

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES HIDROCARBONADAS EN LOS
PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS
DE LA HEPATITIS C: ESTUDIO DE PREVALENCIA Y DE
LOS MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS.**

**Albert Lecube Torelló
2005**

**ALTERACIONES HIDROCARBONADAS EN LOS
PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS
DE LA HEPATITIS C: ESTUDIO DE PREVALENCIA Y DE
LOS MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS.**

Albert Lecube Torelló

TESIS DOCTORAL, 2005

DIRECTORES:

Dr. Rafael Simó Canonge
Dra. Cristina Hernández Pascual

TUTOR:

Dr. Joan Genescà Ferrer

**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Medicina
Hospitals Vall d'Hebron**

**A la Càrol
i als meus pares,
José Manuel i Pepita**

***Cuando otros creen que se está al final es cuando
verdaderamente hay que empezar.***

K. Adenauer

AGRAÏMENTS

Als Drs. Rafael Simó i Cristina Hernández, més enllà del temps que han destinat a ajudar-me en aquesta tesi, gràcies per ser responsables de crear els meus fonaments científics i despertar en mi un esperit de recerca que no coneixia. Però sobre tot, per la seva amistat.

Al Drs. Ignaci Esteban, Antonio González, Lluís Viladomiu i Maria Buti, del Servei d'Hepatologia, per la seva col·laboració al ajudar-me a reclutar gran part dels pacients inclosos en aquesta tesi.

Als Drs. Josep Maria Castellanos, Robert Català i Rosa Galard, així com a la resta de l'equip del Laboratori d'Hormones (Núria Vilalta, Salvador Oliveros, Carme Molinos i Gabriel Gaspar) pel seu inestimable ajut en el desenvolupament d'aquest treball, i per no donar-me mai un no per resposta.

A la Dra. Alicia Carrera del Servei d'Hematologia i als Drs. Rosend Jardí, Lydia García i Francisco Rodríguez, del Servei de Bioquímica, pel seu valuós ajut en la realització d'algunes de les tècniques de laboratori i la seva gran disponibilitat a l'hora de solucionar els meus dubtes.

Al Dr. Jordi Mesa, de la Secció d'Endocrinologia, per haver-me ensenyat bona part de l'Endocrinologia, pel seu recolzament i la seva amistat. De la mateixa manera, i especialment, als meus companys de la Secció d'Endocrinologia per la seva desinteressada col·laboració en tot moment.

Al Dr. Joan Genescà, professor del Departament de Medicina, a més a més d'ajudar-me en el reclutament dels pacients, per la tasca realitzada en qualitat de tutor de la tesi.

I per últim, a tots els que sense adonar-se m'han ajudat a completar aquesta tasca.

Aquesta tesi ha estat finançada parcialment per la "Fundació La Marató TV3", mitjançant el projecte "Virus de l'hepatitis C com factor de risc per desenvolupar una diabetis mellitus: estudi dels mecanismes etiopatogènics" (99/2.610).

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Epidemiología.....	2
1.2.- Infección por el VHC en pacientes diabéticos.....	6
1.3.- Prevalencia de diabetes en pacientes con infección por el VHC.....	8
1.4.- Mecanismos etiopatogénicos por los que el VHC favorecería el desarrollo de diabetes.....	12
1.4.1.- Disfunción de la célula beta.....	12
1.4.2.- Aumento de la resistencia a la insulina.....	13
2.- OBJETIVOS	18
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1.- Casuística y sistemática de trabajo	21
3.1.1.- Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.....	21
3.1.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas.....	24
3.1.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.....	26
3.1.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.....	28
3.2.- Metodología clínica	29
3.2.1.- Criterios diagnósticos de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y de las complicaciones de la diabetes.....	29
3.2.2.- Clasificación del grado de lesión hepática: hepatitis crónica vs. cirrosis.....	31
3.2.3.- Cálculo del índice de masa corporal, del índice cintura-cadera y del consumo de alcohol.....	32
3.3.- Metodología de laboratorio	32
3.3.1.- Extracción de las muestras de sangre, procesamiento y almacenamiento.....	32
3.3.2.- Determinaciones bioquímicas generales.....	33
3.3.3.- Diagnóstico de la infección por el VHC y detección del RNA-VHC.....	34

3.3.4.- Estudio de los genotipos del VHC.....	34
3.3.5.- Valoración de la resistencia a la insulina.....	35
3.3.6.- Evaluación de la secreción de insulina.....	35
3.3.7.- Estudio de los parámetros del metabolismo del hierro y de las mutaciones del gen de la hemocromatosis.....	36
3.3.8.- Estudio de los marcadores inflamatorios relacionados con la resistencia a la insulina.....	37
3.4.- Análisis estadístico.....	38
4.- RESULTADOS	39
4.1.- Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.....	40
4.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas	44
4.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.....	51
4.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.....	55
5.- DISCUSIÓN	58
5.1.- Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.....	59
5.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas.....	63
5.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.....	68
5.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.....	70

6.- CONCLUSIONES.....	72
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	75
8.- PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	104

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- EPIDEMIOLOGÍA.

La diabetes mellitus (DM) y la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) representan importantes problemas de salud pública por su elevada prevalencia y capacidad de ocasionar graves complicaciones a largo plazo, con el consiguiente impacto sanitario, social y económico.

Aproximadamente el 90% de los pacientes con DM presentan una DM tipo 2, también conocida como diabetes del adulto o no insulino-dependiente ^{1, 2}. La prevalencia de la DM tipo 2 en los países occidentales oscila entre el 4,0% y el 9,4% ^{3, 4}, cifras que coinciden con las comunicadas en nuestro medio (9,0% en Cataluña ⁵, 6,1% en Aragón ⁶ y 7,3% en el conjunto del estado español ³). Existe una clara relación entre la DM tipo 2 y la edad. Así, en sujetos mayores de 40 años se ha comunicado una prevalencia que alcanza el 12,3% ⁴. Precisamente el aumento de esperanza de vida de la población general, junto con la adopción de un estilo de vida más sedentario en los países en vías de desarrollo y el incremento de la obesidad, serán factores determinantes que contribuirán a incrementar la prevalencia de la DM tipo 2 en los próximos años ^{3, 7}. Así, se ha calculado que la cifra de personas con DM tipo 2 en el mundo pasará de 135 millones en el año 1995 a 299 millones en el 2025 ³ y, por tanto, será una de las auténticas epidemias del siglo XXI (Figura 1).

El impacto socio-sanitario de la DM tipo 2 está condicionado fundamentalmente por las severas complicaciones que puede producir tanto a nivel macrovascular (cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y arteriopatía periférica) como microvascular (retinopatía, nefropatía y neuropatía). Desde el punto de vista macrovascular la DM se considera un factor de riesgo de primera magnitud. Así, por ejemplo, en el estudio publicado por Haffner *et al* ⁷ la incidencia de infarto agudo de miocardio (IAM) en un individuo diabético sin antecedentes de cardiopatía isquémica fue similar a la que presentaba un paciente no diabético que ya había presentado un IAM, con unas curvas de supervivencia prácticamente superponibles. En este sentido, la ATPIII (*Adult Treatment Panel III*) considera a la DM como un equivalente de

enfermedad cardiovascular (ECV), es decir, se asume que el paciente con una DM sin historia de ECV tiene un riesgo equivalente al del paciente con ECV conocida ⁸. En lo referente a las complicaciones microvasculares, hay que tener en cuenta que la retinopatía diabética es la primera causa de ceguera en la población en edad laboral en el mundo occidental ⁹ y la nefropatía diabética la principal causa de insuficiencia renal ¹⁰. En cuanto a la neuropatía diabética, es una complicación muy frecuente y está directamente implicada en el origen del pie diabético, que aún persiste como la principal causa de amputación no traumática de las extremidades inferiores ^{11, 12}.

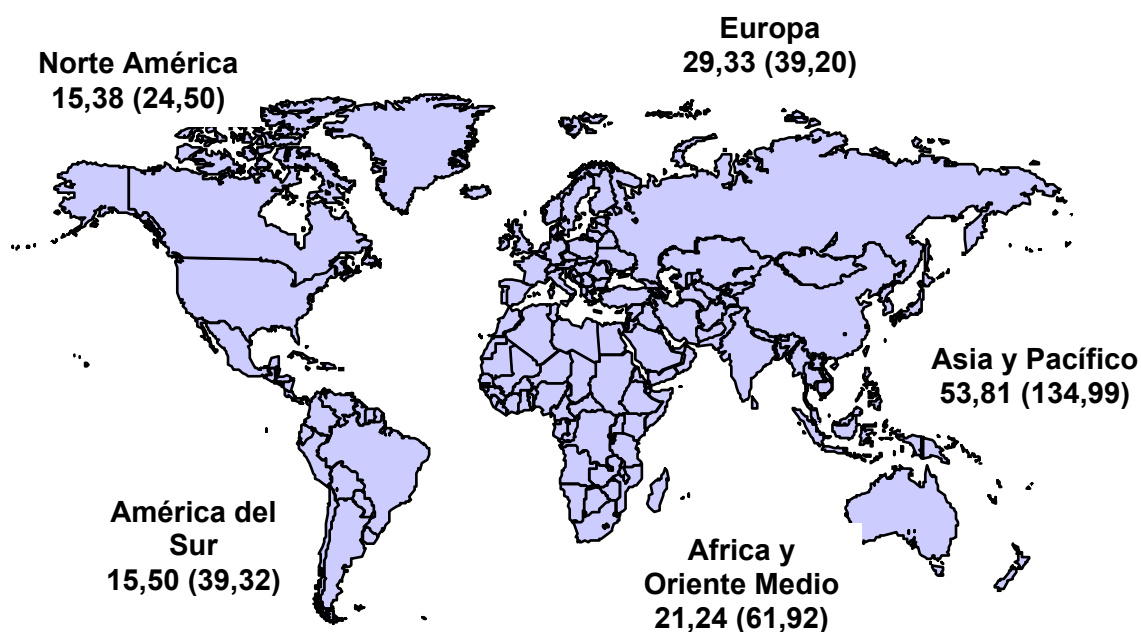


Figura 1. Prevalencia de la DM tipo 2 en el mundo, expresada en millones de habitantes, en 1995. Entre paréntesis aparece la prevalencia estimada para el año 2025. En estos 30 años el número de personas con diabetes mellitus tipo 2 pasará de 135 a 299 millones ³.

La hepatitis C es una de las infecciones víricas de mayor prevalencia y la principal causa de enfermedad hepática en la mayoría de países desarrollados. Se estima que el 3% de la población mundial, cerca de 170 millones de personas, sufre una infección crónica por el VHC ^{13, 14} (Figura 2). En España, la prevalencia oscila entre el 1,6% y el 2,6%, y al igual que ocurre con la DM tipo 2, aumenta de forma progresiva con la edad, alcanzando el 4,1% en los mayores de 65 años ^{15, 16, 17}.

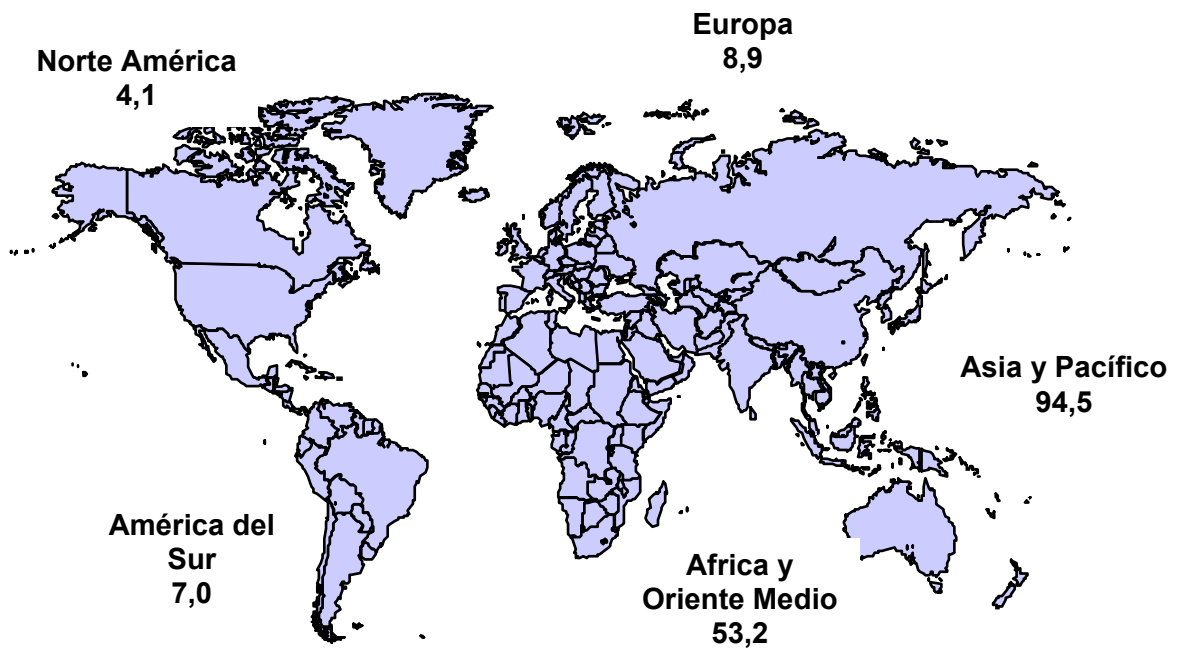


Figura 2. Prevalencia de la infección crónica por el VHC en el mundo, expresada en millones de habitantes, en el 2002 ¹⁴.

El VHC fue identificado en 1989 ¹⁸ y pertenece a la familia de los *Flaviviridae* ¹⁹, familia que comprende virus con un genoma RNA de cadena única. El VHC es de transmisión fundamentalmente parenteral y los principales factores de riesgo son la adicción a drogas por vía parenteral ^{20, 21}, la transfusión de sangre y derivados plasmáticos ²² y el transplante de órganos de donantes infectados ²³. Sin embargo, a partir del año 1990, estas dos últimas vías de infección virtualmente han desaparecido debido al cribado rutinario para detectar la presencia de VHC ²⁴. También se ha descrito la infección en los pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis ²⁵ y en el personal sanitario tras la punción accidental con material contaminado por el VHC ²⁶. Sin embargo, sólo en la mitad de los casos llega a identificarse el antecedente epidemiológico de la infección ^{24, 27}. Otras vías de contagio del VHC, como la transmisión sexual, intrafamiliar y vertical, juegan un escaso papel

en la población sin conductas de alto riesgo, y justificarían sólo el 10-15% de casos en los que no es evidente el factor de riesgo^{21, 24}.

El VHC se divide en seis grupos principales (genotipos 1 - 6) que difieren entre sí un 30-40% de su secuencia génica y, que a su vez, se subdividen en tres subtipos principales (a, b y c), cuyas secuencias difieren entre sí en un 15-20%^{29, 30}. Los genotipos 1, 2 y 3, y sus subtipos, están ampliamente distribuidos por todo el mundo, pero su prevalencia varía de un área geográfica a otra³¹. Los subtipos 1a y 1b son los más predominantes en Europa³² y son responsables del 70% de las infecciones crónicas en España³³. El subtipo 1b se detecta preferentemente en las hepatitis crónicas postransfusionales o esporádicas, mientras que los individuos adictos a drogas por vía parenteral están infectados predominantemente por los genotipos 2 y 3^{34, 35}. Por su parte, el genotipo 4 se distribuye básicamente por el Norte de África y Oriente Medio, mientras que los genotipos 5 y 6 están confinados a Sudáfrica y Hong Kong respectivamente³¹.

El 80% de los individuos infectados por el VHC son portadores crónicos de la enfermedad^{36, 37}. Un tercio de éstos desarrollará una cirrosis hepática en los siguientes 20 años, y hasta un 7% de los individuos con cirrosis presentará con el paso del tiempo un carcinoma hepatocelular^{37, 38}. Sin embargo, la mayoría presenta una infección crónica clínicamente asintomática u oligosintomática, que en ausencia de otros factores sinérgicos, como el consumo de alcohol o la coinfección por el virus de la hepatitis B, se mantendrá estable, o con una lenta progresión del grado de fibrosis hepática, durante toda la vida³⁹. Más aún, estudios recientes indican que el porcentaje de progresión hacia la enfermedad hepática avanzada puede ser incluso inferior al asumido previamente⁴⁰⁻⁴².

La infección crónica por el VHC se ha asociado con una larga lista de manifestaciones extrahepáticas⁴³⁻⁴⁶. Así, se ha demostrado una relación causa-efecto con la crioglobulinemia mixta esencial⁴⁷ y la glomerulonefritis membranoproliferativa⁴⁸. Además, existen estudios epidemiológicos que evidencian una asociación con otras

enfermedades como la porfiria cutánea tarda ⁴⁹, el síndrome de Sjögren ^{50, 51}, la úlcera corneal de Mooren ⁵², y los linfomas no Hodgkin de células B de bajo grado ⁵³. No está bien establecido si el VHC juega un papel etiopatogénico en el desarrollo del líquen plano o de la enfermedad tiroidea autoinmune, si bien el tratamiento con interferón podría estar también implicado en la aparición de éstas y otras manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC ^{45, 46, 54}

Diversos estudios epidemiológicos, que se revisan a continuación, han demostrado una asociación entre la infección por el VHC y la DM tipo 2. Estos estudios pueden dividirse en dos grandes grupos: los que evalúan la prevalencia de infección por el VHC en los pacientes diabéticos y los que evalúan la prevalencia de diabetes en pacientes infectados por el VHC.

1.2.- INFECCIÓN POR EL VHC EN PACIENTES DIABÉTICOS.

Los estudios en los que se analiza la prevalencia de infección por el VHC en la población diabética se resumen en la Tabla 1. Como puede observarse, esta prevalencia oscila entre el 1,78% y el 12,1% en los pacientes con una DM tipo 2 ⁵⁵⁻⁶², muy superior a la de los sujetos control en la mayoría de los estudios.

En un estudio que incluyó 176 pacientes diabéticos y 6172 donantes de sangre equiparados por edad, sexo, uso de drogas por vía parenteral e historia previa de transfusiones, detectamos una prevalencia de positividad anti-VHC del 11,5% en los pacientes diabéticos frente al 2,5% de la población control ($p < 0,001$; razón de odds 4,39, IC 95%: 2,61-7,24) ⁵⁷. En este estudio, además de ser el primero en el que se controlaron los principales factores para adquirir la infección por el VHC, se descartó la posibilidad de que los pacientes diabéticos tuvieran una mayor prevalencia de infección por el VHC debido a un mayor número de ingresos hospitalarios, intervenciones quirúrgicas o instrumentalización médica asociada a sus complicaciones tardías. Además, en los pacientes diabéticos anti-VHC positivos con antecedentes de transfusión, ésta siempre fue anterior al diagnóstico de la diabetes.

Todo ello nos hizo proponer la hipótesis de que la infección por VHC favorecería el desarrollo de la diabetes. Apoyando esta hipótesis, estudios posteriores han demostrado que cuando se intenta establecer una relación cronológica entre la infección por VHC y el diagnóstico de diabetes, el probable factor de riesgo para el contagio del VHC precede al descubrimiento de la diabetes en el 52-74% de los casos^{59, 63}. Al mismo tiempo, a diferencia del VHC, no encontramos mayor frecuencia de

Tabla 1. Estudios que evalúan la prevalencia de anticuerpos frente al VHC en la población diabética.

	DM (n)	ANTI-VHC (+)	CONTROL (n)	ANTI-VHC (+)	p
Özyilkan et al, 1994 ⁵⁵	100 - 25 tipo 1 - 75 tipo 2	8 % - 0% - 10,6%	-	-	-
Gray et al, 1995 ⁵⁶	200 tipo 2	7,5 %	-	-	-
Simó et al, 1996 ⁵⁷	176 - 60 tipo 1 - 116 tipo 2	11,5 % - 6,6% - 12,1%	6172	2,5 %	<0,001
Rudoni et al, 1999 ⁵⁸	259 - 45 tipo 1 - 214 tipo 2	3,09 % - 0 % - 3,73 %	14100	0,04 %	<0,001
Mason et al, 1999 ⁵⁹	596 [†]	4,2%	377	1,6 %	0,02
Sotiropoulos et al, 1999 ⁶⁰	423 - 30 tipo 1 - 393 tipo 2	1,65 % - 0 % - 1,78 %	-	-	-
Ryu et al, 2001 ⁶¹	627 [†]	2,1 %	-	-	-
Okan et al, 2002 ⁶²	692 tipo 2	7,5%	1014	0,1%	<0,0001

[†] : no se detalla el porcentaje de DM tipo 1 ni DM tipo 2. **DM**: diabetes mellitus.

infección por el virus de la hepatitis B, que comparte similares vías de transmisión con el VHC, en los pacientes diabéticos en comparación con la población general ⁶⁴, observación confirmada posteriormente en otros estudios ^{59, 61, 62, 65}.

Además de la importancia epidemiológica de los estudios referidos en la Tabla 1, de ellos se desprende que ante una elevación de las transaminasas en un paciente diabético debe descartarse siempre una infección por el VHC.

1.3.- PREVALENCIA DE DIABETES EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR EL VHC.

En el año 2000, dentro del estudio NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*) se realizó un amplio estudio transversal ⁶⁵ que incluyó a 9841 individuos mayores de 20 años, de los que 1242 (8,37%) eran pacientes diabéticos tipo 2 y 230 (2,14%) eran sujetos infectados por el VHC. Se observó que la prevalencia de diabetes era mayor en los pacientes anti-VHC (+) que en los sujetos anti-VHC (-) para cada franja de edad a partir de los 40 años. De forma global, las personas mayores de 40 años tenían una probabilidad 3 veces superior de tener una DM tipo 2 si presentaban una infección por el VHC. Además, como en el 15-20% de los sujetos infectados no se cronifica la infección a pesar de que la determinación de los anticuerpos contra el VHC resulta positiva ^{36, 37}, se evaluó también a un subgrupo de 230 pacientes anti-VHC (+) en los que se había determinado el RNA del virus y los resultados fueron similares: el riesgo de tener una diabetes de los pacientes RNA-VHC (+) era de 2,48, frente al 0,98 de los pacientes RNA-VHC (-) ⁶⁶. Otro estudio transversal, en el que se incluyeron 2327 individuos mayores de 35 años, observó también una probabilidad tres veces superior de tener una diabetes en los pacientes anti-VHC (+) en comparación con los sujetos anti-VHC (-) en la franja de edad entre 35 y 49 años ⁶⁷. Estos datos apoyarían la hipótesis de que la infección por el VHC favorecería el desarrollo de la diabetes.

