

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Postgrado e Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

**AUSENCIA DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN PACIENTES INFECTADOS POR VHC
EN TRATAMIENTO**

Trabajo de investigación que presenta:

DRA MAYRA GPE SANTIAGO ARANO

Para obtener el Diploma de la especialidad de:

GASTROENTROLOGÍA

Asesor de Tesis:

DRA MA. ANTONIETA XÓCHITL GARCÍA SAMPER

Número de registro de protocolo:

224.2009

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR FÉLIX OCTAVIO MARTÍNEZ ALCALÁ
COORDINADOR DE CAPADESI

DR GUILBALDO PATIÑO CARRANZA
JEFE DE ENSEÑANZA

DRA MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO
JEFE DE INVESTIGACIÓN

DRA MA. ANTONIETA XÓCHITL GARCÍA SAMPER
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE GASTROENTEROLOGÍA

DRA MA. ANTONIETA XÓCHITL GARCÍA SAMPER
ASESORA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, Alejandro Regalado sin tu amor, confianza y respaldo esto no sería posible, gracias por el mundo que me has hecho descubrir a tu lado.

A mi papá, Joel Santiago que siempre ha sido mi fortaleza cuando he querido desfallecer y a quien admiro por el gran ser humano que es, espero te sientas orgulloso de mí.

A mi madre, Emilia Arano por su paciencia y amor que me han guiado cuando más he necesitado, gracias por ser incondicional.

A mi hermana, Ingrid Santiago quien me ha apoyado aún sin saberlo, siempre te llevo conmigo, le agradezco a la vida por tenerte.

A la Dra Ma Antonieta Xóchilt García Samper, por haber brindado su amistad, confianza y sus conocimientos durante estos años.

A la Dra Cortes, por sus consejos y amistad durante estos tres años, gracias por confianza.

Al Dr Luis Felipe Montaña Estrada por su amistad, su apoyo y la sabiduría que me ha compartido.

Al Dr Luis Alberto Salazar López por su amistad, y el respaldo brindado para que esta tesis se hiciera realidad.

A mis amigos por su confianza, apoyo y cariño

ÍNDICE

PORTADA EXTERNA.....	I
PORTADA INTERNA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	4
III. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	7
IV. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
V. OBJETIVOS.....	8
V a. Objetivo general.....	8
V b. Objetivos específicos.....	8
VI. HIPÓTESIS.....	9
VI a. Hipótesis nula.....	9
VI b. Hipótesis alterna.....	9
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
VII a. Diseño del estudio.....	10
VII b. Perfil bioquímico.....	11
VII c. Grupo de estudio.....	11
VII d. Grupo problema.....	11
VII e. Grupo testigo.....	11
VII f. Tamaño de la muestra.....	12
VII g. Criterios de inclusión.....	12
VII h. Criterios de exclusión.....	13
VII i. Criterios de eliminación.....	13
VII j. Cédula de recolección de datos.....	14
VII k. Descripción general del estudio.....	15
VII l. Análisis de datos.....	15
VII m. Métodos matemáticos para análisis de datos.....	15
VII n. Recursos.....	16
VII o. Financiamiento.....	16
VII p. Aspectos éticos.....	16
VIII. RESULTADOS.....	17
IX. DISCUSIÓN.....	20
X. BIBLIOGRAFÍA.....	23

I. INTRODUCCIÓN

La esteatosis hepática, es definida como una acumulación excesiva de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos, lo cual es frecuente en pacientes con infección crónica por VHC. El examen histológico de las biopsias obtenidas de pacientes infectados con VHC muestra que en más del 50% de estos pacientes existe esteatosis hepática en diferentes estadios ⁽¹⁾. Esta alteración se da en estos pacientes aún en ausencia de otros posibles factores esteatogénicos, como alcohol, drogas. Se ha observado que el grado de esteatosis hepática está directamente relacionado con el nivel de replicación viral del VHC ^(2,3)

El comprender los mecanismos que causan esteatosis hepática en pacientes infectados por VHC ha sido difícil debido a la existencia de diversos cofactores metabólicos. El paciente con VHC pueden desarrollar esteatosis como consecuencia de síndrome metabólico concomitante, posiblemente asociado con diabetes tipo 2, obesidad o incremento del índice de masa corporal (IMC) ^(2,3). Se ha propuesto que en pacientes infectados por VHC coexisten dos tipos de esteatosis. El primero de tipo metabólica observado principalmente relacionado con un incremento del IMC, dislipidemia, y resistencia a insulina. El segundo, de tipo viral que se desarrolla en ausencia de cualquier factor esteatogénico y que está relacionado directamente con la infección por el VHC. El VHC puede estar involucrado como cofactor en el desarrollo de esteatosis hepática tipo viral, ya que por sí mismo puede inducir resistencia a la insulina que consecuentemente favorece el desarrollo de esteatosis hepática

La infección por el virus de la hepatitis C induce varios mecanismo muy complejos que llevan a la inflamación, resistencia a la insulina, esteatosis, fibrosis, apoptosis, alteración en la expresión de genes, y carcinoma hepatocelular. ^(4,5,6). En la actualidad la infección por VHC se considera una causa de síndrome de metabólico. Al tratar la infección por VHC como una enfermedad metabólica se puede tener enfoques novedosos para el entendimiento de la patogénesis del VHC asociada a la esteatosis hepática. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar como la infección por VHC puede inducir resistencia a la insulina, por ejemplo el estrés oxidativo, algunas proteínas no estructurales, la proteína central del virus, y

como un evento asociado la producción de citocinas ^(7,8). En este trabajo, proponemos que el VHC tiene una interferencia específica en el metabolismo de lípidos a partir de alteraciones en citocinas que están relacionadas con la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de otras citocinas liberadas en el transcurso de la activación de las células fagocíticas (células Kupffer) por proteínas virales ^(9,10,11)

