

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Associação entre o polimorfismo na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6, *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica

Belo Horizonte, MG

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Associação entre o polimorfismo na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6, *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre.

Cliviany Borges da Silva

Orientadora: Prof^a. Luciana Diniz Silva

Coorientadora: Prof^a. Juliana Maria Trindade Bezerra

Belo Horizonte, MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: **Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida**

Vice-Reitora: **Prof. Alessandro Fernandes Moreira**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Prof. Fábio Alves da Silva Junior**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Prof. Mario Fernando Montenegro Campos**

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof^a. Alamanda Kfoury Pereira**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof^a. Eli Iola Gurgel Andrade**

Chefe do Departamento de Clínica Médica: **Prof^a. Valéria Maria Augusto**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora: **Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari**

Subcoordenadora: **Prof^a. Suely Meireles Rezende**

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:

Prof. Eduardo Garcia Viela

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Eduardo Garcia Viela

Prof^a. Luciana Costa Faria

Prof^a. Luciana Diniz Silva

Prof. Paulo Caramelli

Prof^a. Suely Meireles Rezende

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

SI586a Silva, Cliviany Borges da.
Associação entre o polimorfismo na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6, diabetes mellitus tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica [manuscrito]. / Cliviany Borges da Silva. - - Belo Horizonte: 2019.

87f.: il.

Orientador (a): Luciana Diniz Silva.

Coorientador (a): Juliana Maria Trindade Bezerra.

Área de concentração: Ciências Aplicadas a Saúde do Adulto.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Diabetes Mellitus Tipo 2. 2. Hepatite C Crônica. 3. Interleucina-6. 4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 5. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Luciana Diniz. II. Bezerra, Juliana Maria Trindade. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WK 810



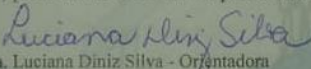
FOLHA DE APROVAÇÃO

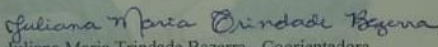
ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -174 G/C DA REGIÃO PROMOTORA
DO GENE QUE CODIFICA A INTERLEUCINA IL-6 E DIABETES MELLITUS TIPO
2 EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA

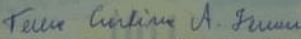
CLIVIANY BORGES DA SILVA

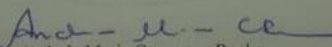
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

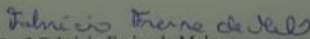
Aprovada em 27 de junho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Luciana Diniz Silva - Orientadora
UFMG


Profa. Juliana Maria Trindade Bezerra - Coorientadora
UFMG


Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
UFMG


Prof. Andreia Maria Camargos Rocha
UFMG


Prof. Fabricio Freire de Melo
UFBA

Belo Horizonte, 27 de junho de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família que sempre esteve ao meu lado em todas as decisões. Em especial aos meus pais José Domingos da Silva (*in memoriam*) e Iracilda Borges Faria da Silva que sempre empenharam pela educação dos filhos, de forma ética e humilde, mas com grande sabedoria. Ao meu amado marido Johann Eustáquio, que cresceu ao meu lado durante esse tempo aprendendo a superar desafios e colher frutos juntos. Aos meus irmãos Marcelo e Michael, a minha irmã Flavianne, as minhas cunhadas Michelle e Aline e a meu cunhado Marcelo pela palavra amiga, orações e escuta. E por fim as flores do meu jardim do coração, minha dindinha, minha Marcellinha e minha Fernandinha, que semeiam esperança, serenidade e alegria em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que faz um *Kairós* em minha vida e à Nossa Senhora que me acolhe e intercede a cada momento.

À Prof^a. Luciana Diniz Silva, minha orientadora, com seu caráter profissional e dedicação com a pesquisa, que me recebeu em seu grupo. Agradeço pelo tempo dedicado, pela serenidade e paciência em ensinar e direcionar meu trabalho para que este se concretizasse. Por todo meu crescimento, como pesquisadora e pessoa e por sua capacidade de me enxergar além de uma bióloga. Fica meu sentimento de agradecimento e carinho.

À Prof^a. Juliana Maria Trindade Bezerra, minha coorientadora que com todo comprometimento e conhecimento, buscou estar sempre de prontidão. Pelos ensinamentos, além da pesquisa e pela amizade, todo o meu reconhecimento e gratidão.

À Prof^a. Rosangela Teixeira, pela acolhida para que fizéssemos este bonito trabalho junto à equipe do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (AHEV/IAG/HC/UFMG), pelo seu companheirismo, carisma e pelos sólidos e grandiosos ensinamentos acerca da hepatite C crônica e outras hepatopatias.

Ao Prof. Gifone Aguiar Rocha, pela disponibilidade e colaboração durante as análises que contribuíram para o enriquecimento do trabalho por meio de diversas sugestões enriquecedoras.

À Prof^a. Djenane, que através de suas aulas me inspirou a trabalhar com os pacientes de forma sistêmica e integrada, buscando dar aos mesmos uma melhor qualidade de vida frente ao tratamento.

À Prof^a. Yone, que participou de nossas reuniões sempre dando sugestões que enriqueceram a pesquisa.

À Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, pelos ensinamentos de imunologia, genética e estatística e por sua grande contribuição para minha formação como pesquisadora.

As minhas colegas Aline, Cecy, Luciana Rodrigues, Kiara Diniz, Marta, Nataly e Tamires e ao meu colega Diego do grupo de pesquisa, NUTRICLIM, pelo ensinamento, apoio e parceria durante todo o tempo de pesquisa. Em especial à Cecy, que de forma tranquila e sábia abriu um caminho de oportunidades para minha vida acadêmica.

A todos os alunos de extensão e iniciação científica, em especial à Luísa Freitas e Ana, que auxiliaram de forma grandiosa na organização dos dados.

Ao Dr. Rodrigo Dias Cambraia, Geraldo Scarabelli, Isabella Gomes, Raquel e toda a equipe interdisciplinar do AHEV/IAG/HC/UFMG, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela cooperação tão fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Walter, Luiza e a toda a equipe do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia, pelo acolhimento e cooperação imprescindível para a realização desta pesquisa.

Ao colegiado do programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto por todo suporte e por construírem um Programa de Pós-Graduação tão grandioso.

Em especial, a todos os pacientes e doadores de sangue que se voluntariaram para a realização deste estudo.

RESUMO

Antecedentes científicos e objetivos: A hepatite C crônica está associada ao *diabetes mellitus* tipo 2. Embora a patogênese, ainda, não esteja completamente esclarecida, evidências reforçam o papel da resposta imunológica pró-inflamatória. Concentrações séricas elevadas de interleucina-6 (IL-6) são identificadas nos cenários clínicos de resistência periférica à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2 e em formas avançadas de doença hepática associadas à infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -174 G/C na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6 em pacientes com hepatite C crônica e em indivíduos saudáveis de origem étnica semelhante. Foram avaliadas, ainda, associações entre fatores demográficos, clínicos, nutricionais, virológicos e genéticos com *diabetes mellitus* tipo 2. **Métodos:** Foram incluídos, prospectivamente, 245 pacientes com hepatite C crônica [média de idade, 51,8 ± 11,4; sexo masculino, 129 (52,7%)] e 179 indivíduos saudáveis [média de idade 38,9 ± 10,3; sexo masculino, 95 (53,1%) (doadores de sangue do Hemocentro do hospital Felício Rocho Hemoter-Clínica Romeu Ibrahim de carvalho - grupo controle)]. O *diabetes mellitus* tipo 2 foi diagnosticado de acordo com os critérios da *American Diabetes Association*. O diagnóstico e o estadiamento da doença hepática foram baseados em critérios clínicos, bioquímicos, histológicos e radiológicos. O SNP do gene que codifica a IL-6 foi avaliado por genotipagem de SNP Taqman. Os dados foram analisados em modelos de regressão logística. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da UFMG. **Resultados:** *Diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e

cirrose hepática foram observados em 20,8% (51/245), 40,0% (98/245) e 38,4% (94/245) dos pacientes, respectivamente. A frequência do SNP de *IL6* estudado não diferiu entre pacientes com hepatite C crônica e grupo controle ($P = 0,81$) e esse polimorfismo estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,38$). Na análise multivariada, *diabetes mellitus* tipo 2 foi inversamente associado aos genótipos GC e CC do gene *IL6*-174 [Razão de chances (RC) = 0,42; Intervalo de confiança (IC) de 95% = 0,22 - 0,78; $P = 0,006$] e positivamente associado à hipertensão arterial sistêmica (RC = 5,56 ; IC 95% = 2,79 - 11,09; $P < 0,001$). **Conclusão:** Este é o primeiro estudo a demonstrar que os genótipos GC e CC do SNP de *IL6*-174 estão associados a risco menor de *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica. Em investigações futuras torna-se essencial identificar mediadores inflamatórios potenciais que possam estar envolvidos na interação entre a infecção pelo HCV e o eixo pâncreas-fígado.

Palavras chave: *Diabetes mellitus* tipo 2; hepatite C crônica, interleucina IL6, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -174 G/C na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6.

ABSTRACT

Background and aims: Chronic hepatitis C (CHC) is associated with type 2 diabetes mellitus. Although the pathogenesis remains to be elucidated, a growing evidence has suggested a role of pro-inflammatory immune response. Increased serum concentrations of IL-6 have been associated with insulin resistance, type 2 diabetes mellitus as well as advanced forms of liver disease in chronic hepatitis C infection. Therefore, we investigated the frequency of *IL6*-174G/C (rs1800795) single nucleotide polymorphism (SNP) in CHC patients and in healthy subjects of the same ethnicity. In addition, we also evaluated the association between demographic, clinical, nutritional, virological and *IL6* genotyping data with type 2 diabetes mellitus in CHC patients. **Methods:** Two hundred and forty-five patients with CHC and 179 healthy control subjects (blood donors) were prospectively included. Type 2 diabetes mellitus was diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association. The diagnosis and staging of the liver disease were based on clinical, biochemical, histological and radiological criteria. *IL6* polymorphism was evaluated by Taqman SNP genotyping assay. The data were analysed by logistic regression models. **Results:** Type 2 diabetes mellitus, blood hypertension and liver cirrhosis were observed in 20.8% (51/245), 40.0% (98/245) and 38.4% (94/245) of the patients, respectively. The frequency of the studied *IL6* SNP did not differ between the CHC patients and controls ($P = 0.81$) and this polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.38$). In the multivariate analysis, type 2 diabetes mellitus was inversely associated with GC and CC genotypes of *IL6*-174 (OR = 0.42; 95%CI = 0.22 - 0.78; $P = 0.006$) and positively associated with blood hypertension (OR = 5.56 ; 95%CI = 2.79 - 11.09;

$P < 0.001$). **Conclusion:** This is the first study to demonstrate that GC and CC genotypes of *IL6*-174 SNP are associated with a decreased risk of type 2 diabetes mellitus in patients with CHC. The challenge remains for forthcoming research to identify potential inflammatory mediators involved in the crosstalk between hepatitis C virus (HCV) infection and the pancreas-liver axis.

Key words: Chronic Hepatitis C; type 2 diabetes mellitus; *interleukin-6* (-174 G/C) gene promoter single nucleotide polymorphism, blood hypertension, healthy control subjects.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AHEV	Ambulatório de Hepatites Virais
CDA	<i>Center For Disease Analysis</i>
CHC	<i>Chronic hepatitis C</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAA	<i>Direct acting antivirais</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EMA	<i>European Medical Agency</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ESH	<i>European Society of Hypertension</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBV	<i>Hepatitis B Vírus</i>
HIV	<i>Vírus da imunodeficiência adquirida</i>
HC	Hospital das Clínicas
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
IC95%	Intervalo de Confiança de 95%
IFN	Interferon
IL-6	Interleucina-6
<i>IL6</i>	Gene que codifica a IL-6
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RI	Resistência à insulina

RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa por reação de cadeia da polimerase
SNPs	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Classificação das manifestações extra-hepáticas da hepatite C crônica	6
Tabela 2. Sondas e condições utilizadas na PCR em tempo real para genotipar o SNP na posição -174 (rs1800795) do gene que codifica a IL-6.	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frases dos pacientes incluídos no presente estudo.	25
Figura 2: Interface assistência, pesquisa e extensão ambulatório de Hepatites Virais – Sala de espera.	26

SUMÁRIO

1. Antecedentes científicos	1
1.1. Cenário da hepatite C	1
1.2. Manifestações extra-hepáticas	5
1.3. Associação entre <i>diabetes mellitus</i> e hepatite C crônica	7
2. Justificativa e objetivos	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Pacientes e Métodos	15
3.1. Desenho do estudo	15
3.2. Critérios de inclusão e exclusão	19
3.3. Coleta e preparação das amostras de sangue	19
3.3.1. Análise dos polimorfismos de genes que codificam as citocinas	20
3.3.1.1. Extração de DNA	20
3.3.1.2. Determinação dos polimorfismos dos genes que codificam as citocinas IL-6 por PCR em tempo real	21
3.4. Análise estatística	22
3.5. Aspectos de bioética e de assistência	23
4. Artigo	27
5. Considerações Finais	61
6. Anexos	62

1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

1.1. Cenário da hepatite C

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é considerada grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo (BRUGGMANN *et al.*, 2014; POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; WHO, 2017).

Estima-se que cerca de 71 milhões de pessoas sejam portadoras crônicas do HCV e que 399.000 morram, anualmente, em decorrência de doença hepática associada ao vírus (POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; WHO, 2017). Endêmica em todo o mundo, a prevalência da hepatite C não é homogênea e apresenta diferenças regionais consideráveis (CDA, 2015; WHO, 2017).

Bruggmann P, Berg T, Øvrehus AL, Moreno C, Brandão Mello CE, Roudot-Thoraval F *et al.* Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 2014;21 Suppl 1:5-33. doi: 10.1111/jvh.12247. PMID: 24713004.

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2:161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9. PMID: 28404132.

World Health Organization (2017) - Global Hepatitis Report. Geneva. <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Acesso abril, 2019.

Center for Disease Analysis. HCV Epidemiology – Summary Slides. Colorado, 2015. Disponível em: <http://www.centerforda.com/downloads.htm>. Acesso abril, 2019.