Diversos estudios han evaluado la prevalencia de diabetes en pacientes con infección por el VHC y la han comparado con la que existe en otras enfermedades hepáticas. En este tipo de estudios es fundamental tener en cuenta el grado de lesión histológica, dado que la incidencia de diabetes se correlaciona directamente con la severidad de la hepatopatía ^{68,69}. Sin embargo, en muchos trabajos no se ha tenido en cuenta esta variable de confusión y se han evaluado de forma conjunta pacientes con diversos grados de lesión histológica ^{59, 70-73}. En las Tablas 2 y 3 se resumen los resultados de los estudios en los que se han considerado por separado pacientes con hepatitis crónica y pacientes con cirrosis hepática. Sólo dos estudios han evaluado la prevalencia de diabetes tanto en los pacientes con hepatitis crónica como en los pacientes cirróticos ^{59, 74}.

En la Tabla 2 puede observarse que la prevalencia de diabetes en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC oscila entre el 4,9% y el 33% ^{59, 61, 63, 74}, y es siempre superior a la que se observa en pacientes con otras enfermedades hepáticas.

Tabla 2. Prevalencia de DM tipo 2 en la hepatitis crónica por VHC.

	VHC (n)	Diabetes	Grupo Control (n)	Diabetes	p
Mangia et al, 1998 ⁷⁴ [†,Φ]	102	4,9 %	22 VHB 14 OH	0% 0%	* *
Mason et al, 1999 ⁵⁹ [‡,Φ]	212	18,4 %	144 VHB	9,7 %	0,02
Knobler et al, 2000 ⁶³ [†,Φ]	45	33 %	88 VHB	12 %	0,004
Ryu et al, 2001 ⁶¹ [‡,Ψ]	68	23,5 %	157 VHB	8,2%	0,002

Criterio diagnóstico de diabetes: [†] glucemia basal > 126 mg/dl; [‡] glucemia basal > 140 mg/dl. Criterio diagnóstico hepatitis crónica: [Φ] por biopsia hepática; [Ψ] no específica. * : no se realiza comparación estadística con el grupo control. OH: hepatopatía enólica; VHB: infección crónica por el VHB.

Como es lógico, la prevalencia de diabetes en los pacientes cirróticos es mayor que en los que presentan hepatitis crónica y en los pacientes infectados por el VHC oscila entre el 19% y el 50% (Tabla 3). Sin embargo, en este caso, las diferencias entre las prevalencias de diabetes entre VHC (+) y otras hepatopatías no son tan claras como en el caso de la hepatitis crónica. A diferencia de lo que ocurre en la hepatitis crónica, el número de estudios en los que se comunica una mayor prevalencia de diabetes en los pacientes VHC (+)^{59, 75-79} es similar al de los que no encuentran diferencias con los pacientes con cirrosis de otra etiología^{61, 74, 80, 81}.

Existen algunos estudios en los que se ha intentado relacionar a los genotipos del VHC con una distinta prevalencia de diabetes. Mason *et al*⁵⁹ y Knobler *et al*⁶³ comunicaron mayor potencial diabetógeno para los genotipos 2a y 1b respectivamente, mientras que Hui *et al*⁸² asocian el genotipo 3 con una menor resistencia a la insulina en sujetos infectados por el VHC no diabéticos. Sin embargo, otros autores han observado una distribución similar de los genotipos entre los pacientes VHC (+) con y sin diabetes⁸³⁻⁸⁵. La principal limitación de estos trabajos es el reducido número de pacientes diabéticos que incluyen, que oscila entre 12⁸³ y 23⁸⁵. Este pequeño tamaño de la muestra condiciona la disparidad de los resultados e impide realizar un análisis estadístico que permita extraer conclusiones definitivas. Recientemente se ha comunicado que el genotipo 3 del VHC se relaciona con un mayor grado de esteatosis hepática^{86, 87}. Sin embargo, estos estudios no evalúan la asociación entre este hallazgo, el control glucémico y la resistencia a la insulina.

En resumen, aunque parece existir una relación entre la infección crónica por el VHC y la DM tipo 2 en los pacientes con hepatitis crónica, los resultados no son tan evidentes cuando se analiza la cirrosis. La falta de uniformidad de los estudios en cuanto a los criterios diagnósticos, tanto de la diabetes como del grado de lesión hepática, así como la no consideración de otras variables que pueden influir en la aparición de diabetes (ej: edad e índice de masa corporal) contribuyen, sin duda, a que

la posible relación entre la infección por el VHC y la diabetes sea todavía un tema controvertido.

Tabla 3. Prevalencia de DM tipo 2 en la cirrosis por VHC.

	VHC (n)	Diabetes	Grupo control (n)	Diabetes	p
Allison <i>et al</i>, 1994 ⁷⁵ [Ψ , \S , δ]	34	50 %	66 VHC (-)	9 %	<0,0001
Olmo <i>et al</i>, 1996 ⁸⁰ [Φ]	112	23,3 %	75 OH 51 VHB	25,3 % 27,5 %	ns ns
Guerrero <i>et al</i>, 1998 ⁷⁶ [\ddagger , δ]	28	28,6 %	47 VHC (-)	10,6 %	< 0,05
Mangia <i>et al</i>, 1998 ⁷⁴ [\dagger]	157	34,3 %	38 VHB 49 OH	31,5 % 28,5 %	ns ns
Mason <i>et al</i>, 1999 ⁵⁹ [\ddagger]	145	33,1 %	88 VHB	20,5 %	0,04
Caronia <i>et al</i>, 1999 ⁷⁷ [Φ]	1151	23,6%	181 VHB	9,4%	0,0002
Zein <i>et al</i>, 2000 ⁸³ [\ddagger , \S]	64	25%	78 CLD 53 OH	1,3% 19%	0,0001 0,36
Bigam <i>et al</i>, 2000 ⁷⁸ [\dagger , \S]	110	29%	53 VHB 115 CLD	6% 4%	<0,001 <0,001
Garrido <i>et al</i>, 2001 ⁷⁹ [\dagger , δ]	50	36%	50 VHC (-)	18 %	< 0,05
Ryu <i>et al</i>, 2001 ⁶¹ [\ddagger]	28	25%	102 VHB 43 OH	13,7% 30,2%	0,07 ns
Thuluvath <i>et al</i>, 2003 ⁸¹ [\dagger , \S , δ]	97	19,6%	194 VHC (-)	11,5%	0,06

Criterio diagnóstico de diabetes: [\dagger] glucemia basal > 126 mg/dl; [\ddagger] glucemia basal > 140 mg/dl; [Φ] requerimiento de hipoglucemiantes orales o insulina; [Ψ] glucemia basal > 216 mg/dl. [\S] pacientes en situación de pretransplante hepático. [δ] grupos equiparados por edad, sexo y estadios de Child-Pugh. OH: hepatopatía enólica; VHB: infección crónica por el VHB; CLD: enfermedad colostásica.

1.4.- MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS POR LOS QUE EL VHC FAVORECERÍA EL DESARROLLO DE DIABETES.

Los mecanismos específicos responsables del desarrollo de diabetes en los pacientes infectados por el VHC todavía se desconocen. Entre los potenciales mecanismos involucrados podrían incluirse la disfunción de la célula beta pancreática, mediada o no por fenómenos autoinmunitarios, y/o un aumento de la resistencia a la insulina.

1.4.1.- Disfunción de la célula beta.

Autoinmunidad contra la célula beta. El VHC se asocia a manifestaciones extrahepáticas de origen autoinmunitario, como la glomerulonefritis membranoproliferativa ⁴⁸ y la crioglobulinemia mixta esencial ⁴⁷, que están causadas por el depósito de inmunocomplejos en los vasos de pequeño y mediano calibre ^{47, 48}. Además, una región de la secuencia de aminoácidos del VHC muestra gran homología con la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), uno de los principales antígenos de los islotes pancreáticos ⁸⁸. Por ello, previamente analizamos si la infección por el VHC desencadenaba una respuesta autoinmunitaria contra las células beta pancreática. Sin embargo, no detectamos mayor prevalencia de autoanticuerpos contra la célula beta (ICA, antiGAD, IA2) en los sujetos con infección por el VHC respecto a la población general, por lo que concluimos que la mayor prevalencia de diabetes en los pacientes VHC (+) no se explicaría por la presencia de fenómenos autoinmunitarios ⁸⁹. De forma similar, otros autores tampoco han detectado un incremento de marcadores inmunológicos contra la célula beta en los pacientes con infección crónica por el VHC ^{59, 63, 71}.

Lesión directa de la célula beta no mediada por autoanticuerpos. Aunque el VHC afecta principalmente al hígado ⁹⁰, la demostración en otros tejidos de la replicación viral confirma que es capaz de infectar también otros órganos. Así, se ha podido detectar su replicación en múltiples localizaciones extrahepáticas como células

mononucleares⁹¹, nódulos linfáticos, cerebro, glándula adrenal, corazón, riñón, intestino, tiroides, médula ósea, bazo y también en páncreas⁹²⁻⁹⁴. Concretamente en el páncreas se ha detectado la replicación activa del VHC en las células acinares del páncreas exocrino y en las células epiteliales de los conductos pancreáticos⁹³. Sin embargo, si bien es posible que el VHC pueda infectar también la célula beta pancreática e interferir así en la síntesis y la secreción de insulina, la replicación del VHC en el páncreas endocrino aún no ha podido ser confirmada⁹³.

1.4.2.- Aumento de la resistencia a la insulina.

Es lógico pensar que en la infección por el VHC se produce un aumento de la resistencia a la insulina, ya que se trata de un proceso infeccioso que además produce una lesión hepática^{95,96}. Sin embargo, deben existir algunos mecanismos específicos asociados a la infección por VHC que condicionen una mayor prevalencia de diabetes que la observada en otras hepatopatías. En este sentido existen datos que nos permiten especular que la producción de citocinas proinflamatorias y el aumento de los depósitos de hierro podrían ser responsables del mayor potencial diabetógeno del VHC.

Citocinas proinflamatorias. Es bien conocido que la resistencia a la insulina se asocia a un aumento de la actividad proinflamatoria, con elevación de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6)⁹⁷⁻¹⁰². El TNF- α favorece la fosforilación de la serina del sustrato 1 del receptor de la insulina, disminuyendo así la actividad tirosinasa de este receptor^{103, 104}, y su expresión se relaciona directamente con la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia^{105, 106}. El TNF- α ejerce su efecto biológico a través de la interacción con dos tipos de receptores que se expresan en la membrana celular, tipo 1 (TNFR1 ó p55) y tipo 2 (TNFR2 ó p75)¹⁰⁷. Estos receptores pueden circular también como proteínas solubles tras desligarse proteolíticamente su dominio extracelular (sTNFR1 y sTNFR2)^{108, 109}. La cuantificación

en plasma de los dos receptores constituye el mejor indicador de la activación global del sistema, al tener una vida media más prolongada, unos niveles plasmáticos más elevados y una menor variabilidad que el TNF- α ¹¹⁰⁻¹¹³. Por su parte, la IL-6 es una citocina multifuncional, producida por una gran variedad de tipos celulares, incluyendo el sistema inmune, los hepatocitos y el tejido adiposo ^{114, 115}, que media tanto en la reacción inflamatoria como en la respuesta inducida por el estrés ¹¹⁴. La IL-6 favorece la insulín-resistencia a través de la inhibición de la transcripción del transportador de glucosa GLUT-4, del sustrato 1 del receptor de insulina y del receptor de la activación de la proliferación de los peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) ^{116, 117}. Los niveles circulantes de IL-6 se relacionan con la resistencia a la insulina en los seres humanos ^{102, 106, 118-120} y predicen el riesgo de desarrollar una DM tipo 2 ¹⁰³.

En pacientes con infección crónica por el VHC se han detectado mayores concentraciones tanto de TNF- α ¹²¹⁻¹²³ como de sus receptores solubles, sTNFR1 y sTNFR2 ¹²¹⁻¹²⁴, y también de IL-6 ^{125, 126} en comparación con la población general. Además, se ha relacionado la concentración de estas citocinas con el grado de severidad de la lesión hepática ^{122-125, 127-130}. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha evaluado la relación entre TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 e IL-6 con la resistencia a la insulina y/o la diabetes en los pacientes infectados por el VHC en comparación con pacientes con otras enfermedades hepáticas.

Aumento de los depósitos de hierro. Otro posible mecanismo por el que el VHC podría favorecer la aparición de una diabetes es a través del aumento de los depósitos de hierro. Es bien conocido que el aumento de estos depósitos, como ocurre en la hemocromatosis ¹³¹⁻¹³³ o tras la administración parenteral de hierro en modelos animales ^{134, 135} se asocia a la aparición de diabetes. En la población general la ferritina se correlaciona estrechamente con los depósitos de hierro ^{136, 137} y se ha demostrado

que el aumento de la concentración de ferritina se relaciona con un mayor riesgo para desarrollar una diabetes ¹³⁸⁻¹⁴¹. Así, se ha llegado a proponer a la ferritina como otro componente más del síndrome de resistencia a la insulina ¹⁴²⁻¹⁴⁴. De hecho, se ha demostrado que las sangrías mejoran la resistencia a la insulina en pacientes con DM tipo 2 ^{145, 146}. Asimismo, también se ha evidenciado mejoría del control glucémico en pacientes con DM tipo 2 y ferritina elevada tras el tratamiento con desferoxamina ¹⁴⁷.

En los pacientes con infección crónica por el VHC también se ha observado un incremento de los niveles plasmáticos de ferritina ^{79, 148-152}, y la concentración intrahepática de hierro se ha relacionado de forma directa con el grado de fibrosis hepática ¹⁵³. Por tanto, se podría especular que el aumento de los depósitos de hierro sería uno de los mecanismos por los que el VHC facilitaría el desarrollo de diabetes. Con esta hipótesis, nuestro grupo realizó en el año 2000 un estudio piloto caso-control para investigar si la mayor prevalencia de diabetes observada en los pacientes infectados por el VHC estaba asociada a un aumento de la ferritina ¹⁵⁴. Para ello evaluamos a 123 pacientes anti-VHC (+) (55 diabéticos y 68 no diabéticos) y observamos que la concentración de ferritina sérica era significativamente mayor en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos (205 ng/ml [14-861] vs. 58 ng/ml [15-494]; $p < 0,0001$). De este estudio concluimos que los niveles de ferritina estaban relacionados con la presencia de diabetes en los pacientes infectados por el VHC. En concordancia con estos resultados, en el estudio NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*) también se observaron niveles de ferritina más elevados en los pacientes infectados por el VHC que presentaban una DM tipo 2 en comparación con los no diabéticos, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ¹⁵⁵.

Aunque estos estudios sugieren que el aumento de los depósitos de hierro es un mecanismo que explicaría la mayor prevalencia de diabetes en los sujetos infectados por el VHC, también podría ser que la diabetes fuera un factor más importante en el aumento de los niveles de ferritina que la propia infección por el VHC.

En este sentido, hay que tener en cuenta que si bien la ferritina es un buen reflejo de los depósitos de hierro en la población general ^{136, 137}, podría no ser así en los pacientes diabéticos. Como es bien conocido, la ferritina se comporta como un reactante de fase aguda ¹⁵⁶ y existe cada vez más evidencia de que la inflamación desempeña un papel fundamental en la etiopatogenia de la DM tipo 2 ^{99, 157}. En este sentido, varios estudios han demostrado un aumento de la concentración sérica de ferritina en los pacientes con DM tipo 2 ^{138, 139, 158, 159}. Por otra parte, estudios autópsicos no han demostrado un mayor depósito hepático de hierro en los pacientes con DM tipo 2 que en los sujetos no diabéticos ¹⁶⁰. Por tanto, el aumento de ferritina que se detecta en la población diabética podría atribuirse más al proceso inflamatorio subyacente que a un aumento de los depósitos de hierro. Para poder demostrar esta hipótesis debería realizarse un estudio que analizara la relación entre los depósitos hepáticos de hierro y los niveles de ferritina en población diabética y controles sanos. Sin embargo, ello comportaría la realización de biopsias hepáticas a población sin hepatopatía y, por tanto, difícilmente podría ser aprobado por ningún Comité Ético. Otra manera de abordar el problema es determinar los receptores solubles de la transferrina (sTfR).

El receptor de la transferrina (TfR) es un receptor de membrana con una alta afinidad para la transferrina, que es la principal proteína de transporte del hierro ¹⁶¹. Cuando la transferrina se une al TfR se produce un complejo de membrana que es internalizado por endocitosis y liberado en el citosol, para que el hierro pueda emplearse en la síntesis de constituyentes celulares esenciales ^{162, 163}. La síntesis de los TfR y de la ferritina están reguladas de forma recíproca a nivel post-transcripcional en función de la concentración intracelular de hierro ¹⁶³. Durante el proceso de endocitosis, una parte del complejo se libera a la circulación sistémica, dando lugar a la fracción soluble de los TfR (sTfR). Esta fracción puede cuantificarse en el suero y es proporcional a la concentración de los TfR expresados a nivel de la membrana celular ¹⁶⁴. La concentración sérica de sTfR está estrechamente relacionada con la demanda

celular de hierro y, en consecuencia, a mayores concentraciones de ferritina menor concentración del sTfR y viceversa ¹⁶⁵. Así, se han detectado niveles disminuidos de sTfR en los pacientes con hemocromatosis y elevados en los sujetos con ferropenia ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Además, es importante mencionar que la concentración del sTfR, al contrario que la ferritina, no se comporta como un reactante de fase aguda ¹⁶⁹, por lo que se considera un buen índice para estimar los depósitos de hierro en pacientes con procesos inflamatorios ¹⁷⁰. Por este motivo, la determinación del sTfR nos permitirá evaluar si el incremento de los niveles séricos de ferritina detectados en la DM tipo 2 reflejan un verdadero aumento de los depósitos de hierro o, si por el contrario, son un reflejo del proceso inflamatorio subyacente que existe en la diabetes ¹⁵⁷. Hasta el momento los sTfR sólo han sido evaluados en la DM tipo 1 con el objetivo de estudiar su utilidad en el diagnóstico del déficit de hierro en los pacientes con gastritis atrófica asociada ¹⁷¹.

2.- OBJETIVOS

1.- Analizar la prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en los pacientes con infección crónica por el VHC y compararla con la que presentan los pacientes con otras enfermedades hepáticas, considerando el grado de lesión hepática y los genotipos del VHC en el análisis de los resultados.

2.- Evaluar los mecanismos etiopatogénicos por los que el VHC puede favorecer el desarrollo de diabetes.

3.- Analizar si el aumento de ferritina que existe en los pacientes infectados por el VHC es debido a la propia infección por el VHC o, si por el contrario, puede atribuirse a la mayor prevalencia de diabetes en estos pacientes.

4.- Determinar, mediante el análisis de los sTfR, si la concentración de ferritina en los pacientes diabéticos tipo 2 es un buen indicador de los depósitos de hierro.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Casuística y sistemática de trabajo.

A fin de obtener resultados valorables que permitan alcanzar los objetivos planteados se han efectuado cuatro estudios por separado, con el calendario que se muestra en la Figura 3.

En todos los estudios los pacientes fueron informados de los propósitos y metodología del estudio, y aceptaron libre y voluntariamente su participación. Estos estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

3.1.1.- Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.

Entre Junio del 2000 y Diciembre del 2001 se incluyeron un total de 642 pacientes que acudieron de forma consecutiva, los lunes y martes de cada semana, a las consultas externas de la Unidad de Hepatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Los pacientes se dividieron en dos grupos en función de la presencia o no de anticuerpos anti-VHC: anti-VHC positivo (n = 498) y anti-VHC negativo (n = 144). Las características clínicas de los 642 pacientes incluidos en el estudio se recogen en la Tabla 4. Se consideraron criterios de exclusión los siguientes:

- a) Tratamiento con corticoides o haber recibido tratamiento con interferón.
- b) DM tipo 1.
- c) Pancreatitis crónica o neoplasia pancreática.
- d) Enolismo mayor de 50 gr de alcohol diarios.
- e) Enfermedad hepática atribuible a más de una etiología.
- f) Infección concomitante en el momento de la inclusión o evidencia de

cualquier enfermedad crónica a excepción de la hepática y la diabetes.

g) Hemocromatosis.

Para evaluar la prevalencia de las alteraciones hidrocarbonadas se siguieron los criterios recomendados por el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes ¹⁷², que se fundamentan en la determinación de la glucemia basal. A fin de averiguar si la prevalencia de diabetes podía incrementarse tras la práctica de una sobrecarga oral de glucosa (SOG), a los primeros 50 pacientes anti-VHC positivo con hepatitis crónica y sin criterios de diabetes según el valor de la glucemia basal se les realizó una SOG. Otros 50 pacientes con hepatitis crónica anti-VHC negativo y no

Tabla 4. Principales características clínicas de los 642 pacientes incluidos en el estudio.

	ANTI-VHC (+) n = 498	ANTI-VHC (-) n= 144	p
Edad media (años ± DE)	52,9 ± 14,1	54,7 ± 15,2	n.s.
Hombre / Mujer (%)	45 / 55	51 / 49	n.s.
IMC (Kg / m²)	25,8 ± 4,2	26,2 ± 5,3	n.s.
Hepatitis crónica, n (%)	380 (76,3 %)	92 (63,9 %)	n.s.
Cirrosis, n (%)	118 (23,7 %)	52 (36,1 %)	n.s.
Etiología primaria (n)			
Infección VHC	498	-	
Alcohólica	-	46	
Infección VHB	-	33	
Esteatosis / esteatohepatitis	-	29	
Hepatitis crónica autoinmune	-	15	
Cirrosis biliar primaria	-	14	
Criptogenética	-	7	

IMC: índice de masa corporal; **VHC:** virus hepatitis C; **VHB:** virus hepatitis B

diabéticos según los criterios arriba mencionados, equiparados por edad, índice de masa corporal y sexo, que accedieron a realizar una SOG, se seleccionaron como grupo control. Las características clínicas de estos 100 pacientes se recogen en la Tabla 5.

El genotipo del VHC se determinó en 259 de los 498 pacientes (52%) con infección crónica por el VHC. Para el análisis de los resultados se excluyeron los pacientes en los que coexistían dos o más genotipos (n=12).

Tabla 5. Principales características clínicas de los 100 pacientes que realizaron un test de tolerancia oral a la glucosa.