En la infección crónica por VHC que se ha asociado con síndrome metabólico ⁽¹²⁾, se ha documentado que el tejido adiposo abdominal es una fuente importante de moléculas pro-inflamatorias, como son, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), y otras adiposinas como el factor transformante de crecimiento tipo beta (TGF- β) y la adiponectina, que se relacionan con el desarrollo de resistencia a la insulina ⁽¹³⁾. Esta última se ha relacionado con otras enfermedades asociadas a la obesidad, tales como hipertensión arterial, aterosclerosis, y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La fibrosis hepática es un proceso dinámico por el cual el hígado responde a condiciones de daño persistente. Esto lleva al depósito de fibras de matriz extracelular, regeneración alterada del hepatocito, modificación en la arquitectura microvascular y cirrosis. La evidencia demuestra que la obesidad y la resistencia a la insulina se asocian con un proceso de progresión fibrogénico más severo y más rápido, por lo que últimamente se ha enfocado mucho en el posible lazo entre tejido adiposo y reparación hepática.

El aumento en la síntesis de ROS activa la vía del factor de transcripción KAPPA B (NF-Kb) y esto supone un aumento en la síntesis de TNF- α e IL-1 y la disminución en la sensibilidad a la insulina que favorece el inicio de la hiperinsulinemia y la dislipidemia, así como la aparición de esteatosis hepática en pacientes con virus de la Hepatitis C ⁽¹⁴⁾.

Se ha observado resistencia a la insulina, hiperinsulinemia en enfermos con infección crónica por VHC (sobre todo en pacientes infectados con genotipos 1 y 4 ^(15,16,17)).

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar las posibles diferencias en la concentración sérica de las citocinas pro-inflamatorias relacionadas con el desarrollo de resistencia a la insulina entre pacientes infectados por VHC con hiperinsulinemia versus normoinsulinemia.

RESUMEN

Introducción: La infección por virus de hepatitis C (VHC) ha sido asociada con resistencia a la insulina, síndrome metabólico. Sin embargo, mientras la resistencia a la insulina ha sido asociada con un estado proinflamatorio, la hiperinsulinemia ha sido ligada con un estado antiinflamatorio.

Objetivos: Determinar la presencia de diferencias inmunológicas o histológicas en pacientes con infección crónica por VHC con o sin hiperinsulinemia.

Métodos: 115 pacientes con infección crónica por VHC en tratamiento con Interferón pegilado- α + Ribavirina fueron analizados, para realizar la selección. El índice de masa corporal y la escala Child- Pugh fueron determinados antes de que las tomas de muestras de sangre fueran obtenidas para las pruebas de función hepática y perfil bioquímico. El genotipo de VHC y la carga viral fueron determinadas con el Sistema Amplicor. Los nitritos séricos fueron determinados con el reactivo Griess mientras el TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, e insulina fueron determinados por kits comercial ELISA.

Resultados: 20 pacientes tuvieron niveles de insulina séricos $> 25 \mu\text{UI/ml}$, los 95 pacientes restantes tuvieron valores normales. Los pacientes con hiperinsulinemia tuvieron un HOMA de 14.8 en contraste con 3.1 en los pacientes con normoinsulinemia. Ninguno de los pacientes presentaron glucosa $> 126 \text{ mg/dl}$. Los triglicéridos estuvieron elevados en pacientes con normoinsulinemia (163 vs 128 mg/dl). No hubo diferencias en el IMC, ALT, carga viral o genotipo entre pacientes con hiper y normoinsulinemia, aunque hubo más pacientes con cirrosis en el último grupo (6 vs 2). Las concentraciones de IL-6 y TNF- α fueron menores en los pacientes comparados con el grupo control ($p < 0.001$) en contraste con los niveles de nitritos los cuales fueron altos (10.3 vs 3.7 $\mu\text{Mol/l}$; $p < 0.003$).

Conclusión: Las diferencias en la concentración de citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico en pacientes infectados por VHC con hiperinsulinemia, sugiere que la resistencia a la insulina es el origen del daño hepático en pacientes con infección crónica por VHC.

ABSTRACT

Background. Hepatitis C virus infection has been associated with insulin resistance, metabolic syndrome. However, while insulin resistance has been associated with a pro-inflammatory state, high insulin has been linked with an anti-inflammatory state.

Aims. To determine the presence of immunological or histological differences in chronic HCV-infected patients with or without hyperinsulinemia.

Methods. One hundred and fifteen chronic HCV-infected patients under pegylated IFN- α + ribavirin treatment were analyzed. Body mass index and Child-Puigh score were determined before blood sera samples were obtained for liver function tests and biochemical profile. HCV genotype and viral load were determined with the Amplicor System. Serum nitrites were determined with the Griess reagent whereas TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, and insulin by commercially available ELISA kits.

Results. Twenty patients had serum insulin levels >25 μ UI/ml, the remaining 95 patients had normal values. Hyperinsulinemia patients had a 14.8 HOMA-IR value versus 3.1 in normoinsulinemia patients. None of the patients had a glycemia value >126 mg/dl. Tryglycerides concentration was increased in normoinsulinemic patients (163 vs 128 mg/dl). There were no differences in BMI, ALT, viral load or genotype between hyper- and normoinsulinemia patients, although there were more patients with cirrhosis in the latter group (6 vs 2). IL-6 and TNF- α concentration was lower in patients than controls ($p < 0.001$) as opposed to nitrites concentration which was higher (10.3 vs 3.7 μ Mol/l; $p < 0.003$).