Em 2010, o Ministério da Saúde divulgou o resultado de um Inquérito Nacional de Hepatites Virais (UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO, 2010). A prevalência da infecção nas capitais brasileiras foi de 1,38% (intervalo de confiança - IC 95%, 1,12% - 1,64%) e homogênea entre todas as regiões do Brasil. Dentre essas regiões, a prevalência da hepatite C foi maior na região Norte [2,1% (IC 95% 1,4% - 2,8%)].

Em relação à história natural da hepatite C, aproximadamente 80,0% dos indivíduos que adquirem a infecção aguda tornam-se portadores crônicos e, destes, cerca de 20,0% evoluem para a cirrose e suas complicações em aproximadamente 10 a 20 anos após a infecção (ALTER *et al.*, 1992). Dessa maneira, o número de indivíduos cronicamente infectados pelo HCV, que estão em risco de evoluir para formas avançadas da doença hepática, é projetado em aumentar de forma significativa nas próximas décadas (MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013; WEASTBROOK & DUSHEIKO, 2014).

Universidade de Pernambuco. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelo vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. UdPNd, Núcleo de Pós-graduação, Relatório de pesquisa, p. 1-295, 2010.

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-905. doi: 10.1056/NEJM199212313272702. PMID: 1280771.

Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333-42. doi: 10.1002/hep.26141. PMID: 23172780.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014;61(1 Suppl):S58-68. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.012. PMID: 25443346.

Nos últimos 15 anos, o interferon peguilado alfa-2a ou alfa-2b (PegIFN) e a ribavirina (RBV) foram os componentes essenciais do tratamento antiviral da hepatite C crônica, contudo a partir de 2011, essa terapia passa por mudança profunda e radical (WHO, 2018a). Inicialmente, foram introduzidos os agentes antivirais diretos [*direct-acting antivirals* (DAAs)] de primeira geração, que compreendiam dois inibidores de proteases do HCV: boceprevir e telaprevir (EASL, 2011). Esses medicamentos foram usados em combinação com o PegIFN + RBV e se associaram à maior complexidade do tratamento e elevada frequência de efeitos adversos (SARRAZIN *et al.*, 2012). Conseqüentemente, três anos após sua aprovação, essa terapia não é mais recomendada em muitos países (DUSHEIKO & WEDEMEYER, 2012).

World Health Organization (2018a) - Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection [Internet]. Geneva 2018 Jul. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531733/PubMed>. Acesso abril, 2019.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245-64. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.023. PMID: 21371579.

Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012;56 Suppl 1:S88-100. doi: 10.1016/S0168-8278(12)60010-5. PMID: 22300469.

Dusheiko G, Wedemeyer H. New protease inhibitors and direct-acting antivirals for hepatitis C: interferon's long goodbye. *Gut* 2012;61:1647-52. doi:10.1136/gutjnl-2012-302910. PMID: 22936671.

Desde o ano de 2013, a terapia sem o emprego de interferon alfa (IFN- α) tornou-se realidade. Em 2015, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medical Agency* (EMA) aprovaram novos DAAs: sofosbuvir (inibidor de polimerase nucleotídeo análogo); simeprevir (inibidor de protease de segunda geração); daclatasvir (inibidor da VHC-NS5A); combinação - sofosbuvir + ledipasvir (inibidor da NS5A); combinação paritaprevir + ombitasvir + dasabuvir. As taxas de RVS atingiram valores entre 92,0% e 100,0% (EASL, 2014). Pela primeira vez, 90,0% dos pacientes acometidos por doença crônica podem ser “curados” com apenas três meses de terapia. No entanto, o avanço no tratamento da hepatite C crônica também representa um desafio para muitos sistemas de saúde em todo o mundo. Apesar de extremamente seguras e eficazes, as novas terapias são caras (WEDEMEYER *et al.*, 2015). No Brasil, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e coinfeções (BRASIL, 2019), entre os DAAs que são fornecidos pelo Ministério da Saúde para o tratamento da hepatite C crônica estão: ledipasvir/sofosbuvir, velpatasvir/sofosbuvir e glecaprevir/pibrentasvir (NOTA INFORMATIVA Nº 13/2019-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS, de 31 de outubro de 2019).

European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014;60:392-420. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.003. Epub 2013 Dec 9. Erratum in: *J Hepatol* 2014;61:183-4. PMID: 24331294.

Wedemeyer H, Dore GJ, Ward JW. Estimates on HCV disease burden worldwide - filling the gaps. *J Viral Hepat* 2015;22 Suppl 1:1-5. doi: 10.1111/jvh.12371. PMID: 25560838.

Brasil, 2019 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfeções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes>>.

NOTA INFORMATIVA Nº 13/2019-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS. Atualizada em 17 de outubro de 2019, retificada em 31 de outubro de 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-132019-covigcgvpdiahvsvsms>.

Em síntese, 25 anos após a descoberta do VHC, DAAs são desenvolvidos e revolucionam o tratamento da infecção pelo VHC, proporcionando, assim, perspectivas em relação à cura abrangente de uma infecção viral crônica em seres humanos (CHUNG & BAUMERT, 2014).

1.2. Manifestações extra-hepáticas

A hepatite C crônica é considerada doença sistêmica e várias condições extra-hepáticas que podem aumentar a morbidade e a mortalidade têm sido descritas, a exemplo da crioglobulinemia mista, distúrbios linfoproliferativos, doenças cardiovasculares e renais, resistência periférica à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2, síndrome Sicca, artrite reumatóide e produção de autoanticorpos (YOUNOSSI *et al.*, 2016; RAMOS-CASALS *et al.*, 2017). De acordo com o grau de evidência de associação com a hepatite C crônica, as manifestações extra-hepáticas são classificadas como apresentado na **Tabela 1**.

Chung RT, Baumert TF. Curing chronic hepatitis C-the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* 2014;370:1576-8. doi: 10.1056/NEJMp1400986. PMID: 24720678.

Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology* 2016;150:1599-1608. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.039. PMID: 26924097.

Ramos-Casals M, Zignego AL, Ferri C, Brito-Zerón P, Retamozo S, Casato M et al. International Study Group of Extrahepatic Manifestations related to HCV (ISG-EHCV). Evidence-based recommendations on the management of extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2017;66:1282-1299. doi: 10.1016/j.jhep.2017.02.010. PMID: 28219772.

Tabela 1. Classificação das manifestações extra-hepáticas da hepatite C crônica

Associação determinada pela epidemiologia e fisiopatologia
Crioglobulinemiamista
Linfomanão-Hodgkin
Associação determinada com base na forte associação epidemiológica
Gamopatiamonoclonais
Porfiriacutâneatarada
Líquen plano
<i>Diabetes mellitus</i>
Associação a ser caracterizada ou confirmada
Tireoiditeautoimune
Câncer de tireóide
Síndrome <i>sicca</i>
Fibrosepulmonar alveolar
Nefropatias
Alterações neuropsiquiátricas (déficits cognitivos, fadiga e humor deprimido)
Evidências científicas fracas
Psoríase
Neuropatiaperiférica
Poliartritescrônicas
Artriterreumatóide
Poliarteritenodosa
Síndrome de Behçet
Miosites/dermatomiosites
Fibromialgia
Urticária crônica
Vitiligo
Pseudosarcoma de Kaposi
Cardiomiopatias
Úlcera córnea

Fonte: adaptado de Craxì A, Laffi G, Zignego AL, 2008.

Craxì A, Laffi G, Zignego AL. Hepatitis C virus (HCV) infection: a systemic disease. *Mol Aspects Med* 2008;29:85-95. doi: 10.1016/j.mam.2007.09.017. PMID: 18177700.

1.3. Associação entre *diabetes mellitus* e hepatite C crônica

Em estudo pioneiro de 1898, Naunyn descreveu a associação entre a cirrose hepática e o *diabetes mellitus*, que foi denominado “*hepatogenous diabetes*”. Assim, a cirrose hepática pode ocasionar intolerância à glicose ou *diabetes mellitus*. A prevalência da diabetes em cirróticos com doença hepática gordurosa não alcoólica, cirrose idiopática, hepatite C e hepatopatia alcoólica varia entre 27,3% e 56,1% (LEE *et al.*, 2019). No contexto da infecção crônica pelo HCV e da doença hepática gordurosa não alcoólica, observa-se que o *diabetes mellitus* tipo 2 pode surgir previamente à instalação da cirrose hepática (CIMINO *et al.* 2001; LECUBE *et al.*, 2006a; HUNTER, 2012). Dessa forma, em conjunto, o metabolismo da glicose modificado e o HCV contribuem para o aumento da inflamação e, ambos, interagem em ciclo de retroalimentação (LECUBE *et al.*, 2006b; CHEN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Naunyn B. Glykosurie and Diabetes durch experimentelle Insulte and Krankheiten der Leber. In: Naunyn B, ed. *Der Diabetes Mellitus*. Vienna:1898:38-49.

Lee WG, Wells CI, McCall JL, Murphy R, Plank LD. Prevalence of diabetes in liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2019;35:e3157. doi: 10.1002/dmrr.3157. PMID: 30901133.

Cimino L, Oriani G, D'Arienzo A, Manguso F, Loguercio C, Ascione A, Caporaso N, Del Vecchio Blanco C, Budillon G. Interactions between metabolic disorders (diabetes, gallstones, and dyslipidaemia) and the progression of chronic hepatitis C virus infection to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A cross-sectional multicentre survey. *Dig Liver Dis* 2001;33:240-6. doi: 10.1016/s1590-8658(01)80714-3. PMID: 11407669.

Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 2006a;29:1140-9. doi: 10.2337/diacare.2951140. PMID: 16644655.

Hunter P. The inflammation theory of disease. *EMBO Rep* 2012; 13:968-970. doi: 10.1038/embor.2012.142. PMID: 23044824.

Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care* 2006b;29:1096-101. doi: 10.2337/diacare.2951096. PMID: 16644643.

Chen Y, Ji H, Shao J, Jia Y, Bao Q, Zhu J, Zhang L, Shen Y. Different Hepatitis C Virus Infection Statuses Show a Significant Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus: A Network Meta-Analysis. *Dig Dis Sci* 2019. doi: 10.1007/s10620-019-05918-7. PMID: 31758432. [Epub ahead of print].

Wang CC, Cheng PN, Kao JH. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Aliment Pharmacol Ther* 2019. doi: 10.1111/apt.15575. PMID: 31746482. [Epub ahead of print]

A patogênese da *diabetes mellitus* tipo 2 engloba, ambos, graus diferentes de resistência à insulina e deficiência relativa de insulina (NARITA *et al.* 2004; STUMVOLL *et al.* 2005). Embora, em vigência da infecção pelo HCV, alguns mecanismos subjacentes à alteração do metabolismo da glicose tenham sido elucidados (SHINTANI *et al.* 2004; SERFATY & CAPEAU, 2009; BALLESTRI *et al.* 2016; DESBOIS *et al.* 2017), vários aspetos permanecem, ainda, desconhecidos. Além deste aspecto, pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 são suscetíveis à progressão acelerada da doença hepática, ou seja, desenvolvimento de fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (NEGRO *et al.* 2009; WONG *et al.* 2018; LI *et al.* 2019).

Narita R, Abe S, Kihara Y, Akiyama T, Tabaru A, Otsuki M. Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004;41:132-8. doi: 10.1016/j.jhep.2004.03.020. PMID: 15246219.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365(9467):1333-46. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X. PMID: 15823385.

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;126:840-8. doi: 10.1053/j.gastro.2003.11.056. PMID: 14988838.

Serfaty L, Capeau J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2009;29 Suppl 2:13-25. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01952.x. PMID: 19187069.

Ballestri S, Nascimbeni F, Romagnoli D, Baldelli E, Targher G, Lonardo A. Type 2 Diabetes in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatitis C Virus Infection - Liver: The "Musketeer" in the Spotlight. *Int J Mol Sci* 2016;17:355. doi: 10.3390/ijms17030355. PMID: 27005620.

Desbois AC, Cacoub P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. *World J Gastroenterol* 2017;23:1697-1711. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1697. PMID: 28321170.

Negro F, Alaei M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2009;15:1537-47. doi: 10.3748/wjg.15.1537. PMID: 19340895.

Wong A, Le A, Lee MH, Lin YJ, Nguyen P, Trinh S, Dang H, Nguyen MH. Higher risk of hepatocellular carcinoma in Hispanic patients with hepatitis C cirrhosis and metabolic risk factors. *Sci Rep* 2018;8:7164. doi:10.1038/s41598-018-25533-2. PMID: 29740031.

Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, Moorman AC, Spradling PR, Teshale EH, Boscarino JA, Schmidt MA, Daida YG, Lu M; CHeCS Investigators. Sustained virological response to hepatitis C treatment decreases the incidence of complications associated with type 2 diabetes. *Aliment Pharmacol Ther* 2019;49:599-608. doi: 10.1111/apt.15102A. PMID: 30650468.

Diversos fatores podem estar envolvidos nesta interação, incluindo os efeitos relacionados ao HCV e os fatores associados ao hospedeiro. Em relação ao indivíduo, destacam-se o excesso de peso e a resposta inflamatória com a produção de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (LECUBE *et al.*, 2006a; HUNTER, 2012; FALLAHI *et al.*, 2012). Entre os marcadores inflamatórios, as concentrações séricas aumentadas de IL-6 têm sido associadas à resistência à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2, assim como às formas avançadas de doença hepática em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV (HUTH *et al.*, 2009; FALLETI *et al.*, 2010; ZAMORA-GINEZ *et al.*, 2013; SGHAIER *et al.*, 2017).

Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 2006a;29:1140-9. doi: 10.2337/diacare.2951140. PMID: 16644655.

Hunter P. The inflammation theory of disease. *EMBO Rep* 2012; 13:968-970. doi: 10.1038/embor.2012.142. PMID: 23044824.

Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, Corrado A, Sansonno D, Antonelli A. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:468107. doi: 10.1155/2012/468107. PMID: 22611419.

Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Doring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt Asterholm I, Jansson JO, Boeing H, Mohlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. *Ann Med* 2009;41:128-38. doi: 10.1080/07853890802337037. PMID: 18752089.

Falleti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, Fontanini E, Cmet S, Minisini R, Bitetto D, Toniutto P, Pirisi M. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. *Human Immunology* 2010;71: 999-1004. doi: 10.1016/j.humimm.2010.06.006. PMID: 20655350.