	ANTI- VHC (+) n = 50	ANTI-VHC (-) n = 50	p
Edad (años)	56 ± 11	54 ± 14	n.s.
Hombre/Mujer (%)	22 / 28	19 / 31	n.s.
IMC (Kg / m ²)	25,5 ± 4,9	27,6 ± 5,1	n.s.

IMC: índice de masa corporal.

La hemocromatosis se descartó mediante el estudio de las mutaciones His63Asp y Cys282Tyr del gen de la hemocromatosis (ver Metodología de laboratorio) en los pacientes infectados por el VHC o por un índice de saturación de transferrina superior al 45% en el resto ¹⁷³.

3.1.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y los pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas.

Entre Julio del 2002 y Diciembre del 2002 se realizó un estudio caso-control que incluyó a 14 pacientes anti-VHC negativo, no diabéticos y con el diagnóstico histológico de hepatitis crónica. Por cada paciente anti-VHC negativo se escogieron dos pacientes anti-VHC positivo (n=28) de nuestra base de datos, equiparados por todas las características que pueden influir en la resistencia a la insulina, como la edad, el sexo, la glucemia basal, el índice de masa corporal (IMC), el índice cintura-

Tabla 6. Principales características clínicas de los 42 pacientes incluidos en el estudio.

	ANTI- VHC (+) n = 28	ANTI-VHC (-) n = 14	p
Edad (años)	48,54 ± 11,64	48,43 ± 14,34	n.s.
Hombre/Mujer (n)	10 / 18	5 / 9	n.s.
Glucosa (mg/dl)	94,91 ± 8,50	92,52 ± 11,23	n.s.
IMC (Kg/m²)	25,88 ± 3,21	25,89 ± 4,30	n.s.
ICC	0,84 ± 0,06	0,85 ± 0,08	n.s.
A. F. de Diabetes (%)	25,00 (7/28)	21,4 (3/14)	n.s.
AST (UI/l)	37,42 ± 14,48	38,57 ± 15,68	n.s.
ALT (UI/l)	52,19 ± 27,59	58,79 ± 36,75	n.s.
Triglicéridos (mg/dl)	78,0 (46-207)	100,5 (39-195)	n.s.
Etiología primaria (n)			
Infección VHC	28	-	
Esteatosis / esteatohepatitis	-	5	
Infección VHB	-	4	
Criptogenética	-	3	
Hepatitis crónica autoinmune	-	1	
Cirrosis biliar primaria	-	1	

IMC: índice de masa corporal; **ICC:** índice cintura cadera; **AST:** aspartato aminotransferasa; **ALT:** alanino aminotransferasa.

cadera (ICC) y los antecedentes familiares de diabetes. Los dos grupos fueron también equiparados por los niveles de transaminasas y de triglicéridos. Las características clínicas de los dos grupos se muestran en la Tabla 6.

A los pacientes de ambos grupos se les determinaron los niveles de citocinas proinflamatorias relacionadas con la resistencia a la insulina (TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 y IL-6). También se les evaluó la resistencia y la secreción de insulina mediante pruebas funcionales que se detallan en el punto 3.2.5. Se consideraron los mismos criterios de exclusión que en el apartado anterior.

3.1.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.

Entre Enero de 2001 y Abril de 2002 se incluyeron de forma consecutiva un total de 634 pacientes que acudieron de forma programada a las consultas externas de la Sección de Endocrinología (Grupo B) y de la Unidad de Hepatología (Grupos A y C) del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Los 634 sujetos se clasificaron en 4 grupos en función de la presencia o no de anticuerpos anti-VHC y de DM tipo 2: Grupo A (anti-VHC positivo y DM tipo 2), Grupo B (anti-VHC negativo y DM tipo 2), Grupo C (anti-VHC positivo y no diabético) y Grupo D (anti-VHC negativo y no diabético). Los sujetos del grupo D eran las parejas o familiares de los pacientes incluidos en el grupo B. Las características clínicas de los pacientes en función del grupo se detallan en la Tabla 7. Para este estudio, se consideraron como criterios de exclusión los siguientes:

- a) Mujeres premenopáusicas.
- b) Episodio hemorrágico en los 6 meses previos a la inclusión.
- c) Ferritina < 10 ng/ml en las mujeres y < 20 ng/ml en los hombres.
- d) Tratamiento con hierro, corticoides o interferón en los doce meses previos a la inclusión.
- e) DM tipo 1.

- f) Enolismo mayor de 50 gr. de alcohol diarios.
- g) Cirrosis hepática.
- h) Pancreatitis crónica o neoplasia pancreática.
- i) Enfermedad hepática atribuible a más de una etiología.
- j) Infección concomitante en el momento de la inclusión o evidencia de cualquier enfermedad crónica a excepción de la diabetes.
- k) Hemocromatosis.

La hemocromatosis se descartó mediante el estudio de las mutaciones His63Asp y Cys282Tyr del gen de la hemocromatosis (ver Metodología de laboratorio) en los pacientes infectados por el VHC (Grupos A y C) o por un índice de saturación de transferrina superior al 45% en el resto (Grupos B y D) ¹⁷³.

Tabla 7. Principales características clínicas y parámetros de laboratorio de los 634 pacientes incluidos en el estudio.

	Grupo A Anti-VHC (+) con diabetes mellitus	Grupo B Anti-VHC (-) con diabetes mellitus	Grupo C Anti-VHC (+) sin diabetes mellitus	Grupo D Anti-VHC (-) sin diabetes mellitus
n	53	242	191	148
Edad (años)	62,9 ± 9,8	64 ± 11	56 ± 13	55 ± 14
Hombre/Mujer (%)	50 / 50	46,2 / 53,8	46,8 / 53,2	42,7 / 57,3
IMC (Kg/m²)	25,7 ± 4,1	31,5 ± 6,9	25,7 ± 4,3	28,1 ± 5,3
Glucosa (mg/dl)	158 ± 55	167 ± 58	93 ± 10	96 ± 9
Fructosamina (mg/dl)	394 ± 114	353 ± 77	-	-
HbA1c (%)	8,4 ± 1,6	8,9 ± 1,6	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,3
AST (U/l)	65 ± 40	19 ± 9	50 ± 41	22 ± 9
ALT (U/l)	83 ± 60	23 ± 14	72 ± 71	25 ± 17
GGT (U/l)	70 ± 49	33 ± 39	40 ± 49	39 ± 50

IMC: índice de masa corporal; **HbA1c:** hemoglobina glucosilada; **AST:** aspartato aminotransferasa; **ALT:** alanino aminotransferasa; **GGT:** gammaglutamil transpeptidasa.

Además, en el análisis de los resultados, consideramos como una concentración elevada de ferritina la correspondiente al tercil superior del grupo control. Es decir, una concentración de ferritina ≥ 158 ng/ml en los hombres y ≥ 72 ng/ml en las mujeres.

3.1.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en los pacientes diabéticos tipo 2.

Entre Enero y Marzo del 2003 se incluyeron un total de 84 pacientes con DM tipo 2 que acudieron de forma consecutiva (los siete primeros pacientes de cada martes) a las consultas externas de la Sección de Endocrinología del Hospital Vall d'Hebron. Como grupo control se seleccionaron 60 individuos presuntamente sanos entre el personal laboral del hospital o sus familiares equiparados por edad y sexo. Las características clínicas de los pacientes en función del grupo se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Principales características clínicas y parámetros de laboratorio de los 144 sujetos incluidos en el estudio.

	Pacientes diabéticos n = 84	Grupo control n = 60	p
Edad (años)	60,7 \pm 12	57,9 \pm 13	0,11
Hombre / Mujer (n)	38 / 46	26 / 34	0,48
IMC (Kg / m ²)	31,6 \pm 6,2	28 \pm 6,4	0,04
Duración diabetes (años)	12,7 \pm 8	-	-
HbA1c (%)	8,6 \pm 1,95	-	-
Tratamiento con insulina (%)	54,7	-	-
Complicaciones diabetes (%)	50	-	-

IMC: índice de masa corporal; **HbA1c:** hemoglobina glucosilada. Tratamiento con insulina: se incluyen pacientes en tratamiento combinado con hipoglucemiantes orales. Complicaciones de la diabetes: retinopatía, nefropatía y/o neuropatía.

Se consideraron criterios de exclusión los siguientes:

- a) Episodio hemorrágico en los 6 meses previos a la inclusión.
- b) Ferritina < 10 ng/ml en las mujeres y < 20 ng/ml en los hombres.
- c) Tratamiento con hierro en los 12 meses previos a la inclusión.
- d) DM tipo 1.
- e) Enolismo mayor de 50 gr. de alcohol diarios.
- f) Infección concomitante en el momento de la inclusión o evidencia de cualquier enfermedad crónica a excepción de la diabetes.
- g) Hemocromatosis.

3.2.- Metodología clínica.

3.2.1.- Criterios diagnósticos de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y de las complicaciones de la diabetes.

El diagnóstico de diabetes méllitus se estableció en base a la anamnesis dirigida. Se consideró que el paciente presentaba una DM tipo 1, y por tanto era excluido del estudio, cuando existía historia previa de cetoacidosis y/o inicio del tratamiento con insulina antes de los 30 años. Así pues, basándose en la información clínica, todos los pacientes incluidos en los distintos estudios pueden considerarse como diabéticos tipo 2. En todos los pacientes no diagnosticados previamente de diabetes, se utilizaron los criterios diagnósticos recomendados por el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes ¹⁷², y aceptados por la Organización Mundial de la Salud ¹⁷⁴. El principal cambio en relación con los criterios previos es la disminución del valor de glucemia basal en ayunas para el diagnóstico de DM tipo 2, pasando de 140 a 126 mg/dl, y la introducción de una nueva categoría diagnóstica, la glucemia anómala en ayunas (*impaired fasting glucose*, IFG) ¹⁷⁵, considerada un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes y enfermedad vascular ¹⁷⁶. Los criterios diagnósticos son los siguientes:

DM: - Síntomas de DM y una glucemia al azar ≥ 200 mg/dl,
- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl.

IFG: - Glucemia plasmática en ayunas entre 110 y 125 mg/dl.

La glucemia debe confirmarse en una segunda ocasión si resulta patológica, que en todos los casos incluidos en el estudio se realizó en un plazo no superior a los 6 meses.

Los 100 pacientes del punto 3.1.1. en los que se realizó la sobrecarga oral de glucosa (SOG) fueron citados por vía telefónica al Laboratorio de Hormonas del Hospital Vall d'Hebron, al que acudieron entre las 8:30 y 9:30 horas. Tras confirmar mediante entrevista que habían completado una noche de ayuno, se realizó una extracción basal y se les dió a beber, en un máximo de 5 minutos, una solución preparada con 75 gr de glucosa disueltos en un volumen de 200 ml (Glucomedics-75[®] Sabor Naranja, Biomedics, S.L., Madrid, España). Se repitieron las extracciones a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Durante las 2 horas que dura la prueba el paciente permanece sentado o acostado, sin tomar alimentos, fumar ni beber (excepto agua). Los criterios diagnósticos de diabetes y de intolerancia oral a la glucosa (IOG) tras la sobrecarga de glucosa son los siguientes:

DM: - Glucemia plasmática a las 2 horas ≥ 200 mg/dl.

IOG: - Glucemia plasmática a las 2 horas entre 140 y 199 mg/dl.

En los pacientes diabéticos, la presencia de retinopatía se objetivó mediante oftalmoscopia con dilatación pupilar previa ⁹. El examen fue efectuado exclusivamente por oftalmólogos de la Sección de Retina de nuestro hospital. Para el estudio de la nefropatía determinamos la creatinina plasmática y la microalbuminuria en orina de 24

horas. La recogida de orina de 24 horas se efectuó en régimen domiciliario y siguiendo una actividad física normal. La ausencia de nefropatía se definió como la excreción urinaria de albúmina inferior a 20 $\mu\text{g}/\text{minuto}$. La presencia de nefropatía se clasificó como: nefropatía incipiente (excreción urinaria de albúmina entre 20-200 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ en al menos 2 de tres determinaciones efectuadas en el último año), nefropatía establecida (excreción urinaria de albúmina superior a 200 $\mu\text{g}/\text{minuto}$) y nefropatía establecida con insuficiencia renal (excreción urinaria de albúmina superior a 200 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ con creatinina plasmática mayor o igual a 1,4 mg/dl) ¹⁰. El diagnóstico de neuropatía clínica se efectuó siguiendo las recomendaciones del consenso de San Antonio ¹⁷⁷. Es decir, evidencia de síntomas o signos compatibles junto con la demostración objetiva mediante estudio neurofisiológico de afectación neurológica periférica no atribuible a otra etiología distinta a la diabetes mellitus.

La presencia de enfermedad macrovascular (cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y arteriopatía periférica) se obtuvo mediante revisión de la historia clínica, anamnesis dirigida y exploración física que incluía la práctica de un electrocardiograma en todos los casos.

3.2.2.- Clasificación del grado de lesión hepática: hepatitis crónica vs. cirrosis.

La cirrosis hepática se diagnosticó por biopsia hepática o por la presencia de signos clínicos de hipertensión portal (esplenomegalia, ascitis, varices esofágicas), hiperesplenismo (plaquetopenia, pancitopenia) y/o fallo hepatocelular (reducción del tiempo de protrombina, hipoalbuminemia).

El diagnóstico de hepatitis crónica se estableció mediante biopsia hepática en todos los pacientes con transaminasas elevadas (n=285) y en 91 de los 187 pacientes con transaminasas normales (AST y ALT inferiores al límite superior de normalidad en tres ocasiones) ¹⁷⁸. En los pacientes VHC (+) no biopsiados (n=96), se asumió el

diagnóstico de hepatitis crónica ya que las transaminasas y la ecografía abdominal fueron normales durante los siguientes 12 meses a la inclusión.

3.2.3.- Cálculo del índice de masa corporal, del índice cintura-cadera y del consumo de alcohol.

El índice de masa corporal (IMC) es el resultado del cociente entre el peso, expresado en kilogramos, y el cuadrado de la talla medida en centímetros (Kg/m^2). Este índice, aunque simple, tiene un gran valor epidemiológico. Según la Sociedad Española para el estudio de la Obesidad un IMC inferior a $18,5 \text{ Kg}/\text{m}^2$ equivale a un peso insuficiente, entre $18,5$ y $24,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$ a una situación de normopeso, entre 25 y $29,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$ a sobrepeso, entre 30 y $39,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$ a obesidad y un IMC igual o superior a $40 \text{ Kg}/\text{m}^2$ equivale a una obesidad mórbida ¹⁷⁹.

El índice cintura-cadera (ICC) se calculó mediante el cociente entre la circunferencia corporal medida al nivel de la cresta ilíaca y la circunferencia a nivel del trocánter mayor. Este índice permite valorar la distribución de la grasa corporal: un ICC superior a $1,0$ en el hombre y de $0,85$ en la mujer se asocia con una distribución central del tejido adiposo ¹⁸⁰ y se correlaciona estrechamente con el grado de insulinoresistencia ¹⁸¹.

El consumo de alcohol se calculó tras entrevista personal con cada paciente y se consideró que era significativo cuando era igual o superior a 50 gr. diarios. El cálculo de los gramos de alcohol consumidos se realiza con la siguiente fórmula: volumen (cc) x grados de alcohol x $0,8 / 100$. La constante de $0,8$ corresponde a la densidad del alcohol ¹⁸².

3.3.- Metodología de laboratorio.

3.3.1.- Extracción de las muestras de sangre, procesamiento y almacenamiento.

Para la obtención de suero se utilizaron tubos de 6 ml (BD Vacutainer, Plymouth, Reino Unido). Todas las muestras de sangre, a los 30 minutos de su

obtención, se centrifugaron a 1800 r.p.m. Posteriormente, toda la muestra de suero no utilizada para la determinación de los parámetros bioquímicos en fresco se dividió en alícuotas de 250 microlitros y se conservó inmediatamente a -80° centígrados hasta su procesamiento. Para la obtención de sangre total se utilizaron los mismos tubos.

3.3.2.- Determinaciones bioquímicas generales.

En suero se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: glucemia, fructosamina, creatinina, alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos. La glucosa se determinó mediante el método de la hexoquinasa (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania). La fructosamina se determinó mediante un test colorimétrico (Sentinel CH, Milan, Italia). La creatinina se determinó por el método de Jaffé (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania). El colesterol total y el colesterol HDL se determinaron siguiendo el método CHOD-PAP (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania) y los triglicéridos mediante el método GPO-PAP (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania). El colesterol LDL, cuando los triglicéridos eran menores de 300 mg/dl, se determinó aplicando la fórmula de Friedewald (colesterol LDL= colesterol total – colesterol HDL – (triglicéridos/5))¹⁸³ y, cuando los triglicéridos eran mayores de 300 mg/dl, por ultracentrifugación mediante una Ultracentrífuga Beckman L8-M (Beckman Instruments, USA).

La ALT y la AST se determinaron en suero siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania). La GGT se determinó mediante el método de Szasz (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania).

Las determinaciones de insulina y péptido-C también se realizaron en suero. La insulina se determinó mediante un método IRMA (INSI-CTK IRMA, DiaSorin Inc, Reutlinger, Alemania) y el péptido-C mediante un método RIA (C-PEP-RIA-CT, BioSource Europe S.A, Bélgica).

Las muestras de sangre total se utilizaron para la determinación de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) mediante cromatografía, del hemograma mediante las técnicas de laboratorio estándar utilizadas en nuestro hospital y de las mutaciones del gen de la hemocromatosis (ver apartado 3.3.7).

Todas las determinaciones arriba descritas se realizan de forma rutinaria en el Servicio de Bioquímica y en el Laboratorio de Hormonas de nuestro hospital, disponiendo ambos de la Certificación de Calidad ISO 9001:00.

3.3.3.- Diagnóstico de la infección por el VHC y detección del RNA-VHC.

El diagnóstico serológico de la infección por el VHC se realizó mediante la detección de los anticuerpos IgG frente al VHC utilizando un test de enzimoimmunoanálisis de segunda generación (Abbot Laboratories, Chicago, USA). Para confirmar el diagnóstico de infección por el VHC, todas las muestras de suero anti-VHC positivas fueron también analizadas utilizando una prueba de immunoblot (LIA-HCV-3, Sorin Biomedica, Saluggia, Italia). Además, en los sujetos con transaminasas normales, la infección activa por el VHC se confirmó mediante la detección del RNA del virus (Amplicor™, Roche, Molecular Systems, New Jersey, USA) o durante el genotipage del VHC.

3.3.4.- Estudio de los genotipos del VHC.

El genotipage del VHC se realizó por amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de la región del core del RNA, y la posterior hibridación de ese fragmento con los oligonucleótidos específicos de cada genotipo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (HCV Genotyping, DNA Enzyme Immunoassay, DiaSorin, Italia). Esta técnica está diseñada para reconocer los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 y 6 del VHC.

3.3.5.- Evaluación de la resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se ha calculado utilizando el *homeostasis model assessment* (HOMA) ¹⁸⁴, que considera las concentraciones plasmáticas basales de glucosa (mg/dl) e insulina (mU/l), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA} = [(\text{glucemia} / 18) \times \text{insulina}] / 22,5$$

El cálculo de la resistencia insulínica mediante el HOMA se correlaciona estrechamente con el clamp euglicémico hiperinsulinémico, que es el método considerado de referencia ^{185, 186}. Además, a diferencia del clamp, es un método no invasivo y más económico, por lo que se considera de elección para el estudio de grandes poblaciones.

3.3.6.- Evaluación de la secreción de insulina.

La secreción pancreática de insulina se evaluó mediante la respuesta del péptido C a la ingesta de una comida estándar y a la prueba de estimulación con glucagón intravenoso. Se han escogido estas dos pruebas porque presentan una alta reproducibilidad en sus resultados ^{187, 188}. Además, la ingesta de una comida estándar permite valorar de forma integrada la función de la célula beta y el efecto de las hormonas gastrointestinales del eje enteroinsular sobre la secreción de insulina ^{189,190}.

Ambas pruebas se realizaron en un intervalo máximo de 2 semanas. Los pacientes acudieron al Laboratorio de Hormonas del Hospital Vall d'Hebron, entre las 8:30 y 9:30 horas y, tras confirmar mediante entrevista que habían completado un mínimo de 8 horas de ayuno, se colocó un catéter en la vena antecubital y se realizó una extracción basal. Para la prueba de estimulación mediante la ingesta de una comida estándar se les dió a tomar 200 ml de una comida semilíquida estandarizada en un máximo de 10 minutos (Fortisip[®], NUTRICIA, S.A., Madrid, España). Tras completar la ingesta se repitieron las extracciones a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos.

Durante las 2 horas que dura la prueba el paciente permaneció sentado, sin tomar alimentos, fumar ni beber (excepto agua).

Para la prueba del glucagón intravenoso, tras confirmar mediante entrevista que el sujeto había completado una noche de ayuno, se colocó un catéter en la vena antecubital, se realizó una extracción basal y se inyectó 1 mg de glucagón biosintético (Glugacon-Gen Hypokit[®], Novo Nordisk Pharma, S.A., Bagsvaerd, Dinamarca) por vía intravenosa. Las extracciones se repitieron a los 5 y 15 minutos.

El cálculo del área bajo la curva de la secreción de insulina y péptido C en estas pruebas funcionales se realizó mediante el paquete informático GW-Basic 3.22 (Copyright Microsoft 1987) para Windows.

3.3.7.- Estudio de los parámetros del metabolismo del hierro y de las mutaciones del gen de la hemocromatosis.

Los parámetros séricos utilizados para evaluar los depósitos de hierro han sido la ferritina, la transferrina, la sideremia, el índice de saturación de transferrina (IST) y el receptor soluble de la transferrina (sTfR). Tanto la ferritina como la transferrina se determinaron mediante una prueba inmunoturbidimétrica (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Alemania). La sideremia se determinó mediante un test colorimétrico siguiendo el método TPTZ (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Alemania). El IST se calculó mediante la siguiente fórmula: $[\text{sideremia} \times 70,9] / \text{transferrina}$. El sTfR se determinó mediante nefelometría (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania).

