

Diego Casas Deza

Alteraciones lipídicas y
metabólicas tras la erradicación
del virus de la hepatitis C
mediante antivirales de acción
directa

Director/es

Bernal Monterde, Vanesa
Arbonés Mainar, José Miguel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ALTERACIONES LIPÍDICAS Y METABÓLICAS
TRAS LA ERRADICACIÓN DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS C MEDIANTE ANTIVIRALES DE
ACCIÓN DIRECTA

Autor

Diego Casas Deza

Director/es

Bernal Monterde, Vanesa
Arbonés Mainar, José Miguel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2023



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ALTERACIONES LIPÍDICAS Y METABÓLICAS
TRAS LA ERRADICACIÓN DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS C MEDIANTE ANTIVIRALES DE
ACCIÓN DIRECTA.

Diego Casas Deza

Directores

Vanesa Bernal Monterde

José Miguel Arbonés Mainar

Escuela de doctorado en Medicina, Facultad de Medicina de Zaragoza

2023

Dña. Vanesa Bernal Monterde, Doctora en Medicina y cirugía y profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Alteraciones lipídicas y metabólicas tras la erradicación del virus de la hepatitis C mediante antivirales de acción directa” ha sido realizada bajo su dirección por el Graduado en Medicina y Cirugía **D. Diego Casas Deza** como trabajo para optar al grado de Doctor.

Hallándose concluida y reuniendo las condiciones necesarias, autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza a 22 de marzo de 2023

Fdo. Dña. Vanesa Bernal Monterde

D. José Miguel Arbonés Mainar, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) de Zaragoza, España.

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Alteraciones lipídicas y metabólicas tras la erradicación del virus de la hepatitis C mediante antivirales de acción directa” ha sido realizada bajo su dirección por el Graduado en Medicina y Cirugía **D. Diego Casas Deza** como trabajo para optar al grado de Doctor.

Hallándose concluida y reuniendo las condiciones necesarias, autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza a 4 de Abril de 2023

Fdo. D. José Miguel Arbonés Mainar

Agradecimientos

Habría sido imposible llevar a cabo este proyecto de investigación que me ha permitido concluir este manuscrito con mi tesis doctoral sin la ayuda de muchas personas que me han acompañado en este proceso.

En primer lugar, gracias a Vanesa Bernal, quién nada más llegar yo al servicio captó mi interés por la investigación clínica y me reclutó para este proyecto cuando era un residente de primer año recién aterrizado. Desde entonces, me acompañó en los primeros pasos y me animó a empezar a caminar solo, aunque siempre en compañía.

También a José Miguel Arbonés, mi maestro y del que he aprendido tanto a lo largo de estos años trabajando a su lado. Alguien que ha conseguido que vea la investigación como una pasión y que me ha ayudado a plantearme preguntas y a tratar de buscar las respuestas para conseguir avanzar.

Al resto de miembros del grupo de investigación ADIPOFAT, especialmente a Mapi, Raquel y Marta. Además de ser el espíritu del laboratorio, sin su esfuerzo tampoco habría salido adelante este proyecto.

También quiero agradecer su ayuda a Pilar Calmarza y Ana Martínez-Sapiña por su ayuda y colaboración en el estudio y en especial a Silvia Espina, ya que con ella empezó todo esto.

Por último, quiero darle las gracias a Marta, por ser mi compañera en este viaje y en todos los que vendrán.

Sic parvis magna

Este trabajo ha sido posible gracias a financiación de Gilead, mediante una Gilead Fellowship entregada al proyecto "*Lipoprotein profiling 4 HCV infection*". También gracias al Instituto de Salud Carlos III (contrato de investigación Río Hortega) y el Gobierno de Aragón, mediante la concesión de subvenciones a la actividad investigadora de los grupos de investigación de referencia reconocidos por el Gobierno de Aragón

ÍNDICE:

Abreviaturas y siglas

1. Introducción y marco teórico	pág. 14
a. Epidemiología de la infección por VHC	pág. 14
b. Biología del virus de la hepatitis C y su asociación con las lipoproteínas	pág. 15
i. La partícula del VHC	pág. 15
ii. Replicación viral	pág. 17
c. Tratamiento de la infección por VHC	pág. 18
d. Lipoproteínas	pág. 18
i. Vía exógena	pág. 20
ii. Vía endógena	pág. 20
e. Manifestaciones extrahepáticas metabólicas de la infección por VHC	pág. 21
i. Alteraciones del perfil lipídico	pág. 22
ii. Diabetes y resistencia a la insulina	pág. 23
iii. Otras alteraciones metabólicas	pág. 24
iv. Enfermedades cardiovasculares	pág. 25
v. Otros	pág. 26
1. Crioglobulinemia mixta	pág. 26
2. Síndromes linfoproliferativos	pág. 26
3. Artralgias y mialgias	pág. 27
4. Síndrome seco	pág. 27
5. Insuficiencia renal	pág. 27
f. Modificaciones metabólicas relacionadas con el tratamiento con antivirales de acción directa	pág. 27
g. Valoración del perfil de lipoproteínas más allá de la concentración sérica de colesterol	pág. 28
i. Espectroscopia de RMN en dos dimensiones para la medición de lipopartículas	pág. 32
2. Hipótesis de trabajo	pág. 36
3. Justificación del trabajo	pág. 40

4. Objetivos	pág. 44
a. Objetivo principal	pág. 44
b. Objetivos secundarios	pág. 44
5. Material y métodos	pág. 48
a. Diseño del estudio	pág. 48
b. Población del estudio	pág. 48
i. Pacientes	pág. 48
ii. Criterios de inclusión y exclusión	pág. 48
1. Criterios de inclusión	pág. 48
2. Criterios de exclusión	pág. 48
c. Métodos	pág. 49
i. Recogida y registro de la información	pág. 49
ii. Variables del estudio	pág. 49
iii. Obtención de la muestra sanguínea	pág. 51
iv. Análisis de laboratorio	pág. 51
v. Genotipado y carga viral	pág. 52
vi. Análisis de lipopartículas mediante DOSY-RM	pág. 52
vii. Análisis de lipopartículas mediante cromatografía	pág. 53
viii. Genotipado de APOE	pág. 53
d. Desarrollo del estudio	pág. 53
e. Tamaño de la muestra y potencia estadística	pág. 54
f. Análisis estadístico	pág. 54
g. Consideraciones éticas	pág. 55
6. Resultados	
a. Características de la cohorte	pág. 58
b. Cambios longitudinales hepáticos	pág. 63
c. Cambios longitudinales extrahepáticos	pág. 64
d. Análisis de lipopartículas mediante DOSY-RMN y cromatografía	pág. 69
i. Niveles de colesterol, apolipoproteínas y TG séricos	pág. 72
ii. Lipopartículas y carga viral	pág. 73

iii. Evaluación de lipopartículas por DOSY-RMN	pág. 73
iv. Eventos clínicos durante el seguimiento	pág. 79
7. Discusión	pág. 84
a. Introducción	pág. 84
b. Cambios en el metabolismo	pág. 84
c. Análisis de las características de las lipopartículas	pág. 88
8. Conclusiones	pág. 96
9. Índice de figuras	pág. 100
10. Índice de tablas	pág. 104
11. Anexos	pág. 108
12. Bibliografía	pág. 134

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAD: Antivirales de Acción Directa

ALT: Alanino aminotransferasa

AP: Actividad de protrombina

Apo: Apolipoproteína

APRI: AST to Platelet Ratio Index

ARN: Ácido Ribonucleico

AST: Aspartato aminotransferasa

CEICA: Comité de ética en la investigación clínica de Aragón

COLT: Colesterol Total

CV: Cardiovascular

DM: Diabetes mellitus

EBR: Elbasvir

FA: Fosfatasa alcalina

FIB-4: Fibrosis-4 score

GGT: Gamma-glutamyl transferasa

GLE: Glecaprevir

GZR: Grazoprevir

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HDL-TG: TG contenidos en las partículas HDL

HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina

HTP: Hipertensión portal

LDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

INR: Ratio internacional normalizado

kPa: Kilopascales

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDV: Ledipasvir

MELD: Model for End-stage Liver Disease

MLM: Modelos lineales mixtos

PIB: Pibrentasvir

QM: Quilomicrones

RIQ: Rango intercuartílico

RVS: Respuesta viral sostenida

RVS12: Respuesta viral sostenida a las 12 semanas

RVS48: Respuesta viral sostenida a las 48 semanas

SOF: Sofosbuvir

TG: Triglicéridos

TNF: Factor de necrosis tumoral

TPT: Tiempo parcial de tromboplastina

VEL: Velpatasvir

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

Hazlo o no lo hagas, pero no lo intentes

1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

El virus de la hepatitis C (VHC) es un importante patógeno humano que causa hepatitis aguda y crónica, cirrosis hepática y hepatocarcinoma, lo que supone un importante problema de salud pública a nivel mundial.

El VHC, previamente conocido como virus no-A no-B, fue identificado en 1989 (1). Es un virus ARN de cadena simple, miembro de la familia *Flaviridae*, que incluye otros patógenos humanos como el virus del Nilo Occidental o el virus de las fiebres amarillas. Una de las características principales del VHC es su clasificación en un total de 7 genotipos, con múltiples subtipos (2). Estos diferentes genotipos se distribuyen de manera irregular geográficamente y presentan respuestas específicas tanto al tratamiento como al desarrollo de complicaciones, particularmente en el caso del hepatocarcinoma (3, 4).

1.1 Epidemiología de la infección por VHC:

La incidencia y la prevalencia de infección por VHC se encuentran en descenso desde la segunda mitad del siglo XX (5). Varios estudios de seroprevalencia realizados en distintos países indican una menor incidencia en los últimos años (6-10). Esto se debe en parte a la mejoría de las condiciones higiénico-sanitarias en los países en vías de desarrollo y a la vigilancia activa en países con alta incidencia, como por ejemplo Egipto.

A pesar de este descenso en las cifras de incidencia, los modelos de prevalencia mundial estiman que en el 2022 existían unas 1.5 millones de nuevas infecciones anuales (23.7 por cada 100 000 habitantes). En Europa, Las principales áreas de incidencia son los países de la zona oriental del mediterráneo (62.5 por 100 000), donde se asocia a cuidados sanitarios, y la región de Europa del este (61.8 por cada 100 000) donde se asocia al uso de drogas por vía parenteral (11).

El contagio relacionado con el consumo de opiáceos no es un fenómeno exclusivo de Europa del este. En algunas áreas en las que se estaba registrando un descenso progresivo de la incidencia,

como los Estados Unidos, se ha observado un repunte en las nuevas infecciones a partir del 2010 (12, 13), relacionado principalmente con el uso de drogas derivadas de los opioides por vía parenteral (14, 15).

Independientemente de la zona geográfica, el grupo de hombres que tienen sexo con hombres también supone un grupo de riesgo para la infección y re-infección por el VHC, y especialmente para la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el VHC(16-19).

