among donors showed a trend for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. The C-allele frequency was similar, however, to that reported among other liver transplant recipient populations and is likely a reflection of an enrichment of nonresponders to AVT and failure to clear HCV during acute infection among liver transplant recipients.

In conclusion, the clinical evolution of posttransplant HCV infection varies with the origin of the CC genotype. We also confirm the favorable association of both recipient and donor CC genotype on response to AVT. In the absence of viral eradication, donor CC genotype is associated with a greater frequency of a composite endpoint including progression to cirrhosis, liver-related death, and retransplantation. It is particularly important that patients who receive an allograft from a donor with a CC *IL28B* genotype receive AVT. The interplay between donor and recipient genotypes is clearly complex in liver transplant recipients. Studies of the relative impact of donor and recipient *IL28B* genotype on ISG and IFN- λ 1-3 expression are eagerly awaited.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The study included patients with CHC who underwent LT between January 1995 and July 2010 at our center. All patients were followed up according to a standard protocol. DNA was collected from recipients and donors. Available liver biopsies included mandatory biopsies at day 7 and at 4 and 12 months after LT and yearly thereafter and those requested by the treating physician for clinical reasons. Quantification of HCV RNA in the serum was performed with COBAS AMPLICOR HCV Test, version 2.0 assay (Roche Molecular Systems). The study protocol was approved by the institutional review board of the Mayo Clinic.

DNA Extraction and *IL28B* Genotyping

DNA was extracted from stored paraffin-fixed liver tissue blocks using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) assay. Donor and

recipient DNA was tested for the polymorphism rs12979860 using the ABI TaqMan allelic discrimination kit and the ABI7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Clinical Endpoints

Hepatitis C Recurrence and Allograft Histology

Recurrent hepatitis C infection was defined as a panlobular or portal lymphocytic infiltrate, with detection of quantifiable HCV RNA in the serum, and in the absence of any alternative cause. All liver biopsies were reviewed for evidence of ACR (29). Fibrosis stage and inflammation grade were evaluated in a standard fashion at years 1, 3, and 5 after LT and at the last biopsy (if >5 years) (30).

SVR

A subset of patients received AVT with peginterferon ± ribavirin. In these, SVR was assessed and defined as undetectable HCV RNA at 24 weeks after the end of treatment.

Survival

A composite endpoint consisting of liver-related death and/or allograft failure (retransplantation or progression to F4) was used as the primary endpoint. Patients with death or retransplantation during the first 90 days after LT, hepatic artery thrombosis, or biliary strictures at anytime during follow-up were excluded.

Statistical Analysis

Continuous variables are summarized as mean (SD) or median (interquartile range). Comparisons were made with *t* test and analysis of variance or Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests according to the distribution of data. Categorical variables were compared by means of the chi-square test. Analyses were performed considering all genotypes for *IL28B* (CC, CT, and TT) and grouping them as favorable versus nonfavorable (CC vs. nonCC). Univariate (multiple linear, logistic, and Cox) regression analyses were applied to build final multivariate models assessing risk factors for time to recurrence of HCV, fibrosis progression, and SVR, respectively. Factors in the univariate analysis showing *P*<0.2 were entered in the multivariate analyses. The final model included the covariates with the best fit to the data. All statistical analyses were performed with Stata (version 9.2; Stata Corp, College Station, TX).