Para excluir a los pacientes con hemocromatosis, y así evitar un posible sesgo en el análisis de los resultados, se realizó un estudio de las mutaciones His63Asp y Cys282Tyr del gen de la hemocromatosis (HFE). Este estudio se realizó basándose en la técnica descrita por Bollhalder *et al*¹⁹¹ utilizando una muestra de sangre total con anticoagulante EDTA. El método consiste en la amplificación por PCR a tiempo real de dos fragmentos de los exones 2 y 4 del HFE a partir de ADN de los linfocitos. El proceso de amplificación y la posterior detección de las mutaciones se realiza

mediante curvas de fusión en el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Alemania).

3.3.8.- Estudio de los marcadores inflamatorios relacionados con la resistencia a la insulina.

Las determinación de los niveles de TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 y de IL-6 se realizó en muestras de suero utilizando una técnica cuantitativa de inmunoensayo no competitiva (Quantikine^R, R&D Systems Europe, Abingdon Lane, Reino Unido). En la tabla 9 están representados los coeficientes de variación intraensayo e interensayo de cada una de los marcadores inflamatorios estudiados.

Tabla 9. Coeficientes de variación intraensayo e interensayo en la determinación de los marcadores inflamatorios estudiados.

		INTRAENSAYO			INTERENSAYO		
TNF- α	Concentración (pg/ml)	48,1	317	587	45,8	301	587
	Desviación estándar	2,5	13,2	27,1	3,4	13,7	31,6
	CV (%)	5,2	4,2	4,6	7,4	4,6	5,4
sTNFR1	Concentración (pg/ml)	54	263	355	54,8	252	356
	Desviación estándar	3,7	7,6	9,7	4,8	9,3	20,6
	CV (%)	6,9	2,9	2,7	8,8	3,7	5,8
sTNFR2	Concentración (pg/ml)	102	201	452	89,8	197	444
	Desviación estándar	2,5	5,0	7,2	4,6	6,9	16,2
	CV (%)	2,5	2,5	1,6	5,1	3,5	3,6
IL-6	Concentración (pg/ml)	16,8	97,7	186	17,2	101	191
	Desviación estándar	0,7	1,6	3,8	1,1	3,3	7,2
	CV (%)	4,2	1,6	2,0	6,4	3,3	3,8

CV: coeficiente de variación; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; **sTNFR1:** receptor soluble tipo 1 del TNF- α ; **sTNFR2:** receptor soluble tipo 2 del TNF- α ; **IL-6:** interleucina 6.

3.4.- Análisis estadístico

Para evaluar si las variables continuas seguían una distribución normal se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En caso de que las variables no siguieran una distribución normal, se procedió a su transformación logarítmica decimal (ej. ferritina, sTfR, ALT, AST, GGT, triglicéridos y péptido C) para conseguir que su distribución fuese similar a la normal y utilizar test paramétricos. Los resultados de las variables distribuidas normalmente se expresan como media \pm DE, y las que siguen una distribución asimétrica se expresan como mediana (rango). La comparación de las variables continuas entre los distintos grupos de estudio se realizó mediante la prueba t-Student (2 grupos) y ANOVA (3 ó más grupos). Las variables categóricas se compararon mediante el test de χ^2 . Para estudiar la existencia de correlación entre dos variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. El estudio multivariante se realizó mediante análisis de regresión logística o de regresión múltiple por el método *stepwise* en función de las características de la variable dependiente estudiada (categórica o continua, respectivamente).

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete informático SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. La significación estadística se aceptó ante una $p < 0,05$.

4.- RESULTADOS

4.1. Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.

La prevalencia de las alteraciones hidrocarbonadas, diabetes y glucemia anómala en ayunas (IFG), en los grupos anti-VHC positivo y negativo se muestra en la -Tabla 10. Considerando de forma global a todos los pacientes (n=642), la diabetes resultó ser más prevalente en los pacientes con infección crónica por el VHC (23%) que en los pacientes con otras enfermedades hepáticas (18%), si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la prevalencia de IFG sí fue significativamente superior en los pacientes anti-VHC positivo que en los anti-VHC negativo (14% vs. 6%, $p=0,007$). Al considerar de forma conjunta ambas categorías diagnósticas, es decir, la diabetes y la IFG, las diferencias fueron estadísticamente significativas (37% vs. 24%, $p=0,005$).

En la cohorte de pacientes con hepatitis crónica, tanto la diabetes como la IFG fueron significativamente más prevalentes en los pacientes anti-VHC positivo que en los anti-VHC negativo (17% vs. 7%, $p=0,03$ y 15% vs. 5%, $p=0,009$, respectivamente). Además, cuando se evaluó sólo a los pacientes con hepatitis crónica y transaminasas normales, las diferencias continuaron siendo estadísticamente significativas (IFG + DM: 24,5% vs. 5%, $p=0,003$). Por el contrario, en los pacientes con cirrosis, a pesar de que tanto la diabetes como la IFG resultaron ser más prevalentes en los pacientes anti-VHC positivo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En el análisis de regresión logística se demostró que la infección por el VHC se relaciona de forma independiente con las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en el total de los pacientes y en los sujetos con hepatitis crónica (Tabla 11). El riesgo relativo para la infección por el VHC fue de 2,26 (IC 95%: 1,47-3,70) cuando todos los pacientes fueron incluidos, y de 4,26 (IC 95%: 2,03-8,93) en los

pacientes con hepatitis crónica. Por el contrario, el VHC no apareció como un predictor independiente de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en los pacientes con cirrosis.

Tabla 10. Prevalencia de las alteraciones hidrocarbonadas en los pacientes anti-VHC positivo y negativo, de forma global, en la hepatitis crónica, en la cirrosis hepática y en aquellos con hepatitis crónica y transaminasas normales.

	ANTI-HCV (+)	ANTI-HCV (-)	p
TODOS LOS PACIENTES	n = 498	n = 144	
Diabetes	23 %	18 %	0,19
IFG	14 %	6 %	0,007
IFG + Diabetes	37 %	24 %	0,005
HEPATITIS CRÓNICA Y TRANSAMINASAS NORMALES	n = 147	n = 40	
Diabetes	14,3 %	5 %	0,08
IFG	10,2 %	0 %	0,02
IFG + Diabetes	24,5 %	5 %	0,003
HEPATITIS CRÓNICA	n = 380	n = 92	
Diabetes	17 %	7 %	0,03
IFG	15 %	5 %	0,009
IFG + Diabetes	32 %	12 %	0,0003
CIRROSIS	n = 118	n = 52	
Diabetes	40 %	36 %	0,45
IFG	12 %	7 %	0,32
IFG + Diabetes	52 %	43 %	0,30

IFG: glucemia anómala en ayunas.

Tabla 11. Análisis de regresión logística considerando la presencia de anti-VHC, el grado de lesión hepática, el sexo, el IMC, la edad y los triglicéridos como variables independientes y la presencia de alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (diabetes o IFG) como variable dependiente. Valor predictivo del modelo: 76% (todos los pacientes), 75% (pacientes con hepatitis crónica) y 80% (pacientes con cirrosis hepática).

	p	OR (95% IC)
TODOS LOS PACIENTES (n = 642)		
Anti-VHC (negativo/positivo)	0,001	2,26 (1,47-3,70)
Grado de lesión hepática (hepatitis crónica/cirrosis)	0,005	1,86 (1,21-2,86)
Sexo (hombre/mujer)	0,022	1,56 (1,07-2,29)
IMC (Kg / m ²)	0,002	1,11 (1,04-1,19)
Edad (años)	0,000	1,06 (1,05-1,07)
Triglicéridos (>1.7 mmol/L)	n.s.	-
HEPATITIS CRÓNICA (n = 472)		
Anti-VHC (negativo/positivo)	0,000	4,26 (2,03-8,93)
Sexo (hombre/mujer)	0,002	2,16 (1,33-3,49)
IMC (Kg / m ²)	0,005	1,12 (1,04-1,22)
Edad (años)	0,000	1,07 (1,04-1,08)
Triglicéridos (>1.7 mmol/L)	n.s.	-
CIRROSIS (n = 170)		
Anti-VHC (negativo/positivo)	n.s.	-
Sexo (hombre/mujer)	n.s.	-
IMC (Kg / m ²)	0,047	1,15 (1-1,33)
Edad (años)	0,002	1,05 (1,02-1,08)
Triglicéridos (>1.7 mmol/L)	n.s.	-

IMC: índice de masa corporal.

Los resultados de la SOG, realizada en el subgrupo de 100 pacientes con hepatitis crónica en los que la diabetes no había sido diagnosticada previamente

mediante la glucemia plasmática en ayunas, se muestran en la tabla 12. La SOG permitió el diagnóstico de un 18% más de nuevos casos de diabetes y de un 30% más de IOG en los pacientes anti-VHC positivo, cifras significativamente superiores a las obtenidas en los pacientes anti-VHC negativo ($p=0,02$ y $p=0,04$, respectivamente).

Tabla 12. Prevalencia de diabetes y IOG tras la sobrecarga oral de glucosa en pacientes con hepatitis crónica en los que la diabetes no fue diagnosticada mediante la glucemia plasmática en ayunas.

	ANTI- VHC (+)	ANTI-VHC (-)	p
	n = 50	n = 50	
Diabetes (%)	18	4	0,02
IOG (%)	30	18	0,04

IOG: intolerancia oral a la glucosa.

La distribución de los genotipos observada en nuestro estudio fue la siguiente: 207 pacientes con genotipo 1 (83,8%), 12 pacientes con genotipo 2 (4,8%), 18 pacientes con genotipo 3 (7,3%) y 10 pacientes con genotipo 4 (4%). No se

Tabla 13. Distribución de los genotipos del VHC y prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en el total de los pacientes evaluados (n=247) y en los pacientes con hepatitis crónica (n=207).

	n (%)	EDAD	ALTERACIONES DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO	
			Total pacientes	Hepatitis crónica
Genotipo 1	207 (83,8%)	55 ± 14	39,1 %	20 %
Genotipo 2	12 (4,8%)	51 ± 14	33 %	14,3 %
Genotipo 3	18 (7,3%)	43 ± 12	16 %	20 %
Genotipo 4	10 (4%)	40,2 ± 10,9	33 %	22,2 %

observaron diferencias en la prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado entre estos 4 genotipos (genotipo 1: 39,1%, genotipo 2: 33%, genotipo 3: 16%, genotipo 4: 33%, $\chi^2 = \text{n.s.}$). Cuando se consideró sólo a los pacientes con hepatitis crónica, la prevalencia se igualó aún más en todos los grupos (20%, 14,3%, 20% y 22,2%, respectivamente, $\chi^2 = \text{n.s.}$) (Tabla 13).

4.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas.

Los pacientes anti-VHC positivo presentaron unos niveles de insulinemia basal y unos valores de resistencia a la insulina, calculada mediante el HOMA, significativamente superiores a los pacientes anti-VHC negativo. Los niveles de péptido C fueron también significativamente superiores en los pacientes anti-VHC positivo (Tabla 14). Al evaluar los marcadores inflamatorios relacionados con la resistencia a la insulina, los pacientes anti-VHC positivo presentaron unos valores significativamente superiores de TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 e IL-6 en comparación con los pacientes anti-VHC negativo.

En las figuras 4-6 se representan las curvas de glucosa, péptido C e insulina obtenidas tras la estimulación de la célula beta mediante la administración de 1 mg de glucagón endovenoso y tras la ingesta de una comida estándar. En las tablas 15 y 16 se muestran los valores medios y la desviación estándar o rango. Como puede observarse los niveles de glucemia alcanzados los dos grupos en ambas pruebas fue similar. Sin embargo, los pacientes anti-VHC positivos alcanzaron valores de insulinemia y péptido C significativamente más elevados en diversos puntos.

Tabla 14. Resultados del HOMA, insulinemia, péptido C y niveles circulantes de citocinas proinflamatorias en los dos grupos de pacientes estudiados.

	ANTI-VHC (+)	ANTI-VHC (-)	
	n=28	n=14	p
Insulina (mU/l)	19,04 ± 9,43	11,04 ± 6,96	0,008
HOMA	4,47 ± 2,23	2,58 ± 1,74	0,009
Péptido C (ng/ml)	3,80 (1,20-8,00)	2,25 (1,70-7,10)	0,038
TNF-α (pg/ml)	6,47 ± 3,44	2,71 ± 3,06	0,007
sTNFR1 (pg/ml)	173,95 ± 34,73	149,41 ± 27,06	0,040
sTNFR2 (pg/ml)	299,91 ± 78,55	241,75 ± 81,55	0,046
IL-6 (pg/ml)	3,78 ± 1,45	2,07 ± 1,02	0,002

HOMA: homeostasis model assessment; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; **sTNFR1:** receptor soluble tipo 1 del TNF- α ; **sTNFR2:** receptor soluble tipo 2 del TNF- α ; **IL-6:** interleucina 6

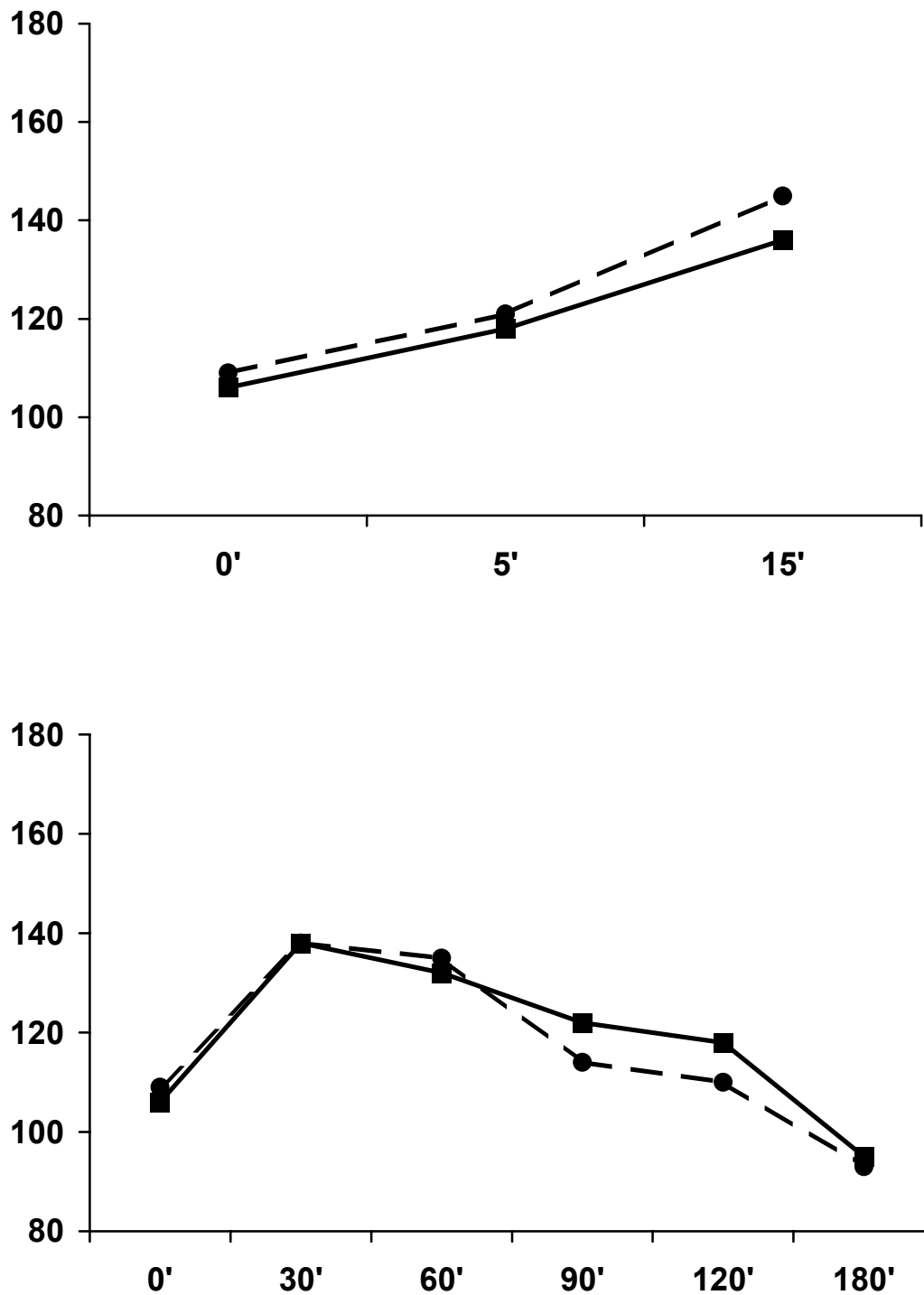


Figura 4. Curva de glucosa obtenida con los niveles medios de glucosa (mg/dl) durante la prueba de estimulación de la célula beta pancreática con 1 mg de glucagón ev (figura superior) y tras la ingesta de una comida estándar (figura inferior). ■: pacientes anti-VHC (+); ●: pacientes anti-VHC (-).

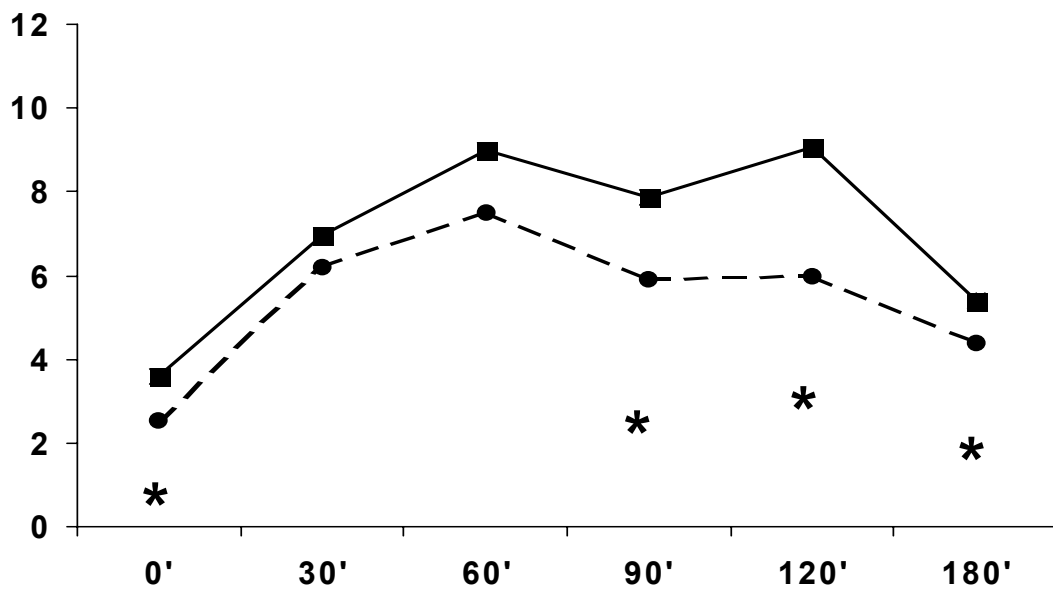
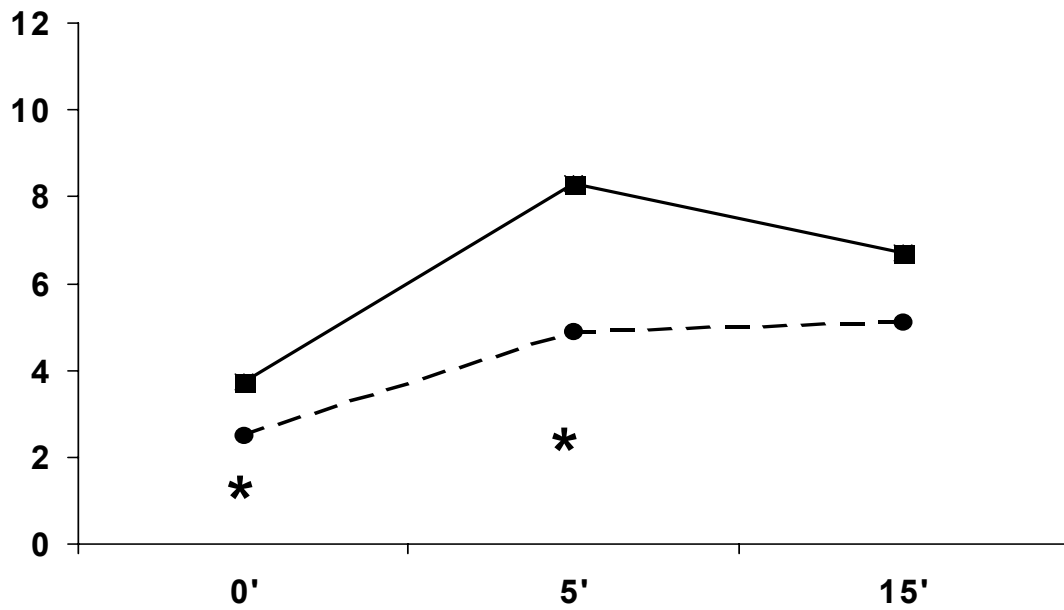


Figura 5. Curva de péptido C obtenida con los niveles medios de péptido C (ng/ml) durante la prueba de estimulación de la célula beta pancreática con 1 mg de glucagón ev (figura superior) y tras la ingesta de una comida estándar (figura inferior). ■: pacientes anti-VHC (+); ●: pacientes anti-VHC (-); * : $p < 0,05$.