Conclusions. Differences in the concentration of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in hyperinsulinemic HCV+ patients, suggest that insulin resistance is the origin of hepatic damage in patients with chronic HCV infection.

I. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En pacientes con infección por virus de hepatitis C (VHC) ¿que eficacia tiene el tratamiento a base de interferón- α exógeno en intensificar el estado proinflamatorio necesario para erradicar el virus?

I. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

El virus de Hepatitis C (VHC) es el único miembro del género Hepacivirus de la familia Flaviviridae, mide 50 nm. El VHC está constituido por un genoma de una sola cadena de ARN positiva de 9.6 Kb con sentido positivo que incluye una región 5' no codificadora de 341 bases, un marco de lectura abierta (ORF) única de 9033-9099 bases y una región 3' no codificadora. ⁽¹⁸⁾

La hepatitis C es la primera causa de cirrosis y cáncer hepático en el mundo, afectando aproximadamente 3.2 millones de americanos. La forma más común de transmisión del VHC, en orden descendiente de frecuencia es el uso de drogas intravenoso, transfusión de sangre (antes de introducción en 1992 de prueba de detección de anticuerpos para VHC), exposición sexual. Actualmente la prevalencia de anticuerpos HVC es del 1.8% en población general, y de 0.6% en donantes de sangre voluntarios. ⁽¹⁹⁾ La prevalencia es mayor en el sexo masculino, afroamericanos y mexicanos.

La infección por VHC es asintomática en la mayoría de los casos. Los síntomas se desarrollan en una tercera parte de pacientes con infección aguda, y la mayoría de pacientes con infección crónica tienen pocas manifestaciones hasta que el desarrollo de cirrosis ⁽²⁰⁾. La historia natural de la hepatitis C es variable; la infección aguda desaparece en 20% de pacientes, se desarrolla infección crónica en el 80% de los casos, 15-20% con infección crónica desarrollaran cirrosis en 15 a 30 años aproximadamente. El riesgo anual de hepatocarcinoma es del 1-2% en paciente cirróticos ⁽¹⁹⁾

Se han identificado seis genotipos del VHC que varían en la secuencia de nucleótidos en un 30-50%. Los aislamientos del mismo genotipo presentan una homología de secuencia media del 95%. Los subtipos de cada genotipo presentan una homología de secuencia media del 80%. Por el contrario, los genotipos diferentes muestran una similitud de secuencia de únicamente alrededor del 65%. El genotipo 1 es el más frecuente (40-80%) y existe en todo el mundo. Los subtipos 1^a y 1b son los de mayor prevalencia en EE. UU. Y cada uno de ellos se observa en aproximadamente el 35% de los casos. El subtipo 1b es el más prevalente en Europa, Turquía, Japón y Taiwán. El genotipo 2 también está muy distribuido aunque es menos frecuente que el genotipo 1 (10-40%). El

genotipo 3 es más frecuente en India, Pakistán, Australia y Escocia. El genotipo 4 se observa predominantemente en Oriente Medio y África; el genotipo 5 en Sudamérica, y el tipo 6 en Hong Kong y Macao^(21,22).

En México, se ha informado que el genotipo predominante es el 1b, el cual se caracteriza por desarrollar una rápida resistencia frente al IFA-interferón alfa ⁽²¹⁾

La rápida replicación del VHC y el elevado número de hepatocitos infectados constituye un reto para el sistema inmune celular. La infección por VHC desencadena una respuesta de anticuerpos específica, con células T CD 8+ y CD4+ específicas contra el virus, tanto circulantes como infiltrantes del hígado y de actividad de células NK.

La respuesta de células T CD8+ específicas contra VHC es policlonal y se dirige contra diferentes epítopos de las regiones estructural y no estructural de la poliproteína viral (core, envoltura, NS3, NS4 y NS5). La cantidad de células T CD8+ que producen interferón y se encuentra comprometido en la eliminación viral en los momentos iniciales de la infección. Las respuestas de las células T CD8+ específicas contra antígenos de VHC son detectables hasta 20 años después de la infección en personas en las que se resuelve la hepatitis C pero no en las que tienen infección persistente por VHC, lo que sugiere que el mantenimiento de las células T CD8+ determina la evolución benigna de la enfermedad⁽²³⁾.

El hecho de que la carga infecciosa supere la capacidad de la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) es causa de la persistencia de la infección. La expresión definitiva de VHC depende del equilibrio entre las respuestas de CD4+ de tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2). Las respuestas de las citocinas, moléculas reguladoras que desempeñan una función importante en los diferentes procesos patológicos y fisiológicos, producidas por los subgrupos de células T colaboradoras CD4 se denominan Th1, Th2 y Th0. Las respuestas del tipo Th1 son la secreción de IL2, IL1, IL6, TNF- α e IFN- γ , que son estímulos importantes para la respuesta inmune antiviral del huésped e incluyen la generación de LTC y la activación de células NK. Las respuesta de tipo Th2 producen IL-4, IL-10 que incrementan la producción de anticuerpos y regulan hacia abajo la respuesta TH1 ⁽²⁴⁾.