REFERENCES

- Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 31.
- Veldt BJ, Saracco G, Boyer N, et al. Long term clinical outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon monotherapy. *Gut* 2004; 53: 1504.
- Morgan TR, Ghany MG, Kim HY, et al. Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 52: 833.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338.
- Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 823.
- Charlton M, Ruppert K, Belle SH, et al. Long-term results and modeling to predict outcomes in recipients with HCV infection: results of the NIDDK liver transplantation database. *Liver Transpl* 2004; 10: 1120.
- Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852.
- Prieto M, Berenguer M, Rimola A, et al. Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multi-centre experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 771.
- Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, et al. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 889.
- Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, et al. Variants in *IL28B* in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139: 1577.
- Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, et al. Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2011; 53: 317.
- Eurich D, Boas-Knoop S, Ruehl M, et al. Relationship between the interleukin-28b gene polymorphism and the histological severity of hepatitis C virus-induced graft inflammation and the response to antiviral therapy after liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 289.
- Lange CM, Moradpour D, Doehring A, et al. Impact of donor and recipient *IL28B* rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *J Hepatol* 2011; 55: 322.
- Coto-Llerena M, Perez-Del-Pulgar S, Crespo G, et al. Donor and recipient *IL28B* polymorphisms in HCV-infected patients undergoing antiviral therapy before and after liver transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1051.
- Megjugorac NJ, Gallagher GE, Gallagher G. Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29). *J Leukoc Biol* 2009; 86: 1359.
- Gallagher G, Megjugorac NJ, Yu RY, et al. The lambda interferons: guardians of the immune-epithelial interface and the T-helper 2 response. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30: 603.
- Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the T_H1/T_H2 response. *Genes Immun* 2007; 8: 254.
- Morrow MP, Pankhong P, Laddy DJ, et al. Comparative ability of IL-12 and IL-28B to regulate Treg populations and enhance adaptive cellular immunity. *Blood* 2009; 113: 5868.
- Barth H, Rybczynska J, Patient R, et al. Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 2011; 54: 1135.
- Honda M, Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139: 499.
- Dill MT, Duong FH, Vogt JE, et al. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than *IL28B* genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1021.
- Bochud PY, Bibert S, Negro F, et al. *IL28B* polymorphisms predict reduction of HCV RNA from the first day of therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55: 980.
- Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, et al. Genetic variation in the *interleukin-28B* gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011; 54: 1127.
- Barreiro P, Pineda JA, Rallon N, et al. Influence of interleukin-28B single-nucleotide polymorphisms on progression to liver cirrhosis in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus-coinfected patients receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011; 203: 1629.
- Demetris A, Adams D, Bellamy C, et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An international panel. *Hepatology* 2000; 31: 792.
- Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Surg Pathol* 1995; 19: 1409.

CONCLUSIONES

La investigación realizada durante el Doctorado en Ciencias Médicas me ha permitido consolidar mi perfil de investigación hacia la fisiopatogenia de la respuesta antiviral y desenlaces clínicos en VHC, tanto antes como después del trasplante hepático. El proyecto de propuesta de tesis incluyó la aplicación de cuestionarios de calidad de vida (SF-36) antes y después de la intervención, y se estableció una seroteca con muestras de las semanas 0, 12 y 24. Esto dio lugar a un nuevo proyecto que ha sido aceptado para su presentación como un póster en "The Internacional Liver Congress, European Association for Study of the Liver", a llevarse a cabo en Londres, 9-13 de abril de 2014. Lo que reportamos en este resumen es que existe una reducción en los niveles de la proteína IP-10 (interferon-gamma-inducible protein 10 kDa) en pacientes que realizan ejercicio. Esto es importante porque se sabe que los niveles elevados de IP-10 en sangre predicen falla al tratamiento antiviral, al ser un subrogado de la expresión de los genes estimulados por interferón (ISGs). Así, además de la mejoría en el perfil metabólico, el ejercicio y la intervención nutricional mejoraron el perfil de ISGs. Aunque, como ya se mencionó, no se realizará un estudio aleatorizado con pacientes recibiendo terapia antiviral con y sin ejercicio/dieta, estos resultados apoyan aún más la importancia de modificaciones en el estilo de vida para facilitar el éxito de la terapia antiviral. Otro resultado interesante es que se logró impactar positivamente la calidad de vida, particularmente en lo referente al componente físico de SF-36.

Nuevas hipótesis han surgido sobre el papel que el ejercicio puede jugar en el período pretrasplante para favorecer desenlaces clínicos postrasplante. Actualmente, estoy en proceso de obtener aprobación por el comité de ética de la universidad donde laboro (University of Arkansas for Medical Sciences) para evaluar los cambios en amoníaco sanguíneo en candidatos a trasplante sometidos a una prueba de estrés cardiorespiratorio. Esto es relevante porque de observarse elevación considerable en amoníaco durante la prueba de

esfuerzo, esto podría implicar riesgo para desarrollo de encefalopatía hepática asociada a ejercicio. De ser así, medidas de seguridad para evitar esta complicación deberán ser tomadas en algunos pacientes.