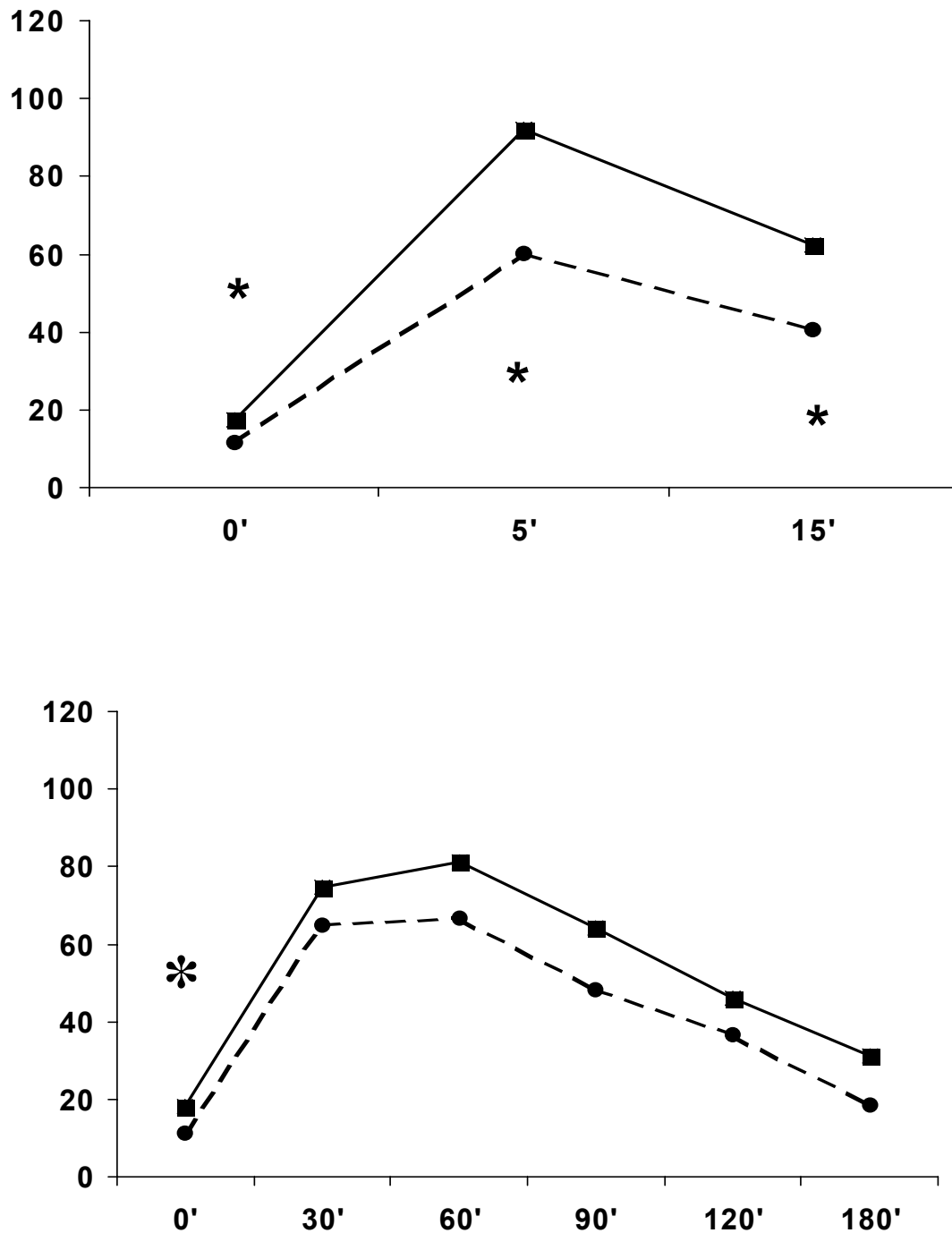


Figura 6. Curva de insulina obtenida con los valores medios de insulina (mU/l) durante la prueba de estimulación de la célula beta pancreática con 1 mg de glucagón ev (figura superior) y tras la ingesta de una comida estándar (figura inferior). ■: pacientes anti-VHC (+); ●: pacientes anti-VHC (-); * : $p < 0,05$.

Tabla 15. Niveles de glucosa, péptido C e insulina plasmáticos obtenidos durante la estimulación de la célula beta pancreática con 1 mg de glucagón ev.

		ANTI-VHC (+) n = 28	ANTI-VHC (-) n = 14	p
Glucosa (mg/dl)	0'	107,64 ± 9,11	108,78 ± 15,76	0,817
	5'	119,14 ± 9,09	121,92 ± 17,59	0,607
	15'	136,71 ± 16,85	144,71 ± 23,40	0,309
Péptido C (ng/ml)	0'	3,75 (1,2-8,00)	2,50 (1,80-7,10)	0,030
	5'	8,30 (4,10-26,20)	4,90 (3,30-14,90)	0,012
	15'	6,70 (2,20-15,80)	5,10 (2,60-62,50)	0,317
Insulina (mU/l)	0'	17,30 ± 8,74	11,77 ± 7,37	0,049
	5'	92,20 ± 43,50	60,01 ± 34,64	0,048
	15'	62,18 ± 32,84	40,44 ± 22,10	0,050

Valores expresados media ± DE en mediana (rango).

Tabla 16. Niveles de glucosa, péptido C e insulina obtenidos durante la estimulación de la célula beta pancreática tras la ingesta de una comida estándar.

		ANTI-VHC (+) n = 28	ANTI-VHC (-) n = 14	p
Glucosa (mg/dl)	0'	106,07 ± 14,71	109,85 ± 14,98	0,515
	30'	138,92 ± 25,77	138,21 ± 25,72	0,944
	60'	132,46 ± 28,70	135,78 ± 37,17	0,798
	90'	122,69 ± 38,08	114,42 ± 31,35	0,543
	120'	118,46 ± 29,41	110,21 ± 36,45	0,526
	180'	95,92 ± 14,27	93,92 ± 22,12	0,785
Péptido C (ng/ml)	0'	3,40 (2,00-6,20)	2,55 (1,17-4,30)	0,030
	30'	6,95 (5,20-15,20)	6,05 (1,48-22,50)	0,094
	60'	9,00 (6,30-19,10)	7,50 (0,50-20,70)	0,067
	90'	7,85 (5,10-20,90)	5,85 (0,86-12,40)	0,025
	120'	9,05 (3,10-19,30)	6,00 (3,10-9,20)	0,010
	180'	5,40 (2,30-9,20)	4,37 (2,00-7,10)	0,034
Insulina (mU/l)	0'	18,20 ± 9,04	11,26 ± 7,90	0,019
	30'	74,71 ± 49,78	65,06 ± 36,96	0,580
	60'	81,10 ± 41,66	66,68 ± 37,20	0,361
	90'	64,03 ± 47,25	48,21 ± 33,87	0,337
	120'	46,15 ± 24,02	36,47 ± 25,45	0,328
	180'	31,25 ± 37,28	18,44 ± 13,91	0,257

Valores expresados en media ± DE y mediana (rango).

4.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.

Los parámetros del metabolismo del hierro de los 634 pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 17. No se observaron diferencias significativas de estos parámetros entre los 4 grupos a excepción de la ferritina sérica (ANOVA: $p < 0,01$). Los niveles de ferritina en los sujetos anti-VHC positivo con DM tipo 2 (Grupo A) fueron significativamente superiores a los hallados en los otros tres grupos (A>B, $p < 0,01$; A>C, $p < 0,001$; A>D, $p < 0,001$). Los sujetos diabéticos sin infección por el VHC (Grupo B) mostraron mayor concentración de ferritina que los sujetos anti-VHC positivo sin diabetes (Grupo C) y que el grupo control (Grupo D) (B>C, $p < 0,001$; B>D, $p < 0,001$). Sin embargo, los sujetos anti-VHC positivo no diabéticos (Grupo C) presentaron unos niveles de ferritina sérica similar a la del grupo control (Grupo D) ($p = 0,8$).

Tabla 17. Parámetros relacionados con el metabolismo del hierro en los 4 grupos de pacientes incluidos en el estudio.

	Grupo A Anti-VHC (+) con diabetes mellitus	Grupo B Anti-VHC (-) con diabetes mellitus	Grupo C Anti-VHC (+) sin diabetes mellitus	Grupo D Anti-VHC (-) sin diabetes mellitus
N	53	242	191	148
Sideremia ($\mu\text{g/dl}$)	123 \pm 99	78 \pm 30	106 \pm 37	91,3 \pm 32
Transferrina (mg/dl)	287 \pm 54	235 \pm 38	281 \pm 48	247 \pm 44
IST (%)	38,7 \pm 16	34,2 \pm 14	38,1 \pm 14	38,1 \pm 16
Hemoglobina (g/dl)	14,3 \pm 3,7	13,6 \pm 1,3	14,3 \pm 1,2	13,8 \pm 1,4
Hematocrito (%)	42 \pm 4,2	40,3 \pm 3,7	42,2 \pm 4	40,7 \pm 3,7
Ferritina* (ng/ml)	184 (16-828)	111 (10-831)	85 (10-848)	91 (11-959)

IST: índice de saturación de transferrina. *Diferencias en las concentraciones de ferritina sérica entre los grupos: A>B ($p < 0,01$), A>C ($p < 0,001$), A>D ($p < 0,001$), B>C ($p < 0,001$), B>D ($p < 0,001$), y C=D ($p = 0,8$). No se han observado diferencias en los otros parámetros relacionados con el metabolismo del hierro entre los grupos. Unidades expresadas como media \pm DS o mediana (rango).

La relación por sexos entre la ferritina y las variables clínicas y de laboratorio en los pacientes infectados por el VHC (Grupos A y C) y en los sujetos diabéticos (Grupos A y B) se muestra en las tablas 18 y 19. En la infección crónica por el VHC la concentración elevada de ferritina se relacionó con una mayor glucemia basal, una mayor prevalencia de DM tipo 2 y unos niveles más elevados de transaminasas. Sin embargo, cuando evaluamos sólo a los sujetos infectados por el VHC sin diabetes

Tabla 18. Comparación de las variables clínicas y de laboratorio considerando los niveles de ferritina en los pacientes anti-VHC positivo (grupos A y C; n=244), y tras excluir a los pacientes diabéticos (grupo C; n=191).

	Hombres			Mujeres		
	Ferritina ≥158 ng/ml	Ferritina <158 ng/ml	p	Ferritina ≥ 72 ng/ml	Ferritina <72 ng/ml	p
Grupos A y C						
N (%)	51 (41)	72 (59)	-	61 (50)	60 (50)	-
Edad (años)	54 ± 13	53 ± 15	0,49	59 ± 11	56 ± 11	0,11
IMC (Kg / m ²)	25,1 ± 2,8	24,7 ± 3,7	0,50	26,2 ± 4,5	25,1 ± 4,93	0,40
Glucosa (mg/dl)	124 ± 47	100 ± 27	0,01	113 ± 48	98 ± 22	0,05
DM, n (%)	23 (45)	10 (14)	0,003	16 (26)	4 (7)	0,01
Triglicéridos (mg/dl)	87 (36-238)	83 (28-635)	0,48	87 (37-625)	88 (49-203)	0,64
AST (UI/l)	50 (15-233)	40 (11-138)	0,014	40 (15-311)	30 (14-148)	0,03
ALT (UI/l)	64 (19-425)	51 (10-349)	0,015	46 (9-360)	35 (11-289)	0,03
GGT (UI/l)	44 (11-187)	36 (11-126)	0,13	24 (13-455)	22 (6-77)	0,09
Grupo C						
N	39 (43)	51 (57)	-	45 (45)	56 (55)	-
Edad (años)	51 ± 13	49 ± 17	0,49	57 ± 11	55 ± 12	0,42
IMC (Kg / m ²)	25,1 ± 2,9	24,3 ± 4,2	0,55	25,8 ± 3,8	25,2 ± 5,4	0,69
Glucosa (mg/dl)	93 ± 8	90 ± 11	0,22	91 ± 9	93 ± 11	0,40
Triglicéridos (mg/dl)	84 (36-191)	84 (28-635)	0,78	78 (46-162)	85 (49-188)	0,12
AST (UI/l)	38 (15-91)	37 (11-138)	0,20	33 (15-311)	30 (15-141)	0,27
ALT (UI/l)	59 (19-123)	50 (18-349)	0,23	36 (9-360)	34 (15-289)	0,29
GGT (UI/l)	42 (17-134)	35 (11-109)	0,14	20 (13-455)	22 (6-67)	0,22

IMC: índice de masa corporal; **AST:** aspartato aminotransferasa; **ALT:** alanino aminotransferasa; **GGT:** gamma glutamiltransferasa. Resultados expresados como media ± DS o mediana (rango).

(Grupo C) la relación entre la ferritina y las transaminasas se perdió. En los pacientes diabéticos, la concentración elevada de ferritina se asoció con las transaminasas y con la presencia de infección por el VHC.

Tabla 19. Comparación de las variables clínicas y de laboratorio considerando los niveles de ferritina en los pacientes diabéticos (grupos A y B; n=295), y tras excluir a los pacientes infectados por el VHC (grupo B; n=242).

	Hombres			Mujeres		
	Ferritina ≥158 ng/ml	Ferritina <158 ng/ml	p	Ferritina ≥ 72 ng/ml	Ferritina < 72 ng/ml	p
Grupos A y B						
N (%)	79 (55)	64 (45)	-	90 (59)	62 (41)	-
Edad (años)	60 ± 10	61 ± 11	0,60	66 ± 8	67 ± 11	0,15
IMC (Kg / m ²)	28 ± 4	27 ± 4	0,11			0,96
Infección VHC, n (%)	23 (29)	10 (16)	0,04	16 (18)	4 (6)	0,03
Glucosa (mg/dl)	156 ± 52	157 ± 60	0,9	175 ± 56	174 ± 65	0,46
HbA1c (%)	9,2 ± 0,7	8,9 ± 0,4	0,43	9,6 ± 2	9,7 ± 1,2	0,70
Triglicéridos (mg/dl)	155(57-1300)	140(47-550)	0,32	143(37-625)	139(45-589)	0,67
AST (UI/l)	21 (9-233)	18 (11-111)	0,12	19 (10-153)	17 (10-97)	0,001
ALT (UI/l)	31 (11-425)	20 (9-124)	0,000	23 (7-168)	18 (7-56)	0,000
GGT (UI/l)	30 (11-239)	25 (9-360)	0,04	22 (7-219)	19 (8-77)	0,03
Grupo B						
N (%)	56 (50)	57 (50)	-	73 (56)	57 (44)	-
Edad (años)	60 ± 10	62 ± 11	0,12	65 ± 8	67 ± 11	0,13
IMC (Kg / m ²)	30 ± 4	27 ± 4	0,02	34 ± 7	34 ± 8	0,36
Glucosa (mg/dl)	152 ± 55	164 ± 59	0,30	175 ± 55	176 ± 66	0,89
HbA1c (%)	9,3 ± 2	9,0 ± 2	0,4	9,8 ± 2	9,7 ± 1.5	0,68
Triglicéridos (mg/dl)	175(57-1300)	142(57-435)	0,08	147(54-432)	145(45-589)	0,39
AST (UI/l)	18 (9-46)	17 (11-57)	0,69	18 (10-86)	17 (10-32)	0,04
ALT (UI/l)	22 (11-107)	18 (9-60)	0,01	20 (7-82)	17 (7-56)	0,02
GGT (UI/l)	27 (12-239)	23 (9-360)	0,15	20 (7-206)	19 (8-73)	0,06

IMC: índice de masa corporal; **AST:** aspartato aminotransferasa; **ALT:** alanino aminotransferasa; **GGT:** gamma glutamiltransferasa. Resultados expresados como media ± DS o mediana (rango).

En el análisis de regresión múltiple observamos que, además del sexo, los niveles de ALT y la presencia de diabetes eran variables independientemente

asociadas con las concentraciones séricas de ferritina (Tabla 20). Sin embargo, la presencia de infección por el VHC no se asoció con la concentración sérica de ferritina al considerar de forma global a todos los sujetos del estudio (Grupos A, B, C y D) ni al considerar sólo a los pacientes con diabetes (Grupos A y B).

Tabla 20. Variables independientemente asociadas con las concentraciones de ferritina en todos los sujetos (grupos A, B, C y D), en los pacientes anti-VHC positivo (grupos A y C) y en los pacientes diabéticos (grupos A y B).

	B	Std. Error	Beta	t	p
Todos los sujetos [†]					
Sexo (H/M)	-0,29	0,042	-0,362	-7,14	<0,0001
Diabetes (sí/no)	-0,26	0,048	-0,288	-5,36	<0,0001
ALT (log)	0,33	0,070	0,256	4,67	<0,0001
Constante	2,32	0,126		18,49	<0,0001
Pacientes anti-VHC positivo[‡]					
Sexo (H/M)	-0,29	0,064	-0,350	-4,65	<0,0001
Diabetes (sí/no)	-0,25	0,071	-0,266	-3,63	<0,0001
ALT (log)	0,24	0,109	0,168	2,20	0,028
Constante	2,49	0,277		8,99	<0,0001
Pacientes diabéticos [Φ]					
Sexo (H/M)	-0,37	0,061	-0,430	-6,098	<0,0001
ALT (log)	0,47	0,112	0,299	4,240	<0,0001
Constante	1,96	0,194		10,114	<0,0001

[†]: $R^2 = 0,52$. No entran en la ecuación: infección por el VHC (sí/no), edad, IMC, AST (log), GGT (log), triglicéridos (log). **[‡]:** $R^2 = 0,57$. No entran en la ecuación: edad, IMC, AST (log), GGT (log), triglicéridos (log). **[Φ]:** $R^2 = 0,58$. No entran en la ecuación: infección por el VHC (sí/no), edad, IMC, AST (log), GGT (log), glucosa, HbA1C, fructosamina, triglicéridos.

4.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.

Los parámetros del metabolismo del hierro en el grupo de pacientes con DM tipo 2 y en el grupo control se muestran en la Tabla 21. No se detectaron diferencias en los niveles de sideremia, transferrina ni IST entre los dos grupos, pero los pacientes diabéticos presentaban mayor concentración de ferritina sérica que el grupo control (114 ng/ml (12-831) vs. 74 ng/ml (11-697); $p=0,006$). Sin embargo, no existían diferencias en la concentración del sTfR entre los pacientes diabéticos y el grupo control [1,27 mg/l (0,69–2,47) vs. 1,24 mg/l (0,77-2,80), $p=0,24$].

Tabla 21. Parámetros de laboratorio de los 144 pacientes incluidos en el estudio.

	Pacientes diabéticos n = 84	Grupo control n = 60	p
Ferritina (ng/ml)	114 (12 – 831)	74 (11 – 697)	0,006
sTfR (mg/L)	1,27 (0,69 – 2,47)	1,24 (0,77 – 2,8)	0,24
Sideremia ($\mu\text{g/dl}$)	80,3 \pm 33,2	84,7 \pm 32	0,23
Transferrina (mg/dl)	239 \pm 40	245 \pm 44	0,12
IST (%)	37,1 \pm 16	35,3 \pm 14	0,48

sTfR: receptor soluble de la transferrina; **IST:** índice de saturación de la transferrina. Resultados expresados como mediana (rango) o media \pm DE.

En el grupo control detectamos una correlación negativa entre la ferritina y la concentración del sTfR, pero no en los pacientes diabéticos (Figura 7). Realizamos también un análisis de regresión múltiple para explorar las variables independientemente relacionadas con las concentraciones de ferritina en los pacientes diabéticos y en el grupo control (Tabla 22). Las variables consideradas en los sujetos control fueron la edad, el sexo y el sTfR, mientras que en los pacientes diabéticos también se incluyeron la HbA1c y la presencia de complicaciones tardías relacionadas

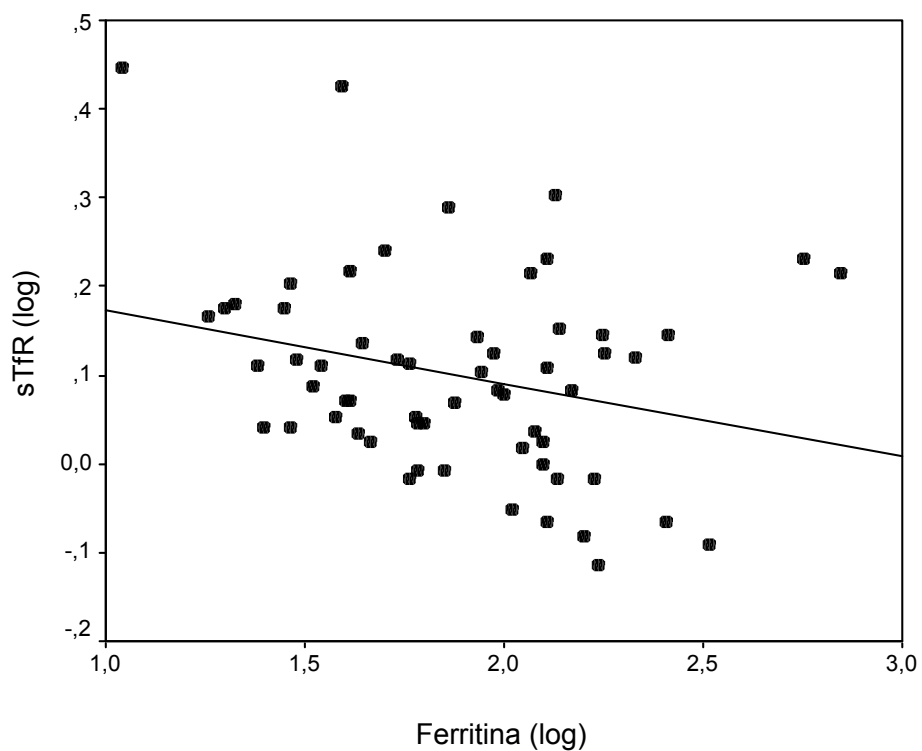
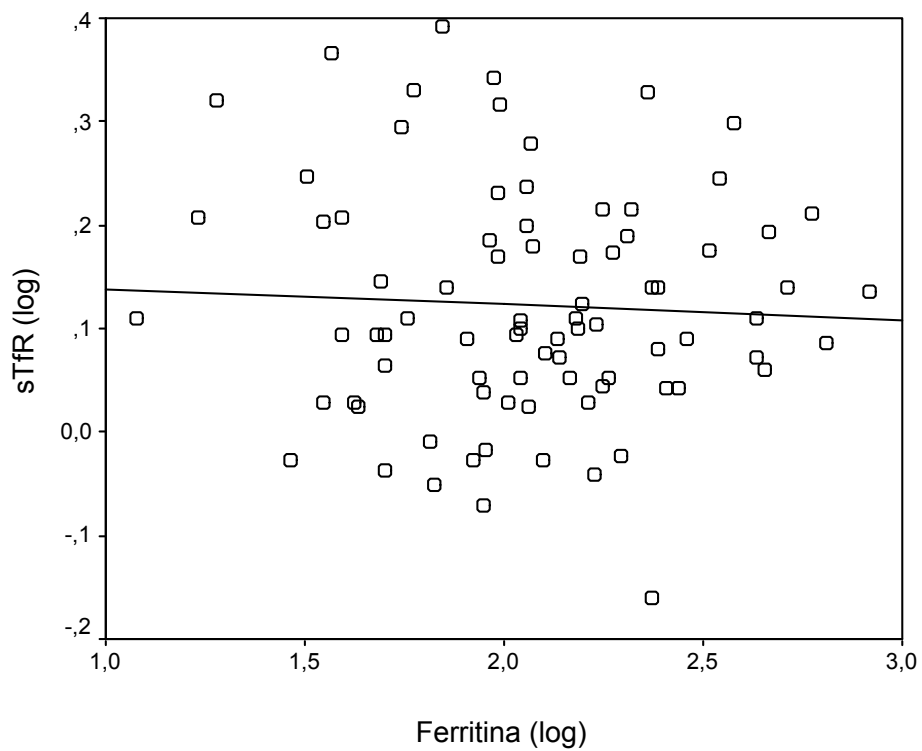


Figura 7. Correlación entre el sTfR (log) y la ferritina (log) en los sujetos con DM tipo 2 (O) [$r=-0,02$; $p=0,83$; $Y=0,153-0,015 \times \text{ferritina}(\log)$] y en el grupo control (●) [$r=-0,29$; $p=0,03$; $Y=0,255+0,082 \times \text{ferritina}(\log)$].

con la diabetes (retinopatía, nefropatía y/o neuropatía). En los sujetos control, la edad y el sexo se relacionaron de forma independiente con la ferritina. Además, y como era de esperar, la concentración de sTfR se asoció de forma inversa e independiente a la concentración de ferritina. Sin embargo, en los pacientes diabéticos sólo se observó relación entre la ferritina y el sexo (mayor en los varones) pero no con la edad ni con los sTfR.