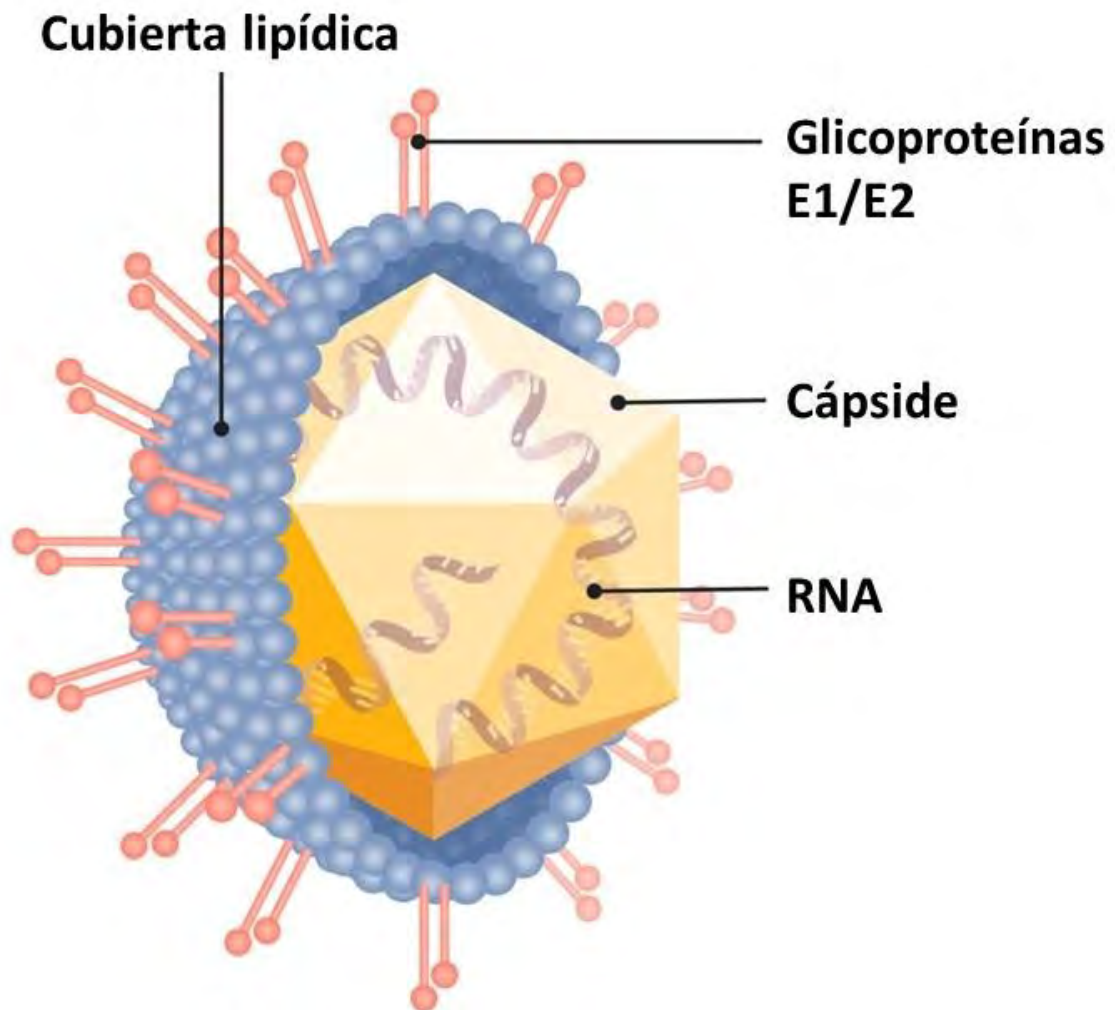
En España los datos extraídos del Plan Estratégico HEPATITIS C informan de una prevalencia de anticuerpos frente al VHC en la población de 20 a 80 años de 0.85% (IC 95%: 0.64%-1.08%) y de infección activa de 0.22% (IC 95%: 0.12%-0.32%) entre los años 2017 a 2018. Se ha observado un pico de prevalencia de infección activa en los varones nacidos entre 1958 y 1967 (0.86%), estando el resto de los grupos por debajo del 0.20% (20). La prevalencia se ha asociado con una situación sociocultural desfavorable, incluyendo clase social y nivel de estudios. Destaca la altísima prevalencia entre consumidores de drogas por vía parenteral, alcanzándose el 61.4%(20). En cuanto a la incidencia, en el año 2018 se declararon en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica 1494 nuevos diagnósticos de VHC, lo que supone una tasa global de incidencia de 3.39 casos por cada 100 000 habitantes. Las formas crónicas pueden evolucionar a cirrosis (15-30% tras 20-40 años) y hepatocarcinoma (2-4% al año). Según datos de la Alianza para la Eliminación de las Hepatitis Víricas en España, el año pasado se produjeron 4789 fallecimientos por la infección por VHC (20).

1.2 Biología del virus de la hepatitis C y su asociación con las lipoproteínas

1.2.1 La partícula del VHC

El VHC es una partícula de entre 50 y 80 nm de diámetro (21), íntimamente asociada a lipoproteínas, lo que le concede una densidad marcadamente baja (22-24). Las partículas de VHC contienen una cadena simple de genoma RNA, núcleo y glicoproteínas E1 y E2 (25).

Figura 1. Estructura del VHC



Debido a la asociación de las partículas virales infectivas libres (virión) con las lipoproteínas, apolipoproteínas como la APOA, APOB, APOC1, APOC2, APOC3 y APOE pueden encontrarse en asociación con partículas de VHC (26-28). Además, aparte de las ya mencionadas apolipoproteínas, también se han caracterizado en cultivos celulares partículas virales unidas a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (29).

Las interacciones que rigen la relación entre los viriones del VHC con las diferentes lipoproteínas implicadas siguen sin estar completamente caracterizadas. Se ha sugerido que el virión del VHC sea un híbrido, formado por una parte virión y una parte de lipoproteínas (30). Otra hipótesis planteada es que la relación se produzca mediante la interacción de las apolipoproteínas y las

moléculas lipídicas que forman parte de la envoltura del VHC (31). En ambos casos, la interacción con las lipoproteínas del huésped podría contribuir a proteger y ocultar las partículas del virión, cubriendo su superficie.

Esta cubierta glicoproteica es fundamental en el proceso de inclusión de la partícula viral en las células diana. Juega un papel fundamental en la unión y en el proceso de fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal de las células del huésped. Las glicoproteínas E1 y E2 del VHC antes mencionadas son proteínas transmembrana de tipo I, que forman enlaces de tipo covalente con las células infectadas (32, 33).

1.2.2 Replicación viral:

La replicación viral requiere del apoyo del mecanismo celular del huésped para llevarse a cabo (34). Tras los procesos iniciales de replicación del RNA, el VHC se asocia a membranas derivadas del retículo endoplásmico. Estas membranas, junto a varias proteínas, como NS3/4, NS4B, NS5A y NS5B forman la parte viral de la maquinaria de replicación (35). Dentro de este proceso de replicación, la polimerasa NS5B y el microRNA 122 (miR-122) juegan un papel primordial (36). Para llevar a cabo la replicación de su genoma, el VHC induce una reorganización masiva de membranas intracelulares, para crear una red membranosa(35). Estudios realizados mediante microscopía de electrones han demostrado que la estructura predominante son unas vesículas de doble membrana (37, 38). En estas vesículas se han identificado numerosas proteínas celulares, pero también moléculas de otro tipo como por ejemplo colesterol (39). Junto al colesterol, otros lípidos probablemente también participan en la replicación del VHC. Es especialmente reseñable que el VHC altera la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, dando como resultado la acumulación de lípidos intracelulares (40).

Además de las vesículas de doble membrana, también se forman otros tipos de formaciones micelares que se comportan como un depósito de triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol. Se

considera que estas partículas tienen un papel central en la coordinación de la síntesis de RNA viral y en la génesis de la partícula del virión (41, 42).

1.3 Tratamiento de la infección por VHC:

El objetivo principal del tratamiento contra el VHC es su eliminación del organismo. Hasta hace no mucho tiempo, las estrategias de tratamiento se basaban en la combinación de interferón pegilado y ribavirina, siendo las tasas de respuesta inferiores al 50% (43-46).

Este paradigma cambió en el año 2011, cuando se aprobaron los primeros AAD, boceprevir y telaprevir, para el tratamiento del VHC genotipo 1, en combinación con la terapia dual habitual (47, 48). Desde 2013 se han incorporado progresivamente nuevos AAD cada vez mejores y actualmente en España existen cuatro regímenes de tratamiento indicados para el tratamiento del VHC (sofosbuvir/velpatasvir, glecaprevir/pibrentasvir, ledipasvir/sofosbuvir y elbasvir/grazoprevir). Todos ellos han demostrado su efectividad en diferentes ensayos clínicos(49-55).

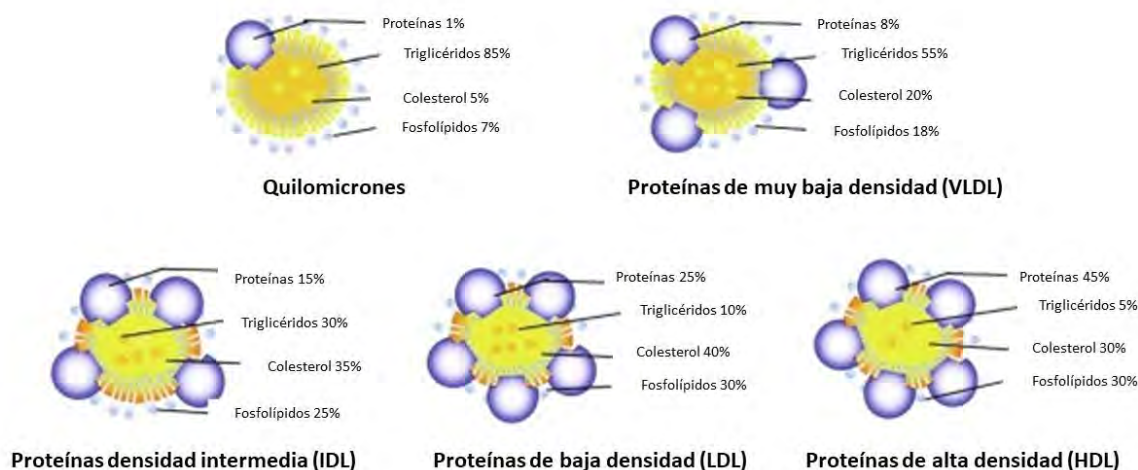
Actualmente sólo se utilizan sofosbuvir/velpatasvir y glecaprevir/pibrentasvir, dos fármacos orales pangenotípicos, que no precisan interferón ni ribavirina, con tasas de RVS cercanas al 100%, con pautas de tratamiento cortas (8 ó 12 semanas) y sin apenas riesgo de toxicidad.

En los pacientes con cirrosis hepática por el VHC y descompensación clínica, el tratamiento antiviral está indicado siempre que no presenten comorbilidades graves que condicionen la esperanza de vida del paciente.

1.4 Lipoproteínas:

Las lipoproteínas son macromoléculas transportadoras de lípidos. Están compuestas por un núcleo apolar con TG y colesterol esterificado recubierto por una capa polar con apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre.

Figura 2. Tipos de lipoproteínas y su composición



Las lipoproteínas se suelen clasificar en cinco clases basándonos en su densidad, medida mediante ultracentrifugación: quilomicrones, VLDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las características de las diferentes familias de lipoproteínas se exponen resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las familias de lipoproteínas

Nombre	Densidad (g/ml)	Diámetro (nm)	% proteínas	% Colesterol	% Fosfolípidos	% TG	% ácidos grasos libres
QM	<0.95	100-1000	<2	4-8	7-8	84-88	0
VLDL	0.95-1.006	30-80	7-10	20-25	18-20	50-55	1
IDL	1.006-1.019	25-50	10-18	29-45	22-27	25-31	1
LDL	1.019-1.063	18-28	20-25	45-58	20-28	10-15	1
HDL	1.063-1.210	5-15	33-57	17-40	26-46	3-15	0-6

QM: Quilomicrones; VLDL: Very Low Density Lipoproteins; IDL: Intermediate Low Density Lipoproteins; LDL: Low Density Lipoproteins; HDL: High Density Lipoproteins

El metabolismo de las lipoproteínas puede ser exógeno cuando los lípidos son absorbidos a través de los enterocitos intestinales, y endógeno cuando las lipoproteínas son sintetizadas principalmente en los hepatocitos y/o en los enterocitos.