Zamora-Ginez I, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J, Baez-Duarte BG, Torres-Rasgado E, Romero JR, Pérez-Fuentes R, Mendoza-Carrera F; Multidisciplinary Research Group on Diabetes of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Low prevalence of interleukin-6 haplotypes associated with a decreased risk of type 2 diabetes in Mexican subjects with a family history of type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2013;44:529-34. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.09.003. PMID: 24051035.

Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, Loueslati BY. Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine* 2017;89:62-67. doi: 10.1016/j.cyto.2016.10.004. PMID: 28340949.

Polimorfismos do gene que codifica a interleucina-6 (IL-6), que podem alterar a expressão de IL-6, foram investigados previamente no contexto da doença metabólica e da hepatite C crônica (HUTH *et al.*, 2009; FALLETI *et al.*, 2010; ZAMORA-GINEZ *et al.*, 2013; SGHAIER *et al.*, 2017).

A associação entre o polimorfismo de nucleótido único (SNP) do *IL6* localizado na região promotora na posição -174G/C (rs1800795) com *diabetes mellitus* tipo 2 foi reportada pela primeira vez nos índios pima dos EUA e caucasianos espanhóis (VOZAROVA *et al.*, 2013).

Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Doring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt Asterholm I, Jansson JO, Boeing H, Mohlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. *Ann Med* 2009;41:128-38. doi: 10.1080/07853890802337037. PMID: 18752089.

Falleti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, Fontanini E, Cmet S, Minisini R, Bitetto D, Toniutto P, Pirisi M. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. *Human Immunology* 2010;71: 999-1004. doi: 10.1016/j.humimm.2010.06.006. PMID: 20655350.

Zamora-Ginez I, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J, Baez-Duarte BG, Torres-Rasgado E, Romero JR, Pérez-Fuentes R, Mendoza-Carrera F; Multidisciplinary Research Group on Diabetes of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Low prevalence of interleukin-6 haplotypes associated with a decreased risk of type 2 diabetes in Mexican subjects with a family history of type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2013;44:529-34. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.09.003. PMID: 24051035.

Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, Loueslati BY. Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine* 2017;89:62-67. doi: 10.1016/j.cyto.2016.10.004. PMID: 28340949.

Vozarova B, Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; doi: 10.1007/s00439-003-0912-x 112:409-13. PMID: 12589429.

O alelo C foi significativamente associado à risco menor de *diabetes* tipo 2. No entanto, em novas investigações, estes resultados não foram confirmados (HUTH *et al.*, 2006; HUTH *et al.*, 2009).

No cenário da hepatite C, SNPs do *IL6* têm sido associados a desfechos hepáticos e manifestações extra-hepáticas como cirrose, carcinoma hepatocelular e redução dos escores de qualidade de vida (FALLETI *et al.*, 2010; CUSSIGH *et al.*, 2011; GIANNITRAPANI *et al.*, 2013; SGHAIER *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2019).

Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wolford JK, Langer B, Thorand B, Klopp N, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Lyssenko V, Groop L, Meisinger C, Döring A, Löwel H, Lieb W, Hengstenberg C, Rathmann W, Martin S, Stephens JW, Ireland H, Mather H, Miller GJ, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Boeing H, Möhlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Wernstedt I, Niklason A, López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Hanson RL, Gallart L, Vendrell J, Tsiavou A, Hatziaelaki E, Humphries SE, Wichmann HE, Herder C, Illig T. IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 2006;55:2915-21. doi: 10.2337/db06-0600. PMID: 17003362.

Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Döring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt Asterholm I, Jansson JO, Boeing H, Möhlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. *Ann Med* 2009;41:128-38. doi: 10.1080/07853890802337037. PMID: 18752089.

Falleti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, Fontanini E, Cmet S, Minisini R, Bitetto D, Toniutto P, Pirisi M. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. *Human Immunology* 2010;71: 999-1004. doi: 10.1016/j.humimm.2010.06.006. PMID: 20655350.

Cussigh A, Falleti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, Bignulin S, Fornasiere E, Fumolo E, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. *Immunogenetics* 2011;63:33-41. doi: 10.1007/s00251-010-0491-7. PMID:21072509.

Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19:2449-2455. doi: 10.3748/wjg.v19.i16.2449. PMID: 23674845.

Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, Loueslati BY. Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine* 2017;89:62-67. doi: 10.1016/j.cyto.2016.10.004. PMID: 28340949.

Vieira DA, da Cunha LR, da Silva CB, Almeida MTB, Gomes AD, de Faria CLL Jr, Teixeira R, Neves FS, Rocha GA, de Melo FF, de Magalhães Queiroz DM, Silva LD. The combined polymorphisms of interleukin-6-174GG genotype and interleukin-10 ATA haplotype are associated with a poor quality of life in patients with chronic hepatitis C. *Qual Life Res* 2019;28:1531-1542. doi: 10.1007/s11136-019-02129-5. PMID: 30734130.

No geral, experimentos *in vitro*, assim como estudos clínicos, incluindo indivíduos saudáveis, a presença de alelo C foi associada a níveis mais baixos de IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998; TERRY *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2013). A associação entre concentração reduzida desta citocina e o SNP *IL6-174* é mais relevante em indivíduos que apresentam o genótipo CC (FISHMAN *et al.*, 1998; TERRY *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2013).

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369- 1376. doi: 10.1172/JCI2629. PMID: 9769329.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000 ;275(24):18138-44. doi: 10.1074/jbc.M000379200. PMID: 10747905.

Woo P & Humphries SE. IL-6 polymorphisms: a useful genetic tool for inflammation research? *J Clin Invest* 2013;123:1413-1414. doi: 10.1172/JCI67221. PMID: 23543063.

2. JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS

Globalmente, estima-se que 422 milhões de adultos tenham *diabetes mellitus* (WHO, 2016) e cerca de 71 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) (POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; WHO, 2017). Nas últimas duas décadas, várias evidências científicas apontam para a associação entre *diabetes mellitus* tipo 2 e infecção pelo HCV (HUM *et al.*, 2018). Com base na prevalência elevada e a na distribuição mundial destas duas comorbilidades, a associação entre elas tem impacto significativo na saúde pública (WHO, 2016; POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; WHO, 2017).

World Health Organization (2016). Global Report on Diabetes. Geneva. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf. Acesso abril, 2019.

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2:161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9. PMID: 28404132.

World Health Organization (2017) - Global Hepatitis Report. Geneva. <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Acesso abril, 2019.

Hum J, Jou JH. The link between hepatitis C virus and diabetes mellitus: Improvement in insulin resistance after eradication of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* (Hoboken) 2018;11:73-76. doi: 10.1002/cld.694. PMID: 30992793.

Além dos dados descritos acima, sabe-se que a resposta imunológica do hospedeiro contra o HCV pode ocasionar o aparecimento de manifestações extra-hepáticas. Diante dessas evidências elaboramos a hipótese de que pacientes com hepatite C crônica que apresentam o genótipo *IL6-174G/G*, isto é, fenótipo com produção elevada de IL-6, teriam uma resposta inflamatória exacerbada. Esse perfil pró-inflamatório influenciaria negativamente o curso do *diabetes mellitus* tipo 2 nesses pacientes. Ainda, esses fatores poderiam acelerar a fibrose hepática, que também interfere na resistência à insulina. Portanto, para ampliar o conhecimento na área, são objetivos desse estudo:

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6 com *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica.

2.2 . Objetivos específicos

- Avaliar a frequência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -174 G/C na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6 em pacientes com hepatite C crônica e em indivíduos saudáveis de origem étnica semelhante;
- Avaliar associações entre fatores demográficos, clínicos, nutricionais, virológicos e genéticos com *diabetes mellitus tipo 2*.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo caso-controle realizado no período de agosto de 2016 a janeiro 2019. Este estudo foi conduzido no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (AHEV/IAG/HC/UFMG) e na Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho do Hospital Felício Rocho, depois da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais [COEP-UFMG, (ETIC 0631.0.203.000-09 e ETIC 0404.0.203.000-10) ANEXO A] e autorização do respectivo hospital (ANEXO A). Todos os indivíduos incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B e ANEXO C).

Duzentos e sessenta pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica foram convidados a participar do estudo. Quinze pacientes foram excluídos: doze não completaram o questionário e em três não foi possível usar a amostra de sangue para o estudo genético. Duzentos e quarenta e cinco pacientes [média de idade, $51,8 \pm 11,4$ anos; sexo masculino, 129/245 (52,7%)] e 179 controles [média de idade, $38,9 \pm 10,3$; sexo masculino, 95/179 (53,1%)] permaneceram no estudo. O grupo controle foi composto por doadores de sangue, que foram incluídos prospectivamente após esclarecimento e assinatura do TCLE (ANEXO C). Todos os doadores de sangue incluídos no estudo não estavam infectados pelos vírus HCV, HBV e/ou HIV.

O cálculo da amostra foi feito pelo emprego do programa Epi Info, com intervalo de confiança de 95,0% [(IC 95,0%) e poder do teste de 80,0%], com base na prevalência de *diabetes mellitus* na população brasileira e em pacientes cronicamente infectados pelo HCV e empregando a frequência de 5,5% a 11,9% e 16,0% a 64,0%, para controles e casos, respectivamente, na proporção de casos e controles (2:1), seriam necessários pelo menos 180 casos e 90 controles (TELO *et al.*, 2016; GASTALDI *et al.*, 2017).

Ao serem incluídos no estudo, todos os indivíduos responderam a um questionário contendo informações sobre dados pessoais, sociodemográficos e clínicos (ANEXO D). Ainda, os participantes, foram submetidos à avaliação clínica detalhada, constituída pela história clínica e pelo exame físico. Adicionalmente, foram submetidos aos exames complementares: bioquímicos, sorológicos, histológicos e radiológicos por técnicas rotineiras para o diagnóstico e estadiamento da hepatopatia pelo HCV.

O diagnóstico de hepatite C crônica foi feito por sorologia, ensaio imunoenzimático comercial de terceira geração (AxSYM HCV 3.0, ABBOTT, Wiesbaden, Alemanha) e confirmado por detecção do RNA do HCV no sangue (RNA viral qualitativo para HCV) por transcrição reversa por reação de cadeia da polimerase (RT-PCR) (Cobas amplicor VHC 2.0; Roche diagnostics, Branchburg, Nova Jersey, EUA).

Telo GH, Cureau FV, de Souza MS, Andrade TS, Copês F, Schaan BD. Prevalence of diabetes in Brazil over time: a systematic review with meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 2016;8:65. doi: 10.1186/s13098-016-0181-1. PMID: 27610204.

Gastaldi G, Goossens N, Clément S, Negro F. Current level of evidence on causal association between hepatitis C virus and type 2 diabetes: A review. *J Adv Res* 2017;8:149-159. doi: 10.1016/j.jare.2016.11.003. PMID: 28149650.

O diagnóstico de cirrose hepática foi feito com base em parâmetros clínicos, bioquímicos, radiológicos e histológicos (Child & Turcotte, 1964, Bedossa & Poynard, 1996; Tsochatzis *et al.*, 2014; D'Amico *et al.*, 2014). A gravidade da disfunção hepática foi avaliada de acordo com a pontuação *Child-Pugh-Turcotte* (Child & Turcotte, 1964). Cirrose compensada foi definida como ausência de hemorragia digestiva ocasionada por ruptura de varizes esofagianas, ascite e edema, icterícia ou encefalopatia sintomática em exame físico, e cirrose descompensada como a presença de qualquer uma dessas complicações (D'Amico *et al.*, 2014). O escore de *Child-Turcotte*, baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais e estratifica os pacientes com cirrose hepática em três grupos distintos (A, B ou C) em ordem crescente de gravidade. Deve ser ressaltado que esse escore aponta o prognóstico da cirrose, especialmente em relação à mortalidade desses pacientes. O índice *aspartate amino transferase to platelet ratio index* (APRI) (Wai *et al.*, 2003) foi calculado para cada participante com base em dados laboratoriais e clínicos.

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014;383(9930):1749-1761 [PMID: 24480518 doi: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5].

Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24, 289-293 [PMID: 8690394 doi: 10.1002/hep.510240201].

Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964;1: 1-85 [PMID: 4950264].

D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, Tinè F, Giannuoli G, Traina M, Vizzini G, Politi F, Luca A, Virdone R, Licata A, Pagliaro L. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: A 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39: 1180-1193 [PMID: 24654740 doi: 10.1111/apt.12721].

Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-26 [PMID: 12883497 doi: 10.1053/jhep.2003.50346].

O diagnóstico de *diabetes mellitus* foi baseado nos seguintes parâmetros: uso atual de medicação hipoglicemiante oral ou insulina; glicose plasmática aleatória ≥ 200 mg/dl na presença de sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, glicemia de jejum (GPJ) ≥ 126 mg/dl em duas ocasiões; glicemia plasmática ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) detectada depois de duas horas da ingestão de 75 gramas de dextrosol, (teste oral de tolerância à glicose); hemoglobina glicada (A1c) $\geq 6,5\%$ em duas ocasiões. O diagnóstico de DM foi feito de acordo os critérios diagnósticos recomendados pela Sociedade Americana de Diabetes (ADA, 2019).

Os exames complementares (bioquímicos, sorológicos, histológicos, métodos de imagem e de biologia molecular) foram solicitados conforme os protocolos de assistência instituídos no AHEV/IAG/HC/UFMG, de acordo com as portarias de tratamento das hepatites virais do Ministério da Saúde para hepatite C (BRASIL, 2019). A biópsia hepática somente foi realizada se houvesse indicação clínica. As informações relativas à atividade e estadiamento da hepatopatia observadas no exame anatomopatológico foram disponibilizadas para a pesquisa. Portanto, não foram realizados exames adicionais na rotina do serviço para o objetivo desta pesquisa. A continuidade da assistência médica foi garantida a todos os indivíduos, independentemente de seu aceite em participar do estudo. Nenhum nome ou endereço foi incluído no banco de dados, para se preservar a confidencialidade.

American Diabetes Association Diabetes Care (ADA), 2017. Disponível em: <http://www.diabetes.org/>. Acesso abril de 2019.