En los pacientes con infección crónica por VHC se ha observado una activación elevada de células T junto con elevación de las concentraciones séricas de numerosas citocinas. La estimulación peptídica de clones de células T con especificidad VHC procedentes de la sangre periférica o del hígado da lugar a una respuesta de citocinas predominantemente Th1, con liberación de IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α ^(25,26)

Los agentes antivirales, interferón- α y ribavirina han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de infección crónica por VHC, con el objetivo de prevenir el desarrollo de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular ⁽²⁰⁾. El Interferón- α , que es una citocina importante en la inmunidad innata, actúa a través de receptores de superficie celular que por medio de señales del sistema de kinasas, señales de traducción y activación de transcripción induce la estimulación de genes de INF. Inhibe la replicación a través de mecanismos antivíricos directos como: Inhibición de la unión y cobertura del virus, inducción de proteínas y ribonucleasas intracelulares; amplificación de respuesta inmune específica o inespecífica ⁽²⁷⁾. Sin embargo parece existir una evasión inmune como mecanismo de defensa del VHC que persiste a pesar de la aplicación de interferón- α exógeno, con el que se esperaba intensificar el estado proinflamatorio ya existente por regla en un proceso infeccioso como el VHC, y con esto incrementar la posibilidad de erradicar el virus ⁽²⁷⁾.

I. OBJETIVOS

V a. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si existe diferencia del estado proinflamatorio en pacientes con infección crónica por VHC e hiperinsulinemia, sin y con tratamiento a base de interferón α , mediante la detección sérica de IL-1 e IL-6 y TNF- α .

V b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los niveles séricos de IL-1, IL-6, TNF- α , antes, y durante el tratamiento con interferón- α en pacientes infectados con VHC:
 - Medidos con kits comerciales de la marca R & D systems, con límite de sensibilidad del ensayo para IL-6 de 0.48-1500 pg/ml, para IL-1 es 0.12-8.0 pg/ml, para TNF- α de 0.5-32 pg/ml
 - Los valores normales para IL-6 son < 1 pg/ml, IL-1 < 2 pg/ml, TNF- α < 1.2 pg/ml
- Correlacionar los niveles de IL-1, IL-6, TNF- α en pacientes infectados por VHC e hiperinsulinemia

II. HIPÓTESIS

VI a. HIPÓTESIS NULA. El interferón alfa incrementa el estado proinflamatorio, con lo cual ayuda a eliminar la infección por virus de hepatitis C.

VI b. HIPÓTESIS ALTERNA. El tratamiento con interferón alfa exógeno no aumenta el estado proinflamatorio como es de esperarse, para erradicar al virus de hepatitis C.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La infección por virus de hepatitis C es la causa más importante a nivel mundial de cirrosis y hepatocarcinoma. El tratamiento convencional a base de interferón- α y ribavirina presenta altas tasas de recaídas y efectos adversos; además el costo de un curso de 48 semanas de tratamiento es aproximadamente de \$ 30,000 a 40,000; lo cual representa una inversión elevada para esta institución y el sistema nacional de salud. Una de los mecanismos de acción del interferón- α para erradicar el VHC es intensificar la respuesta inmune. Mediante la medición de las principales citocinas proinflamatorias a nivel sérico, como IL1, IL6, TNF α , con kits comerciales de la marca R & D systems; permitirá de una manera confiable y accesible evaluar la eficacia de la respuesta inmune del huésped, así como de la utilidad del tratamiento a base de interferón- α exógeno en amplificar el estado proinflamatorio, para facilitar la erradicación del virus de una manera exitosa

I. MATERIAL Y MÉTODOS

VII a. Diseño del estudio.

Se llevó a cabo un estudio Prospectivo, longitudinal, comparativo, clínico, aplicado durante el período comprendido entre abril del 2009 a mayo del 2010. De 115 pacientes con diagnóstico de Hepatitis C del Servicio de Gastroenterología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, ISSSTE, solo se seleccionaron aquellos pacientes con una historia de infección crónica por VHC, con al menos 25 años de evolución y no que hubieran recibido tratamiento médico en el momento del estudio. El diagnóstico de infección por VHC fue confirmado por métodos serológicos (ELISA) y moleculares (PCR). La toma de muestra de sangre se realizó antes de inicio de tratamiento y posteriormente a la semana ocho de haber iniciado el tratamiento, ya que en esta semana se considera que el PegIFN- α alcanza un nivel adecuado a nivel sistémico (17).

El estadio de la enfermedad hepática había sido previamente evaluado a través de la escala Child-Pugh. La carga viral se determinó con el Sistema Amplicor (Roche) con un valor de corte de $<50\text{IU/mL}$. La toma de muestra se realizó antes de iniciar tratamiento y en la semana 8 de iniciado el tratamiento combinado. Los pacientes infectados por VHC fueron divididos en dos grupos de acuerdo a su nivel de Insulina en suero (punto de corte para los individuos sanos en México se ha fijado en $17\pm 4.5\text{ uU/mL}$, con un límite máximo de 24IU/mL (18)). Los individuos con niveles de insulina en ayunas igual o mayor de 25uU/mL se consideraron con hiperinsulinemia y se incluyeron en el grupo A, los que tuvieron valores más bajos se incluyeron en el grupo B. La valoración del índice de fibrosis hepática se realizó por biopsia hepática.

El protocolo fue llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki y con la aprobación del Comité de Bioética del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, ISSSTE. Todos los pacientes y los individuos control firmaron un consentimiento informado por escrito.

VII b. Perfil Bioquímico

Las muestras de sangre se tomaron después de un ayuno nocturno (mínimo de 12hrs). En el perfil bioquímico completo se evaluó en nivel de colesterol total, triglicéridos, aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), bilirrubina total, albúmina, glucosa e insulina). Las pruebas bioquímicas de rutina se realizaron de acuerdo al manual del ensayo enzimático (Human Gessellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Germany). Los niveles de Insulina fueron detectados por inmunoensayo enzimático (DakoCytomation Ltd, Denmark House, UK). La resistencia a la insulina se evaluó por el “Homeostasis Model of Assesment” (HOMA) de acuerdo a la fórmula descrita por Yokohama et al ⁽²⁴⁾.