1.4.1 Vía exógena:

El 90% de los lípidos que obtenemos de la dieta son TG, mientras que solo aportamos a través de la dieta 400 mg al día de colesterol. La principal fuente de colesterol es la bilis, en la cual se secretan aproximadamente 1500 mg de colesterol al día (56). Los lípidos absorbidos en el intestino se unen a la apoproteína B-48 en los enterocitos, con lo que se forman los quilomicrones (57). Estos quilomicrones son secretados a los vasos linfáticos y alcanzan la circulación general a través del conducto torácico. Estos quilomicrones reciben APOCII y APOE desde las partículas HDL, con lo que se convierten en quilomicrones maduros. Dichos quilomicrones son partículas muy grandes y de baja densidad.

Existe un intercambio de TG entre los quilomicrones y las partículas LDL, que se sitúan en el endotelio vascular. Los quilomicrones maduros quedan reducidos a quilomicrones remanentes, que son captados por los hepatocitos mediante una interacción con la APOE (57)

1.4.2 Vía endógena:

El órgano clave de la vía endógena de las lipoproteínas es el hígado(58). Los hepatocitos secretan las VLDL, cuya formación se inicia en el retículo sarcoplásmico con la incorporación de TG a partículas de APOB100, gracias a la acción de la proteína transferente de TG microsomal. Posteriormente a esta partícula se le incorporan ésteres de colesterol y APOE. A continuación, se lleva a cabo la exocitosis de las lipoproteínas VLDL al torrente sanguíneo. Estas VLDL, una vez que han sido secretadas, adquieren mayor cantidad de APOE y APOC proveniente de las partículas HDL.

Las VLDL maduras son catabolizadas por la acción de la enzima lipoproteinlipasa, que es activada por la APOCII. Con esta reacción enzimática se liberan ácidos grasos que son incorporados al tejido muscular y adiposo, donde se utilizan como sustrato energético o son re-esterificados en el tejido adiposo.

Las partículas VLDL catabolizadas se denominan VLDL remanentes o IDL, y se incorporan al hígado de nuevo mediante la interacción de la APOE (59). Otra opción es que sean de nuevo hidrolizadas por la lipasa hepática, por lo que las IDL se transforman en LDL, deplecionadas de TG y con alto contenido en colesterol. Estas partículas se encargan de transportar el colesterol a los tejidos periféricos o al hígado a través de interacciones de la APOB100 con los receptores LDL(60).

Por otra parte, la APOAI supone la principal apolipoproteína de las partículas HDL (61, 62). De nuevo es sintetizada en el hígado y en el intestino(56) y se ve implicada en la formación de dichas moléculas a través de la esterificación del colesterol y los fosfolípidos(62, 63). Posteriormente se unen a estas partículas más moléculas de ésteres de colesterol, siendo repartidos por los tejidos periféricos gracias a estas moléculas maduras de HDL(64, 65). Durante este proceso las moléculas de HDL pierden progresivamente parte de su carga en colesterol, hasta retornar al hepatocito o al enterocito, donde recargan sus depósitos de colesterol(64, 66).

1.5 Manifestaciones extrahepáticas metabólicas de la infección por VHC:

Como ya se ha comentado, la cirrosis y el cáncer hepático son las complicaciones más importantes asociadas a la infección por el VHC. No obstante, existen un amplio abanico de manifestaciones extrahepáticas que condicionan una gran morbi-mortalidad.

En algunas cohortes de pacientes, el porcentaje de enfermos que sufren algún tipo de manifestación extrahepática alcanza el 74%, con diferentes niveles de prevalencia y de

gravedad(67). Igualmente es diferente el grado de conocimiento que tenemos de ellas, y, en algunos casos, la relación con el VHC no está del todo demostrada.

La mayor parte de los datos disponibles establecen un origen inmunológico o linfoproliferativo para las manifestaciones extrahepáticas, como en los casos de la crioglobulinemia mixta o de los linfomas(68). Con el paso del tiempo se han ido identificando complicaciones que afectan a multitud de órganos, como por ejemplo renales, cardiovasculares, metabólicas o del sistema nervioso central.

1.5.1 Alteraciones del perfil lipídico:

La magnitud de la afectación parece estar relacionada con polimorfismos del huésped y el genotipo del VHC(69). La infección crónica por VHC produce niveles bajos de VLDL y LDL. A pesar de esta modificación aparentemente beneficiosa, estos pacientes presentan un aumento del desarrollo de aterosclerosis que conlleva un aumento del riesgo CV. Esto sucede independientemente de otros factores de riesgo como la diabetes tipo II o la esteatosis hepática (70-74). Curiosamente, la erradicación del VHC produce un aumento en el colesterol sérico y los niveles de LDL(75), creando una combinación de circunstancias que puede agravar el riesgo de lesiones por aterosclerosis. Estas modificaciones post tratamiento se discutirán detalladamente en el apartado 1.6 (Modificaciones metabólicas relacionadas con el tratamiento con antivirales de acción directa; AAD).

Otra posible etiología de las alteraciones lipídicas puede ser la propia alteración de la función hepática debido a la infección por el VHC. Sin embargo, la alteración de los niveles de VLDL y de TG se observa en etapas muy tempranas de la infección incluso cuando no existe daño hepático (76).

Otro hallazgo observado en pacientes con infección crónica por el VHC, es la existencia de lipoproteínas anómalas, como por ejemplo partículas VLDL con un aumento de la cantidad de

TG, lo que les confiere un mayor poder aterogénico. Estas partículas no están presentes tras la curación. Por otra parte, mientras que las relaciones de las partículas VLDL y LDL con el VHC son bien conocidas, no ocurre lo mismo con las partículas HDL. Sin embargo, sí se ha observado que la carga de partículas VHC-LVP es inversamente proporcional a los niveles de HDL colesterol en pacientes con genotipo 3 (77).

1.5.2 Diabetes y resistencia a la insulina:

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) es una de las complicaciones más frecuentes de entre las relacionadas con el VHC. La relación entre la diabetes y el VHC proviene de una compleja interacción entre procesos de resistencia a la insulina, esteatosis hepática y procesos inflamatorios (78). Parece ser que la transcripción del core-VHC provoca un aumento de la expresión del TNF-alfa y, con ello, una inducción de la resistencia a la insulina(79). Esto explica por qué la prevalencia de diabetes es superior en los pacientes con hepatopatía por VHC comparados con otras etiologías de hepatopatía(80).

El desarrollo de DM-2 se correlaciona directamente con el grado de fibrosis hepática, es decir, si bien puede aparecer en pacientes con fibrosis leve, es en los pacientes con cirrosis hepática en los que se observa una mayor incidencia (81, 82). A su vez, los pacientes que presentan diabetes asociada al VHC tienen un mayor riesgo de desarrollar hepatocarcinoma(83).

En cuanto a la relación de la diabetes con el tratamiento para el VHC, en los primeros tratamientos con interferón, se comprobó una peor respuesta de aquellos pacientes que presentaban DM-2 y VHC (84). Con los nuevos tratamientos, los AAD, se ha observado una disminución del riesgo de aparición de diabetes de novo en diversos estudios (82, 85, 86). Sin embargo, también existe un estudio, con un número reducido de pacientes, con resultados opuestos(87).

Los AAD no solo evitan la futura aparición de diabetes, sino que también mejoran el metabolismo de la glucosa en los pacientes que alcanzan Respuesta Viral Sostenida (RVS). Se ha observado un descenso en la hemoglobina glicada (88, 89) y una mejoría en los parámetros relacionados con la resistencia insulínica (90-93). Parece que este efecto es más evidente en pacientes con diabetes previa. Sin embargo, su duración a largo plazo tras alcanzar la RVS no está bien establecida.

1.5.3 Otras alteraciones metabólicas:

Además de los lípidos y de la glucosa, existen otras vías metabólicas que se ven afectadas por la interacción del VHC con el huésped.

Varios estudios realizados previamente han propuesto la relación entre el VHC y la cianocobalamina o vitamina B12. El hígado es el principal almacén fisiológico de esta vitamina (94, 95) y la elevación de sus niveles séricos se ha relacionado en varios estudios con la presencia de enfermedad, tanto de origen hepático hepático(96-104) como también hematológico (105, 106) y neoplásico (107, 108).

Se ha descrito una implicación de la cianocobalamina en el ciclo de replicación del VHC, especialmente debido a su alta afinidad por el RNA (109-111). Algunos autores han hipotetizado que podría actuar como un inhibidor del ciclo de replicación viral (112, 113). Un ensayo clínico realizado cuando el interferón era el estándar de tratamiento demostró que la suplementación con vitamina B12 aumentaba las tasas de respuesta (114). Sin embargo, la aparición de los AAD y sus altísimas tasas de respuesta hizo caer esta línea de investigación. Se desconoce lo que ocurre con estos niveles de vitamina B12 tras la curación de la enfermedad, en este caso, de la hepatitis C.

En cuanto al metabolismo férrico, también se han observado modificaciones en los pacientes infectados por el VHC. En el hígado de estos pacientes se han observado depósitos de hierro,

tanto en los hepatocitos como en las células reticuloendoteliales(115-117). Dicha sobrecarga se relaciona con el grado de fibrosis según la clasificación METAVIR y con la presencia de cirrosis. Para explicar la relación entre la infección por el VHC y el hierro, la hepcidina juega un papel capital. El hierro no tiene un mecanismo fisiológico de eliminación en caso de sobrecarga, y es la hepcidina la que se encarga de regular su entrada en el organismo en caso de hipersideremia (118, 119) . Se asume que el VHC altera el metabolismo del hierro a través de la reducción de los niveles de hepcidina (120-124) y debe tenerse en cuenta que éste parece un efecto característico del VHC, ya que esta alteración es mucho más marcada en los pacientes infectados por dicho virus respecto a los infectados por el VHB (122).

Hay pocos datos acerca de cuál es el comportamiento del metabolismo del hierro tras la erradicación del virus. Apenas hay estudios que lo evalúen, y además muestran resultados variables. Uno de ellos no mostró modificaciones significativas (125), mientras que otro sí que mostro que la ratio hepcidina sérica/ferritina aumentaba tras el tratamiento, sugiriendo una mejoría de la secreción inadecuada de hepcidina tras la erradicación del virus (126).

1.5.4 Enfermedades cardiovasculares:

Al igual que otras enfermedades infecciosas crónicas, los datos disponibles muestran un aumento en la morbimortalidad cardiovascular (CV) en aquellos pacientes infectados por el VHC con respecto a los controles (127, 128). Los primeros estudios que se realizaron mostraron una relación entre la seropositividad para el VHC y una reducción en el cociente intima-media de la carótida(129). Posteriormente se descubrió también que el VHC provocaba un aumento en la expresión de citoquinas pro-aterogénicas (130).

La afectación CV parece predominar en los pacientes con VHC con respecto a otros pacientes con otras patologías similares, como por ejemplo el virus de la hepatitis B (VHB)(131). Esto indica

que el riesgo CV no deriva solo de manera secundaria al daño del hígado, sino que es un efecto inherente al propio VHC (132).

Además, en grandes cohortes de pacientes con periodos de seguimiento muy largos se puso en evidencia que aquellos pacientes que recibían tratamiento antiviral y se lograba la erradicación del VHC tenían tasas de mortalidad inferiores a aquellos pacientes que no se trataban, no solo por causa hepática, sino también extrahepática, especialmente CV (133). Otros trabajos mostraron una mejoría en la perfusión miocárdica en aquellos pacientes que presentaron RVS con respecto a los controles (134).