Brasil, 2019 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfecoes>>.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

3.2.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico de hepatite C crônica;
- Paciente com idade igual ou superior a 18 anos;
- Concordância em participar da pesquisa, após informação de seus objetivos e métodos;
- Assinatura do TCLE.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Gravidez e amamentação;
- Encefalopatia hepática;
- Coinfecção pelos vírus da hepatite B e da hepatite C (HBV/HCV);
- Coinfecção pelos vírus da hepatite C e HIV (HCV/HIV);
- Uso atual ou prévio de interferon nos últimos doze meses;
- Presença de doença avançada, como doença renal crônica, insuficiência cardíaca, doença pulmonar crônica, pancreatite crônica e neoplasia, incluindo carcinoma hepatocelular.

3.3 Coleta e preparação das amostras de sangue

De cada paciente foi colhida uma amostra de sangue periférico em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a pesquisa de polimorfismos nos genes que codificam citocinas. As amostras foram centrifugadas a 4.000 x g

durante 15 minutos a 18°C, distribuídas em alíquotas em criotubos separados (células e plasma) e mantidas a -80°C até a realização dos experimentos.

3.3.1. Análise dos polimorfismos de genes que codificam as citocinas

3.3.1.1. Extração de DNA

A extração de DNA dos leucócitos foi feita com o “*QIAmp DNA mini kit*” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Os criotubos contendo aproximadamente 200 µl de leucócitos foram retirados do freezer a -80°C, agitados vigorosamente em vórtex por 10 segundos e centrifugados. Foram adicionados a cada um dos tubos 20µl de proteinase K (20mg/ml) e a suspensão foi homogeneizada. Foram, então, acrescentados 200µl do tampão de lise e a mistura foi homogeneizada em vórtex, centrifugada e incubada a 58°C por 30 minutos.

A seguir, 200µl de etanol foram adicionados e a solução homogeneizada foi transferida para a coluna de sílica. Após centrifugação por 8.000 rpm por um minuto, o tubo coletor com o eluato foi substituído por um novo. O material da coluna foi lavado duas vezes (250µl cada) com o primeiro tampão e duas com o segundo tampão de lavagem. Finalmente, o DNA foi eluído com 50µl de tampão TE (Tris-EDTA). A concentração de DNA e a pureza foram analisadas por espectrofotometria (*NanoDrop Lite Spectrophotometer*, ThermoScientific, Wilmington, EUA). A concentração do DNA foi determinada por absorbância a 260nm e a pureza foi avaliada pela relação das absorbâncias a 260/280nm. O DNA das amostras foi mantido em freezer -20°C.

3.3.1.2 Determinação dos polimorfismos dos genes que codificam as citocinas IL-6 por PCR em tempo real

Foi investigado o SNP na posição -174G/C (rs1800795) da região promotora do gene que codifica a IL-6. As reações de genotipagem para determinação do SNP foi realizada por ensaios TaqMan predefinidos que usam sondas que se ligam no sulco menor do DNA, marcadas com fluorocromos FAM (6carboxi-fluoresceína) ou VIC para detectar os alelos polimórficos ou selvagens, respectivamente. As reações de PCR em tempo real foram feitas do seguinte modo: em um *mix* de 18µl contendo 0,5µl do ensaio, 10µl do Master Mix 2X (Applied Biosystems, ThermoScientific, Wilmington, EUA) e 7,5µl de H₂O deionizada estéril; foram adicionados dois µl do DNA genômico a 10ng/µl. O ciclo térmico das placas ópticas foi realizado no *Real Time PCR System 7.500* (Applied Biosystems, ThermoScientific, Wilmington, EUA). As sequências de iniciadores de oligonucleótidos sintéticos utilizados foram anteriormente descritas por FISHMAN *et al.* (1998) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Sondas e condições utilizadas na PCR em tempo real para genotipar o SNP na posição -174 (rs1800795) do gene que codifica a IL-6.

<i>IL6</i> gene -174 (rs1800795)	
ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAA	60°C - 1 min; 95 °C - 10 min; 50 cycles (95°C - 15 s, 60°C - 90 s) e 60°C - 1 min
AGGACGTACATTGCACA	

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376. doi: 10.1172/JCI2629. PMID: 9769329.

3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). A análise de caracterização dos dados foi baseada nas frequências absolutas e percentagens para as variáveis categóricas. Para avaliação das variáveis quantitativas foram utilizados cálculo de média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil. A comparação das percentagens foi feita pelo teste Qui-quadrado de Pearson assintótico ou exato. A comparação das medianas foi feita pelo teste Mann-Whitney, quando não houve distribuição normal. O teste de normalidade usado foi o Shapiro-Wilk.

Em relação à análise do SNP, o equilíbrio Hardy-Weinberg de alelos em *loci* individuais foi avaliado pelo teste Qui-quadrado Bicaudal ou teste exato de Fisher. A frequência dos genótipos, assim como o desequilíbrio de ligação entre os *loci* foram calculados através do programa eh (disponível em: <http://www.jurgott.org/linkage/eh.htm>).

As associações de cada variável, incluindo *IL6-174G/C*, sexo, idade > 55 anos, hipertensão, estado nutricional, estágio da fibrose hepática (hepatite crónica e cirrose) com *diabetes mellitus* tipo 2 (variável dependente) foram avaliadas em análise univariada. Todas as variáveis com valores $P < 0,20$ foram incluídas no modelo de regressão logística. A razão de chance (RC) e IC95% foram usados como estimativa do risco. O teste de Hosmer-Lemeshow foi empregado para avaliar a adequação dos modelos. Variáveis que tinham mais de 10,0% de dados sem informação não foram selecionadas para os modelos da análise multivariada.

Os valores de $P \leq 0, 5$ foram considerados significativos.

3.5. Aspectos de bioética e de assistência

O estudo faz parte dos projetos de pesquisa intitulados **“Concentração sérica de marcadores periféricos e polimorfismos genéticos em portadores de hepatites virais crônicas B e C e comorbidades psiquiátricas associadas”** e **“Estado nutricional, qualidade de vida, atividade física, alcoolismo e concentração sérica de citocinas em portadores de hepatite B ou C crônica”**, que têm como objetivo, além dos aspectos de pesquisa, contribuir na assistência aos pacientes com hepatite C crônica de maneira interdisciplinar e interprofissional.

Houve a criação da interface pesquisa e extensão e várias atividades interdisciplinares foram elaboradas com os pacientes do ambulatório de Hepatites virais do Hospital das clínicas de Belo Horizonte, MG. Dentre elas destacam-se os grupos operativos, as atividades na sala de espera e abordagens do indivíduo e de seus familiares. Vale ressaltar que as ações extensionistas influenciaram de forma relevante o aprimoramento da qualidade do trabalho da equipe do ambulatório. Ainda, o processo de interface “pesquisa e extensão” promoveu a integração da nossa equipe com os pacientes, os seus familiares e a comunidade em geral. Em conjunto, essas ações auxiliaram aos pacientes buscarem melhor qualidade de vida e estilo de vida que gerasse melhor estado de saúde.

As atividades foram fundamentadas em metodologias ativas, com o objetivo de estimular os pacientes a refletirem sobre sua qualidade de vida e

desafios relacionados à sua doença. Agora, descrevo de forma mais detalhada as atividades desempenhadas na “sala de espera”. Esse local é um ambiente holístico no qual ocorre a troca de experiências do saber popular em consonância com os saberes dos profissionais da saúde. O ambulatório recebe em média 5.000 pacientes com hepatite B e/ou C crônica. A troca de experiências e de saberes, são cruciais para a construção do conhecimento adquirido nas práticas educativas em sala de espera. Os pacientes foram convidados a escreverem sobre sua jornada no processo do adoecimento e tratamento da hepatite, revelando suas incertezas, medos, capacidade de recuperar e mecanismos de resiliência. As frases citadas (**Figura 1**) nesse trabalho destacam os processos empregados para melhorar a auto-estima e a inserção social de nossos paciente.

Os projetos foram aprovados pelo COEP (UFMG COEP ETIC 0631.0.203.000-09 e ETIC 0404.0.203.000-10) pela PROEX [Projeto - 400606 - Impacto da abordagem interdisciplinar (avaliação psicológica e psiquiátrica; abordagem nutricional; avaliação da atividade física) na qualidade de vida de pacientes com hepatites crônicas B ou C]. Desde a elaboração dos projetos em 2009/2010, tem sido preconizada a interface entre a pesquisa, a extensão e a assistência (**Figura 2**).

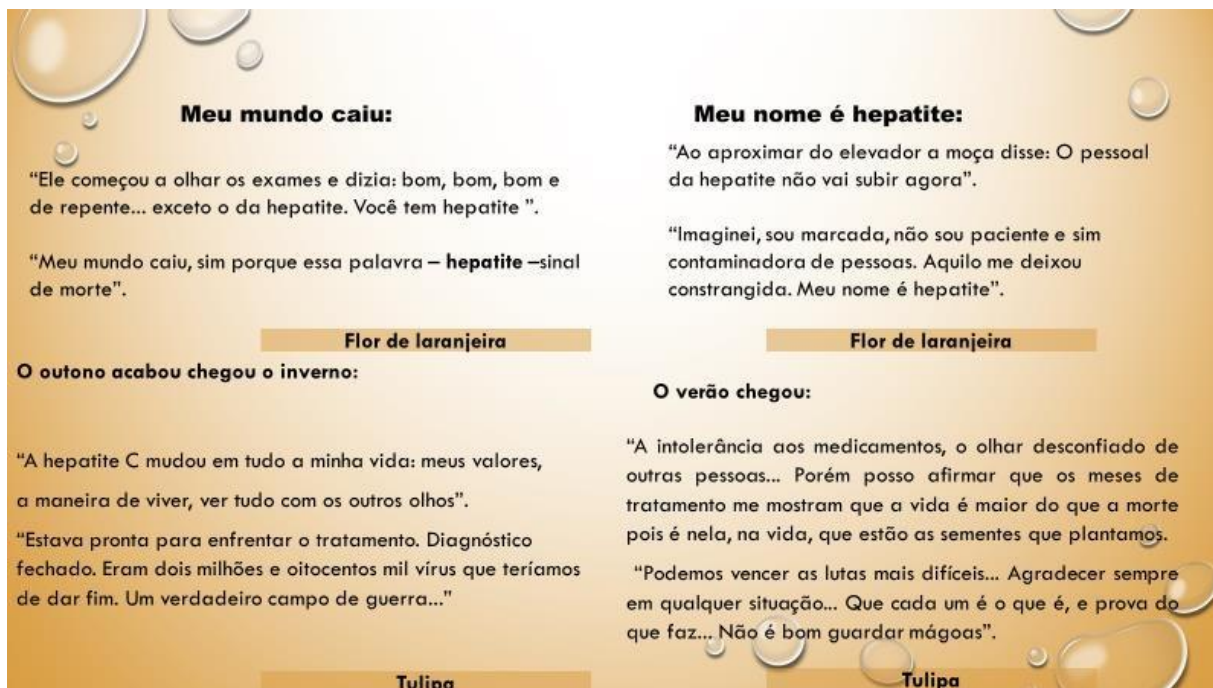


Figura 1: Frases dos pacientes incluídos no presente estudo.

"A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria."
Paulo Freire



Figura 2: Interface assistência, pesquisa e extensão no ambulatório de Hepatites Virais – Sala de espera.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Interleukin-6-174G/C polymorphism is associated with a decreased risk of type 2 diabetes in patients with chronic HCV

Silva CB et al. IL6 polymorphism and type 2 diabetes in chronic HCV

Authors:

Cliviany Borges da Silva, Diego Alves Vieira, Luisa Freitas de Melo, Anna Luiza Soares Chagas, Adriana Dias Gomes, César Lúcio Lopes de Faria Jr, Rosangela Teixeira, Gifone Aguiar Rocha, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Maria Marta Sarquis Soares, Juliana Maria Trindade de Bezerra, Luciana Diniz Silva*

Name of Journal: World Journal of Gastroenterology

Manuscript Type: CASE CONTROL STUDY

Interleukin-6-174G/C polymorphism is associated with a decreased risk of type 2 diabetes in patients with chronic HCV

Silva CB *et al.* **IL6 polymorphism and type 2 diabetes in chronic HCV**

Authors:

Cliviany Borges da Silva, Diego Alves Vieira, Luisa Freitas de Melo, Anna Luiza Soares Chagas, Adriana Dias Gomes, César Lúcio Lopes de Faria Jr, Rosangela Teixeira, Gifone Aguiar Rocha, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Maria Marta Sarquis Soares, Juliana Maria Trindade de Bezerra, Luciana Diniz Silva*

Authors' affiliations:

Cliviany Borges da Silva, Outpatient Clinic of Viral Hepatitis, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Sciences Applied to Adult Health Care Post-Graduate Programme, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Diego Alves Vieira, Luisa Freitas de Melo, Anna Luiza Soares Chagas, Outpatient Clinic of Viral Hepatitis, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Medical undergraduate student, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Adriana Dias Gomes, César Lúcio Lopes de Faria Jr, Gifone Aguiar Rocha, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Laboratory of Research in Bacteriology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Maria Marta Sarquis Soares, Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Juliana Maria Trindade de Bezerra, Epidemiology of Infectious and Parasitic Diseases Laboratory, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Rosangela Teixeira, Luciana Diniz Silva, Outpatient Clinic of Viral Hepatitis, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), zip code 30130-100, Belo Horizonte, Brazil.

Author contributions:

Cliviany Borges da Silva and Luciana Diniz Silva: designed research (project conception, development of overall research plan, and study oversight); Cliviany Borges da Silva, Diego Alves Vieira, Luisa Freitas de Melo, Anna Luiza Soares Chagas, Adriana Dias Gomes, César Lúcio Lopes de Faria Jr conducted research (hands-on conduct of the experiments and data collection); Maria Marta Sarquis Soares, Rosangela Teixeira, Gifone Aguiar Rocha and Dulciene Maria de Magalhães Queiroz provided essential reagents or provided essential materials; Cliviany Borges da Silva, Juliana Maria Trindade de Bezerra and Luciana Diniz Silva: analysed data or performed statistical analysis; Cliviany

Borges da Silva, Juliana Maria Trindade de Bezerra, Gifone Aguiar Rocha and Luciana Diniz Silva wrote paper; Cliviany Borges da Silva, Juliana Maria Trindade de Bezerra, Gifone Aguiar Rocha and Luciana Diniz Silva had primary responsibility for final content. All authors critically revised the manuscript, agree to be fully accountable for ensuring the integrity and accuracy of the work, and read and approved the final manuscript.