Citocinas séricas

La concentración de las citocinas séricas evaluadas (TNF- α , IL-1, IL-6 y TGF- β) se determinó por kits comerciales (R&D Systems) siguiendo las especificaciones del fabricante. Al final del ensayo, las placas se leyeron a 450nm y se corrigió a 570nm en el lector para ELISA EL-311. Los resultados se expresaron en ng/mL y se analizaron con el programa Bio-Tek's Gen5.

VII c. Grupo de estudio.

Pacientes con diagnóstico de infección por virus de hepatitis C, atendidos en forma consecutiva en la consulta externa de Gastroenterología en el Hospital Licenciado Adolfo López Mateos de México, DF, que cumplieron los criterios para inicio de tratamiento a base interferón- α y ribavirina.

VII d. Grupo problema.

Pacientes con infección por VHC en tratamiento con interferón- α y ribavirina

VII e. Grupo testigo

Como testigo se utilizaron los valores de referencia considerados como normales por los laboratorios que diseñaron los reactivos utilizados

VII f. Tamaño de la muestra.

- Por conveniencia
- $$N = \frac{0.25 N}{(\alpha/z)^2 (N-1) + 0.25} = 80$$

N= tamaño de la población

alfa = es el valor del error tipo 1

z es el valor del número de unidades de desviación estándar para una prueba de dos colas con una zona de rechazo igual alfa.

0.25 es el valor de p^2 que produce el máximo valor de error estándar, esto es $p = 0.5$

n es el tamaño de la muestra.

El valor que toma al inicio del programa para el error alfa, es del 5 % (0.05) con un nivel de confianza de 95 % (0.95) lo que equivale a un valor de z de 1.959963985 (a nivel práctico 1.96)

VII g. Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de VHC por anticuerpos y confirmación por PCR cuantitativo.
- Cualquier genotipo es incluido (genotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6)
- Pacientes que cumplan los requisitos ya establecidas a nivel mundial, para iniciar tratamiento con interferón- α y ribavirina
- Edad menor de 65 años

VII h. Criterios de exclusión.

- Hepatopatía descompensada
- Enfermedades autoinmune incontrolables
- Alteraciones hematológicas
- Embarazo
- Enfermedad psiquiátrica
- Incapacidad de apego al tratamiento
- Consumo de alcohol, drogas
- > 65 años

VII i. Criterios de eliminación.

- Defunción
- Pacientes que no acepten participar en el estudio
- Pacientes en quienes se suspenda el tratamiento para VHC por efectos adversos propios del medicamento.

VII j. Cédula de recolección de datos

VARIABLES		
Edad	Años	
Sexo	Femenino/Masculino	
Genotipo	Tipo de genotipo	
PFH completas		Antes del inicio de Tx, durante el tratamiento, seguimiento
USG Hepático		Antes de inicio de Tratamiento
Panel viral	Positivo para VHC	
Carga viral		Antes del tratamiento, a las 8 semanas de tratamiento
Niveles séricos de IL-1, IL-6, TNF- α		Valor en pg/ml Antes del inicio de Tx, durante el tratamiento
Tratamiento con interferón- α		Inicio, termino del tratamiento de acuerdo al genotipo

VII k. Descripción general del estudio.

En pacientes con diagnóstico de infección por VHC con detección de anticuerpos positivos, y confirmado por PCR cuantitativo, que cumplan con los criterios para el inicio de tratamiento a base de interferón- α y ribavirina, en el período de tiempo comprendido de Abril 2009 a Mayo del 2010; se le tomará una muestra de suero fresco antes del inicio del tratamiento, y a las 8 semanas del mismo, para medir IL-2, IL-6, TNF- α , cuyos valores normales para IL-6 son < 1 pg/ml, IL-1 < 2 pg/ml, TNF- α < 1.2 pg/ml. La medición se realizarán con kits comerciales de la marca R & D systems, con límite de sensibilidad del ensayo para IL-6 de 0.48-1500 pg/ml, para IL-1 es 0.12-8.0 pg/ml, para TNF- α de 0.5-32 pg/ml.

VII l. Análisis de datos.

Realizado con el paquete estadístico SPSS versión 10.0

VII m. Métodos matemáticos para el análisis de los datos

Los datos numéricos se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media). La comparación de los valores obtenidos de ambos grupos fueron evaluados por ANOVA y por T – Student's utilizando el Software SPSS versión 16. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo

VII n. Recursos

Recursos humanos:

- Investigadores: Mayra Gpe Santiago Arano, Luis Felipe MontañaEstrada, Luis Alberto Salazar LÓPEZ
- Pacientes infectados con VHC

Recursos físicos:

- Libreta de registro de pacientes
- Reportes de laboratorio, gabinete e histopatología durante el seguimiento del estudio
- kits comerciales de la marca R & D systems
- Hoja de recolección de datos
- Lápices
- Computadora (Excel, Word, SPSS versión 13.0)

VII o. Financiamiento.

Costo de la investigación.

- Recursos disponibles en el hospital Adolfo López Mateos
- kits comerciales de la marca R & D systems de la UNAM

VII p. Aspectos Éticos.

A los pacientes se les solicitó su consentimiento informado por escrito, para la toma de una muestra de suero fresco antes de iniciar el tratamiento, a la mitad de este y al finalizar, sin modificar el tratamiento ni el tiempo de duración de este.