1.5.5 Otros

1.5.5.1 Crioglobulinemia mixta:

La crioglobulinemia mixta es una vasculitis de pequeño vaso que involucra principalmente la piel, las articulaciones, el sistema nervioso periférico y los riñones. La infección por el VHC es la causa del 80% del total de los casos de crioglobulinemia, siendo su expresión patológica muy variable, desde casos leves a casos potencialmente mortales fulminantes (68, 135). Las manifestaciones de la vasculitis responden a la erradicación del virus a través de los diferentes tratamientos farmacológicos disponibles (136).

1.5.5.2 Síndromes linfoproliferativos:

Diferentes meta-análisis han confirmado la asociación existente entre el VHC y diferentes enfermedades hematológicas, principalmente linfomas no-Hodgkin de tipo B. La incidencia acumulada disminuye cuando se trata la infección, por lo que ésta actúa como una acción preventiva (137).

1.5.5.3 Artralgias y mialgias:

Entre un 40 y un 80% de los pacientes con crioglobulinemia refieren artralgias(138), afectando habitualmente de manera bilateral, simétrica y no deformante. Las artralgias sin relación con la crioglobulinemia mixta son mucho más infrecuentes, situándose en torno a un 10% de prevalencia (139, 140). Es difícil determinar cuándo las artralgias y las mialgias se deben primariamente a la infección por VHC y cuando son ocasionadas por otra patología intercurrente.

1.5.5.4 Síndrome seco:

El síndrome seco aparece en entre un 20 y un 30% de los pacientes con VHC, mientras que tan solo un 5% de los pacientes diagnosticados de síndrome de Sjögren presentan una infección por VHC (141-144). A pesar de las similitudes clínicas entre el síndrome seco asociado al VHC y el síndrome de Sjögren, en los casos asociados al VHC es raro encontrar positividad para los anticuerpos típicos del Sjögren, como son los anticuerpos anti-SSA y anti SSB (145).

1.5.5.5 Insuficiencia renal:

La forma más común de afectación renal en los pacientes infectados por el VHC es la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I asociada a crioglobulinemia mixta. La forma más frecuente de presentación es la aparición de proteinuria asociada a hematuria microscópica junto a un grado variable de afectación de la función renal.

1.6 Modificaciones metabólicas relacionadas con el tratamiento con antivirales de acción directa

Como se ha descrito previamente, el tratamiento del VHC se encuentra hoy en día muy al alcance de la inmensa mayoría de los pacientes. No obstante, la relación del VHC con el metabolismo lipídico no termina con su erradicación.

El propio tratamiento con los AAD y la curación del virus origina nuevos cambios en el metabolismo lipídico, que han sido ampliamente estudiados, pero sobre los que aún existen importantes lagunas de conocimiento.

Lo más establecido es que se produce un aumento del colesterol total sérico y de los niveles de colesterol-LDL (146), lo cual crea una combinación de circunstancias que puede agravar el riesgo de lesiones por aterosclerosis.

No obstante, los resultados de los diferentes estudios que han evaluado estos cambios son en ocasiones contradictorios. Algunos muestran aumentos en los niveles de colesterol-HDL (147-149), que sin embargo no se han observado en otros estudios (150-152). Incluso hay un estudio que mostró un descenso en los niveles séricos de HDL (153).

En cuanto a las modificaciones en los TG, también se han reportado resultados incongruentes, con cambios mínimos o ausentes en algunos trabajos (149, 154) mientras que otros lo que muestran es un descenso en los niveles séricos (146, 155, 156) o incluso un aumento (157, 158).

Estos resultados contradictorios pueden explicarse por la heterogeneidad de los trabajos en los que se basan. Se han realizado en poblaciones genotípicas dispares y con diferentes regímenes de tratamiento, algunos asociados a ribavirina (146, 149, 153, 159) e incluso a interferón (153), con distintos esquemas de tratamiento y con diferentes proporciones de pacientes con cirrosis hepática, desde el 25% (153) hasta el 80% (159). Alguno también incluía pacientes coinfectados por VIH, con una población VIH positiva de hasta el 60% (150). Por último, los tiempos de seguimiento también son muy variables entre los diferentes trabajos, oscilando entre las 4 (147) y las 48 semanas (149, 154, 160, 161). No obstante, sólo dos estudios presentan un seguimiento prospectivo a largo plazo, el de Shimizu (211) y el de González-Colominas (204). Sin embargo, estos dos estudios presentan poblaciones con una afectación hepática que va más allá de la simple infección por el VHC. El estudio de González Colominas tiene un 50% de pacientes con

cirrosis hepática, mientras que todos los pacientes del estudio de Shimizu presentaban esteatosis hepática. Los resultados de los principales estudios pueden observarse resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales estudios sobre VHC, AAD y perfil lipídico

Estudio	Año	N	Tipo	Seguimiento	Fármaco	Genotipo	Cirrosis	Colesterol Total	HDL	LDL	TG	Otros
Chida T(147)	2018	70	Retrospectivo	4 semanas	DCL+ASV	1b	NC	Aumenta	Aumenta	Aumenta	NC	
Endo(148)	2014-2016	276	Retrospectivo	24 semanas	DCV+ASV SOF+LDV SOF/LDV	1b	NC	Aumenta	Aumenta	Aumenta	NC	
Inoue(149)	2018	216	Prospectivo post Hoc	48 semanas	DCV+ASV SOF/RBV	1b y 2	NC	Aumenta	Aumenta	SC	Estable	
Meissner(162)	2015	54	Retrospectivo	24 semanas	SOF/RBV	1	NC	NC	NC	Aumenta	Descenso	
Chaudhury(163)	2011-2017	251	Prospectivo Ad hoc	28 meses	NC	1	NC	NC	NC	Aumento	Descenso	30% VIH
Sun(151)	2018	24	Prospectivo	NC	EBV/GPV LDV/SOF	1	NC	Aumento	NC	NC	Descenso	
Satoru	2013-2015	100	Retrospectivo	4 semanas	DCV/ASV LDV/SOF	1	70%	Nc	NC	Aumento	NC	
Townsend(164)	2016	90	Prospectivo post Hoc	24 semanas	LDV/SOF SOF/LDV	1	NC	NC	NC	Aumento	NC	60% VIH
Morales(153)	2014-2016	52	Retrospectivo	6 meses	SOF IFN LDV SPV/RBV	Todos	24%	Aumento	Descenso	Aumento	Descenso	
Beig(160)	1998-2016	132	Retrospectivo	48 semanas	DAA sin IFN	Todos	No	Aumento	NC	Aumento	NC	Trasplantados
Carvalho(165)	2018	178	Prospectivo	NC	DAA sin IFN ni RBV	Todos	NC	Aumento	NC	Aumento	Descenso	
Gitto(159)	2015	100	Prospectivo	24 semanas	DAA con RBV sin IFN	Todos	80%	Aumento	NC	NC	NC	
Mauss(166)	2017	520	Prospectivo	NC	DAA	Todos	NC	Aumento	NC	Aumento	Estable	
El Sagheer(167)	2018	80	Retrospectivo		SIM/SOF	4	>50%	Aumento	Aumento	Aumento	Descenso	
Gonzalez Colominas(154)	2019	226	Prospectivo	48 semanas	DAA	Todos	50%	Aumento	Aumento	aumento	NC	
Juanbeltz	2015	227	Retrospectivo	12 semanas	DAA y RBV	Todos	NC	Aumento	Aumento	NC	NC	
Doyle(168)	2015-2016	24	Prospectivo	24 semanas	Ombitasvir Dasabuvir	Todos	NC	Aumento	Aumento	NC	Aumento	Excluidos hipolipemiantes. Miden APOA, APOB y APOE, HOMA-IR
Ichikawa(169)	2014-2016	39	Prospectivo	24 semanas	Daclatasvir Asunaprevir	1b	NC	Aumento	No aumento	Aumento	No aumento	
Shimizu(170)	2012-2016	70	Retrospectivo	48 semanas	Todos	1 y 2	NC	No cambio	Aumento	Aumento	No cambios	Todos con esteatosis
Cheng(171)	2017	102	Prospectivo	12 semanas	Todos	Todos (1b 80%)	75%	Aumento	No cambios	Aumento	Aumento	Glucemia sin cambios
Jain(172)	2017	50	Prospectivo	12 semanas	SOF Daclatasvir	NC	NC	Aumento	Sin cambios	Aumento	Sin cambios	
Petta(173)	2018	182	Prospectivo	48 semanas	Todos	Todos	66%	Aumento	NC	NC	NC	20% DM, 15% obesos, 42% HTA y 35% fumadores. Todos fibrosis avanzada

Las principales dudas existentes respecto a las modificaciones lipídicas tras el tratamiento con AAD, son la persistencia en el tiempo de los cambios observados en las etapas iniciales y qué ocurre en los pacientes con estadios iniciales de su hepatopatía, dado que es con diferencia el grupo de población menos estudiado.

1.7 Valoración del perfil de lipoproteínas más allá de la concentración sérica de colesterol

La enfermedad CV es la principal causa de mortalidad en Europa y también una importante causa de morbilidad. Por ello, su prevención, tanto primaria como secundaria, es una estrategia fundamental para reducir el impacto y las consecuencias de la enfermedad CV de origen aterotrombótico (174).

La dislipemia es una alteración cuantitativa o cualitativa de las lipoproteínas circulantes en el plasma, destacando el aumento de la concentración de colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (colesterol-LDL). Sin embargo, se siguen observando episodios de patología aterotrombótica en pacientes que presentan niveles de colesterol normales o de bajo riesgo CV (175-177).

Esto sugiere que hay otras alteraciones lipídicas, más allá de los niveles de colesterol LDL, que también aumentan el riesgo CV. Esto sugiere que las características, y no sólo la cantidad, de las propias partículas lipoproteicas definen su potencial aterogénico(178). Por ello, el análisis del número, el tamaño y la composición de las lipoproteínas complementa la valoración del perfil lipídico de los pacientes.

Como ya se ha explicado previamente, las partículas lipoproteicas se diferencian unas de otras por su contenido en colesterol libre y TG. La diferente proporción entre lípidos y proteínas les confiere distinta densidad y permite establecer su clasificación. La relación entre densidad y tamaño es inversa, siendo las partículas más pequeñas las de mayor densidad. A su vez, las diferentes clases pueden dividirse en subclases.

Estas diferencias en la composición de una misma clase de partículas (por ejemplo, las diferentes subclases de LDL) influyen en el proceso aterosclerótico. El endotelio vascular sano puede ser atravesado libremente por partículas con diámetros inferiores a los 70nm. Estas partículas pueden quedar retenidas, en especial las LDL de menor tamaño, siendo el origen del proceso aterogénico (179, 180).

También se ha observado que las partículas HDL pueden sufrir modificaciones que cambien su estructura y composición, y con ello alteren su función. Por ejemplo, en patologías como la diabetes, la enfermedad renal crónica, la sarcoidosis o en procesos inflamatorios, las partículas HDL pierden su función protectora y adquieren un efecto aterogénico (181).

El tamaño de las lipoproteínas LDL es variable y depende del contenido en lípidos presente en su núcleo, condicionando a su vez la densidad de las partículas. Esta variabilidad, sobre la que pueden incidir diversas alteraciones del metabolismo lipoproteico, puede provocar una discrepancia entre la concentración sérica de colesterol LDL y el número de partículas LDL circulantes. De esta manera, un número elevado de partículas LDL puede asociarse a una concentración de colesterol LDL normal. Esta situación se conoce como discordancia c-LDL:p-LDL (182-184). En estos casos, diferentes estudios han observado que la medición del número de partículas es mejor indicador que la concentración de LDL para evaluar el riesgo CV(182, 185, 186).