Conflict of interests Statement: Authors declare no conflict of interests.

ORCID number: Cliviany Borges da Silva (0000-0003-1060-9015); Diego Alves Vieira (0000-0001-6847-8068); Luisa Freitas de Melo (0000-0003-1225-8263); Anna Luiza Soares Chagas (0000-0002-5966-5555); Adriana Dias Gomes (0000-0001-7304-1864); César Lúcio Lopes de Faria Jr (0000-0001-6753-4486); Rosangela Teixeira (0000-0003-2192-722X); Gifone Aguiar Rocha (0000-0002-5708-7069); Dulciene Maria de Magalhães Queiroz (0000-0003-1334-9423); Maria Marta Sarquis Soares (0000-0002-0847-7060); Juliana Maria Trindade de Bezerra (0000-0001-9840-6217); Luciana Diniz Silva* (0000-0003-0061-7361).

Ethical approval: The protocol was approved by the Federal University of Minas Gerais Ethical Board (ETIC 0404.0.203.000-10).

Supportive foundation acknowledgement: Doctoral scholarship was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (grant APQ-02320-18).

The guidelines of the STROBE Statement have been adopted.

Corresponding author:

Luciana Diniz Silva* (MD, PhD), Associate Professor of Medicine. Postal address:
Av Alfredo Balena 190 s/257 - zip code 30130-100 - Belo Horizonte, Minas Gerais,
Brazil. Telephone: +55 31 3274 2767, Mobile phone: +55 31
999036988.

E-mail: lucianadinizsilva@gmail.com; lucianadinizsilva@ufmg.br.

ABSTRACT

Background and aims: Chronic hepatitis C (CHC) is associated with type 2 diabetes mellitus. Although the pathogenesis remains to be elucidated, a growing evidence has suggested a role of pro-inflammatory immune response. Increased serum concentrations of IL-6 have been associated with insulin resistance, type 2 diabetes mellitus as well as advanced forms of liver disease in chronic hepatitis C infection. Therefore, we investigated the frequency of *IL6*-174G/C (rs1800795) single nucleotide polymorphism (SNP) in CHC patients and in healthy subjects of the same ethnicity. In addition, we also evaluated the association between demographic, clinical, nutritional, virological and *IL6* genotyping data with type 2 diabetes mellitus in CHC patients. **Methods:** Two hundred and forty-five patients with CHC and 179 healthy control subjects (blood donors) were prospectively included. Type 2 diabetes mellitus was diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association. The diagnosis and staging of the liver disease were based on clinical, biochemical, histological and radiological criteria. *IL6* polymorphism was evaluated by Taqman SNP genotyping assay. The data were analysed by logistic regression models. **Results:** Type 2 diabetes mellitus, blood hypertension and liver cirrhosis were observed in 20.8% (51/245), 40.0% (98/245) and 38.4% (94/245) of the patients, respectively. The frequency of the studied *IL6* SNP did not differ between the CHC patients and controls ($P = 0.81$) and this polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.38$). In the multivariate analysis, type 2 diabetes mellitus was inversely associated with GC and CC genotypes of *IL6*-174 (OR = 0.42; 95%CI = 0.22 - 0.78; $P = 0.006$) and positively associated with blood hypertension (OR = 5.56 ; 95%CI = 2.79 - 11.09; $P < 0.001$). **Conclusion:** This is the first study to demonstrate that GC and CC genotypes of *IL6*-174 SNP are associated with a decreased risk of type 2 diabetes mellitus in patients with CHC. The challenge remains for forthcoming research to identify potential

inflammatory mediators involved in the crosstalk between hepatitis C virus (HCV) infection and the axis pancreas-liver.

Key words: Chronic Hepatitis C; type 2 diabetes mellitus; *interleukin-6* (-174 G/C) gene promoter single nucleotide polymorphism, blood hypertension, healthy control subjects.

LIST OF ABBREVIATIONS:

ALP: Alkaline phosphatase

ALT: Alanine aminotransferase

APRI: The aspartate amino transferase to platelet ratio index

AST: Aspartate amino transferase

BMI: Body mass index **CHC:**

Chronic hepatitis C **CI:**

confidential interval **DAA:**

Direct antiviral agents **DNA:**

Deoxyribonucleic acid

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium

HbA1c: Glycated haemoglobin **HCV:**

Hepatitis C virus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IL-6: Interleukin-6

OR: *Odds ratio*

PCR: polymerase chain reactions

SNPs: Single nucleotide polymorphisms

γ-GT: Gamma-glutamyl transpeptidase

CORE TIP

Chronic hepatitis C (CHC) is associated with type 2 diabetes mellitus. Previous studies have demonstrated that increased serum concentrations of IL-6 have been associated with type 2 diabetes as well as advanced forms of liver disease. However, the role played by *IL6*-174G/C SNP on the pathogenesis of HCV-associated type 2 diabetes remains to be elucidated. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate that the GC and GG genotypes of *IL6* are inversely associated with type 2 diabetes. We believe that our results could contribute to the understanding of the extra-hepatic manifestations in hepatitis C.

INTRODUCTION

Globally, an estimated 422 million adults have diabetes mellitus^[1] and around 71 million people are living with hepatitis C virus (HCV) infection^[2,3]. Over the past two decades, an accumulating body of scientific evidence has been linked type 2 diabetes mellitus to HCV infection^[4-11]. Given the high prevalence and the worldwide distribution of these two comorbidities, their association have an utmost impact on public health^[1-3].

In pioneering study, in 1898, Naunyn firstly described an association between liver cirrhosis and diabetes mellitus that it is known as hepatogenous diabetes^[12]. Hence, cirrhosis *per se* might lead to glucose intolerance or diabetes mellitus. The prevalence of diabetes in cirrhotic patients with non-alcoholic fatty liver disease, cryptogenic, hepatitis C, and alcoholic hepatopathy ranges from 27.3% to 56.1%^[13]. Regarding the HCV and the non-alcoholic fatty hepatic disease we have to bear in mind that type 2 diabetes mellitus can be detected prior to the onset of hepatic cirrhosis^[13-15] promoting a vicious cycle of hyperglycaemia causing a worsening metabolic state. Thus, altogether, glucose disturbed metabolism and HCV enhance the chronic inflammation and might interact as a reciprocal feed-forward loop^[16-19].

The pathogenesis of type 2 diabetes mellitus encompasses both different degrees of insulin resistance and relative insulin deficiency^[20,21]. Although, some mechanisms underlying the modified glucose metabolism in HCV infection have elucidated^[22-24], several aspects remain unknown. Additionally, CHC patients with type 2 diabetes mellitus are likely to have an accelerated liver disease progression, *i.e.*, hepatic fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma^[25-28]. Various factors can be involved in this interaction including direct viral effects, and host factors, such as overweight, pro-inflammatory cytokines and chemokines^[16,17,29]. Among the inflammatory markers, increased serum concentrations of IL-6 have been associated with insulin resistance, type 2 diabetes mellitus as well as advanced forms of liver disease in chronic hepatitis C infection^[30-38].

The polymorphisms in the interleukin-6 (*IL-6*) gene, which may alter the expression of IL-6, have been investigated in the context of metabolic disease and CHC^[30,31; 33-41]. The association between the single nucleotide polymorphism (SNP) of *IL6* located in the promoter region at the position -174G/C (rs1800795) with type 2 diabetes mellitus was first reported in U.S. Pima Indians and Spanish Caucasians^[42]. The C-allele was significantly associated with a decreased risk of type 2 diabetes. However, in further investigations, these results have not been confirmed^[33,38]. In the setting of hepatitis C, *IL6* SNP polymorphisms have been associated with hepatic- and extra hepatic-related outcomes, such as cirrhosis, hepatocellular carcinoma and poor quality of life^[30,31; 39-41]. Altogether, *in vitro* experiments as well as clinical studies including healthy individuals, the presence of C allele was associated with lower levels of IL-6^[43-45]. The interrelationship between decreased concentration of this cytokine and *IL6*-174 SNP is more pronounced in individuals carrying the CC genotype^[43-45].

Because the host's immune response against HCV may also affect extrahepatic manifestations in patients with CHC, even before the onset of liver cirrhosis, we hypothesized that *IL6*-174G/G genotype, the IL-6 high-producer phenotype, may be linked to a high inflammatory profile that negatively influences the course of type 2 diabetes in these patients. Additionally, these factors might accelerate the liver fibrosis that also impacts on the insulin resistance. Therefore, we investigated the frequency of *IL6*-174G/C SNP in CHC patients and in healthy subjects of the same ethnicity. We also evaluated the association between demographic, clinical, nutritional, virological and *IL6* genotyping data with type 2 diabetes mellitus in CHC patients.

MATERIALS AND METHODS

Participants

We prospectively included 260 patients with confirmed CHC diagnosis attending the Viral Hepatitis Outpatient Clinic, University Hospital, Belo Horizonte, Brazil. The control group consisted of 179 consecutive volunteer blood donors from the hemocenter of Felício Rocho Hospital (Hemoter - Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho), Belo Horizonte, Brazil. The Viral Hepatitis Outpatient Clinic is an outpatient care ambulatory of a metropolitan tertiary teaching hospital that admits patients for the treatment of viral chronic hepatitis. All patients and controls signed the informed consent form. The study was designed and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais/UFMG (ETIC 0404.0.203.000-10).

The exclusion criteria were: pregnancy, breastfeeding, hepatic encephalopathy, HBV/HCV or HCV/HIV co-infection, current antiviral, use of non-steroidal anti-inflammatory drugs or corticosteroids, and the presence of advanced disease such as chronic kidney disease, heart failure, chronic pulmonary disease, chronic pancreatitis and neoplasia, including hepatocellular carcinoma.

The diagnosis of cirrhosis was based on standard clinical, biochemical, radiological, and histological parameter^[46,47]. The severity of liver dysfunction was assessed by the Child-Pugh-Turcotte score^[48]. Compensated cirrhosis was defined as the absence of variceal bleeding, ascites and oedema, jaundice or symptomatic encephalopathy on physical examination, and decompensated cirrhosis as the presence of any of these complications^[49]. The aspartate amino transferase to platelet ratio index (APRI)^[50] was calculated for each participant based on medical data.

The diagnosis of type 2 diabetes mellitus was based on documented use of oral hypoglycaemic medication or insulin; random plasma glucose levels \geq

200 mg/dL in the presence of classic symptoms of hyperglycaemia or hyperglycaemic crisis; fasting plasma glucose \geq 126 mg/dL on two occasions; 2h plasma glucose \geq 200 mg/dL during oral glucose tolerance test or haemoglobin A1c (HbA1c) \geq 6.5% on two occasions^[51].

Blood hypertension was diagnosed according to the 2018 European Society of Hypertension/European Society of Cardiology (ESH/ESC) Guidelines^[52].

An expert nutritionist carried out all nutritional evaluations. Weight and height were measured with a mechanical platform scale (FILIZOLA®, São Paulo, Brazil). Body mass index (BMI) was calculated using the formula, $BMI = \text{weight}/\text{height}^2$ and the nutritional status of the patients were determined according to the World Health Organization criteria^[53]. Elderly individuals were classified according to the Lipschitz classification^[54].

Furthermore, an in-person interview was conducted using instruments to assess the sociodemographic and clinical characteristics of the patients. Fifteen patients were not included: twelve patients who had initially agreed to take part in this study failed to complete the questionnaires; three patients were excluded because blood sample was inadequate for genotyping. Two hundred and forty-five patients and 179 healthy subjects remained in the study.

All participants were from a similar socioeconomic level, as assessed by a previously validated questionnaire^[55], which was based on income and educational level, as well as similar cultural habits. All subjects were natives of Minas Gerais, state in the south-eastern region of Brazil with the following ethnic background: 56.0% of European ancestry, 32% of African ancestry and 12.0% of Amerindian ancestry homogeneously present in each patient, irrespective of their phenotype^[56].

Materials

Laboratory parameters

Blood samples were obtained from each subject after an overnight fasting for cytokine genotyping and biochemical assessments. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) alkaline phosphatase (ALP), albumin, total bilirubin, prothrombin time and hemogram were evaluated by routine laboratory methods.

HCV genotype was determined by a line probe assay (VERSANT HCV genotyping assays; Bayer's Diagnostic Corporation, Tarrytown, NY) and viral load assessed by a commercial test (CobasTaqMan HCV test V.2.0; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). The assays were carried out according to the manufacturers' recommendations.

Aliquots of leukocytes and plasma were stored at -80°C until analysis.

DNA extraction and genotyping of IL6

DNA was extracted from the leukocytes with the QIAmp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA). DNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and purity was assessed by the absorbance ratio at 260/280nm. The DNA of the samples was stored in a freezer at -20°C before use.

IL6-174G/C (rs1800795) genotyping was Taqman assayed by Real Time PCR System 7.500 (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Foster City, CA) by using oligonucleotide primers previously described by Fishman *et al.* (1997). The sequence of synthetic probes and reaction conditions are described in Table 1.

Statistical analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium of alleles at individual *loci* was assessed by two-tailed chi-square test or Fisher's exact test.

Data were analysed with SPSS statistical software package version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Descriptive statistics were used to provide information regarding demographic, clinical, nutritional, virological, and genetic data. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate whether the data were normally distributed. The asymptotic Pearson's χ^2 test was used to compare the percentages. The Student's *t*-test or ANOVA was used to compare the means, and the two-tailed Mann-Whitney U test was used for medians.

The associations of each variable including *IL6*-174G/C, sex, increasing age, hypertension, nutritional status, liver fibrosis stage (chronic hepatitis and cirrhosis) with type 2 diabetes mellitus were tested in univariate analysis. All variables with *P* values < 0.20 were included in the full model of logistic regression. Odds ratio (OR) and 95%CI were used as an estimate of the risk. The Hosmer-Lemeshow test was used to assess the adequacy of the models. Variables that had missing data > 10% were not selected for the models of multivariate analysis.