I. RESULTADOS

A partir de los 115 pacientes analizados, se encontraron 20 pacientes con hiperinsulinemia determinada por un valor de insulina sérica mayor a 25 IU/mL (grupo A); para fines estadísticos se generó un segundo grupo de 20 pacientes infectados normoinsulinémico (grupo B), y como control se obtuvieron muestras de 20 individuos sanos pareados por edad y sexo sin historial ni antecedentes de infección por VHC. La media del valor promedio de insulina de los pacientes del grupo A (hiperinsulinemia) fue de 61.7 ± 9.6 IU/mL, mientras que los pacientes del grupo B y los controles tuvieron una concentración de insulina más bajo (23.1 ± 1.6 y 16.3 ± 0.7 IU/mL respectivamente). Las diferencias entre los valores del grupo A y grupo B o los controles fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$ y $p < 0.0002$, respectivamente). La Tabla 1 muestra los valores séricos medios de concentración y características de los individuos en ambos grupos infectados por VHC y el grupo control.

En la tabla 1 se puede observar las características clínicas de los grupos en estudio. No hubo diferencias de género o de edad entre los grupos. El peso en kilogramos fue mayor en los pacientes del grupo A en comparación con el grupo control; los individuos del grupo B tenían, también, valores más altos de peso, aunque no estadísticamente significativo en comparación con el grupo control (72.1 ± 2.2 y 68.3 ± 5.6 vs. 59.6 ± 2.6 , $p < 0.0001$). La media de índice de masa corporal en el grupo control fue menor que en los dos grupos infectados por el VHC (28.4 ± 1.1 y 26.7 ± 1.7 vs. 22.3 ± 0.68 , $p < 0.004$).

La proporción de pacientes con infección por VHC genotipo 1 o 2 fue similar en ambos grupos y no hubo diferencia estadística entre la cantidad de copias de ARN-VHC en ambos grupos. Todos los pacientes de los grupos A y B recibieron tratamiento combinado PegIFN-a2a/2b y Ribavirina, en función del peso, y del genotipo viral.

El valor de HOMA fue estadísticamente diferente entre los tres grupos (14.8 ± 10.2 para el grupo A, 3.1 ± 1.3 para el grupo B y 3.4 ± 0.6 en el grupo control, $p < 0.0001$ entre el control y el grupo B contra el grupo A)

Los valores de colesterol no mostraron cambios significativos, así como los de triglicéridos se encontraron dentro de valores normales; vale la pena mencionar que estos últimos presentaron una concentración más alta en los pacientes del grupo B (Tabla 1). Los valores de albúmina estuvieron dentro de rangos normales en los tres grupos.

Los valores de glucosa fueron elevados solo en dos de los pacientes con VHC del grupo A y en uno del grupo B; los niveles que tuvieron estos pacientes se encontraban menor o igual a 110 y no mayor a 126mg/dL. El recuento plaquetario promedio fue significativamente menor en ambos grupos infectados por VHC, siendo significativamente menor en los individuos del grupo A (161 vs. 206 k/ μ L en el grupo A vs. en los pacientes del grupo B).

Sorprendentemente encontramos que, ninguno de los pacientes incluidos en el grupo A y B presentaron valores séricos elevados de IL-1, y TGF- β ; los valores séricos de citocinas de ambos grupos problema tuvieron valores similares que los del grupo control. En relación a el TNF- α los pacientes con hiperinsulinemia tuvieron concentraciones significativamente menores que en los pacientes con normoinsulinemia ($P < 0.001$). La IL-6 el grupo A presentó una disminución significativa con respecto al grupo control ($P < 0.001$), sin embargo aunque el valor de esta interleucina con respecto al grupo normoinsulinemia también fue menor la diferencia no alcanzó significancia estadística.

Tabla1. Características y valores séricos de pacientes Hiper- y normoinsulinémicos.

	Grupo A (n= 20)	Grupo B (n=20)	Control (n= 20)	Valor P
Sexo, femenino	14	14	7	
Edad (años)	49.8 ± 9.7	49.8 ± 12.2	51.2 ± 14.9	
Peso (kg)	72.1 ± 2.2	68.3 ± 5.6	59.6 ± 2.0	b<0.0001
IMC (kg/m ²)	28.4 ± 1.1	26.7 ± 1.7	22.3 ± 0.6	b,c<0.004
VHC genotipo				
1	8	6	0	
2	2	4	0	
VHC ARN (UI/ml)(valores mínimos-máximos)	933,825 (66,800-3,666,000)	865,930 (13,300-4,620,000)	Negativo	
Tratamiento				
PEG-IFN 2A	8	6	0	
PEG-IFN 2B	2	4	0	
ALT (UI/ml)	79.3± 15.4	57.3 ± 9.08	25 ± 1.62	b,c <0.003
Concentración Insulina (UI/ml)	60 ± 9.64	13.1 ± 1.64	16.3 ± 0.767	a,b<0.001
Hiperglicemia (>110 <126 mg/dL)	2	1	0	
HOMA-IR	14.8 ± 10.2	3.1 ± 1.3	3.4 ± 0.6	a,b<0.0001
Colesterol (mg/dL)	157.2 ± 12.9	156.9 ± 16.0	156.1 ± 11.3	
Triglicéridos (mg/dL)	128.6 ± 21.4	163.7 ± 35.8	114 ± 19	
Albúmina (g/dL)	4 ± 0.4	3.9 ± 0.8	4.1 ± 0.4	
Plaquetas (k/μL)	161.3 ± 20	206.6 ± 27	304.7 ± 22.6	b,c<0.009
TNF-a (pg/mL)*	6.5 ± 1.2	8.5 ± 1.9	12.9 ± 3.5	b,c<0.001
IL-1β (pg/mL)*	4.9 ± 2.1	4.9 ± 1.7	4.87 ± 1.9	b,c<0.001
TGF-β (ng/mL)	35.1 ± 2.2	35.4 ± 3.7	39.8 ± 6.9	
IL-6 (pg/mL)*	6.13 ± 2.3	8.13 ± 3.1	9.6 ± 5.91	b,c<0.001

*El rango de detección del ensayo es 3.13-300 pg/mL para IL-6 y 15.6-1000 pg/mL para TNF-a. Los valores normales para colesterol son 140-239 mg/dL, triglicéridos de 35-135 mg/dL, albúmina 3.8-5.1 g/dL, plaquetas 150 a 450 x10³/uL, ALT 10-40 IU/ml. a representa la comparación entre los grupos A y B, b entre grupo A y el grupo control, c entre el grupo B y el grupo control.