La capacidad pronóstica del número de partículas LDL se ha evaluado en diferentes estudios (186-189). Por ejemplo, en la cohorte de Framingham se demostró que una concentración de partículas LDL por debajo del percentil 25 era un predictor de riesgo CV más fiable que un nivel equivalente de concentración sérica de colesterol LDL (188). Incluso se han realizado estudios que han demostrado que el tratamiento basado en objetivos de número de partículas LDL mejora los resultados clínicos por encima del basado en la concentración de colesterol LDL (187, 190, 191).

1.7.1 Espectroscopia de RMN en dos dimensiones para la medición de lipopartículas

Existen diferentes técnicas de medición del número y tamaño de las lipopartículas muy conocidas como: la ultracentrifugación con gradiente de densidad, la cromatografía líquida de alta resolución en gel, los métodos electroforéticos o el análisis de movilidad iónica.

Otra de las técnicas desarrolladas y utilizadas es la resonancia magnética nuclear (RMN). La base de su utilización es que el colesterol esterificado y los TG que se transportan en el núcleo de las lipoproteínas contienen como parte de su estructura grupos metilol que, al ser sometidos a pulsos de radiofrecuencia, resuenan a frecuencias levemente diferentes en función del tamaño de la lipoproteína que los transporta. A menor tamaño de la lipoproteína, más baja es la frecuencia de resonancia de los lípidos de su núcleo (192).

Recientemente se ha desarrollado en España un nuevo sistema de medición, denominado Liposcale®. Esta prueba está basada en la espectroscopia de RMN de dos dimensiones, analizando la atenuación de las señales de los picos lipídicos cuando estos son sometidos a un gradiente de campo magnético previamente establecido. La diferencia en la atenuación se asocia a una difusión de las partículas lipoproteicas diferencial (Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy DOSY-RMN). A partir de los coeficientes de difusión se puede calcular directamente el tamaño de las diferentes subclases de lipoproteínas, dividiendo el volumen espacial de las moléculas de lípidos totales por el volumen medio (181, 192).

El espectro generado por Liposcale® aporta información acerca del número y tamaño de las partículas lipoproteicas VLDL, LDL y HDL y de tres subfracciones de cada una de ellas. Adicionalmente permite determinar el contenido de colesterol y de TG totales en cada tipo de lipoproteína.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Realmente, mañana será otro día

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Esta descrita en la literatura la interacción entre el VHC y el metabolismo del huésped a diferentes niveles. No obstante, los cambios tras el tratamiento y en especial su comportamiento a largo plazo han sido menos evaluados.

Por ello planteamos este trabajo desde la hipótesis de que *El tratamiento con antivirales de acción directa contra el virus de la hepatitis C produce cambios en el metabolismo de lípidos, hidratos de carbono, hierro y vitamina B12, persistentes en el tiempo. Adicionalmente, la curación del VHC puede producir modificaciones en las características de las lipopartículas, que podrían explicar, al menos en parte, las modificaciones metabólicas citadas anteriormente.*

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Vamos, alégame el día

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Las alteraciones que tienen lugar en el metabolismo del huésped relacionadas con la infección con el VHC son amplias, variadas y afectan a múltiples niveles del huésped. Como se ha descrito previamente, algunas de las vías más importantes que se ven afectadas son los lípidos, los hidratos de carbono o el hierro.

El conocimiento disponible hasta el momento es fragmentado. Los diferentes estudios han evaluado cada uno una pequeña parte de un todo y la heterogeneidad es la nota predominante en este campo de trabajo.

Por ello en este trabajo se plantea un estudio prospectivo, con una población bien delimitada, y con un seguimiento a largo plazo, evaluando periódicamente la situación del metabolismo de los pacientes que permita describir no solamente que cambios se producen, sino cuándo tienen lugar y durante cuánto tiempo se mantienen dichos cambios.

Además, buscamos analizar en conjunto todos los parámetros previamente descritos, para hacer una valoración integral de los cambios metabólicos que tienen lugar tras la erradicación del VHC y evaluar cómo afectan a los distintos parámetros de interés.

4. OBJETIVOS

No pienses, siente, usa tu instinto

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal:

- Analizar las modificaciones en el perfil lipídico de los pacientes infectados por el VHC tras el tratamiento con AAD evaluado durante un año de seguimiento.

4.2 Objetivos secundarios:

- Analizar las modificaciones en el perfil de hidratos de carbono, el metabolismo férrico y la cianocobalamina evaluado durante un año de seguimiento.
- Analizar posibles factores que condicionen los cambios metabólicos en los pacientes con VHC y tratamiento con AAD, con especial atención a los factores de riesgo CV y al grado de fibrosis hepática.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio: Para la realización de este trabajo diseñamos un estudio unicéntrico, prospectivo, longitudinal, observacional, antes-después en el que cada paciente es su propio control.

5.2 Población del estudio:

5.2.1 Pacientes: Los pacientes se reclutaron en las consultas externas de Hepatología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, de manera consecutiva. Todos eran pacientes que habían sido derivados a dichas consultas para iniciar un tratamiento con AAD libre de interferón entre diciembre de 2017 y junio de 2019. Los cuatro regímenes de tratamiento posibles eran Sofosbuvir/Velpatasvir, Ledipasvir/Sofosbuvir, Glecaprevir/Pibrentasvir y Elbasvir/Grazoprevir tal y como se recoge en las guías clínicas vigentes durante la realización del estudio. La elección del tratamiento dependió de su médico responsable, según práctica clínica de acuerdo con las guías clínicas de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

5.2.2 Criterios de inclusión y exclusión:

5.2.2.1 Criterios de inclusión:

- Sujetos de ambos sexos con diagnóstico serológico de VHC con carga viral detectable, mayores de 18 años, que no cumplieran ningún criterio de exclusión.

5.2.2.2 Criterios de exclusión:

- Haber recibido tratamiento previo para el VHC
- Incapacidad psíquica o intelectual para cumplir adecuadamente el seguimiento
- Presentar coinfección por el VIH o el VHB, diagnosticada serológicamente
- Embarazo
- Neoplasia activa

- Tratamiento con neurolépticos
- Estar recibiendo tratamiento hipolipemiante, con insulina o con fibratos en el mes previo al reclutamiento.
- Consumo abusivo de alcohol (>40g/día para hombres y >25g/día para mujeres y/o >28 unidades básicas de alcohol para hombres y >17 unidades a la semana para las mujeres y/o ≥ 6 unidades por ocasión para hombres y ≥ 4 unidades por ocasión para mujeres)(193).
- Enfermedad hepática concomitante: colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Wilson, hepatitis autoinmune, etc.

5.3 Métodos:

5.3.1 Recogida y registro de la información: La recogida de la información se realizó de manera estandarizada utilizando una hoja de recogida de datos diseñada específicamente para el estudio. A cada paciente se le asignó un código numérico de identificación para preservar el anonimato de los datos. Dichos datos se almacenaron en una base única de tipo Access para su posterior análisis.

5.3.2 Variables del estudio:

Las principales variables recogidas en el estudio fueron las siguientes:

- Variables demográficas: A todos los pacientes reclutados se les realizó una entrevista clínica durante la primera visita, previamente a iniciar el tratamiento antiviral. Se recogió información sobre los datos demográficos (edad, sexo, fecha de nacimiento), hábitos tóxicos (tabaco, alcohol y otras drogas), consumo de fármacos (principalmente hipolipemiantes, fibratos, neurolépticos, antidiabéticos, hierro oral, vitamina B12 oral y ácido fólico)

- Variables relacionadas con la infección por VHC: Se analizó el genotipo y subtipo viral, así como la carga viral.
- Variables relacionadas con la afectación hepática: en todos los pacientes se valoró la morfología hepática mediante ecografía abdominal y el grado de fibrosis hepática mediante elastografía de transición (FibroScan® 430 Mini, Echosens, Francia). Para que una medida de elastografía fuera considerada válida debía tener un rango intercuartílico inferior al 30% del valor y un porcentaje de mediciones válidas superior al 60%.
- La cirrosis hepática se ha definido como combinación de evidencias clínicas y/o radiológicas de cirrosis hepática y/o una biopsia hepática con un grado de fibrosis 4 en la clasificación de Metavir.
- Variables analíticas relacionadas con el metabolismo lipídico: Se analizaron los niveles de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol no-HDL, ratio colesterol LDL/HDL, APOA, APOB, APOE y TG.
- Variables relacionadas con el metabolismo férrico: Se evaluaron los niveles de hierro sérico, ferritina, índice de saturación de transferrina.
- Variables relacionadas con el metabolismo de la vitamina B12: se midieron los niveles de cianocobalamina en sangre, ácido fólico y homocisteína.
- Variables hematológicas relacionadas con el metabolismo férrico y de la vitamina B12: se cuantificaron los niveles de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito, el volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media y el ancho de distribución eritrocitario.
- Valores relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono: se evaluaron la glucosa en sangre, la hemoglobina glicosilada y la insulina sérica.
- Durante el seguimiento prospectivo se valoraron, al año y a los dos años del reclutamiento, los diagnósticos de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, DM-2 y

déficit de B12. También se evaluó el inicio de tratamiento farmacológico para cualquiera de estas patologías. Igualmente se tuvo en cuenta la aparición de eventos cardiovasculares (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular y/o vasculopatía periférica), el posible exitus del paciente y las causas de este.

5.3.3 Obtención de la muestra sanguínea:

Tras la primera visita y la entrevista clínica tras haber firmado el paciente el consentimiento informado correspondiente, se procedió a la extracción sanguínea. Esta se llevó a cabo mediante venopunción en la unidad de extracciones de Sangre del Hospital Miguel Servet, de acuerdo con los protocolos habituales. Todos los pacientes permanecieron en ayunas durante al menos 8 horas previamente a la extracción.

5.3.4 Análisis de laboratorio:

Se aplicaron procedimientos operativos estándar para garantizar una recogida y un procesamiento idénticos de todas las muestras de sangre en ayunas. Las determinaciones de TG plasmáticos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, APOA, APOB, glucosa e insulina se realizaron en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, España) utilizando analizadores de última generación. Todas las determinaciones cumplieron los requisitos de calidad y competencia (ISO 15189:2012) para laboratorios médicos. La resistencia a la insulina se calculó basándose en la evaluación del modelo homeostático (HOMA) mediante la ecuación: $\text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa en ayunas (mmol/litro)} / 22.5$ (194).

Se utilizó una prueba turbidimétrica para la medición de APOE en plasma (ref#93014, Spinreact) según las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en el autoanalizador DXC 700AU (Beckman Coulter).

5.3.5 Genotipado y carga viral:

La carga viral del VHC y el genotipo se caracterizaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza) utilizando los test Cobas 6800® de carga viral y Cobas 4800 para genotipado (Roche).

5.3.6 Análisis de lipopartículas mediante DOSY-RM:

Se utilizó la prueba Liposcale®(192), basada en la espectroscopia de RMN en dos dimensiones. Esta técnica se basa en la espectroscopia de RMN de dos dimensiones, analizando la atenuación de las señales de los picos lipídicos cuando se someten a un gradiente de campo magnético establecido previamente. La diferencia en la atenuación se asocia a una difusión de las partículas lipoproteicas diferencial (Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy DOSY-RMN). A partir de los coeficientes de difusión se calcula de manera directa el tamaño de las diferentes subclases de lipoproteínas, dividiendo el volumen espacial de las moléculas de lípidos totales por el volumen medio (181 192). El procedimiento puede verse de manera más extensa en el Anexo 2.