P values ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS

Distribution of the IL6 genotypes in CHC patients and controls (blood donors)

The frequencies of the *IL6* SNP did not differ between CHC patients and blood donors (Table 2). All alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group ($P > 0.95$) and in the CHC patients ($P > 0.38$) as shown in Table 2.

Demographic and clinical characteristics of CHC patients

Among the 245 patients with CHC, 94 (38.4%) had cirrhosis [Child-Turcotte-Pugh score A5, 60 (63.8%); A6, 21 (22.3%); B7, 6 (6.4%); B8, 4 (4.3%); B9, 2 (2.1%); C10 1, (1.1%)]. The mean age of the patients was 51.8 ± 11.4 years and 129 (52.7%) were males.

Cirrhosis was significantly more frequent ($P = 0.03$) in males (61.7%) than in females (38.3%). The patients with cirrhosis (53.5 ± 8.8 yr.) were older ($P = 0.05$) than those without (50.8 ± 12.7 yr.). Overweight tended to be more frequent ($P = 0.08$) in the CHC patients without cirrhosis (64.9%) than in those with (53.2%).

There was no significant difference ($P = 0.11$) in blood hypertension rate between CHC patients with cirrhosis (46.8%) and those without (35.8%). The frequency of type 2 diabetes did not differ ($P = 0.33$) between the two groups (24.5% in cirrhotic and 18.5% in non-cirrhotic patients).

HCV viral load and genotype in patients with CHC

There was no significant difference ($P = 0.58$) in the viral load between patients without cirrhosis [HCV-RNA log₁₀ (IU)/mL, 5.93 (IQR: 5.46 - 6.39)] and those with [5.86: (IQR 5.34 - 6.20)]. Also, the frequency of HCV Genotype 1 in patients without cirrhosis [109/126 (86.5%)] did not differ ($P = 0.25$) from that of patients with [61/78 (78.2%)]. The quantification of viral load and HCV genotyping were available in 213/245 (86.9%) patients.

Characteristics of CHC patients with and without type 2 diabetes mellitus

Fifty-one (20.8%) patients had type 2 diabetes mellitus that was significantly more frequent in older patients (Table 3). The prevalence of blood hypertension was higher in type 2 diabetes mellitus than in those without the

disease (Table 3). Lower frequency of *IL6*-174G/C and C/C genotypes was observed in patients with type 2 diabetes compared to those without (Table 3).

Factors associated with type 2 diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C

In the univariate analysis, type 2 diabetes mellitus was associated with old age, blood hypertension, body mass index, and the GC and CC genotypes of *IL6*-174 (Table 3). In the multivariate analysis, type 2 diabetes mellitus remained inversely associated with the GC and CC genotypes of *IL6*-174 and positively associated with blood hypertension (Table 4).

Discussion

Impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus have been reported to frequently occur in patients with chronic HCV infection independently of the hepatic disease severity^[26,57,58]. In consonance with the literature, we found a high prevalence of the type 2 diabetes mellitus in our patients^[5,7,59,60]. Although there is a sizeable body of scientific evidence linking glucose disturbed metabolism and hepatitis C, the biological mechanisms behind the concurrence of these conditions have not been completely clarified yet.

To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate that the GC and GG genotypes of *IL6*-174 are inversely associated with type 2 diabetes mellitus in patients chronically infected with HCV. In the current study, CHC patients with type 2 diabetes mellitus had lower frequency of *IL6*-174 genotypes GC and CC compared to those without. Although, several investigations have shown that subjects carrying the GC and CC genotypes of *IL6* SNP had a decreased risk of type 2 diabetes mellitus^[33-37], the association has not found by others^[33,38], which may be due to the differences in the study designs and/or genetic ancestry of the populations. Concerning the chronic liver diseases, the *IL6*174G/C polymorphism has been associated with both

fibrosis progression or hepatocellular carcinoma development^[40,61,62] in patients with CHC. The majority of the studies has verified an association between the presence of the high producer genotype (GG) and poor outcome in patients with the hepatopathy^[30,31,39,40,61,62].

Patients with CHC, with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus are likely to have a more complicated course of the infection^[24-27]. Based on previous reports, it becomes important to keep in mind, if on the one hand insulin resistance is recognized as a risk factor for the progression of HCV-related liver disease^[26-31], on the other hand, preceding HCV infection significantly increases the risk of developing type 2 diabetes mellitus^[7]. Additionally, diabetic patients are at an increased risk of acquiring HCV infection^[63-65]. Thus, this two-way interface, *i.e.*, the relationship linking HCV and type 2 diabetes mellitus, is possibly determined by complex and multifaceted interactions among the hepatitis virus, the environment and the host. Our current data show that neither different HCV genotypes nor viral load was significantly associated with type 2 diabetes mellitus. In this scenario, the host-related factors should be highlighted.

HCV infection as well as type 2 diabetes mellitus are associated with increased production of IL-6, a pro-inflammatory cytokine that plays a crucial role in viral induced liver damage^[17,29, 30-40, 61,62], and may cause insulin resistance in adipose tissue, skeletal muscle and liver by inhibiting insulin signal transduction^[66,67]. Therefore, the results of the current study pointed to the role of IL-6 pathway in mediating both liver injury and disturbed glucose metabolism in CHC patients. Furthermore, even in the era of direct antiviral agents (DAAs), that has been causing dramatic changes in the treatment of CHC^[68], the evidences of the current investigation should not be disregarded. Although most of the studies have demonstrated that HCV clearance by DAA treatment reverses or improves the insulin resistance^[11,28,68,69], in a more recent investigation, the authors observed that successful hepatitis C virus treatment among patients with type 2 diabetes significantly reduces glycated haemoglobin (HbA1c) shortly after treatment, but not for a long time^[70]. In

addition, Hengst *et al.* (2016) demonstrated that DAA-induced viral clearance does not completely restore the altered cytokine and chemokine milieu in CHC patients^[71]. These evidences aligned with our results reinforce the better understanding of the role played by the immune-mediated mechanisms in the pathogenesis of insulin resistance and diabetes in HCV chronic hepatitis.

In the present study, in addition to *IL6* SNP, arterial hypertension was associated with type 2 diabetes mellitus. Studies have demonstrated that cardiovascular diseases, hypertension and diabetes are strongly correlated to each other^[72]. Their powerful relationship have also been observed in patients chronically infected with HCV^[73,74].

The limitations of our study should also be considered. First, the subjects included were recruited from a referral centre and, consequently, may not be representative of all patients with CHC. Second, the cross-sectional nature of the investigation hindered the likelihood to recognize any cause-effect relationship between type 2 diabetes mellitus and *IL6* SNP in hepatitis C. Furthermore, another limitation is the lack of data on the serum concentrations of IL-6 of patients and controls; however, the functional relevance of the studied polymorphism is well known^[43-45].

Conclusion

In summary, this is the first study to demonstrate that the *IL6*-174G/C gene promoter polymorphism is inversely associated with type 2 diabetes mellitus in patients with CHC. This finding reinforces the need for further studies focusing on the biological mechanisms of diabetes mellitus in CHC patients. The challenge remains for forthcoming research to identify potential inflammatory mediators involved in the crosstalk between HCV and the axis pancreas-liver. Moreover, better comprehension of these processes may positively influence the management strategies for decreasing the extra-hepatic manifestations and their negative impact on health status in patients with CHC.

ACKNOWLEDGEMENTS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

REFERENCES

1. **World Health Organization (2016)**. Global Report on Diabetes. Geneva. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf. Accessed 11 September 2019.
2. **World Health Organization (2017)**. Global Hepatitis Report 2017. Resource document. World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>. Accessed 11 September 2019.
3. **Polaris Observatory HCV Collaborators**. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2: 161-176 [PMID: 28404132 DOI: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9].
4. Hum J, Jou JH. The link between hepatitis C virus and diabetes mellitus: Improvement in insulin resistance after eradication of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* (Hoboken) 2018;11:73-76 [PMID: 30992793 DOI: 10.1002/cld.694].
5. 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 17;133:592-9 [PMID: 11033586 DOI:10.7326/0003-4819-133-8-200010170-00009].
6. 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;29:328-33 [PMID: 9918906 DOI: 10.1002/hep.510290235].
7. 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;38:50-6 [PMID: 12829986 DOI: 10.1053/jhep.2003.50291].
 8. Zein CO, Levy C, Basu A, Zein NN. Chronic hepatitis C and type II diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2005 Jan;100:48-55 [PMID: 15654780 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.40429.x].
 9. Shaheen M, Echeverry D, Oblad MG, Montoya MI, Teklehaimanot S, Akhtar AJ. Hepatitis C, metabolic syndrome, and inflammatory markers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [NHANES III] *Diabetes Res Clin Pract* 2007;75:320-6 [PMID: 16919355 DOI: 10.1016/j.diabres.2006.07.008].
 10. Stepanova M, Lam B, Younossi Y, Srishord MK, Younossi ZM. Association of hepatitis C with insulin resistance and type 2 diabetes in US general population: the impact of the epidemic of obesity. *J Viral Hepat* 2012;19:341-5 [PMID: 22497813 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2011.01554.x].
 11. Li J, Zhang T, Gordon SC, Rupp LB, Trudeau S, Holmberg SD, Moorman AC, Spradling PR, Teshale EH, Boscarino JA, Schmidt MA, Daida YG, Lu M; CHeCS Investigators. Impact of sustained virologic response on risk of type 2 diabetes among hepatitis C patients in the United States. *J Viral Hepat* 2018;25:952-958 [PMID: 29478263 DOI: 10.1111/jvh.12887].
 12. Naunyn B. Glykosurie and Diabetes durch experimentelle Insulte and Krankheiten der Leber. In: Naunyn B, ed. *Der Diabetes Mellitus*. Vienna:1898:38-49.
 13. Lee WG, Wells CI, McCall JL, Murphy R, Plank LD. Prevalence of diabetes in liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis.

- Diabetes Metab Res Rev* 2019;35:e3157 [PMID: 30901133 DOI: 10.1002/dmrr.3157].
14. Cimino L, Oriani G, D'Arienzo A, Manguso F, Loguercio C, Ascione A, Caporaso N, Del Vecchio Blanco C, Budillon G. Interactions between metabolic disorders (diabetes, gallstones, and dyslipidaemia) and the progression of chronic hepatitis C virus infection to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A cross-sectional multicentre survey. *Dig Liver Dis* 2001;33:240-6 [PMID: 11407669 DOI: 10.1016/s1590-8658(01)80714-3].
 15. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care* 2006;29:1140-9 [PMID: 16644655 DOI: 10.2337/diacare.2951140].
 16. Hunter P. The inflammation theory of disease. *EMBO Rep* 2012; 13:968-970 [PMID: 23044824 DOI: 10.1038/embor.2012.142].
 17. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care* 2006;29:1096-101 [PMID: 16644643 DOI: 10.2337/diacare.2951096].
 18. Chen Y, Ji H, Shao J, Jia Y, Bao Q, Zhu J, Zhang L, Shen Y. Different Hepatitis C Virus Infection Statuses Show a Significant Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus: A Network Meta-Analysis. *Dig Dis Sci* 2019 [PMID: 31758432 DOI: 10.1007/s10620-019-05918-7]. [Epub ahead of print].
 19. Wang CC, Cheng PN, Kao JH. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Aliment Pharmacol Ther* 2019 [PMID: 31746482 DOI: 10.1111/apt.15575]. [Epub ahead of print]
 20. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365(9467):1333-46 [PMID: 15823385 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X].

21. Narita R, Abe S, Kihara Y, Akiyama T, Tabaru A, Otsuki M. Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004;41:132-8 [PMID: 15246219 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.03.020].
22. 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;126:840-8 [PMID: 14988838 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.11.056].
23. Ballestri S, Nascimbeni F, Romagnoli D, Baldelli E, Targher G, Lonardo A. Type 2 Diabetes in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatitis C Virus Infection--Liver: The "Musketeer" in the Spotlight. *Int J Mol Sci* 2016;17:355 [PMID: 27005620; DOI: 10.3390/ijms17030355].
24. Serfaty L, Capeau J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2009;29 Suppl 2:13-25 [PMID: 19187069 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01952.x].
25. Desbois AC, Cacoub P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. *World J Gastroenterol* 2017;23:1697-1711 [PMID: 28321170 DOI: 10.3748/wjg.v23.i9.1697].
26. Negro F, Alaei M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2009;15:1537-47 [PMID: 19340895 DOI: 10.3748/wjg.15.1537].
27. Wong A, Le A, Lee MH, Lin YJ, Nguyen P, Trinh S, Dang H, Nguyen MH. Higher risk of hepatocellular carcinoma in Hispanic patients with hepatitis C cirrhosis and metabolic risk factors. *Sci Rep* 2018;8:7164 [PMID: 29740031 DOI:10.1038/s41598-018-25533-2].
28. Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, Moorman AC, Spradling PR, Teshale EH, Boscarino JA, Schmidt MA, Daida YG, Lu M; CHeCS Investigators. Sustained virological response to hepatitis C treatment decreases the incidence of complications associated with type 2 diabetes. *Aliment Pharmacol Ther* 2019;49:599-608 [PMID: 30650468 DOI: 10.1111/apt.15102A].

29. Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, Corrado A, Sansonno D, Antonelli A. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:468107 [PMID: 22611419 DOI: 10.1155/2012/468107].
30. Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, Loueslati BY. Genetic variants in *IL-6* and *IL-10* genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine* 2017;89:62-67 [PMID: 28340949 DOI: 10.1016/j.cyto.2016.10.004].
31. Falleti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, Fontanini E, Cmet S, Minisini R, Bitetto D, Toniutto P, Pirisi M. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. *Human Immunology* 2010;71: 999-1004 [PMID: 20655350 DOI: 10.1016/j.humimm.2010.06.006].
32. Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci* 2008;13:5187-94 [PMID: 18508580 DOI: 10.2741/3074].
33. Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Doring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt Asterholm I, Jansson JO, Boeing H, Mohlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the *IL6* variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. *Ann Med* 2009;41:128-38 [PMID: 18752089 DOI: 10.1080/07853890802337037].
34. Zamora-Ginez I, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J, Baez-Duarte BG, Torres-Rasgado E, Romero JR, Pérez-Fuentes R, Mendoza-Carrera F; Multidisciplinary Research Group on Diabetes of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Low prevalence of interleukin-6 haplotypes associated with a decreased risk of type 2 diabetes in

- Mexican subjects with a family history of type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2013;44:529-34 [PMID: 24051035 DOI: 10.1016/j.arcmed.2013.09.003].
35. Cui ZH, Lu XT, Xiao KL, Chen Y, Li HQ. Association of Interleukin-6 -174G/C Polymorphism with the Risk of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Curr Med Sci* 2019;39:250-258. [PMID: 31016518 DOI: 10.1007/s11596-019-2027-1].
36. Saxena M, Srivastava N, Banerjee M. Cytokine Gene Variants as Predictors of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2018;14:307- 319. [PMID: 28081697 DOI:10.2174/1573399813666170112145429].
37. Yin YW, Sun QQ, Zhang BB, Hu AM, Liu HL, Wang Q, Zeng YH, Xu RJ, Zhang ZD, Zhang ZG. Association between the interleukin-6 gene -572 C/G polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 11,681 subjects. *Ann Hum Genet* 2013;77:106-14. PMID: 23289913 DOI: 10.1111/ahg.12003].
38. Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wolford JK, Langer B, Thorand B, Klopp N, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Lyssenko V, Groop L, Meisinger C, Döring A, Löwel H, Lieb W, Hengstenberg C, Rathmann W, Martin S, Stephens JW, Ireland H, Mather H, Miller GJ, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Boeing H, Möhlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Wernstedt I, Niklason A, López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Hanson RL, Gallart L, Vendrell J, Tsiavou A, Hatziaelaki E, Humphries SE, Wichmann HE, Herder C, Illig T. *IL6* gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 2006;55:2915-21. [PMID: 17003362 DOI: 10.2337/db06-0600].
39. Cussigh A, Falletti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, Bignulin S, Fornasiere E, Fumolo E, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. *Immunogenetics* 2011;63:33-41. [PMID:21072509 DOI: 10.1007/s00251-010-0491-7].

40. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19:2449-2455 [PMID: 23674845 DOI: 10.3748/wjg.v19.i16.2449].
41. Vieira DA, da Cunha LR, da Silva CB, Almeida MTB, Gomes AD, de Faria CLL Jr, Teixeira R, Neves FS, Rocha GA, de Melo FF, de Magalhães Queiroz DM, Silva LD. The combined polymorphisms of interleukin-6-174GG genotype and interleukin-10 ATA haplotype are associated with a poor quality of life in patients with chronic hepatitis C. *Qual Life Res* 2019;28:1531-1542 [PMID: 30734130 DOI: 10.1007/s11136-019-02129-5].
42. Vozarova B, Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003;112:409-13 [PMID: 12589429 DOI: 10.1007/s00439-003-0912-x].
43. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (*IL-6*) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376 [PMID: 9769329 DOI: 10.1172/JCI2629].
44. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275(24):18138-44 [PMID: 10747905 DOI: 10.1074/jbc.M000379200].
45. Woo P & Humphries SE. *IL-6* polymorphisms: a useful genetic tool for inflammation research? *J Clin Invest* 2013;123:1413-1414 [PMID: 23543063 DOI: 10.1172/JCI67221].
46. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014;383(9930):1749-1761 [PMID: 24480518 DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5].

47. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24, 289-293 [PMID: 8690394 DOI: 10.1002/hep.510240201].
48. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964;1: 1-85 [PMID: 4950264].
49. D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, Tinè F, Giannuoli G, Traina M, Vizzini G, Politi F, Luca A, Virdone R, Licata A, Pagliaro L. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: A 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39: 1180-1193 [PMID: 24654740 DOI: 10.1111/apt.12721].
50. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-26 [PMID: 12883497 DOI: 10.1053/jhep.2003.50346].
51. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl 1):S13-S27 [PMID: 29222373 DOI: 10.2337/dc18-S002].
52. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement D, Coca A, De Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen S, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder R, Shlyakhto E, Tsioufis K, Aboyans V, Desormais I; List of authors/Task Force members:.. 2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology: ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2018;36:2284-2309 [PMID: 30379783 DOI: 10.1097/HJH.0000000000001961].
53. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser 2015.

http://www.who.int/childgrowth/publications/physical_status/en/.

Accessed 8 Nov 2019 .

54. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care* 1994;21:55–67 [PMID: 8197257].
55. Silva LD, Cunha CC, Cunha LR, Araújo RF, Barcelos VM, Menta PL, Neves FS, Teixeira R, Rocha GA, Gontijo ED. Depression rather than liver impairment reduces quality of life in patients with hepatitis C. *Braz J Psychiatry* 2015;37(1):21-30 [PMID: 25806552 DOI: 10.1590/1516-4446-2014-1446].
56. Queiroz DMM, Anacleto C, Trant C, Pinto AM, Calixto RS, Teixeira KN, Kehdy FS, Santos ET, Coimbra RS, Rocha GA, Rocha AMC. Ancestral origin and virulence markers of *H. pylori* strains and host genetic structure as predictors of gastric cancer and duodenal ulcer in an admixed population. *Gastroenterology*, 2013; 144(suppl 1):S-4.
57. 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;35:279-83 [PMID: 11580152 DOI: 10.1016/s0168-8278(01)00143-x].
58. White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008;49:831-44 [PMID: 18814931 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.08.006].
59. Giordanino C, Bugianesi E, Smedile A, Ciancio A, Abate ML, Olivero A, Pellicano R, Cassader M, Gambino R, Bo S, Ciccone G, Rizzetto M, Saracco G. Incidence of type 2 diabetes mellitus and glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection by response to treatment: results of a cohort study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2481-2487 [PMID: 18702647 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02002.x].
60. Simó R, Hernández C, Genescà J, Jardí R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 1996;19:998-1000 [PMID: 8875096 DOI: 10.2337/diacare.19.9.998].
61. Estrabaud E, Vidaud M, Marcellin P, Asselah T. Genomics and HCV infection: progression of fibrosis and treatment response. *J Hepatol* 2012;57:1110-25 [PMID: 22659520 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.05.016].

62. Wang X, Yan Z, Ye Q. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to liver diseases: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e18408 [PMID: 31852161 DOI: 10.1097/MD.0000000000018408].
63. Villar LM, Geloneze B, Vasques ACJ, Pires MLE, Miguel JC, da Silva EF, MarquesVA, Scalioni LP, Lampe E. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C among diabetes mellitus type 2 individuals. *PLoS One* 2019;14:e0211193 [PMID: 30817756 DOI: 10.1371/journal.pone.0211193].
64. Naing C, Mak JW, Ahmed SI, Maung M. Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes mellitus: meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012;18:1642-51 [PMID: 22529694 DOI:10.3748/wjg.v18.i14.1642].
65. Guo X, Jin M, Yang M, Liu K, Li JW. Type 2 diabetes mellitus and the risk of hepatitis C virus infection: a systematic review. *Sci Rep* 2013;3:2981 [PMID: 25671325 DOI: 10.1038/srep02981].
66. 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;286:327-34 [PMID: 11466099 DOI: 10.1001/jama.286.3.327].
67. Akbari M, Hassan-Zadeh V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology* 2018;26:685-698. [PMID: 29508109 DOI: 10.1007/s10787-018-0458-0].
68. Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet* 2019;394(10207):1451-1466 [PMID: 31631857 DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32320-7].
69. Adinolfi LE, Nevola R, Guerrera B, D'Alterio G, Marrone A, Giordano M, Rinaldi L. Hepatitis C virus clearance by direct-acting antiviral treatments and impact on insulin resistance in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33:1379-1382. [PMID: 29228501 DOI: 10.1111/jgh.14067].
70. Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, Moorman AC, Spradling PR, Teshale EH, Boscarino JA, Schmidt MA, Daida YG, Lu M; CHCS Investigators. Sustained virological response does not improve long-term glycaemic control in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Liver Int* 2019;39:1027-1032 [PMID: 30570808 DOI: 10.1111/liv.14031].
71. Hengst J, Falk CS, Schlaphoff V, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H. Direct-acting antiviral-induced hepatitis C virus clearance does

- not completely restore the altered cytokine and chemokine milieu in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2016;214:1965-1974 [PMID: 27683821 DOI: doi.org/10.1093/infdis/jiw457].
72. Lucaroni F, Ciciarella Modica D, Macino M, Palombi L, Abbondanzieri A, Agosti G, Biondi G, Morciano L, Vinci A. Can risk be predicted? An umbrella systematic review of current risk prediction models for cardiovascular diseases, diabetes and hypertension. *BMJ Open* 2019;9:e030234 [PMID: 31862737 DOI: 10.1136/bmjopen-2019-030234]
73. Chou CH, Ho CS, Tsai WC, Wang MC, Tsai YS, Chen JY. Effects of chronic hepatitis C infection on arterial stiffness. *J Am Soc Hypertens* 2017;11:716-723 [PMID: 28923555 DOI: 10.1016/j.jash.2017.08.007].
74. Perticone M, Maio R, Tassone EJ, Tripepi G, Di Cello S, Miceli S, Caroleo B, Sciacqua A, Licata A, Sesti G, Perticone F. Insulin-resistance HCV infection-related affects vascular stiffness in normotensives. *Atherosclerosis* 2015;238(1):108-12 [PMID: 25461736 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.025].

Tables

Table 1. Probes and conditions used in the PCR to genotype *IL6* SNP at position -174 (rs1800795).

<i>IL6</i> gene -174 (rs1800795)	
ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAA	60°C - 1 min; 95 °C - 10 min; 50 cycles (95°C - 15 s, 60°C - 90 s) e 60°C - 1 min
GGACGTCACATTGCACA	

Table 2. The interleukin genotype distribution in patients with chronic hepatitis C ($n = 245$) and healthy controls ($n = 179$).

Variables	CHC <i>n</i> (%)	Control <i>n</i> (%)	<i>P</i> value
<i>IL6</i> genotypes			
-174			0.81
C/C	18 (7.3)	13 (7.3)	
G/C	85 (34.7)	68 (38.0)	
G/G	142 (58.0)	98 (54.7)	
Total	245 (100)	179 (100)	
HWE (<i>P</i> value)	0.38	0.95	

n, number of subjects; CHC, chronic hepatitis C; *IL6*, interleukin-6 gene; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium. The asymptotic Pearson's χ^2 test was used to compare categorical variables. *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

Table 3. Demographic, clinical comorbidity, nutritional status, liver fibrosis stage, virological, cytokine genotyping data of the chronically HCV-infected patients with ($n = 51$) and without type 2 diabetes ($n = 194$).

Variables	Type 2 diabetes n (%)	Non-type 2 diabetes n (%)	P
Demographic			
Male	27 (52.9)	102 (52.6)	1.0
Female	24 (47.1)	92 (47.4)	
Age (years) ^a	55.5 ± 9.6	50.9 ± 11.7	0.01
Clinical comorbidity			
Blood hypertension	36 (70.6)	62 (32.0)	< 0.001
Nutritional status			
Body mass index (Kg/m ²) ^b	27.0 (24.1 - 29.7)	25.6 (23.5 - 28.4)	0.11
Stage of liver disease			
Chronic Hepatitis C	28 (54.9)	123 (63.4)	0.34
Liver cirrhosis	23 (45.1)	71 (36.6)	
Virological parameters			
Viral load HCV-RNA [Log ₁₀ IU/mL] ^b	5.98 (5.66 - 6.24)	5.84 (5.30 - 6.40)	0.38
Genotype 1	40/45 (88.9)	130/159 (81.7)	0.37
IL6 polymorphism			
IL6-174G/G genotypes			0.04
G/G	37 (72.5)	105 (54.1)	
G/C	13 (25.5)	72 (37.1)	
C/C	1 (2.0)	17 (8.8)	
Total	51 (100.0)	194 (100.0)	
HWE (P value)	0.65	0.47	

HCV, hepatitis C virus; n , number of subjects; a, mean ± standard deviation (SD); b, [Median and interquartile range (IQR), 25th-75th percentile]; IL, interleukin; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium. The asymptotic Pearson's χ^2 test was used to compare categorical variables. The t test and Mann-Whitney U test were used for comparison of means and medians, respectively. P values ≤ 0.05 were considered significant.

Table 4. Variables associated with diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C.

Variables	Multivariate analysis		
	OR	95%CI	<i>P</i>
Age	1.01	0.98 - 1.05	0.43
Body mass index	1.03	0.96 - 1.09	0.45
Hypertension	5.56	2.79 - 11.09	< 0.001
<i>IL6-174 G/C</i> (GC and CC)	0.42	0.22 - 0.78	0.006

CI, confidential interval; *IL6*, interleukin 6 gene; OR, *Odds Ratio*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hepatite C crônica está associada ao *diabetes mellitus* tipo 2. Estudos prévios têm demonstrado que concentrações séricas elevadas de IL-6 se associam ao *diabetes mellitus* tipo 2, assim como às formas avançadas de doença hepática. No entanto, o papel desempenhado pelo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -174 G/C na região promotora do gene que codifica a interleucina IL-6 na patogênese do *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, ainda, não foi completamente esclarecido.

Este é o primeiro estudo a demonstrar que os genótipos GC e CC do SNP de IL6-174 estão associados a risco menor de *diabetes mellitus* tipo 2 em pacientes com hepatite C crônica. Em investigações futuras torna-se essencial identificar mediadores inflamatórios potenciais que possam estar envolvidos na interação entre a infecção pelo HCV e o eixo pâncreas-fígado. Acreditamos que os nossos resultados podem contribuir para a compreensão das manifestações extra-hepáticas associadas à hepatite C.