IX. DISCUSIÓN

Nosotros no encontramos diferencias en las pruebas de función hepática y valores bioquímicos séricos entre grupos con hiper y normoinsulinemia que pueden estar asociados con el inicio del síndrome metabólico o diabetes mellitus.

Nuestros resultados mostraron que ambos grupos de pacientes infectados de manera crónica por VHC tuvieron sobrepeso así como una diferencia estadísticamente significativa en el IMC en comparación con el grupo control. La infección crónica por VHC puede inducir resistencia a la insulina, esto contribuye a la esteatosis, progresión de fibrosis, DM y resistencia a la terapia con interferón ^(21,22). La hipótesis de que la prevalencia elevada de DM en pacientes con infección por VHC es una consecuencia de la progresión del daño hepático más que de la infección viral por sí misma, ha sido corroborado recientemente por Hui et al ⁽²⁸⁾; ellos demostraron que el VHC puede inducir resistencia a la insulina en fases iniciales del daño hepático. La obesidad está asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina en la ausencia de otra entidad patológica ⁽²⁹⁾; es posible que los niveles altos de insulina en nuestro grupo experimental sea consecuencia del sobrepeso. Recientemente se ha sugerido que la resistencia a la insulina inducida por infección crónica por VHC más que contribuir, requiere la coexistencia de hepatitis, esteatosis, y/o fibrosis ⁽²⁹⁾. Sin embargo, algunas proteínas de capsido del VHC pueden afectar las vías de señalización mediadoras de insulina ^(16,30). El desarrollo de esteatosis hepática, induce una progresión más rápida de la enfermedad hepática y reducción en la respuesta virológica sostenida al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina lo cual se ha asociado con resistencia a insulina en paciente infectados por VHC ⁽³⁰⁾.

Algunos resultados no esperados fueron los niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias evaluadas en los pacientes infectados por HVC. Las concentraciones séricas bajas de TNF- α pueden ser secundarias a una respuesta adecuada de la terapia con interferón-pegilado así como lo observado en IL-6 ⁽³¹⁾; una disminución en la concentración en la concentración de TNF- α podría modular la

síntesis de IL-1 e IL-6 ⁽³¹⁾. Sin embargo, la carga viral en los dos grupos, pacientes con normo e hiperinsulinemia, bajo ninguna circunstancia hacen pensar que presentaban una buena respuesta al tratamiento. Esta diferencia entre valores de citocinas y carga viral abre una discusión en relación a lo que podría ser considerado como la terapia gold estándar. Otras de las mayores diferencias fueron las concentraciones relativamente altas de ALT y las bajas, aunque dentro de rangos normales, los valores de plaquetas en paciente con hiperinsulinemia vs individuos con normoinsulinemia. Con estas diferencias podríamos esperar un puntaje alto de Child-Pugh en pacientes con hiperinsulinemia pero interesantemente este no es el caso.

Óxido nítrico (ON) y ROS puede incrementarse como resultado de proteínas del NS3 o el NS5A o la respuesta inmune contra el VHC ⁽¹⁰⁾. El estrés oxidativo que activa el factor nuclear Kappa B juega un rol clave en la expresión del TNF- α . El TNF- α inhibe la función del receptor de insulina y disminuye la expresión del transportador de glucosa en los tejidos periféricos; estos cambios promueven la resistencia a la insulina favoreciendo el estado de hiperglucemia, hiperinsulinemia y esteatosis hepática los cuales aumentan el riesgo de desarrollar diabetes ⁽¹⁶⁾. Nosotros esperamos un aumento en los valores del TNF- α pero sorprendentemente no fue así. Los nitratos se incrementaron moderadamente en paciente con normo e hiperinsulinemia comparados con el grupo control 10.3 ± 1.8 and 10.7 ± 2.8 vs 3.7 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$). TNF- α y IL1 β disminuyen la óxido nítrico sintasa (NOS) ⁽²⁸⁾ por lo que se esperaban valores bajos de ON pero al mismo tiempo todos nuestros pacientes estaban bajo tratamiento con interferón pegilado lo cual induce la sintasa de óxido nítrico tipo 2 en hepatitis C ⁽²¹⁾. Nuestros pacientes recibieron tratamiento combinado con Interferón pegilado + Ribavirina. Está bien establecido que la ribavirina cambia una respuesta inmune de tipo Th2 a Th1.

La insulina regula la actividad del factor de transcripción NF- κB ⁽⁷⁾ lo cual regula la síntesis de TNF- α e IL-1 β . Además, la insulina interviene regulando la síntesis de TNF- α asociada con el proceso inflamatorio ⁽⁹⁾. Interesantemente, la insulina también regular la síntesis de ON en las células endoteliales así como en células del sistema inmune ⁽²⁵⁾ y promueve la diferenciación de

células T Th2, lo cual puede suprimir la inflamación crónica asociada con obesidad y DM2. El resultado obtenido en relación a la asociación entre DM2 e infección crónica por VHC ⁽³²⁾, falta ser aclarado. Aunque, nosotros consideremos que el principal papel de la insulina es a nivel metabólico, esta también interviene en la síntesis de TNF- α , IL-6 y ON evitando así una descompensación metabólica y de manera secundaria inmune en paciente infectados con VHC; la falta de diferencia entre los dos grupos de pacientes infectados por VHC pone en duda esta propuesta y sugiere seguir la evaluación de este tipo de pacientes.