El espectro generado por Liposcale® aporta información acerca del número y tamaño de las partículas lipoproteicas VLDL, LDL y HDL y de tres subfracciones de cada una de ellas. Adicionalmente permite determinar el contenido de colesterol y de TG totales en cada tipo de lipoproteína.

En dicho análisis se obtuvo información del número y tamaño medio de tres fracciones de partículas (VLDL, LDL y HDL), subdividiendo cada fracción en tres subfracciones (partículas grandes, medianas y pequeñas). También se determinó la concentración de TG y colesterol de las diferentes clases de lipoproteínas. Para el análisis de lipopartículas mediante DOSY-RM se seleccionaron 83 pacientes de la muestra total, apareados por sexo 1:1. Las determinaciones se realizaron en las instalaciones de Biosfer Teslab (Reus).

5.3.7 Análisis de lipopartículas mediante Cromatografía

Para realizar una segunda caracterización basal del perfil de lipoproteínas se utilizó un análisis mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con una columna de exclusión molecular Superose 6 HR10/30 (GE Healthcare). Para ello se usaron muestras combinadas (n=2-3) en un volumen final de 100µL. De manera combinada con esta técnica se realizó una determinación secuencial de la carga viral y de APOE en cada una de las fracciones recogidas.

5.3.8 Genotipado de APOE:

Se genotipó a los individuos para los polimorfismos que definen los alelos *e2* y *e4* (195). Se aisló el ADN y se genotipó utilizando una mezcla de kits de genotipado TaqMan SNP: C_3084793_20 (rs429358) y C_904973_10 (rs7412) (ThermoFisher). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher), utilizando el software SDS 2.4. Finalmente, los pacientes fueron caracterizados como E2 (*e2/e2* o *e2/e3*), E3 (*e3/e3*, genotipo wild type) o E4 (*e3/e4* o *e4/e4*). Aquellos con resultado *e2/e4* fueron eliminados del análisis final.

5.4 Desarrollo del estudio:

Basalmente se recogieron los datos clínicos y demográficos. Se realizó una primera analítica basal previa al inicio del tratamiento, donde también se analizó el genotipo y la carga viral. La evaluación de la fibrosis hepática se llevó a cabo, antes de comenzar tratamiento, mediante elastografía de transición con FibroScan®.

La respuesta viral se comprobó al finalizar el tratamiento y a las 12 semanas (RVS).

Se recogieron muestras de sangre para los análisis descritos en 5.3.4 de todos los pacientes incluidos en el estudio antes y después de los tratamientos (8 ó 12 semanas en función del régimen de AAD utilizado), así como en RVS12 y en RVS48.

Para el análisis de lipopartículas se evaluaron las muestras en el momento basal, tras completar el tratamiento y en RVS48.

La cohorte se siguió de manera prospectiva durante 2 años. Durante el seguimiento se evaluó la aparición de eventos cardiovasculares (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular agudo y aparición de vasculopatía periférica), así como el inicio de tratamiento farmacológico contra la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia y/o la DM. Se utilizó además la cohorte Sanitas Data4Good (<https://landing.sanitasweb.es/data/opendatacovid/>) para investigar la prevalencia de este tipo de medicaciones en otra cohorte de población española.

5.5 Tamaño de la muestra y potencia estadística

Asumiendo un valor alfa de 0.05 y un efecto bilateral, con una potencia de al menos el 80% para detectar una variación longitudinal de 15 mg/dl en los TG plasmáticos, se calculó un tamaño muestral de 83 pacientes.

5.6 Análisis estadístico:

Las variables descriptivas cuantitativas se expresaron en forma de media e intervalo de confianza de la media al 95% o como media y rango intercuartílico. Las variables cualitativas se expresaron como porcentaje. La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk. El test de la t de Student se utilizó para las distribuciones normales y la u de Mann-Whitney para los datos no normales. Para la evaluación de correlaciones se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para la evaluación longitudinal se realizó un análisis por intención de tratar, dado que algunos pacientes no completaron el seguimiento de acuerdo con el protocolo del estudio. Todos los pacientes que iniciaron el tratamiento con AAD fueron incluidos en el análisis, independientemente de las posibles pérdidas de seguimiento acontecidas antes de la finalización del estudio.

Los datos fueron modelados utilizando para ello modelos lineales mixtos (MLM) para 1) tener en consideración la medición repetida de cada variable a lo largo del seguimiento y 2) valorar el efecto de las covariables en la modificación de las variables a lo largo del tiempo. Estos MLM fueron a su vez ajustados por edad y por uso de inhibidores de la proteasa dentro del régimen de AAD. A partir de estos modelos se han obtenido diferentes valores de p , que representan la variación a lo largo del tiempo de cada variable para la cohorte entera (p_{long}), las diferencias según sexo (p_{sex}) y los cambios longitudinales específicamente debidos al sexo (la interacción entre los modelos longitudinales y el sexo; $p_{long-sex}$).

El nivel de significación se ha establecido para un p valor inferior a 0.05. Todos los análisis se han realizado utilizando el paquete estadístico R (v. 4.1.2; R Core Team 2021) y los paquetes apropiados.

5.7 Consideraciones éticas:

Todos los pacientes incluidos en el estudio otorgaron el correspondiente consentimiento informado escrito previamente a su inclusión en el mismo. Este estudio ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA) con el código de estudio PI17/0390.

6. RESULTADOS

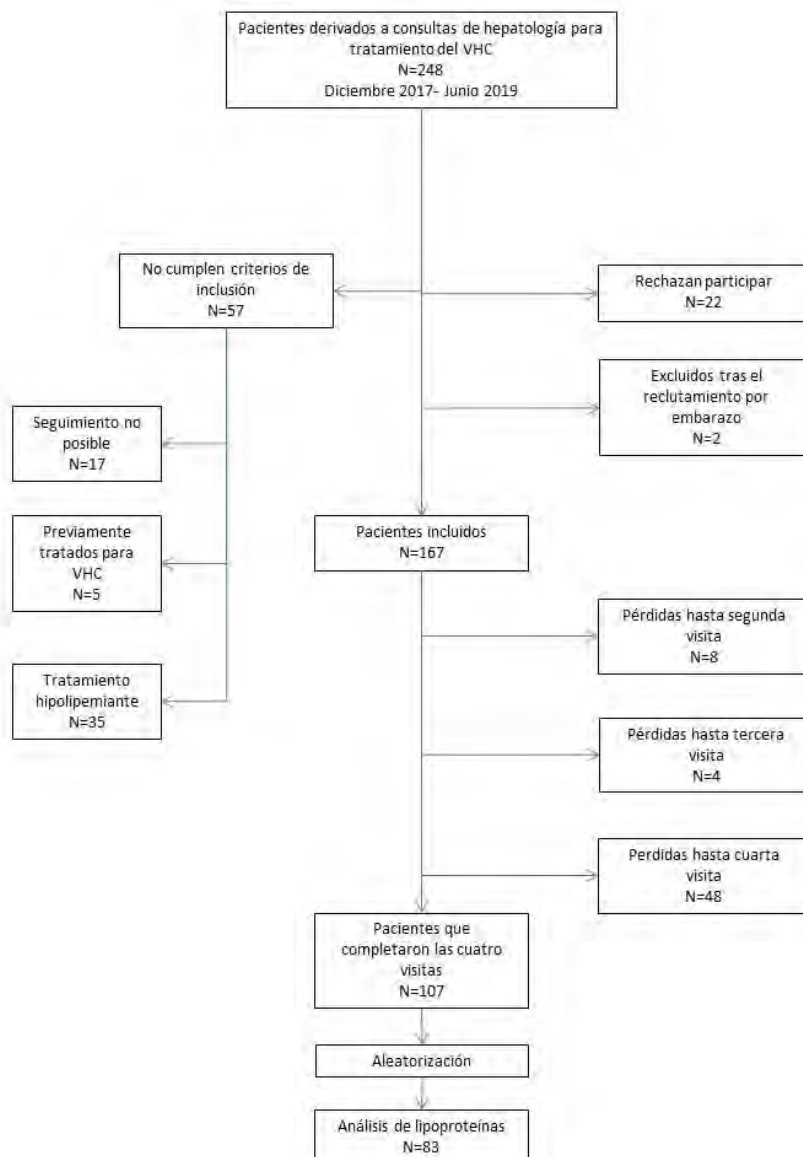
- *Te quiero. -Lo se*

6. RESULTADOS

6.1 Características de la cohorte:

Entre diciembre de 2017 y junio de 2019, 248 pacientes recibieron tratamiento con AAD por infección crónica por VHC. De estos, un total de 167 cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, y aceptaron participar en el estudio. El flujograma completo puede verse en la Figura 3.

Figura 3. Flujograma de inclusión de pacientes



Todos los pacientes eran naive al tratamiento con AAD. El rango de edad de los pacientes tratados fue de 21 a 88 años, siendo las mujeres levemente más mayores que los hombres (57.3 vs 53.3 años; $p=0.039$).

En cuanto a los antecedentes personales, solamente 2 pacientes (1.20%) presentaban antecedentes de eventos cardiovasculares. Valorando los factores de riesgo cardiovasculares, 51 pacientes (30.5%) presentaban al menos un factor de riesgo, siendo el más prevalente la hipertensión arterial (22.2%), seguido por la diabetes (4.19%). Solo un 18% de los pacientes presentaban tabaquismo activo en el momento del tratamiento, por un 13.8% que consumían alcohol.

Respecto a los antecedentes familiares, la mayoría de los pacientes (73.1%) no presentaban ningún antecedente familiar de eventos cardiovasculares. En cuanto a los que sí los presentaban, el más prevalente fue la cardiopatía isquémica (18%) seguida de la vasculopatía periférica (7.78%).

Teniendo en cuenta la situación de la enfermedad hepática, más de la mitad de los pacientes presentaban un bajo grado de fibrosis (F0-F1) y solamente 16 (9.6%) presentaban cirrosis hepática. De estos 16 pacientes, 7 (4.19%) presentaban hipertensión portal y solamente 1 (0.6%) presentaba ascitis.

Todas las características clínicas de la cohorte pueden verse en la Tabla 3.