Tabla 22. Análisis de regresión múltiple de las variables independientes asociadas con las concentraciones de ferritina en los pacientes diabéticos y en el grupo control.

	Variable dependiente: ferritina (log)					
	Pacientes diabéticos			Grupo control		
	β	T	p	β	T	p
Sexo (H/M)	-,4820	-5,236	<0,001	-,4693	-5,335	<0,001
Edad	-,1642	-1,349	0,18	,0079	2,46	0,02
sTfR (log)	,0572	0,483	0,63	-,76112	2,18	0,03
Complicaciones*	,0233	0,197	0,84	-	-	-
R²		0,61			0,65	

H: hombre; M: mujer; * Complicaciones tardías relacionadas con la diabetes (nefropatía, retinopatía y/o neuropatía).

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con infección crónica por el VHC considerando el grado de lesión hepática. Relación con el genotipo del VHC y comparación con la prevalencia detectada en otras enfermedades hepáticas.

Hasta la fecha, entre los trabajos que han evaluado la prevalencia de diabetes en pacientes con infección por el VHC, sólo dos han realizado un análisis multivariante considerando la etiología y el grado de lesión histológica como variables independientes. Los resultados han sido discordantes. Así, Mangia *et al*⁷⁴ observaron que en pacientes hospitalizados, la cirrosis, pero no la infección por el VHC, era la variable que se asociaba de forma independiente con la presencia de diabetes. Sin embargo, Mason *et al*⁵⁹ hallaron que era la infección por el VHC, pero no el grado de lesión histológica, la que se relacionaba de forma independiente con la diabetes. Además, cabe destacar la falta de uniformidad en cuanto a los criterios diagnósticos de la diabetes. Así, mientras que Mangia *et al*¹⁷² siguen los nuevos criterios de la ADA¹⁷² para el diagnóstico de la diabetes, Mason *et al*¹⁷⁵ utilizan los criterios de la OMS¹⁷⁵.

Nuestro estudio es el primero en el que además de la prevalencia de diabetes se evalúa también la de IFG en pacientes infectados por el VHC controlados de forma ambulatoria. Para analizar la frecuencia de alteraciones hidrocarbonadas en los pacientes con enfermedad hepática es fundamental tener en cuenta el grado de lesión histológica, dado que la incidencia de diabetes se correlaciona directamente con la severidad de la hepatopatía^{63, 68, 69}. En este sentido cabe destacar que, en el presente estudio, la amplia muestra de pacientes incluidos nos ha permitido determinar la prevalencia de estas alteraciones considerando por separado los pacientes con hepatitis crónica y los pacientes con cirrosis. Además, ambos grupos (hepatitis crónica y cirrosis) son similares con relación al sexo, la edad y el IMC.

Al evaluar a los pacientes con hepatitis crónica, hemos observado una prevalencia unas 3 veces superior de diabetes (17% vs. 7%, $p=0,03$) y de IFG (15%

vs. 5%, $p=0,009$) en los sujetos anti-VHC positivo frente a aquellos con otras enfermedades hepáticas. Sin embargo, en los sujetos con cirrosis, a pesar de que los pacientes anti-VHC positivo presentaban una mayor frecuencia de alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, al compararlos con los sujetos anti-VHC negativo, las diferencias no alcanzaban la significación estadística. Estos datos sugieren que los mecanismos por los que la infección por el VHC favorecería el desarrollo de la diabetes operarían ya en estadios iniciales de la enfermedad hepática. En este sentido, cabe destacar que en los pacientes con hepatitis crónica anti-VHC positivo y transaminasas normales, la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas detectada en nuestro estudio es 5 veces superior a la observada en los sujetos con hepatitis crónica anti-VHC negativo y transaminasas normales.

Transcurridos ya 15 años desde su identificación ¹⁸, el VHC se ha convertido en la principal causa de enfermedad hepática en la mayoría de países, y el 3% de la población mundial está infectada ¹³. En estudios recientes se ha puesto de manifiesto que el porcentaje de progresión hacia la enfermedad hepática avanzada es inferior al asumido previamente ^{40, 41, 42} y que sólo una minoría de individuos infectados va a desarrollar una enfermedad hepática progresiva y severa ³⁷. Así, Salomon *et al* ⁴² han estimado que la duración media entre la infección y el desarrollo de una cirrosis es de 46 años para los hombres infectados a la edad de 25 años, mientras que menos del 30% de las mujeres infectadas a la misma edad progresaran hasta la cirrosis, incluso tras más de 50 años de infección. De forma paralela, las actuales campañas sanitarias promueven la determinación de anti-VHC en los individuos con factores de riesgo para la infección, lo que favorece el diagnóstico de un gran número de casos clínicamente asintomáticos, aumentando así el grupo de sujetos con hepatitis crónica con menor grado de inflamación y fibrosis. Esta importante consideración debería tenerse en cuenta al elaborar las guías de tratamiento y la política sanitaria a seguir en los pacientes con infección crónica por el VHC. En este sentido, tanto la alta prevalencia de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado como la lenta progresión de la

enfermedad hepática sugieren que el despistaje de la diabetes debe realizarse de forma sistemática en los pacientes anti-VHC positivo, y que deben implementarse las medidas destinadas a conseguir los mismos objetivos terapéuticos que en los pacientes diabéticos anti-VHC negativo. Además, el alto porcentaje de nuevos casos de diabetes que hemos diagnosticado utilizando la SOG en el subgrupo de sujetos con hepatitis crónica sugiere que esta prueba debería ser recomendada en el cribaje de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en estos pacientes.

Si la infección por el VHC es la causa de la diabetes o, si por el contrario, los pacientes diabéticos están más predispuestos a adquirir la infección por el VHC ha sido una tema de debate en los últimos años. Nuestro grupo comunicó previamente la ausencia de factores de riesgo específicos que contribuyeran a explicar una mayor predisposición para adquirir la infección en la población diabética. Además, en los pacientes diabéticos anti-VHC positivo con antecedentes de transfusión, ésta siempre fue anterior al diagnóstico de la diabetes ⁵⁷. Recientemente, en el estudio NHANES III, el riesgo ajustado por edad de tener una DM tipo 2 en los sujetos anti-VHC positivo con positividad del RNA fue del 2,48 (95% IC: 1,23-5,01) comparado con el 0,98 en los que no se detectó el RNA ⁶², es decir, sujetos que habían estado en contacto con el virus pero en los que la infección no se había cronificado. En el presente estudio, hemos mostrado también que no sólo la diabetes sino también la IFG es más prevalente en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC. Además, al contrario que con el VHC, no parece que el virus de la hepatitis B se asocie a mayor prevalencia de diabetes ⁶⁴. En conjunto, estos hallazgos van en contra de la hipótesis de que la diabetes predispone a la infección por el VHC y, más bien señalan que es la propia infección por el VHC la que favorece el desarrollo de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. Así, es posible que la infección por el VHC contribuya de forma importante al incremento en la prevalencia de DM tipo 2 que se observa actualmente a nivel mundial ³. Además, cabe mencionar que la infección por el VHC incrementa el riesgo de desarrollar una DM tipo 2 principalmente en los individuos en los que

coexisten otros factores de riesgo asociados con el desarrollo de diabetes, como la obesidad, la edad avanzada ¹⁹³, los antecedentes familiares de diabetes ^{63, 84}, la raza afroamericana ⁸¹ y la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana ¹⁹⁴. En este último grupo de riesgo, por ejemplo, la alta prevalencia de coinfección por el VHC asociada al aumento de la supervivencia conseguida con la introducción de los fármacos antiretrovirales ha provocado un aumento de la incidencia de nuevos casos de diabetes ¹⁹⁴.

La relación entre los genotipos de VHC y la prevalencia de diabetes es un tema controvertido ^{58, 59, 63, 83-85}. Así, mientras Knobler *et al* ⁶³ sugieren que la diabetes es más prevalente en los individuos infectados por el genotipo 1b, Mason *et al* ⁵⁹ detectan mayor prevalencia del genotipo 2a entre los sujetos diabéticos. Sin embargo, cabe destacar que el mayor grupo de sujetos infectados por el VHC con diabetes evaluado en estos trabajos fue de 23 individuos ⁸⁵. En el presente estudio, hemos incluido un número de pacientes mucho mayor y no hemos observado diferencias en la prevalencia de las alteraciones hidrocarbonadas entre los principales genotipos. Sin embargo, llama la atención la menor prevalencia de estas alteraciones en los pacientes con el genotipo 3, resultado que concuerda con una observación reciente realizada por Hui *et al* ⁸² en el que los pacientes con el genotipo 3 presentan menores niveles de resistencia a la insulina. Debe mencionarse que, en nuestro estudio, los pacientes con este genotipo tenían también una edad menor que el resto, lo que se explica en parte por la vía de adquisición, principalmente a través del uso de drogas por vía parenteral ^{34, 35}. Así pues, la menor frecuencia de alteraciones hidrocarbonadas en el genotipo 3 podría atribuirse a una menor prevalencia de cirrosis por el menor tiempo de evolución de la infección. En este sentido, cuando consideramos sólo a los pacientes con hepatitis crónica, la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas es muy similar en todos los grupos. Sin embargo, dado que hay cuatro genotipos principales con una prevalencia muy distinta entre ellos, el tamaño de la muestra para

los genotipos menos prevalentes no permite todavía ofrecer una conclusión definitiva sobre el tema.

En resumen, los pacientes con infección por el VHC presentan una mayor prevalencia tanto de diabetes como de glucémia anómala en ayunas en comparación con los pacientes con enfermedades hepáticas de otra etiología. Este hallazgo se debe principalmente al grupo de pacientes con hepatitis crónica. Dado que la infección por el VHC es un importante predictor de diabetes, sería recomendable indicar un cribado sistemático en estos pacientes que debería incluir la práctica de una SOG. Además de optimizar el diagnóstico de la diabetes en este grupo de riesgo, son necesarios estudios para diseñar las estrategias específicas que nos permitan prevenir la diabetes en los pacientes infectados por el VHC.

5.2.- Estudio de los mecanismos etiopatogénicos. Análisis comparativo del funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y las citocinas proinflamatorias en los pacientes no diabéticos con infección crónica por el VHC y pacientes no diabéticos con otras enfermedades hepáticas.

Hasta la fecha no se conocen los mecanismos específicos responsables por los que el VHC favorece la aparición de diabetes. En un estudio anterior, nuestro grupo descartó que los fenómenos autoinmunitarios contra la célula beta desempeñen algún papel en la etiopatogenia de la diabetes mellitus asociada a la infección por el VHC ⁸⁹. Por otra parte, tal como se ha comentado en la introducción, aunque es posible que el VHC pueda producir una lesión directa en la célula beta pancreática y mermar así su capacidad de secreción de insulina, la replicación del VHC en el páncreas endocrino aún no ha podido ser confirmada ⁹³. Por tanto, la hipótesis más plausible es que la infección por el VHC pueda causar un incremento de la resistencia a la insulina relacionado con un aumento de los depósitos de hierro y/o de las citocinas proinflamatorias ^{98, 124, 138, 152, 192}.

Diversos estudios han demostrado la presencia de insulínresistencia en la cirrosis hepática^{68, 69}. Sin embargo, un problema importante en la interpretación de los resultados es la heterogeneidad en la etiología de la enfermedad y de su estadio clínico. En los trabajos en los que se ha evaluado sólo a pacientes cirróticos anti-VHC positivo se ha observado una pérdida progresiva de la función secretora de la célula beta⁷⁷ y un aumento de la resistencia a la insulina en relación con la severidad de la enfermedad hepática¹⁹⁵.

Dado que el aumento de la prevalencia de las alteraciones hidrocarbonadas en los pacientes infectados por el VHC se manifiesta ya en los estadios iniciales de la infección, y que la insulínresistencia antecede a la aparición de la IFG o diabetes mellitus, hemos considerado de especial interés investigar la secreción pancreática y la resistencia a la insulina en un grupo de pacientes con hepatitis crónica antes de que presenten alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. Además, cabe mencionar que en los pacientes cirróticos el menor aclaramiento hepático de insulina impide que ésta sea un parámetro fiable para calcular la resistencia a la insulina¹⁹⁶.

Este es el primer estudio en el que se evalúa de forma conjunta el funcionalismo de la célula beta, la resistencia a la insulina y el papel de las citocinas proinflamatorias en pacientes infectados por el VHC. Además los grupos comparados (sujetos anti-VHC positivos y negativos) han sido equiparados por los principales factores asociados a la aparición de diabetes, como son la edad, el sexo, el IMC, el ICC y los antecedentes familiares de diabetes, así como también por el grado de lesión hepática.

En los pacientes anti-VHC positivo hemos demostrado un aumento de la resistencia a la insulina en comparación con los pacientes anti-VHC negativo. El incremento de la insulinemia basal y la disminución de la sensibilidad a la insulina se ha comunicado previamente en los sujetos infectados por el VHC con grados moderados o severos de fibrosis hepática^{96, 197, 198}. Si bien la fibrosis hepática, independientemente de la etiología, puede causar un aumento de la resistencia a la

insulina, los pacientes infectados por el VHC sin fibrosis (fibrosis grado 0) presentan también mayores niveles de HOMA que los pacientes con cirrosis biliar primaria y diversos grados de fibrosis hepática (fibrosis grados 1 a 3), y que los individuos sanos⁸². Estos datos sugieren que el VHC puede ser capaz de producir un incremento en la resistencia a la insulina, incluso antes de causar una mínima fibrosis a nivel hepático, en los sujetos infectados con factores genéticos y/o medioambientales que predispongan a la aparición de IFG y diabetes^{81, 84, 193, 223}. En esta línea se hallan nuestros resultados, al observar que los pacientes con hepatitis crónica en estadios iniciales ya presentan una mayor prevalencia de alteraciones del metabolismo hidrocarbonado que los sujetos anti-VHC negativo.

En cuanto a los mecanismos por los que el VHC aumenta la resistencia a la insulina, en el presente estudio hemos detectado un aumento estadísticamente significativo de las citocinas proinflamatorias (sistema TNF- α e IL-6) en los pacientes anti-VHC positivo en comparación con los pacientes con otras hepatopatías. Estos mediadores proinflamatorios se han relacionado, tanto en la población general como en la población diabética, con la resistencia a la insulina^{102, 103, 105, 199}. En la tabla 23 se resumen los mecanismos por los que el TNF- α induciría resistencia a la insulina. La primera causa de activación del sistema TNF- α en los pacientes infectados por el VHC es la inflamación hepática. La principal célula productora *in vivo* de TNF- α y de sus dos receptores es el macrófago, incluyendo tanto a los macrófagos que infiltran el hígado procedentes de la circulación sistémica como a los macrófagos hepáticos o células de Kupffer^{200, 201}. Su expresión hepática está aumentada en los sujetos infectados por el VHC²⁰¹ y se relaciona estrechamente con los marcadores de daño hepatocelular y el grado histológico de inflamación^{122-124, 127-130, 201, 202}, siendo esto más marcado para el sTNFR2^{122-124, 127, 203}. Esta mayor activación del sistema TNF- α puede estar relacionada con el tipo de respuesta celular inmune inducida por el VHC, que está mediada de forma característica por los linfocitos Th1 (linfocitos TCD4+ tipo 1 ó *T helper cells type 1*). Estos linfocitos secretan interferon gamma (INF- γ) como

citocina predominante ²⁰⁴⁻²⁰⁶, citocina capaz a su vez de regular y aumentar la producción de TNF- α por los macrófagos ²⁰⁷.

Alternativamente, la resistencia a la insulina se ha descrito como un factor predictor independiente de la presencia de fibrosis hepática en los individuos anti-VHC positivo ⁸². En este sentido, son diversos los trabajos que observan que la diabetes mellitus afecta de forma adversa el curso de la infección crónica por el VHC, asociándose a un incremento de la esteatosis y de la fibrosis hepática ^{63, 84, 105, 197, 212-215}, a una mayor prevalencia de carcinoma hepatocelular ^{216, 217} y a una menor respuesta al tratamiento con interferon ¹²⁸. Existen diversos mecanismos que podrían

Tabla 23. Mecanismos por los que el TNF- α induciría la aparición de resistencia a la insulina.

- El TNF- α favorece la fosforilación de la serina del IRS-1, disminuyendo así la actividad tirosinquinasa del receptor ¹⁰⁴.
- El TNF- α estimula la lipólisis, con lo que incrementa la concentración de ácidos grasos libres y favorece la aparición de resistencia a la insulina a nivel muscular y hepático ^{208, 209}.
- El TNF- α , a nivel del adipocito, disminuye la transcripción de los genes que codifican proteínas como el IRS-1, GLUT-4, PPAR-gamma y adiponectina ²¹⁰.
- El TNF- α puede interferir la función de la célula beta por toxicidad directa o disminuyendo su sensibilidad a la acción de la insulina ²¹¹.

IRS-1 (sustrato 1 del receptor de insulina), **GLUT-4** (transportador de glucosa), **PPAR-gamma** (receptor de la activación de la proliferación de los peroxisomas)

explicar el papel de la resistencia a la insulina en el desarrollo de la fibrogénesis hepática. Por una parte, la hiperinsulinemia es capaz de estimular la proliferación de las células estrelladas y aumentar así la secreción de matriz extracelular ²¹⁸. Por otra, tanto la hiperglucemia como la hiperinsulinemia estimularían la síntesis del factor de

crecimiento del tejido conectivo (*connective tissue growth factor*), citocina implicada en la progresión de la fibrosis en diversas enfermedades ^{219, 220}.

El aumento de las concentraciones de citocinas proinflamatorias en los pacientes anti-VHC no diabéticos sugiere que, ya en fases iniciales de la infección, la activación del sistema TNF- α y el incremento de IL-6 son responsables de la mayor resistencia a la insulina observada en estos pacientes. Este aumento de citocinas, especialmente del TNF- α , favorecería tanto la aparición de alteraciones del metabolismo hidrocarbonado como el desarrollo de fibrosis hepática ^{82,221,222} (Figura 8).

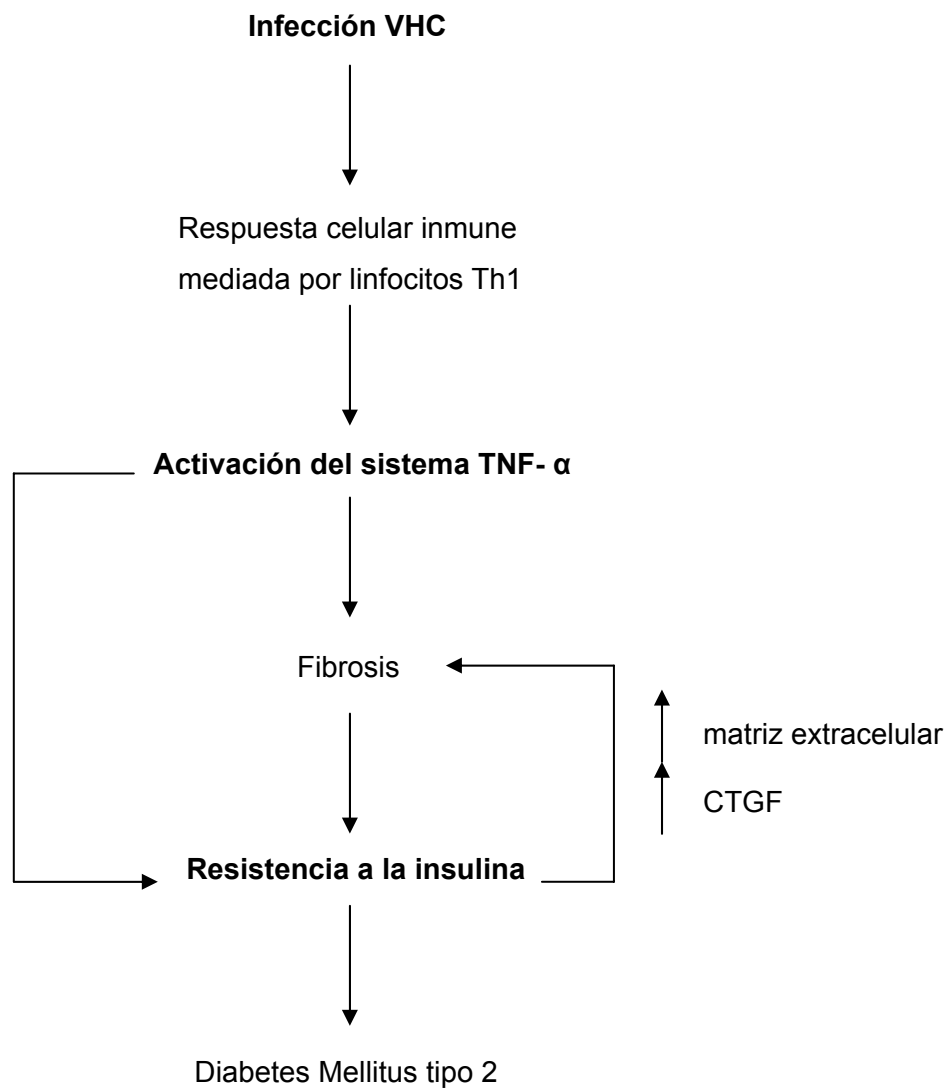


Figura 8. Esquema por el que la infección por el VHC favorecería la aparición de alteraciones hidrocarbonadas. CTGF: connective tissue growth factor.