Ha sido reconocido que el control excesivo de la síntesis así como la respuesta del TNF- α , puede retardar el desarrollo de DM2 ⁽¹⁵⁾. El desarrollo de DM2 es una consecuencia del daño hepático en fases tardías de la enfermedad derivado por una concentración alta de insulina y no una consecuencia de la presencia del virus. Recientemente, Behrendt y Ruiz ⁽¹²⁾ reportan que la hiperglucemia en pacientes con VHC no muestran el comportamiento clásico. Ellos encontraron que la asociación entre una historia familiar de diabetes mellitus es más importante que la presencia del VHC, y que existe una relación inversa entre la presencia de intolerancia a la glucosa en ayuno y carga viral. La hiperinsulinemia en fases tempranas de la infección, es un mecanismo de protección que disminuye el proceso pro inflamatorio e incrementa la síntesis de citocinas anti-inflamatorias, esto atenúa el proceso inflamatoria en pacientes infectados con VHC.

Recientemente, el rol de la resistencia a la insulina como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo ha sido evaluado ⁽³³⁾. Cuando un mecanismo es inhabilitado, la descompensación metabólica inicia permitiendo esteatosis y fibrosis y más tarde diabetes mellitus.

Esto podría suceder en pacientes infectados por VHC. En conclusión nuestros resultados sugieren que la persistencia de hiperinsulinemia por largos periodos de tiempo, retardan el inicio de esteatosis y cirrosis.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. *Liver Int* 2008; 28(3):355-362.
2. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*. 2001;33:1358–64. doi: 10.1053/jhep.2001.24432.
3. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*. 2000;33:106–15. doi: 10.1016/S0168-8278(00)80166-X.
4. Faurtous I, *gut* volu 54 1003-1008 2005
5. Allison MD, *journal of hepatology* vol 21 pa 1135 a 1139 1994
6. Bieche I, *virology* vol 332 pag 130-144 2005
7. Cammà C, Bruno S, Di Marco V, Di Bona D, Rumi M, Vinci M, Rebucci C, Cividini A, Pizzolanti G, Minola E, Mondelli MU, Colombo M, Pinzello G, Craxì A. Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43(1):64-71.
8. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchet J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; 54(7):1003-1008.
9. Lois K, Young J, Kumar S. Obesity; epiphenomenon or cause of metabolic syndrome? *Int J Clin Pract* 2008; 62(6):932-938.
10. Suzuki T, Hirata K, Elkind MS, Jin Z, Rundek T, Miyake Y, Boden-Albala B, Di Tullio MR, Sacco R, Homma S. Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Am Heart J* 2008; 156(2):405-410.
11. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114(3):183-194.

12. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(7):3257-3265.
13. Dandona P, Chaudhuri A, Mohanty P, Ghanim H. Anti-inflammatory effects of insulin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(4):511-517.
14. Albacker T, Carvalho G, Schricker T, Lachapelle K. High-dose insulin therapy attenuates systemic inflammatory response in coronary artery bypass grafting patients. *Ann Thorac Surg* 2008; 86(1):20-27.
15. Kidd LB, Schabbauer GA, Luyendyk JP, Holscher TD, Tilley RE, Tencati M, Mackman N. Insulin activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (Akt) pathway reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326(1):348-353.
16. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582(1): 97-105.
17. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; 46(1):3-18. Oliveira BR, Magalhães O, Furlanetto TW, Bertoluci MC. Increased insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(2):e11-12.
18. Schiff, Eugene R. *Shiff's Hígado*. Marban. 2003
19. Hoofnagle Jay H, Seeff Leonard B. Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* 2006; 355:2444-51
20. Terrés-Speziale Arturo M. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 50, Núm. 4, pp 179-189 • 2003
21. Sleisenger Fordtran. *Enfermedades digestiva y hepáticas*. 2007
22. Georg M. Lauer, Bruce D. Walker. Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 1 July 5, 2001
23. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH, Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 132: 296-305, 2000.
24. Spengler Ulrich, Nattermann Jacob. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clinical Science* 2007; 112, 141-155

25. Fernández Salazar LI , Garrote Adrados JA , Álvarez Gago T, et al. Influencia de la esteatosis en la respuesta inmune hepática frente al VHC. *Revista de la ACAD*, Vol XXIV nº 1 (5-10), 2008
26. Di Bisceglie AM, Thompson J, Smith-Wilkaitis N, Brunt EM, Bacon BR. Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* 2001;33:704-707.
27. Abel et al. Intrahepatic Virus-Specific IL-10-Producing CD8 T Cells Prevent Liver Damage During Chronic Hepatitis C Virus Infection *Hepatology*, Vol. 44, No. 6, 2006
28. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1695-1704.
29. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134(2):416-423.
30. Sheikh MY, Choi J, Qadri I, Friedman JE, Sanyal AJ. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology* 2008; 47(6):2127-2133.
31. Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(12): 2751-2756.
32. Tsochatzis EA, Manolakopoulos S, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Insulin resistance and metabolic syndrome in chronic liver diseases: Old entities with new implications. *Scand J Gastroenterol* 2008; 25: 1-9.
33. Romero-Gómez M. Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non-response. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98(8): 605-615.