Tabla 3. Situación clínica y antecedentes de los pacientes

Variable	Todos N=167	Hombres N=88	Mujeres N=79	P valor
Edad	55.2 (12.4)	53.3 (10.8)	57.3 (13.6)	0.039
Antecedentes personales de eventos CV	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	1.000
Accidente cerebrovascular	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	1.000
Cardiopatía isquémica	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1.000
Vasculopatía periférica	1 (0.60%)	1 (1.14%)	0 (0.00%)	1.000
Antecedentes familiares de eventos CV				0.091
Ninguno	122 (73.1%)	69 (78.4%)	53 (67.1%)	
Accidente cerebrovascular	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	
Cardiopatía isquémica	30 (18.0%)	10 (11.4%)	20 (25.3%)	
Vasculopatía periférica	13 (7.78%)	8 (9.09%)	5 (6.33%)	
Factores riesgo CV	51 (30.5%)	26 (29.5%)	25 (31.6%)	0.900
Hipertensión arterial	37 (22.2%)	19 (21.6%)	18 (22.8%)	1.000
DM	7 (4.19%)	5 (5.68%)	2 (2.53%)	0.448
Tabaquismo				0.077
No fumador	84 (50.3%)	37 (42.0%)	47 (59.5%)	
Exfumador	30 (18.0%)	19 (21.6%)	11 (13.9%)	
Fumador	53 (31.7%)	32 (36.4%)	21 (26.6%)	
Consumo de alcohol	23 (13.8%)	16 (18.2%)	7 (8.86%)	0.128
Índice de masa corporal	25.0 [22.6;27.1]	25.0 [23.4;27.1]	24.9 [22.0;27.3]	0.748
Perímetro abdominal	92.3 (11.2)	93.3 (10.1)	91.3 (12.3)	0.446

Fibrosis hepática (kPa)	6.60 [5.40;10.2]	7.00 [5.50;11.3]	6.35 [5.15;8.80]	0.141
Fibrosis hepática (Elastografía)				0.384
F1	87 (53.4%)	41 (48.2%)	46 (59.0%)	
F2	26 (16.0%)	13 (15.3%)	13 (16.7%)	
F3	27 (16.6%)	16 (18.8%)	11 (14.1%)	
F4	23 (14.1%)	15 (17.6%)	8 (10.3%)	
Cirrosis hepática				0.670
No	151 (90.4%)	79 (89.8%)	72 (91.1%)	
Sí, sin HTP	9 (5.39%)	6 (6.82%)	3 (3.80%)	
Sí, con HTP	7 (4.19%)	3 (3.41%)	4 (5.06%)	
Varices esofágicas	7 (4.19%)	3 (3.41%)	3 (3.80%)	1.000
Ascitis	1 (0.60%)	1 (1.14%)	0 (0.00%)	1.000

CV: Cardiovascular; HTP: Hipertensión Portal; DM: Diabetes Mellitus

Las variables continuas se representan mediante la media (desviación estándar) o la mediana [rango intercuartílico]. Las variables categóricas están descritas mediante el número de casos (porcentaje)

El genotipo más frecuente fue el 1b, presente en el 37.6% de los pacientes, seguido del 1a (30.3%) y del 4 (12.7%). Los tratamientos AAD más utilizados fueron Sofosbuvir/Velpatasvir (39.5%) y Glecaprevir/Pibrentasvir (38.9%). El 100% de las determinaciones de carga viral a 12 semanas tras el tratamiento fueron indetectables. Todos los datos relacionados con la infección por VHC y su tratamiento pueden verse en la tabla 4.

Tabla 4. Situación basal de los pacientes en relación con la infección por VHC

Variable	Todos N=167	Hombres N=88	Mujeres N=79	P valor
Tratamiento AAD				0.909
Sofosbuvir/Velpatasvir	66 (39.5%)	36 (40.9%)	30 (38.0%)	
Ledipasvir/Sofosbuvir	6 (3.59%)	3 (3.41%)	3 (3.80%)	
Glecaprevir/Pibrentasvir	65 (38.9%)	35 (39.8%)	30 (38.0%)	
Elbasvir/Grazoprevir	30 (18.0%)	14 (15.9%)	16 (20.3%)	
Duración del tratamiento				0.848
12 semanas	96 (57.8%)	52 (59.1%)	44 (56.4%)	
8 semanas	70 (42.2%)	36 (40.9%)	34 (43.6%)	
Genotipo viral				0.352
1	5 (3.03%)	4 (4.65%)	1 (1.27%)	
1a	50 (30.3%)	29 (33.7%)	21 (26.6%)	
1b	62 (37.6%)	31 (36.0%)	31 (39.2%)	
2	4 (2.42%)	1 (1.16%)	3 (3.80%)	
2a/c	2 (1.21%)	0 (0.00%)	2 (2.53%)	
3	16 (9.70%)	8 (9.30%)	8 (10.1%)	
3a	2 (1.21%)	0 (0.00%)	2 (2.53%)	
4	21 (12.7%)	10 (11.6%)	11 (13.9%)	
4c/d	2 (1.21%)	2 (2.33%)	0 (0.00%)	
5	1 (0.61%)	1 (1.16%)	0 (0.00%)	
Carga viral (log)	6.05 [5.36;6.54]	6.11 [5.62;6.53]	5.89 [5.16;6.55]	0.199

Los datos están descritos mediante la mediana [rango intercuartílico] y el número de casos (porcentaje)

6.2 Cambios longitudinales hepáticos:

En el seguimiento a un año se observó una reducción global en el valor total de bilirrubina ($p_{\text{long}} < 0.001$). Sin embargo, se evidenció un efecto sexo-específico, dado que en los hombres se observó una disminución de aproximadamente un 20%, mientras que la observada en las mujeres apenas alcanzó el 5% ($p_{\text{long-sex}} = 0.032$). También se vio un incremento en los valores de albúmina y pre-albúmina durante el seguimiento (ambas $p_{\text{long}} < 0.001$). De nuevo, se ha identificado un efecto sexo-específico, dado que el aumento en varones fue de cerca del 25%, mientras que el experimentado por las mujeres solo alcanzó el 5% ($p_{\text{long-sex}} = 0.002$).

Los valores de las enzimas hepáticas mejoraron significativamente desde el momento basal hasta la RVS48 independientemente del sexo. La fosfatasa alcalina disminuyó de manera constante a lo largo del seguimiento ($p_{\text{long}} < 0.001$) mientras que se observamos un abrupto descenso para llegar a una tercera parte del valor basal en los valores de GGT, ALT y AST ($p_{\text{long}} < 0.001$ en los tres casos). Este descenso tuvo lugar principalmente durante el periodo de tratamiento con los AAD.

Esta modificación se ha visto acompañada paralelamente con una reducción en los índices no invasivos de medición de fibrosis hepática (APRI y FIB-4), que también presentaron una pronta mejoría (ambos $p_{\text{long}} < 0.001$) que persistió durante el tratamiento.

Todos estos cambios relacionados con el metabolismo y la función hepática pueden verse en la Tabla 5.

Tabla 5. Cambios longitudinales en función del sexo de los parámetros relacionados con la función y el daño hepático

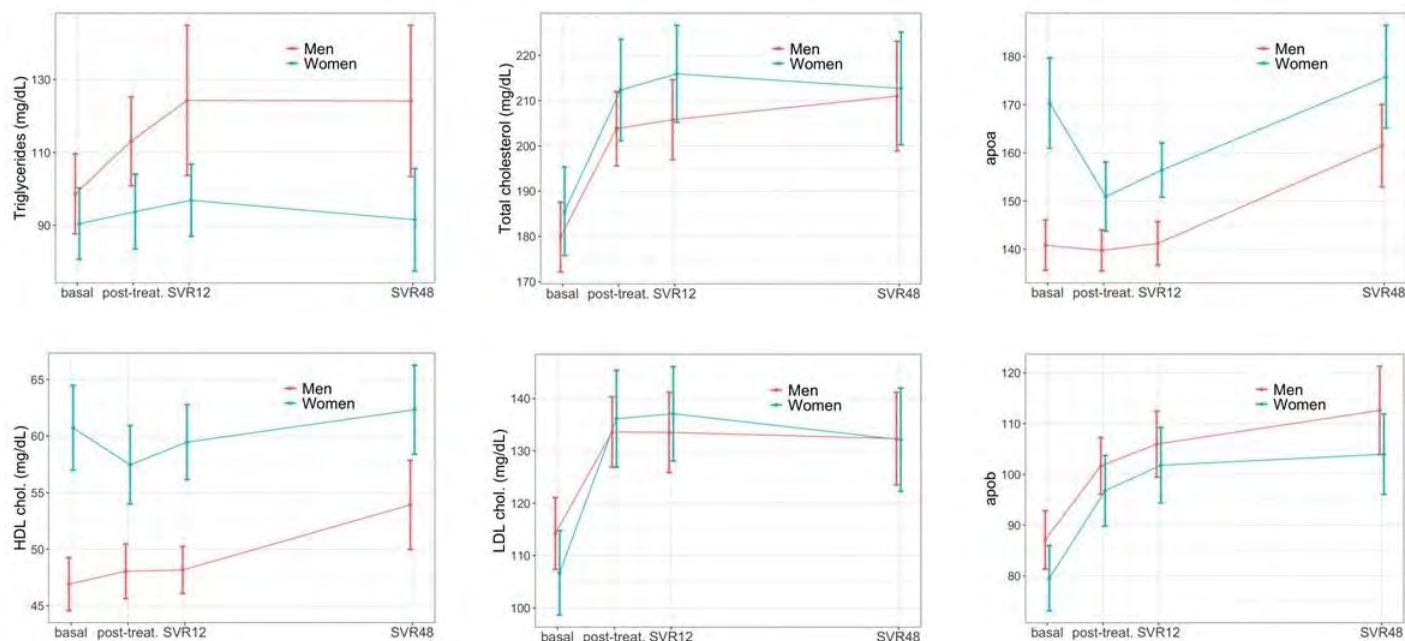
Variable	Hombres				Mujeres				plong	psex	plong*sex
	Basal	post-T	RVS12	RVS48	Basal2	post-T3	RVS124	RVS48			
	N=87	N=81	N=80	N=51	N=79	N=78	N=75	N=56			
Bilirrubina (mg/dL)	0.74 [0.68;0.79]	0.65 [0.59;0.70]	0.63 [0.58;0.69]	0.60 [0.53;0.67]	0.65 [0.58;0.73]	0.59 [0.54;0.65]	0.58 [0.52;0.65]	0.62 [0.54;0.71]	<0.001	0.006	0.032
Albúmina (g/dL)	4.25 [4.17;4.32]	4.28 [4.21;4.35]	4.34 [4.28;4.41]	4.34 [4.22;4.46]	4.11 [4.04;4.18]	4.12 [4.06;4.18]	4.17 [4.10;4.23]	4.26 [4.19;4.34]	<0.001	0.002	0.611
Pre-albúmina (mg/dL)	22.3 [21.0;23.7]	26.2 [24.7;27.6]	27.1 [25.7;28.5]	28.1 [26.0;30.1]	18.4 [17.2;19.7]	20.4 [19.3;21.5]	21.7 [20.6;22.9]	22.0 [20.5;23.5]	<0.001	<0.001	0.002
Fosfatasa alcalina (U/L)	84.7 [79.7;89.6]	85.0 [79.7;90.4]	82.3 [77.3;87.3]	79.2 [74.2;84.2]	93.0 [85.9;100]	91.5 [84.8;98.2]	88.8 [81.8;95.8]	89.8 [82.2;97.4]	<0.001	0.175	0.523
GGT (U/L)	91.9 [66.6;117]	29.1 [24.1;34.2]	30.5 [24.9;36.2]	36.4 [27.0;45.7]	60.3 [46.5;74.1]	26.3 [20.0;32.6]	25.8 [20.9;30.7]	23.9 [19.7;28.2]	<0.001	0.023	0.255
AST (U/L)	63.0 [51.7;74.3]	26.9 [24.3;29.4]	26.1 [23.7;28.4]	27.2 [23.1;31.2]	62.6 [43.1;82.2]	25.1 [22.1;28.1]	24.5 [19.7;29.4]	22.7 [20.8;24.7]	<0.001	0.379	0.786
ALT (U/L)	81.7 [65.8;97.5]	23.9 [20.3;27.5]	21.5 [18.7;24.4]	24.5 [17.7;31.4]	62.7 [45.7;79.7]	20.9 [16.3;25.6]	19.3 [12.4;26.2]	15.8 [14.0;17.5]	<0.001	0.036	0.447
APRI (U/L)	1.08 [0.73;1.42]	0.44 [0.36;0.51]	0.41 [0.33;0.49]	0.39 [0.30;0.47]	1.07 [0.59;1.55]	0.41 [0.31;0.50]	0.37 [0.27;0.47]	0.33 [0.27;0.38]	<0.001	0.465	0.772
FIB-4 (U/L)	2.54 [2.03;3.06]	1.92 [1.67;2.17]	1.92 [1.66;2.17]	1.76 [1.52;2.01]	2.99 [2.23;3.76]	2.13 [1.73;2.54]	2.07 [1.72;2.43]	2.06 [1.66;2.46]	<0.001	0.922	0.636

Los datos se muestran como media [intervalo de confianza al 95%]. plong: psex: plong*sex

6.3 Cambios longitudinales extra-hepáticos

Los niveles medianos de TG (TG), colesterol total (COLT), colesterol LDL y colesterol HDL se elevaron significativamente durante el seguimiento para la cohorte completa ($p_{\text{long}}=0.003$ para los TG y $p_{\text{long}}<0.001$ para COLT, LDL y HDL). Esta elevación fue claramente visible ya al final del tratamiento para el colesterol total y el colesterol LDL, y se mantuvo durante todo el seguimiento (Figura 4).