Apoyando este resultado, recientemente se ha comunicado que un modelo de ratón transgénico, capaz de expresar las proteínas del core del VHC, muestra una marcada resistencia a la insulina que se corrige tras la administración de anticuerpos dirigidos contra el TNF- α ²²³.

Al evaluar el funcionalismo de la célula beta no hemos observado disminución en la secreción de insulina ni de péptido-C en los pacientes anti-VHC positivo. Al contrario, en diversos momentos de ambas pruebas de estimulación los pacientes anti-VHC positivo alcanzan valores de péptido C significativamente superiores a los del grupo control, confirmando que no existe alteración secretora inicial. De este modo, en estas fases iniciales, la célula beta es capaz de compensar la resistencia a la insulina mediante la hiperinsulinemia.

En conclusión, hemos observado que los pacientes con hepatitis crónica anti-VHC positivos no diabéticos no presentan un déficit severo de la función secretora de la célula beta, por lo que virtualmente puede excluirse la afectación directa del páncreas endocrino como un mecanismo causante de la diabetes asociada al VHC. Además, estos pacientes presentan un incremento de citocinas proinflamatorias que sería el fundamento fisiopatológico de la insulínresistencia y la diabetes asociada al VHC.

5.3.- Análisis de la ferritina en los pacientes con hepatitis crónica por el VHC y estudio de su relación con la prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas.

Diversos estudios han comunicado un aumento de los niveles séricos de ferritina en los pacientes con infección crónica por el VHC^{79, 148, 150, 152, 155, 224-226}, si bien la magnitud de esta asociación no ha sido completamente establecida. Así, muchos de estos trabajos no disponen de un grupo control^{149, 150, 152, 224}, y los estudios controlados^{79, 155, 225, 226} son difíciles de interpretar porque no han considerado factores que pueden influir en los niveles de ferritina como el sexo, el consumo de alcohol, la severidad de la lesión hepática (hepatitis crónica vs. cirrosis) o la presencia de mutaciones en el gen

de la hemocromatosis. Además, ningún trabajo ha considerado tampoco la alta prevalencia de DM tipo 2 en esta población.

En nuestro estudio, tras haber considerado todos los factores de confusión mencionados, hemos evidenciado que entre los sujetos infectados por el VHC sólo aquellos que también son diabéticos tienen una concentración sérica de ferritina elevada. Sin embargo, los pacientes anti-VHC positivo no diabéticos muestran una concentración de ferritina comparable a la del grupo control. Los pacientes diabéticos sí tienen, por el contrario, un nivel de ferritina significativamente superior a la del grupo control. Además, en el análisis de regresión múltiple la diabetes, pero no la infección por el VHC, se relaciona de forma independiente con la ferrina. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el incremento de la ferritina observado previamente en la infección por el VHC está íntimamente relacionado con la alta prevalencia de diabetes observada en estos pacientes, y no con la infección por el VHC en sí misma. Los mecanismos específicos responsables de la elevación de la ferritina en la DM tipo 2 se discutirán en el siguiente apartado.

En nuestro estudio, al igual que la diabetes, los niveles de ALT también se asocian de forma independiente con la ferritina sérica, tanto en la infección por el VHC como en la DM tipo 2. En los sujetos anti-VHC positivo esta asociación podría atribuirse a la liberación de hierro provocada por la necrosis hepatocelular inducida por el VHC. Sin embargo, diversos autores han observado que la infección crónica por el VHC no se asocia a una elevación concomitante de la concentración intrahepática de hierro ^{150, 152, 224, 227}, y en nuestro estudio, cuando los pacientes diabéticos son excluidos del grupo de pacientes anti-VHC positivo desapareció la relación entre los niveles de ferritina y transaminasas. Estos resultados sugieren que la DM tipo 2 es el nexo de unión entre los niveles elevados de ferritina y la ALT en los sujetos infectados por el VHC. En este sentido cabe recordar que la esteatosis hepática se relaciona estrechamente con la resistencia a la insulina ^{144, 228-230} y que en la esteatohepatitis no alcohólica los niveles de ferritina están elevados en 58-77% de los casos ^{228, 231}. Por

tanto, la esteatosis hepática podría ser el sustrato en el que se fundamenta la asociación entre niveles de ALT y de ferritina en la diabetes.

La mayor concentración de ferritina observada en el grupo de pacientes anti-VHC con diabetes probablemente pueda explicarse por la concurrencia de dos procesos inflamatorios. Así, en la infección crónica por el VHC, y al igual que en la DM tipo 2, se ha detectado una elevación de mediadores proinflamatorios como el TNF-alfa y la IL-6^{121, 232, 233}. Por tanto, podríamos hipotetizar que los pacientes infectados por el VHC con diabetes presentan una mayor concentración de mediadores inflamatorios que aquellos sin diabetes y, en consecuencia, una mayor concentración de ferritina sérica. También es posible que en los pacientes infectados por el VHC las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado no se manifiestan hasta alcanzar cierto umbral inflamatorio, a partir del cual el componente inflamatorio propio de la diabetes aumentaría aún más los niveles de ferritina. Esta base inflamatoria de la hiperferritinemia en los pacientes anti-VHC positivo podría contribuir a explicar porque los niveles elevados de ferritina son un marcador predictivo de mala respuesta al tratamiento con IFN en estos pacientes²³⁴⁻²³⁸. Por el mismo motivo, es probable que los sujetos diabéticos anti-VHC positivo presenten también una peor respuesta al tratamiento con interferón, aunque faltan estudios que confirmen este último supuesto.

En conclusión, aportamos evidencias de que los pacientes con hepatitis crónica por el VHC sin diabetes no tienen niveles más elevados de ferritina que los sujetos sanos y que el incremento de la concentración sérica de ferritina detectado en la infección crónica por el VHC está íntimamente relacionado con la presencia de diabetes. De ello puede deducirse que el aumento de los depósitos de hierro, evaluados mediante los niveles séricos de ferritina no parece un elemento fundamental en la etiopatogenia de la diabetes asociada al VHC. Por otra parte, nuestros resultados también indican que la DM tipo 2 debe ser una variable a considerar siempre que se quiera estudiar el metabolismo del hierro en los pacientes infectados por el VHC.

5.4.- Estudio de los receptores solubles de la transferrina y la ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.

Al igual que en trabajos previos ^{138, 139, 158, 159}, hemos confirmado un aumento de la concentración de ferritina en los pacientes diabéticos en comparación con el grupo control. Es importante destacar que la presencia de sobrecarga férrica ha experimentado un incremento progresivo en diversas poblaciones durante las últimas décadas ^{239, 240}, incluso en la población catalana adulta ²⁴¹, y ello podría ser atribuible, en parte, al incremento paralelo de la DM tipo 2 que se ha observado en estas edades ²⁴².

Los niveles de sTfR circulante no están influenciados por la respuesta de fase aguda que ocurre en los procesos inflamatorios ¹⁶⁹. Por tanto, su determinación nos ha permitido investigar si el origen de esta elevación es reflejo de un aumento de los depósitos de hierro o reflejo del proceso inflamatorio crónico de baja intensidad que existe en la diabetes ¹⁵⁷. Hemos observado que el incremento de las concentraciones de ferritina en los pacientes diabéticos no se acompaña de un descenso recíproco de los niveles de sTfR. Además, no hemos detectado diferencias en el IST, un marcador de sobrecarga de hierro, entre los pacientes con diabetes y el grupo control. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan de forma consistente el concepto de que es la inflamación el principal factor responsable de la elevación de las concentraciones de ferritina en los pacientes diabéticos ^{139, 140, 143}. Apoyando nuestros resultados, se ha comunicado que la concentración intrahepática de hierro, estudiada en la autopsia de un grupo de sujetos diabéticos, es similar a la de los sujetos no diabéticos ¹⁶⁰.

En resumen, los niveles de ferritina están incrementados en la DM tipo 2 en ausencia de alteraciones en el sTfR ni en otros parámetros de sobrecarga de hierro. Este hallazgo sugiere que el incremento de las concentraciones de ferritina en la DM tipo 2 se debe principalmente a la existencia de fenómenos inflamatorios más que a un aumento de los depósitos tisulares de hierro, o en otras palabras, que la ferritina se comporta como un reactante de fase aguda en los pacientes diabéticos. Estos

resultados demuestran que la ferritina, al no ser un índice fiel de los depósitos de hierro en los pacientes con DM tipo 2, no es un buen parámetro para efectuar el diagnóstico de anemia ferropénica en estos pacientes, lo cual tiene transcendencia en la práctica clínica.

6.- CONCLUSIONES

1.- Los pacientes con infección por el VHC presentan una elevada prevalencia tanto de glucemia anómala en ayunas como de diabetes en comparación con los pacientes con otras enfermedades hepáticas no atribuibles al VHC. Este aumento de prevalencia se produce fundamentalmente en los pacientes con hepatitis crónica e incluso se objetiva en sujetos con transaminasas normales.

2.- El análisis del genotipo no parece útil para identificar una población de pacientes infectados por el VHC con mayor riesgo para desarrollar alteraciones del metabolismo hidrocarbonado.

3.- La infección por el VHC debe ser considerada un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes. Por tanto, es recomendable realizar un cribado sistemático de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en los pacientes infectados por el VHC.

4.- En los pacientes infectados por el VHC la prueba de la sobrecarga oral de glucosa es el método de elección para realizar el diagnóstico de la diabetes.

5.- En los pacientes infectados por el VHC que aún no han desarrollado una diabetes existe un hiperinsulinismo, tanto en situación basal como tras la estimulación con glucagón endovenoso o la ingesta de una comida estándar, lo que traduce un estado de insulinresistencia.

6.- El aumento de resistencia a la insulina en los pacientes infectados por el VHC se asocia a un incremento de citocinas proinflamatorias.

7.- Los pacientes infectados por el VHC no diabéticos presentan concentraciones similares de ferritina que la población general. De ello puede deducirse que el aumento

de los depósitos de hierro, evaluados mediante los niveles séricos de ferritina, no parece un elemento fundamental en la etiopatogenia de la diabetes asociada al VHC.

8.- La diabetes mellitus es el principal factor relacionado con el aumento de las concentraciones séricas de ferritina observado en los pacientes con infección crónica por el VHC. Por tanto, la diabetes mellitus debe ser tomada en cuenta al evaluar el metabolismo del hierro en los pacientes infectados por el VHC.

9.- El aumento de la ferritina en los pacientes diabéticos no se acompaña de un descenso recíproco de los niveles de sTfR, lo que sugiere que es un reflejo del estado inflamatorio crónico de baja intensidad característico de la DM tipo 2.

10.- La determinación de la concentración sérica de ferritina no es un marcador útil de los depósitos de hierro en los pacientes con DM tipo 2.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Zimmet P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes: an epidemiological overview. *Diabetologia* 1982; 22 (6): 399-411.
2. Harris MI. Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* 1993;16 (4): 642-652.
3. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21 (9): 1414-1431.
4. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998; 21 (4): 518-524.
5. Castell C, Tresserras R, Serra J, Goday A, Lloveras G, Salleras L. Prevalence of diabetes in Catalonia (Spain): an oral glucose tolerance test-based population study. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 43 (1): 33-40.
6. Tamayo-Marco B, Faure-Nogueras E, Roche-Asensio MJ, Rubio-Calvo E, Sánchez-Oriz E, Salvador-Olivan JA. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in Aragon, Spain. *Diabetes Care* 1997; 20 (4): 534-536.
7. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339 (4): 229-234.
8. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285 (19): 2486-2497.

9. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL 3rd, Klein R; American Diabetes Association. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl 1): S84-S87.
10. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl 1): S79-S83.
11. American Diabetes Association. Preventive foot care in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl 1): S63-S64.
12. Calle-Pascual AL, García-Torre N, Moraga I, Díaz JA, Duran A, Monux G, Serrano FJ, Martín-Alvarez PJ, Charro A, Maranes JP. Epidemiology of nontraumatic lower-extremity amputation in area 7, Madrid, between 1989 and 1999: a population-based study. *Diabetes Care* 2001; 24 (9): 1686-1689.
13. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999; 6 (1): 35-47.
14. Ray Kim W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes Infect* 2000; 4 (12): 1219-1225.
15. Domínguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol* 2001; 65 (4): 688-693.
16. Riestra S, Fernández E, Leiva P, García S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13 (5): 477-481.
17. Solà R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardí R, Sunyer J, Covas MI, Marrugat J. Prevalencia de las hepatitis B y C en diversas comarcas de Cataluña: estudio transversal. *Med Clin (Barc)* 2002; 119 (3): 90-95.
18. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244 (4902): 359-362.

19. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (6): 2057-2061.
20. van den Hoek JA, van Haastrecht HJ, Goudsmit J, de Wolf F, Countinho RA. Prevalence, incidence, and risk factors of hepatitis C virus infection among drug users in Amsterdam. *J Infect Dis* 1999; 162 (4): 823-826.
21. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341 (8): 556-562.
22. Tremolada F, Casarin C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G, Alberti A, Rulo A. Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. *Ann Intern Med* 1991; 114 (4): 277-281.
23. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995; 15 (1): 5-14.
24. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liv Dis* 2000 ; 20 (1) : 1-16.
25. Hardy NM, Chiao J, Arora N, Mars R, Jenkins SG. Hepatitis C virus in the hemodialysis setting : detecting viral RNA from blood port caps by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin Nephrol* 2000; 54 (2): 143-146.
26. Henderson DK. Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the health care setting. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (3): 546-568.
27. Bruguera M. La hepatitis C, otra plaga. *Med Clín (Barc)* 1994; 103 (16): 615-616.
28. Esteban JI, López-Talavera JC, Genescà J, Madoz P, Viladomiu L, Martín-Vega C, Rosell M, Allende H, Vidal X, González A, Hernández JM, Esteban R, Guardia J. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991; 115 (6): 443-449.

29. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19 (5): 1321-1324.
30. Bukh j Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15 (1): 41-63.
31. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13 (2): 223-235.
32. Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchet C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 1995; 122 (3): 161-168.
33. Alonso Alonso P, Orduña A, San Miguel A, Domínguez E, Bratos MA, Gutiérrez MP, Eiros JM, Inglada L, González Hernández JM, Rodríguez Torres A. Relation of hepatitis C virus genotypes to risk factors and hepatic disease in Spanish patients. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 (6): 647-652.
34. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval E, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171 (6): 1607-1610.
35. Roffi L, Ricci A, Ogliari C, Scalori A, Minola E, Colloredo G, Donada C, Ceriani R, Rinaldi G, Paris B, Fornaciari G, Morales R, Del Poggio P, Sangiovanni A, Buonocore M, Bellia V, Riboli P, Nava MC, Panizzoti F, Piperno A, Pozzi M, Pioltelli P, Mancina G. HCV genotypes in Northern Italy: a survey of 1368 histologically proven chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 1998; 29 (5): 701-706.
36. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351 (9099): 351-355.

37. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liv Dis* 2000; 20 (1): 17-35.
38. Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl 1): S34-S38.
39. Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 17-24.
40. Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, Buskell-Bales Z, Straley-Eason KD, Smoak BL, Johnson LD, Lee SR, Kaplan EL. 45-year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults. *Ann Intern Med* 2000; 132 (2): 105-111.
41. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000; 284 (4): 450-456.
42. Salomon JA, Weinstein MC, Hammitt JK, Goldie SJ. Empirically calibrated model of hepatitis C virus infection in the United States. *Am J Epidemiol* 2002; 156 (8): 761-773.
43. Gumbert SC, Chopra S. Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med* 1995; 123 (8): 615-620
44. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (10): 2204-2212.
45. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G. HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 (52): 1149-1154.
46. Sene D, Limal N, Cacoub P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metab Brain Dis* 2004; 19 (3-4): 357-381.

47. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327 (21): 1490-1495.
48. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, Corey L, Wener MH, Alpers CE, Willson R. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328 (7): 465-470.
49. DeCastro M, Sánchez J, Herrera JF, Chaves A, Durán R, García-Buey L, García-Monzón C, Sequi J, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1993; 17 (4): 551-557.
50. Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Cervera R, Rosas J, Trejo O, de la Red G, Sánchez-Tapias JM, Font J, Ingelmo M. Hepatitis C virus infection mimicking primary Sjögren syndrome. A clinical and immunologic description of 35 cases. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80 (1): 1-8.
51. Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Cervera R, Filella X, Trejo O, de la Red G, Gil V, Sánchez-Tapias JM, Font J, Ingelmo M. Th1/Th2 cytokine imbalance in patients with Sjögren syndrome secondary to hepatitis C virus infection. *Semin Arthritis Rheum* 2002; 32 (1): 56-63
52. Wilson SE, Lee WM, Murakami C, Weng J, Moninger GA. Mooren's corneal ulcers and hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 329 (1): 62.
53. Ferri C, Monti M, La Civita L, Careccia G, Mazzaro C, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Pasero G, Bombardieri S, Zignego AL. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest* 1994; 24 (11): 781-784.
54. Nagao Y, Sata M. Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 (10): 1101-1113.
55. Ozyilkan E, Erbas T, Simsek H, Telatar F, Kayhan B, Telatar H. *J Intern Med* 1994; 235 (3): 283-284.

56. Gray H, Wreghitt MI, Stratton IM, Alexander GJ, Turner RC, O'Rahilly S. High prevalence of hepatitis C infection in Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes and abnormal liver function test. *Diabet Med* 1995; 12 (3): 244-249.
57. Simó R, Hernández C, Genescà J, Jardí R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19 (9): 998-1000.
58. Rudoni S, Petit JM, Bour JB, Aho LS, Castaneda A, Vaillant G, Verges B, Brun JM. HCV infection and diabetes mellitus: influence of the use of finger stick devices on nosocomial transmission. *Diabetes Metab* 1999; 25 (6): 502-505.
59. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29 (2): 328-333.
60. Sotiropoulos A, Peppas TA, Skliros E, Apostolou O, Kotsini V, Pappas SI. Low prevalence of hepatitis C virus infection in Greek diabetic patients. *Diabet Med* 1999; 16 (3): 250-252.
61. Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S. Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med* 2001; 16 (1): 18-23.
62. Okan V, Araz M, Aktaran S, Karşligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F. Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 2002; 56 (3): 175-177.
63. Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A. Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 2000; 75 (4): 355-359.
64. Boluda Monzo S, Mesa Manteca J, Obiols Alfonso G, Simó Canonge R. Antígeno de superficie de la hepatitis B en la diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)* 1989; 92 (10): 397.

65. 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* 2000; 133 (8): 592-599.
66. 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. *Hepatology* 2001; 33 (6): 1554.
67. Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P. Community-based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis severity status. *Am J Epidemiol* 2003; 158 (2): 1154-1160..
68. Kruszynska YT, Home PD, McIntyre N. Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14 (1): 103-111.
69. Nolte W, Hartmann H, Ramadori G. Glucose metabolism and liver cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103 (2): 63-74.
70. Fraser GM, Harman I, Meller N, Niv Y, Porath A. Diabetes mellitus is associated with chronic hepatitis C but not chronic hepatitis B infection. *Isr J Med Sci* 1996; 32 (7): 526-530.
71. el-Zayadi AR, Selim OE, Hamdy H, Dabbous H, Ahdy A, Moniem SA. Association of chronic hepatitis C infection and diabetes mellitus. *Trop Gastroenterol* 1998; 19 (4): 141-144.
72. Akbar DH, Siddique AM, Ahmed MM. Prevalence of Type-2 diabetes in patients with hepatitis C and B virus infection in Jeddah, Saudi Arabia. *Med Princ Pract* 2002; 11 (2): 82-85.
73. Chen LK, Hwang SJ, Tsai ST, Luo JC, Lee SD, Chang FY. Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2003; 9 (3): 505-508.

-
- 74.** Mangia A, Schiavone G, Lezzi G, Marmo R, Bruno F, Villani MR, Cascavilla I, Fantasia L, Andriulli A. HCV and diabetes mellitus: evidence for a negative association. *Am J Gastroenterol* 1998; 93 (12): 2363-2367.
- 75.** 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 (6): 1135-1139.
- 76.** Guerrero Igea FJ, Garrido Serrano A, Lepe Jiménez JA, Palomo Gil S. Alta prevalencia de la diabetes mellitus en los pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C. *Med Clin (Barc)* 1998; 111 (17): 676-677.
- 77.** Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 30 (4): 1059-1063.
- 78.** Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, Wanless IR, Hemming AW, Croxford R, Greig PD, Lilly LB, Heathcote JE, Levy GA, Cattral M. Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32 (1): 87-90.
- 79.** Garrido Serrano A, Guerrero Igea FJ, Lepe Jiménez JA, Palomo Gil S, Grilo Reina A. Hiperinsulinemia en pacientes cirróticos infectados por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24 (3): 127-131.
- 80.** del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM. Liver cirrhosis and diabetes mellitus. *J Hepatol* 1996; 24 (5): 645.
- 81.** Thuluvath PJ, John PR. Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98 (2): 438-441.
- 82.** 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.

83. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH. Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 2000; 32 (2): 209-217.
84. Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 35 (2): 279-283.
85. 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.
86. Sharma P, Balan V, Hernández J, Rosati M, Williams J, Rodríguez-Luna H, Schwartz J, Harrison E, Anderson M, Byrne T, Vargas HE, Douglas DD, Rakela J. Hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 3 infection: does it correlate with body mass index, fibrosis, and HCV risk factors?. *Dig Dis Sci* 2004; 49 (1): 25-29.
87. Cholet F, Nousbaum JB, Richecoeur M, Oger E, Cauvin JM, Lagarde N, Robaszekiewicz M, Gouerou H. Factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28 (3): 272-278.
88. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 1998; 4 (4): 231-239.
89. Piquer S, Hernández C, Enriquez J, Ross A, Esteban JI, Genescà J, Bonifacio E, Puig-Domingo M, Simó R. Islet cell and thyroid antibody prevalence in patients with hepatitis C virus infection: effect of treatment with interferon. *J Lab Clin Med* 2001; 137 (1): 38-42.
90. Nouri Aria KT, Sallie R, Sangar D, Alexander GJ, Smith H, Byrne J, Portmann B, Eddleston AL, Williams R. Detection of genomic and intermediate replicative

- strands of hepatitis C virus in liver tissue by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1993; 91 (5): 2226-2234.
- 91.** Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 4): 669-676.
- 92.** Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 1998; 28 (5): 1398-1401.
- 93.** Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002; 6 (6): 805-811.
- 94.** Vargas HE, Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, Balan V, Douglas DD, Harrison ME, Mulligan DC, Olden K, Adair D, Rakela J. Detection of hepatitis C virus sequences in brain tissue obtained in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8 (11): 1014-1019.
- 95.** Konrad T, Zeuzem S, Vicini P, Toffolo G, Briem D, Lormann J, Herrmann G, Berger A, Kusterer K, Teuber G, Cobelli C, Usadel KH. Evaluation of factors controlling glucose tolerance in patients with HCV infection before and after 4 month therapy with interferon-alpha. *Eur J Clin Invest* 2000; 30 (2): 111-121.
- 96.** Sougleri M, Labropoulou-Karatza C, Paraskevopoulou P, Fragopanagou H, Alexandrides T. Chronic hepatitis C virus infection without cirrhosis induces insulin resistance in patients with alpha-thalassaemia major. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13 (10): 1195-1199.
- 97.** Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?. *Diabetologia* 1998; 41 (10): 1241-1248.