6. ANEXOS

Anexo A: Aprovações dos projetos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0631.0.203.000-09

Interessado(a): Prof. Fernando Silva Neves
Departamento de Saúde Mental
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG -- COEP aprovou, no dia 31 de março de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Concentração sérica de marcadores periféricos e polimorfismos genéticos em portadores de hepatites virais crônicas B e C e comorbidades psiquiátricas associadas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0404.0.203.000-10

Interessado(a): **Profa. Luciana Diniz Silva**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de setembro de 2010, o projeto de pesquisa intitulado **"Estado nutricional, qualidade de vida, atividade física, alcoolismo, polimorfismo genético e concentração sérica de citocinas em portadores de hepatite B e C"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

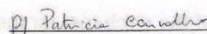
Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXOS**Anexo 1****Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho Ltda****Interessados:****Decisão**

O Comitê de Ética do Banco de Sangue da **Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho Ltda** aprovou, no dia 29 de outubro de 2012, os projetos de pesquisa intitulados "Concentração sérica de marcadores periféricos e polimorfismos genéticos em portadores de hepatites virais crônicas B e C e comorbidades psiquiátricas associadas (Parecer COEP UFMG nº ETIC 0631.0.203.000-09)" e "Estado nutricional, qualidade de vida, atividade física, alcoolismo, polimorfismo genético e concentração sérica de citocinas em portadores de hepatite B e C (Parecer COEP UFMG nº ETIC 0404.0.203.000-10)" bem como os Termos de Consentimentos Livre e Esclarecido para indivíduos saudáveis.

Informamos que o Banco de Sangue **Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho Ltda** autoriza a realização desses projetos com a entrevista e coleta de 10 mL de sangue dos doadores de sangue que concordarem em participar da pesquisa e assinarem o TCLE.

Atenciosamente,



Angela Gabriela Naves Givisiez
Coordenador do Banco de Sangue do Hospital Felício Rocho

Patrícia Carvalho C. Mendonça
Bióloga - CRB 4 Nº 8773 90

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos:

“Avaliação da concentração sérica de marcadores periféricos e de polimorfismos genéticos em pacientes infectados cronicamente pelo vírus da hepatite B (HBV) ou hepatite C (HCV) em correlação com o histórico de comorbidades psiquiátricas.”

“Estado nutricional, qualidade de vida, atividade física, alcoolismo e e concentração sérica de citocinas em portadores de hepatite B ou C crônica.”

O grupo de pesquisa em hepatites virais vem convidar o Senhor/Senhora a participar de um estudo que está em andamento no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das clínicas da UFMG. As informações estão sendo fornecidas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre o estudo e obter seu consentimento.

Estudos científicos vêm mostrando que algumas pessoas portadoras do vírus da hepatite B ou C podem apresentar alterações emocionais como tristeza, fadiga, desânimo e até depressão. Essas alterações podem ser ocasionadas pelo próprio vírus ou pela reação imunológica (defesa do nosso corpo contra o vírus da hepatite) que alterariam substâncias produzidas no nosso cérebro (neurotransmissores) que regulam as nossas emoções e sentimentos (tristeza, alegria, desânimo). O tratamento medicamentoso para a Hepatite também pode levar a alterações emocionais importantes em alguns pacientes.

Nosso estudo tem como objetivo avaliar, em um grupo de pessoas portadoras de hepatites virais, se características individuais tais como as substâncias inflamatórias e ou genes ligados aos neurotransmissores poderiam estar associados ao aparecimento das alterações emocionais mencionadas.

Esse estudo irá consistir de uma entrevista para sabermos de sua história médica e psicológica, assim como uma série de perguntas a fim de avaliar a presença de possíveis problemas emocionais. Essa avaliação não tem riscos e suas informações serão mantidas em sigilo restrito aos responsáveis pelo projeto (Dr. Fernando, Dra. Luciana, Dra. Rosângela, Dr. Renato e Dra. Luciana Rodrigues da Cunha). Os pacientes que forem candidatos ao tratamento medicamentoso para hepatite B ou C também serão reavaliados por um psiquiatra e/ou psicólogo sempre que vierem para consultas clínicas. Caso o Senhor ou a Senhora não queira mais participar da pesquisa, mas, necessite de atendimento psiquiátrico e psicológico, esse será mantido enquanto durar seu tratamento.

Após a entrevista um profissional experiente fará a coleta de 10 mL de seu sangue, com material esterilizado e descartável, que será identificada por código de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis para que seja realizado o estudo. Esse é um procedimento seguro, porém, no local da coleta do sangue periférico poderá surgir um pequeno hematoma. Assim, pedimos que siga as orientações do profissional que estiver realizando o procedimento. A coleta de sangue é necessária para dosarmos as substâncias e estudarmos os genes que podem estar ligados à depressão. A amostra de seu sangue será descartada após realizarmos tais estudos, não sendo aproveitada para outros experimentos de qualquer natureza.

O objetivo do estudo é para que possamos compreender melhor os problemas clínicos, biológicos e psicológicos causados pelo vírus da hepatite C. Não há para o senhor (a) nenhum benefício direto na participação desse estudo, e não é prevista qualquer compensação financeira, porém esses dados podem nos auxiliar a, no futuro, termos métodos mais eficientes no diagnóstico e tratamento de pessoas com hepatites virais. O senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais ao assinar esse termo.

Em qualquer etapa do tratamento você terá acesso aos profissionais responsáveis pelo mesmo para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os profissionais responsáveis podem ser contactados por telefone a qualquer momento: Dr. Fernando Silva Neves (31 3409 9785), Dra. Luciana Diniz Silva, Dra Rosângela Teixeira e Dr. Renato Ferreira Araujo. A comissão de ética em pesquisa da UFMG poderá ser contatada através do endereço Av. Pres. Antônio Carlos, 6627- Unidade administrativa II – 2º andar – sala 2005. CEP: 31270- 901 – BH-MG telefax (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

Seu nome e quaisquer outras informações que possam lhe identificar não aparecerão em nenhuma apresentação ou publicação resultantes desse estudo. O participante deve ter ciência que a qualquer momento ele pode retirar o seu consentimento de participação, sem que isso implique em perda de direitos pré-existentes ou prejuízo no relacionamento profissional, pessoal e no tratamento de sua patologia.

Confirmo que fui devidamente esclarecido sobre os propósitos e os procedimentos desse estudo e livremente aceito participar do mesmo.

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____; ____/____/____

Declaro que pessoalmente expliquei ao participante os propósitos e procedimentos do estudo:

Dr. Fernando Silva Neves

Dra. Luciana Diniz Silva

Dra. Rosângela Teixeira

Dr. Renato Ferreira Araújo

Dra Luciana Rodrigues da Cunha

Local e data: Belo Horizonte, ____/____/____

Anexo C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos saudáveis.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos:

“Avaliação da concentração sérica de marcadores periféricos e de polimorfismos genéticos em pacientes infectados cronicamente pelo vírus da hepatite B (HBV) ou hepatite C (HCV) em correlação com o histórico de comorbidades psiquiátricas.”

“Estado nutricional, qualidade de vida, atividade física, alcoolismo e e concentração sérica de citocinas em portadores de hepatite B ou C crônica.”

O grupo de pesquisa em hepatites virais vem convidar o Senhor/Senhora a participar de um estudo que está em andamento no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das clínicas da UFMG. As informações estão sendo fornecidas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre o estudo e obter seu consentimento.

Estudos científicos vêm mostrando que algumas pessoas portadoras do vírus da hepatite B ou C podem apresentar alterações emocionais como tristeza, fadiga, desânimo e até depressão. Essas alterações podem ser ocasionadas pelo próprio vírus ou pela reação imunológica (defesa do nosso corpo contra o vírus da hepatite) que alterariam substâncias produzidas no nosso cérebro (neurotransmissores) que regulam as nossas emoções e sentimentos (tristeza, alegria, desânimo). O tratamento medicamentoso para a Hepatite também pode levar a alterações emocionais importantes em alguns pacientes.

Nosso estudo tem como objetivo avaliar, em um grupo de pessoas portadoras de hepatites virais, se características individuais tais como as substâncias inflamatórias e ou genes ligados aos neurotransmissores poderiam estar associados ao aparecimento das alterações emocionais mencionadas.

Esse estudo irá consistir de uma entrevista para sabermos de sua história médica e psicológica, assim como uma série de perguntas a fim de avaliar a presença de possíveis problemas emocionais. Essa avaliação não tem riscos e suas informações serão mantidas em sigilo restrito aos responsáveis pelo projeto (Dr. Fernando, Dra. Luciana, Dra. Rosângela, Dr. Renato e Dra. Luciana Rodrigues da Cunha). Os pacientes que forem candidatos ao tratamento medicamentoso para hepatite B ou C também serão reavaliados por um psiquiatra e/ou psicólogo sempre que vierem para consultas clínicas. Caso o Senhor ou a Senhora não queira mais participar da pesquisa, mas, necessite de atendimento psiquiátrico e psicológico, esse será mantido enquanto durar seu tratamento.

Após a entrevista um profissional experiente fará a coleta de 10 mL de seu sangue, com material esterilizado e descartável, que será identificada por código de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis para que seja realizado o estudo. Esse é um procedimento seguro, porém, no local da coleta do sangue periférico poderá surgir um pequeno hematoma. Assim, pedimos que siga as orientações do profissional que estiver realizando o procedimento. A coleta de sangue é necessária para dosarmos as substâncias e estudarmos os genes que podem estar ligados à depressão. A amostra de seu sangue será descartada após realizarmos tais estudos, não sendo aproveitada para outros experimentos de qualquer natureza.

O Objetivo do estudo é para que possamos compreender melhor os problemas clínicos, biológicos e psicológicos causados pelo vírus da Hepatite C. Não há para o senhor (a) nenhum benefício direto na participação desse estudo, e não é prevista qualquer compensação financeira, porém esses dados podem nos auxiliar a, no futuro, termos métodos mais eficientes no diagnóstico e tratamento de pessoas com hepatites virais. O senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais ao assinar esse termo.

Em qualquer etapa do tratamento você terá acesso aos profissionais responsáveis pelo mesmo para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os profissionais responsáveis podem ser contactados por telefone a qualquer momento: Dr. Fernando Silva Neves (31 3409 9785), Dra. Luciana Diniz Silva, Dra Rosângela Teixeira e Dr. Renato Ferreira Araujo. A comissão de ética em pesquisa da UFMG poderá ser contatada através do endereço Av. Pres. Antônio Carlos, 6627- Unidade administrativa II – 2º andar – sala 2005. CEP: 31270- 901 – BH-MG telefax (031) 3409-4592 - email: coep@prpq.ufmg.br

Seu nome e quaisquer outras informações que possam lhe identificar não aparecerão em nenhuma apresentação ou publicação resultantes desse estudo. O participante deve ter ciência que a qualquer momento ele pode retirar o seu consentimento de participação, sem que isso implique em perda de direitos pré-existentes ou prejuízo no relacionamento profissional, pessoal e no tratamento de sua patologia.

Confirmando que fui devidamente esclarecido sobre os propósitos e os procedimentos desse estudo e livremente aceito participar do mesmo.

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

Declaro que pessoalmente expliquei ao participante os propósitos e procedimentos do estudo.

Dra. Luciana Diniz Silva

Dra. Rosângela Teixeira

Mestranda: Cliviany Borges da Silva

Local e data: Belo Horizonte, ____/____/____

Anexo D: Questionário clínico.

Projeto: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MARCADORES PERIFÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PORTADORES DE HEPATITES VIRAIS CRÔNICAS B E C E COMORBIDADES PSIQUIÁTRICAS ASSOCIADAS.

Avaliação clínica

Data ___/___/___ Pesquisadores:

Psicólogo: _____

Médico: _____

Caso nº (RG-HC-UFMG)

Caso nº (Nº no Ambulatório de H.V.)

Nome: _____ Local de moradia atual:

Rua _____ Nº _____ Telefone: _____

Idade

Sexo (M ou F)

Cor: _____ Estado civil: _____

Altura (em cm)

Peso (em Kg)

Naturalidade: _____

Grau de escolaridade: _____

Analfabeto=1; I grau incompleto =2; I grau completo=3; II grau incompleto=4;

II grau completo=5; III grau incompleto=6; III grau completo=7.

Profissão: _____

Características da moradia:

Nº de pessoas na moradia

Nº de cômodos na casa (exceto banheiro e cozinha)

Tem animais de estimação dentro de casa? (S ou N)

Fonte de água:

Água tratada (S ou N) rede de esgoto (S ou N)

Renda familiar: _____ (salários mínimos por mês)

Hábitos:

Fuma (S ou N) Quantidade de cigarros/dia/ano: _____

Bebe (S ou N) (qual tipo de bebida): _____

Quantidade de álcool/dia/ano: _____

História de contato

Recebeu transfusão de sangue alguma vez na vida? (S ou N)

Há quantos anos recebeu a primeira transfusão de sangue? _____

Fez tratamento dentário alguma vez na vida? (S ou N)

Tem tatuagem? (S ou N)

Tem ou já teve *piercing*? (S ou N)

Já fez tratamento com acupuntura? (S ou N)

Quantos parceiros sexuais você tem, aproximadamente? _____

Quando tem relações sexuais costumava usar camisinha? (S ou N)

Já teve relação sexual com prostituta (garoto de programa)? (S ou N)

Compartilha (ou) objetos cortantes – tesoura, lâmina de barbear, navalha, alicate – com outras pessoas em casa ou em salões de beleza? (S ou N)

(Se sim, com quem?) _____

Já usou droga injetável? (S ou N)

Já usou droga inalatória? (S ou N)

Já tomou injeção com seringa de vidro ou compartilhou seringa? (S ou N)

Já precisou fazer diálise? (S ou N)

Já teve hepatite? (S ou N)

Sabe o tipo? _____

1- A

2- B

3- C

4- Outro: _____

5- Não sabe o tipo. _____

Já recebeu vacina contra Hepatite B? (S ou N) Quantas doses? _____

Já foi operado (a)? (considerar aborto) (S ou N)

Quando? _____

Já foi internado em hospital para tratamento clínico (não cirúrgico)? (S ou N)

Quando? _____

Uso de medicação:

Uso de medicação nos últimos dois meses (S ou N)

Quais medicamentos: _____

Comorbidades: (S ou N)

HAS (S ou N)

Diabetes (S ou N)

Asma (S ou N)

Anemia (S ou N)

Insuficiência renal (S ou N)

Úlcera péptica (S ou N)

HIV (S ou N)

Outras _____

Hepatopatia (S ou N) Qual: _____

Idade do diagnóstico da hepatopatia

Cirrose (S ou N) Child (última internação) (A ou B ou C)

Idade do diagnóstico da cirrose Hipertensão portal (S ou N)

Desenvolveu carcinoma hepatocelular: (S ou N)

Se sim tipo histológico: _____ Outros: _____