Las principales causas de mortalidad después del trasplante hepático son: recurrencia de la enfermedad que originalmente causó la falla hepática (dominado por VHC), enfermedad cardiovascular, infecciones, diabetes postrasplante, y neoplasias. El síndrome metabólico postrasplante por tanto afecta grandemente la supervivencia por su asociación con: progresión acelerada de VHC, desarrollo de enfermedad por hígado graso, enfermedad aterosclerótica, mayor riesgo de infecciones en presencia de diabetes pobremente controlada, y mayor riesgo de neoplasias en diabetes bajo tratamiento con insulina. Según datos obtenidos de la base de datos de la Clínica Mayo los pacientes con VHC incrementan alrededor de 3 kg, o 1 kg/m² en su índice de masa corporal por año. El período pretrasplante se caracteriza por gran motivación de los pacientes para realizar cambios en su estilo de vida. En colaboración con Kymberly Watt (Clínica Mayo), y Michael Charlton (ahora Intermountain Medical Center, Utah), actualmente estamos diseñando un protocolo de investigación para evaluar el efecto de un programa de ejercicio pre-trasplante en la mejoría de desenlaces clínicos pre- y postrasplante.

Como proyecto futuro asociado a observaciones hechas durante el Doctorado en Ciencias Médicas, quiero determinar la utilidad de la hemoglobina glucosilada como un marcador de hiperglicemia, así como del "HOMA-IR" para predecir el desarrollo de diabetes o síndrome metabólico, en pacientes con cirrosis compensada y descompensada. Es esperable que, dadas las variaciones en metabolismo de la glucosa / insulina observadas en cirróticos, los puntos de corte de utilidad clínica para HOMA-IR sean muy distintos a los observados en población sin cirrosis. La mejor definición de la utilidad de la hemoglobina glicosilada y el HOMA-IR en pacientes con cirrosis permitirá mejorar el control de diabetes y perfil metabólico antes y después del trasplante hepático.

La base de datos realizada para el estudio de *IL28B* ha dado lugar a diversas publicaciones, detalladas a continuación:

Veldt BJ, Duarte-Rojo A, Thompson AJ, Watt KD, Heimbach JK, Janssen, HL, Tillmann HL, Goldstein DD, McHutchison JG, Charlton MR. Donor *IL28B* TT-polymorphism is associated with increased incidence of hepatic steatosis in liver transplant patients with chronic hepatitis C. *Enviado a publicación*.

Duarte-Rojo A, Budhraj V, Veldt BJ, Goldstein DD, Watt KD, Heimbach JK, McHutchison JG, Tillman HL, Poterucha JJ, Charlton MR. Interleukin-28B and fibrosing cholestatic hepatitis in posttransplant hepatitis C: a case-control study and literature review. *Liver Transpl* 2013;19(12):1311-7.

Duarte-Rojo A, Deneke MG, Charlton MR. Interleukin-28B polymorphism in hepatitis C and liver transplantation. *Liver Transpl* 2013;19(1):49-58

Veldt BJ, Duarte-Rojo A, Thompson AJ, Watt KD, Heimbach JK, Tillmann HL, Goldstein DD, McHutchison JG, Charlton MR. Recipient *IL28B* polymorphism is an important independent predictor of posttransplant diabetes mellitus in liver transplant patients with chronic hepatitis C. *Am J Transplant* 2012;12(3):737-44.

En nuestro análisis de la posible relación con la hepatitis colestásica fibrosante, una forma muy grave pero poco frecuente de recurrencia de VHC postrasplante, no pudimos demostrar una asociación clara dada la falta de poder estadístico, y por tanto se ha iniciado un proyecto multicéntrico para combinar la experiencia de 4 centros de trasplante (Innsbruck, Austria; Barcelona, España; Cleveland Clinic, EEUU; Mayo Clinic) con el mismo objetivo, permitiendo así contar con resultados fiables y de utilidad para la comunidad científica. Este proyecto se completará hacia el verano de 2014.

Por último, el interés en los ISGs e *IL28B*, llevó a nueva evidencia que demostró que ambos marcadores son de menor utilidad para la terapia triple antiviral (IFNpeg + RBV + boceprevir o telaprevir), lo que augura que su utilidad será muy pobre o nula con los nuevos antivirales recientemente aprobados por la FDA en diciembre de 2013 (y con los que están por aprobarse). Este estudio es una colaboración con Jordan J. Feld (University of Toronto) y los resultados se

presentaron como un póster en "The Liver Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases", Washington 2013. A la fecha, he realizado el análisis final y escrito el artículo, mismo que está en revisión con mi colaborador, para enviarse próximamente a publicación.

Los conocimientos acumulados y estudios de colaboración realizados a través de estos casi cinco años del Doctorado en Ciencias Médicas han causado un impacto muy positivo en mi formación, y servirán como fundamento para mi futura vida como investigador clínico. Agradezco a mis maestros, mentores, tutores, y a la UNAM, el sinnúmero de experiencias que han enriquecido mi vida académica.