-
- 98.** Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutiérrez C, Vendrell J, Richart C. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47 (11): 1757-1762.
- 99.** Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 1999; 42 (11): 1367-1374.
- 100.** Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67 (3): 291-300.
- 101.** Fernández-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutiérrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (3): 1154-1159.
- 102.** Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286 (3): 327-334.
- 103.** Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271 (5249): 665-668.
- 104.** Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1543-1549.
- 105.** Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95 (5): 2409-2415.

-
- 106.** Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280 (5): E745-751.
- 107.** Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13 (5): 151-153.
- 108.** Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175 (2): 323-329.
- 109.** Beutler B, van Huffel C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994; 264 (5159): 667-668.
- 110.** Díez-Ruiz A, Tilz GP, Zangerle R, Baier-Bitterlich G, Wachter H, Fuchs D. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol* 1995; 54 (1): 1-8.
- 111.** Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 1997; 46 (3): 451-455.
- 112.** Aderka D, Sorkine P, Abu-Abid S, Lev D, Setton A, Cope AP, Wallach D, Klausner J. Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J Clin Invest* 1998; 101 (3): 650-659.
- 113.** Strackowski M, Kowalska I, Stepień A, Dzienis-Strackowska S, Szelachowska M, Kinalska I. Increased plasma-soluble tumor necrosis factor- α receptor 2 level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2002; 25 (10): 1824-1828.
- 114.** Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998; 128 (2): 127-137.

- 115.** Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 (3): 847-850.
- 116.** Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; 278 (46): 45777-45784.
- 117.** Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 2003; 52 (11): 2784-2789.
- 118.** Makino T, Noguchi Y, Yoshikawa T, Doi C, Nomura K. Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Br J Surg* 1998; 85 (12): 1658-1662.
- 119.** Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (9): 3338-3342.
- 120.** Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001; 9 (7): 414-417.
- 121.** Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci* 1997; 42 (12): 2487-2494.
- 122.** Kallinowski B, Haseroth K, Marinos G, Hanck C, Stremmel W, Theilmann L, Singer MV, Rossol S. Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 111 (2): 269-277.

123. Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Brechot C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999; 30 (2): 185-191.
124. Itoh Y, Okanoué T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y, Minami M, Murakami Y, Kashima K. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94 (5): 1332-1340.
125. Malaguarnera M, Di Fazio I, Romeo MA, Restuccia S, Laurino A, Trovato BA. Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 1997; 32 (2): 211-215.
126. Cotler SJ, Reddy KR, McCone J, Wolfe DL, Liu A, Craft TR, Ferris MW, Conrad AJ, Albrecht J, Morrissey M, Ganger DR, Rosenblate H, Blatt LM, Jensen DM, Taylor MW. An analysis of acute changes in interleukin-6 levels after treatment of hepatic C with consensus interferon. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21 (12): 1011-1019.
127. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 109 (3): 458-463.
128. Fabris C, Soardo G, Falletti E, Toniutto P, Vitulli D, Federico E, Del Forno M, Mattiuzzo M, Gonano F, Pirisi M. Relationship among hepatic inflammatory changes, circulating levels of cytokines, and response to IFN-alpha in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18 (9): 705-709.
129. Dumoulin FL, Wennrich U, Nischalke HD, Leifeld L, Fisher HP, Sauerbruch T, Spengler U. Intrahepatic mRNA levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and response to antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hum Virol* 2001; 4 (4): 195-199.

- 130.** Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le Breton V, Le Guludec G, Marcellin P. Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002; 17 (2): 108-117.
- 131.** Yaouanq JM. Diabetes and haemochromatosis: current concepts, management and prevention. *Diabetes Metab* 1995; 21 (5): 319-329.
- 132.** Dubois-Laforgue D, Caillat-Zucman S, Boitard C, Timsit J. Clinical characteristics of type 2 diabetes in patients with mutations of HFE. *Diabetes Metab* 2000; 26 (1): 65-68.
- 133.** Wilson JG, Lindquist JH, Grambow SC, Crook ED, Maher JF. Potential role of increased iron stores in diabetes. *Am J Med Sci* 2003; 325 (6): 332-339.
- 134.** Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol* 1979; 95 (3): 663-673
- 135.** May ME, Parmley RT, Spicer SS, Ravenel DP, May EE, Buse MG. Iron nitrilotriacetate-induced experimental diabetes in rats. *J Lab Clin Med* 1990; 95 (4): 525-535.
- 136.** Walters GO, Miller FM, Worwood M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol* 1973; 26 (10): 770-772.
- 137.** Cook JD, Lipschitz DA, Miles LE, Finch CA. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 1974; 27 (7): 681-687.
- 138.** Salonen JT, Tuomainen TP, Nyssönen K, Lakka HM, Punnonen K. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 1998; 317 (7160): 727.
- 139.** Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999; 22 (12): 1978-1983.

140. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002; 51 (8): 2348-2354.
141. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004; 291 (6): 711-717.
142. Moirand R, Mortaji AM, Loreal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997; 349 (9045): 95-97.
143. Fernández-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, Balanca R, Casamitjana-Abella R, Cabrero D, Fernández-Castañer M, Soler J. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998; 21 (1): 62-68.
144. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, Deugnier Y. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999; 117 (5): 1155-1163.
145. Fernández-Real JM, Penarroja G, Castro A, García-Bragado F, Hernández-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2002; 51 (4): 1000-1004.
146. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (4): 931-939.
147. Cutler P. Deferoxamine therapy in high-ferritin diabetes. *Diabetes* 1989; 38 (10): 1207-1210.
148. Prieto J, Barry M, Sherlock S. Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1975; 68 (3): 525-533.
149. Di Biesceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102 (6): 2108-2113.

-
- 150.** Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22 (4): 449-456.
- 151.** Haque S, Chandra B, Gerber MA, Lok AS. Iron overload in patients with chronic hepatitis C: a clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1996; 27 (12): 1277-1281.
- 152.** Riggio O, Montagnese F, Fiore P, Folino S, Giambartolomei S, Gandin C, Merli M, Quinti I, Violante N, Caroli S, Senafonte O, Capocaccia L. Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it?. *Am J Gastroenterol* 1997; 92 (8): 1298-1301.
- 153.** Giannini E, Mastracci L, Botta F, Romagnoli P, Fasoli A, Risso D, Fararelli F, Ceppa P, Lantieri PB, Icardi GC, Testa R. Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without HFE mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype and alpha-glutathione S-transferase levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13 (11): 1355-1361.
- 154.** Hernández C, Genescà J, Ignasi Esteban J, García L, Simó R. Relación entre los depósitos de hierro y la diabetes mellitus en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C: estudio de casos y controles. *Med Clin (Barc)* 2000; 115 (1): 23-24.
- 155.** Paris R. Association of hepatitis C and diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2001; 135 (2): 142-143.
- 156.** Konijn AM, Hershko C. Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release. *Br J Haematol* 1977; 37 (1): 7-16.
- 157.** Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24 (3): 278-301.

-
- 158.** O'Brien T, Barrett B, Murray DM, Dinneen S, O'Sullivan DJ. Usefulness of biochemical screening of diabetic patients with for hemochromatosis. *Diabetes Care* 1990; 13 (5): 532-534.
- 159.** Kaye TB, Guay AT, Simonson DC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and elevated serum ferritin level. *J Diabetes Complications* 1993; 7 (4): 246-249.
- 160.** Dinneen SF, Silverberg JD, Batts KP, O'Brien PC, Ballard DJ, Rizza RA. Liver iron stores in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994; 69 (1): 13-15.
- 161.** Fletcher J, Huehns ER. Function of transferrin. *Nature* 1968; 218 (148): 1211-1214.
- 162.** Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 357-393.
- 163.** Theil EC. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 1990; 265 (9): 4771-4774.
- 164.** Baynes RD, Cook JD. Current issues in iron deficiency. *Curr Opin Hematol* 1996; 3 (2): 145-149.
- 165.** Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003; 329 (1-2): 9-22.
- 166.** Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990; 75 (1): 102-107.
- 167.** Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75 (9): 1870-1876.
- 168.** Beguin Y, Lipscei G, Thoumsin H, Fillet G. Serum immunoreactive erythropoietin production and decreased erythropoiesis in early pregnancy. *Blood* 1991; 78 (1): 89-93.

- 169.** Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998; 44 (1): 45-51.
- 170.** Kuiper-Kramer EP, Huisman CM, van Raan J, van Eijk HG. Analytical and clinical implications of soluble transferrin receptors in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34 (8): 645-649.
- 171.** De Block CE, Van Campenhout CM, De Leeuw IH, Keenoy BM, Martin M, Van Hoof V, Van Gaal LF. Soluble transferrin receptor level : a new marker of iron deficiency anemia, a common manifestation of gastric autoimmunity in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23 (9): 1384-1388.
- 172.** American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20 (7): 1183-1197.
- 173.** McLaren CE, McLachlan GJ, Halliday JW, Webb SI, Leggett BA, Jazwinska EC, Crawford DH, Gordeuk VR, McLaren GD, Powell LW. Distribution of transferrin saturation in an Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998; 114 (3): 543-549.
- 174.** 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. *Diabetic Med* 1998; 15 (7): 539-553.
- 175.** World Health Organization. Diabetes mellitus: report of a WHO Study Group. Geneva, World Health Organization, 1985 (Technical Report Series, N° 727).
- 176.** Eldstein SL, Knowler WC, Bain RP, Andres R, Barret-Connor EL, Dowse GK, Haffner SM, Pettitt DJ, Sorkin JD, Muller DC, Collins VR, Hamman RF. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes* 1997; 46 (4): 701-710.

177. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care* 2004; 27 (6): 1458-1486.
178. Bacon BR. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. *Hepatology* 2002; 36 (5 Suppl 1): S179-184.
179. Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad. *Med Clín (Barc)* 2000; 115 (15): 587-597.
180. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, World Health Organization, 1998 (Technical Report Series, N° 894).
181. Kahn HS. The waist-to-hip ratio as an index of central obesity. *JAMA* 1996; 275 (15): 1160.
182. Miller WR, Heather N, Hall W. Calculating standard drink units: international comparissons. *Br J Addict* 1991; 86 (1): 43-47.
183. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18 (6): 499-502.
184. 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* 1985; 28 (7): 412-429.
185. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp thecnique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23 (1): 57-63.
186. Mather KJ, Hunt AE, Steimberg HO, Paradisi G, Hook G, Katz A, Quon MJ, Baron AD. Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance:

- implications for research applications. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (11): 5457-5464.
- 187.** Faber OK, Binder C. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes* 1977; 26 (7): 605-610.
- 188.** Clarson C, Daneman D, Gras AL, Becker DJ, Ehrlich RM. Residual beta-cell function in children with IDDM: reproducibility of testing and factors influencing insulin secretory reserve. *Diabetes Care* 1987; 10 (1): 33-38.
- 189.** Arnold-Larsen S, Madsbad S, Kuhl C. Reproducibility of the glucagon test. *Diabet Med* 1987; 4 (4): 299-303.
- 190.** Small M, Cohen HN, Beastall GH, MacCuish AC. Comparison of oral glucose loading and intravenous glucagon injection as stimuli to C-peptide secretion in normal men. *Diabet Med* 1985; 2 (3): 181-183.
- 191.** Bollhalder M, Mura C, Landt O, Maly FE. LightCycler PCR assay for simultaneous detection of the H63D and S65C mutations in the HFE hemochromatosis gene based on opposite melting temperature shifts. *Clin Chem* 1999; 45 (12): 2275-2278.
- 192.** Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 7): 1527-1531.
- 193.** Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, Szklo M, Thomas DL. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; 38 (1): 50-56.
- 194.** Butt A, Fultz S, Kwoh C, Kelley D, Skanderson M, Justice A. Risk of diabetes in HIV infected veterans pre- and post-HAART and the role of HCV coinfection. *Hepatology* 2004; 40 (1): 115-119.
- 195.** Furutani M, Nakashima T, Sumida Y, Hirohama A, Yoh T, Kakisaka Y, Mitsuyoshi H, Senmaru H, Okanou T. Insulin resistance/beta-cell function and

- serum ferritin level in non-diabetic patients with hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2003; 23 (4): 294-249.
- 196.** Bonora E, Coscelli C, Orioli S, Cambi R, Buzzelli G, Gentilini P, Butturini U. Hyperinsulinemia of chronic active hepatitis: impaired insulin removal rather than pancreatic hypersecretion. *Horm Metab Res* 1984; 16 (3): 111-114.
- 197.** Konrad T, Zeuzem S, Toffolo G, Vicini P, Teuber G, Briem D, Lormann J, Lenz T, Herrmann G, Berger A, Cobelli C, Usadel K. Severity of HCV-induced liver damage alters glucose homeostasis in noncirrhotic patients with chronic HCV infection. *Digestion* 2000; 62 (1): 52-59.
- 198.** Oncul O, Top C, Cavuplu T. Correlation of serum leptin levels with insulin sensitivity in patients with chronic hepatitis-C infection. *Diabetes Care* 2002; 25 (5): 937.
- 199.** Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosh RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95 (5): 2111-2119.
- 200.** Burgio VL, Ballardini G, Artini M, Caratozzolo M, Bianchi FB, Levrero M. Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C etiology. *Hepatology* 1998; 27 (6): 1600-1606.
- 201.** McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2000; 46 (2): 260-269.
- 202.** Yoshioka K, Kakumu S, Arao M, Tsutsumi Y, Inoue M, Wakita T, Ishikawa T, Mizokami M. Immunohistochemical studies of intrahepatic tumor necrosis factor alpha in chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1990; 43 (4): 298-302.
- 203.** Fukuda R, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C, Miyake T, Niigaki M, Tokuda A, Satoh S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M,

- Fukumoto S. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16 (6): 390-399.
- 204.** Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression on Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24 (4): 759-765.
- 205.** Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Cavalli A, Missale G, Lamonaca V, Boni C, Valli A, Bertoni R, Urbani S, Scognamiglio P, Fiaccadori F. Antiviral cell-mediated immune responses during hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154: 330-336.
- 206.** Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000; 20 (2): 127-141.
- 207.** Del Prete G, Maggi E, Romagnani S. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab Invest* 1994; 70 (3): 299-306.
- 208.** Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14 (5): 447-455.
- 209.** Cheung AT, Wang J, Ree D, Kolls JK, Bryer-Ash M. Tumor necrosis factor-alpha induces hepatic insulin resistance in obese Zucker (fa/fa) rats via interaction of leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase with focal adhesion kinase. *Diabetes* 2000; 49 (5): 810-819.
- 210.** Ruan H, Hacoen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; 51 (5): 1319-1336.
- 211.** Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines

- in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 Suppl 3: 24-34.
- 212.** Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, Powell EE. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999; 29 (4): 1215-1219.
- 213.** 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 (6): 1358-1364.
- 214.** Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002; 36 (3): 729-736.
- 215.** Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (9): 2408-2414.
- 216.** El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (8): 2462-2467.
- 217.** Tazawa J, Maeda M, Nakagawa M, Ohbayashi H, Kusano F, Yamane M, Sakai Y, Suzuki K. Diabetes mellitus may be associated with hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2002; 47 (4): 710-715.
- 218.** Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999; 29 (6): 1743-1751.
- 219.** Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martínez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P. Expression of connective tissue

- growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30 (4): 968-976.
- 220.** Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34 (4 Pt 1): 738-744.
- 221.** Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* 2004; 23 (2-3): 177-182.
- 222.** Maeno T, Okumura A, Ishikawa T, Kato K, Sakakibara F, Sato K, Ayada M, Hotta N, Tagaya T, Fukuzawa Y, Kakumu S. Mechanisms of increased insulin resistance in non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18 (12): 1358-1363
- 223.** Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; 126 (3): 840-848.
- 224.** Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102 (6): 2108-2113.
- 225.** Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M, Baratz M, Hallak A, Santo M, Halpern Z, Weiss H, Gilat T. Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig Dis Sci* 1994; 39 (12): 2656-2659.
- 226.** Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, Soldini M, Giancaspro G, Bellomo G, Belloni G, Grisorio B, Barbarini G. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol* 1999; 30 (5): 774-782.

- 227.** Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, Jeffers LJ, Parker TI, Radick JL, Schiff ER, Bacon BR. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; 108 (4): 1104-1109.
- 228.** Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (8): 2448-2455.
- 229.** Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346 (16): 1221-1223.
- 230.** Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (11): 2714-2724.
- 231.** Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107 (4): 1103-1109.
- 232.** Grungreiff K, Reinhold D, Ansorge S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine* 1999; 11 (12): 1076-80.
- 233.** Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG, Sklavounou A, Manolis EN, Gorgoulis VG, Valis D. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. *J Clin Lab Anal* 2002; 16 (1): 40-46.
- 234.** Van Thiel DH, Friedlander L, Fagioli S, Wright HI, Irish W, Gavalier JS. Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 1994; 20 (3): 410-415.
- 235.** Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S, Flamm S, Reddy RK, Grace N, Killenberg P, Hunt C, Tamburro C, Tavill AS, Ferguson R, Krawit E, Banner B, Bacon BR. Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with

- chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 32 (1): 135-138.
- 236.** Distante S, Bjoro K, Hellum KB, Myrvang B, Berg JP, Skaug K, Raknerud N, Bell H. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 2002; 22 (3): 269-275.
- 237.** Carlo C, Daniela P, Giancarlo C. Iron depletion and response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 (53): 1467-1471.
- 238.** Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, Martin S, Chretien Y, Pol S, Caillat-Zuckman S, Brechot C, Nalpas B. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11 (2): 175-182.
- 239.** Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jurgensen KS. Iron status in Danish men 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2002;68:332-340.
- 240.** Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jurgensen KS. Iron status in Danish women 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2003; 71:51-61
- 241.** Altés A, Ruiz MA, Castell C, Roure E, Tresserras R. Déficit y sobrecarga de hierro en la población adulta de Catalunya. *Med Clin (Barc)* 2004; 123 (4): 131-133.
- 242.** Lecube A, Hernández C, Simó R. Sobrecarga de hierro en la población adulta y su posible relación con la diabetes mellitus tipo 2. *Med Clin (Barc)* 2005 (en prensa).

8.- PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han sido publicados en revistas científicas y presentados en diversos congresos que se especifican a continuación.

PUBLICACIONES:

1. 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 2004; 27 (5): 1171 - 1175.
2. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, García L, Simó R. **Diabetes is the main factor accounting for the high ferritin levels detected in chronic hepatitis C virus infection.** Diabetes Care 2004; 27 (11): 2669-2675.
3. Hernández C, Lecube A, Carreras A, Simó R. **Soluble transferrin receptors and ferritin in type 2 diabetic patients.** Diabet Med 2005; 22 (1): 97-101.
4. Lecube A, Hernández C, Simó R. **Sobrecarga de hierro en la población adulta y su posible relación con la diabetes mellitus tipo 2.** Med Clin (Barc) 2005 (en prensa).

APORTACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS.

1. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, Simó R. **Prevalencia de alteraciones hidrocarbonadas en los pacientes infectados por el Virus de la Hepatitis C.** XVI Congreso de la Sociedad Española de Diabetes, Cádiz. Publicado en: Avances en Diabetología 2002; 18 (Supl 1): 37.
2. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Carreras A, Mesa J, Simó R. **Resistencia a la insulina y depósitos de hierro en pacientes no diabéticos infectados por el virus de la hepatitis C.** 44 Congreso Nacional de la Sociedad Española de

- Endocrinología y Nutrición. Alicante. Publicado en: Endocrinol Nutr 2002; 49 (Supl 1): 24.
3. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, Carreras A, Mesa J, Simó R. **Insulin Resistance is associated to iron stores in non-diabetic patients with Hepatitis C Virus infection.** 62nd Scientific Sessions of the American Diabetes Association. San Francisco, USA. Publicado en: Diabetes 2002; 51 (Suppl 2): A 585.
 4. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Jardí R, Mesa J, Simó R. **Eleuada prevalença d'alteracions hidrocarbonades en els pacients infectats pel VHC: estudi prospectiu considerant el tipus d'afectació hepàtica (hepatitis crònica vs. cirrosi).** 7è Congrés de l'Associació Catalana de Diabetis. Maig 2003. Bellaterra.
 5. Lecube A, Hernández C, Garcia L, Genescà J, Mesa J, Simó R. **Diabetes is the main factor related to the high ferritin levels detected in patients with hepatitis C virus infection.** 63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association. New Orleans, USA. Publicado en: Diabetes 2003; 52 (suppl 1): A541.
 6. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Mesa J, Simó R. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection. **A large cohort study considering the liver damage.** 18th Congress of the International Diabetes Federation. 24 – 29 de Agosto. Paris, Francia. Publicado en: Diabetología 2003; 46 (suppl 2): A148.
 7. Lecube A, Hernández C, Carrera A, Francisco G, Simó R. **Receptores solubles de la transferrina y ferritina en la diabetes mellitus tipo 2.** XVII Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Valencia. Publicado en: Avances en Diabetología 2004; 20 (Supl 1): 38-39.
 8. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, García L, Simó R. **La diabetes es el principal factor que explica el aumento de la ferritina sérica en la infección crónica por el virus de la hepatitis C.** 46 Congreso Nacional de la

Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. Barcelona. Publicado en:
Endocrinol Nutr 2004; 51 (Supl 1): 13.

9. Lecube A, Hernández C, Genescà J, García L, Francisco G, Simó R. **Diabetes is the main factor accounting for the high ferritin levels detected in patients with chronic hepatitis due to C virus infection.** 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). 5 – 9 de Septiembre. Munich, Alemania. Publicado en: Diabetología 2004; 46 (suppl 2): A148.