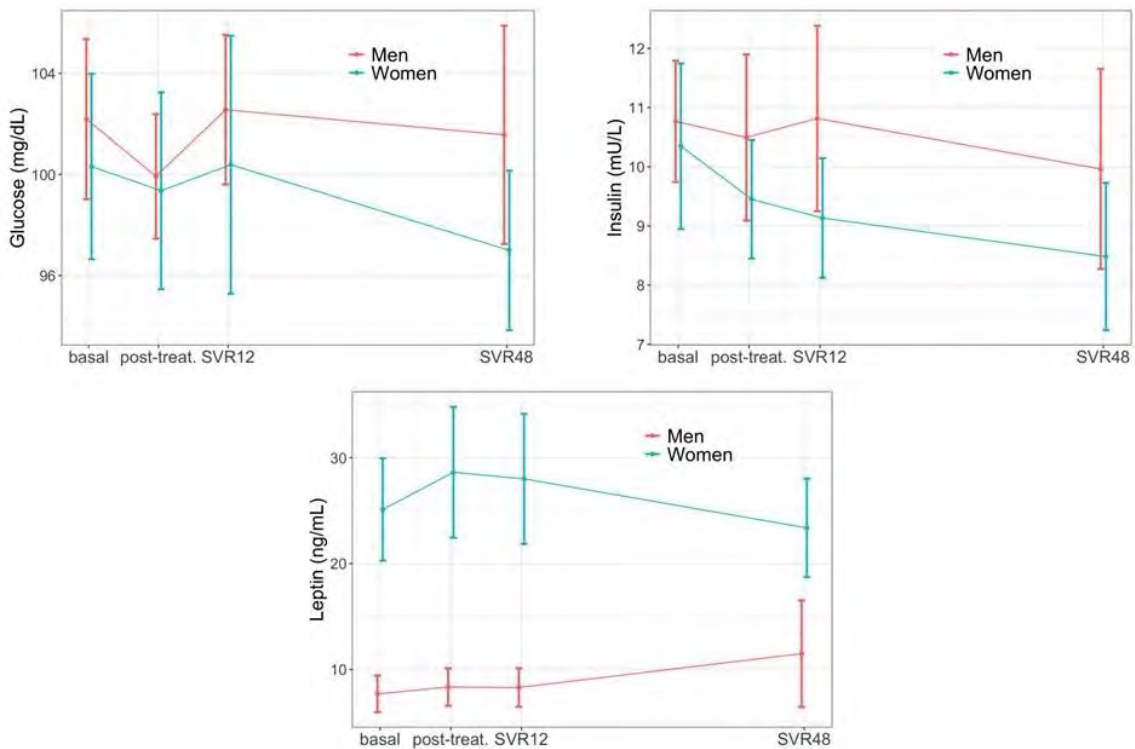
Figura 4: Cambios longitudinales en el perfil lipídico de los pacientes



Comparados con los hombres, las mujeres tuvieron unos niveles consistentemente inferiores de TG ($p_{\text{sex}} < 0.001$) durante el seguimiento. En cuanto a los niveles de HDL, se objetivó un efecto dependiente del sexo, dado que el incremento en hombres fue muy superior al observado en mujeres (15% vs 2.6% respectivamente, $p_{\text{long-sex}} = 0.018$). Todos los datos relacionados con los parámetros del perfil lipídico pueden verse recogidos en la Tabla Suplementaria 1.

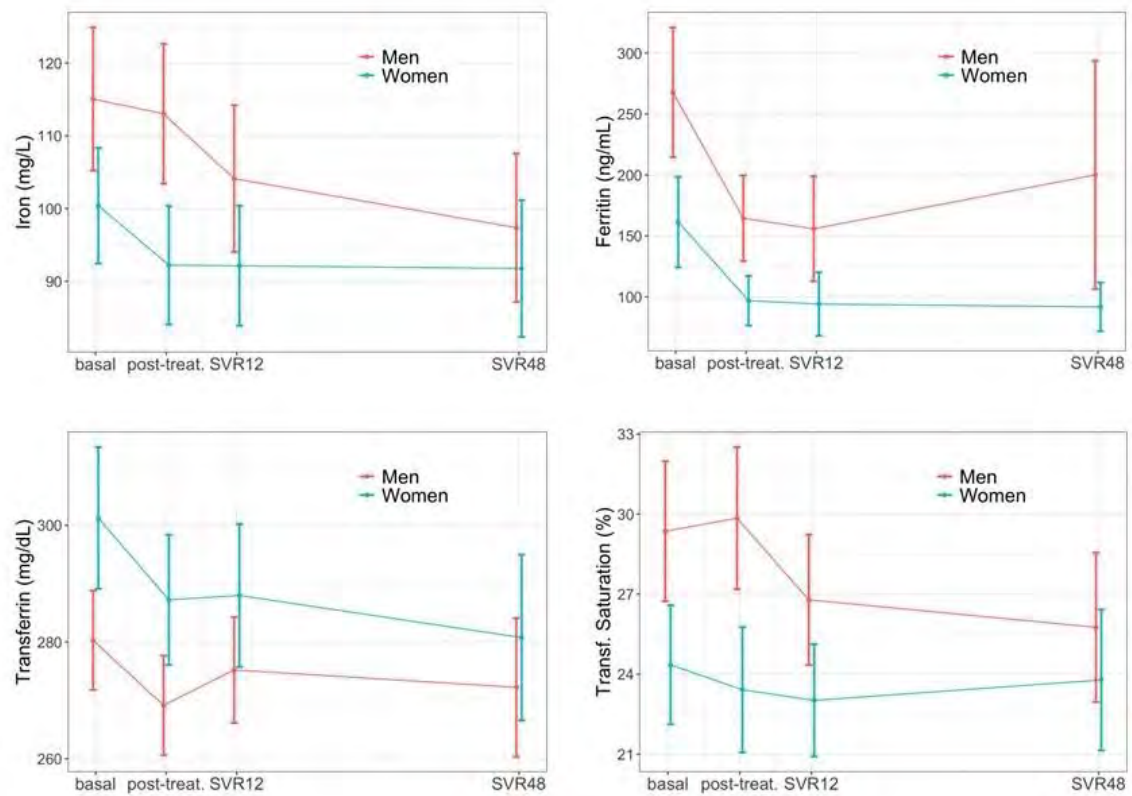
Durante el seguimiento, ni la glucosa ni la leptina presentaron cambios significativos respecto a sus niveles basales ($p_{\text{long}} = 0.077$ y $p_{\text{long}} = 0.099$ respectivamente). Por el contrario, sí que observamos una reducción significativa en los niveles de insulina ($p_{\text{long}} = 0.005$) (Figura 5), lo cual se trasladó en una mejoría del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en el global de la cohorte ($p_{\text{long}} = 0.006$). Las mujeres presentaron de manera consistente niveles más altos de leptina ($p_{\text{sex}} < 0.001$) y más bajos de HOMA-IR ($p_{\text{sex}} = 0.045$) durante todo el curso del estudio, aunque ninguno de estos parámetros presentó cambios específicos por sexo durante el seguimiento longitudinal. Los valores numéricos pueden verse en la Tabla Suplementaria 2.

Figura 5. Cambios longitudinales en los niveles de glucosa, insulina y leptina



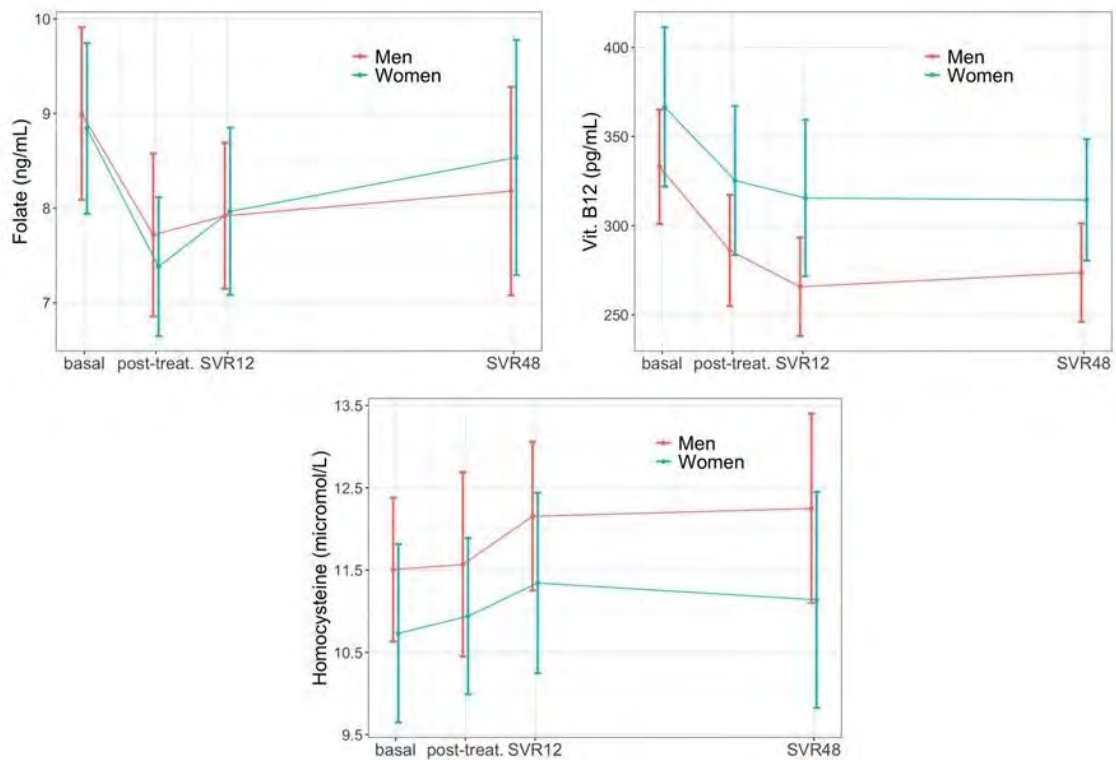
Los niveles de hierro sérico, ferritina y saturación de transferrina descendieron significativamente durante el seguimiento (todos $p_{\text{long}} < 0.001$), mientras que la transferrina no presentó modificaciones (Figura 6). Comparados con los hombres, las mujeres tuvieron durante el seguimiento niveles más altos de transferrina ($p_{\text{sex}} = 0.003$) y niveles más bajos de hierro sérico ($p_{\text{sex}} = 0.005$), ferritina ($p_{\text{sex}} < 0.001$) y saturación de transferrina ($p_{\text{sex}} < 0.001$). Además, también se objetivó un efecto sexo-específico en la magnitud de la reducción de los niveles de saturación de transferrina (14% vs 2.1% para hombres y mujeres respectivamente, $p_{\text{long-sex}} = 0.025$). Estos datos pueden verse en la Tabla Suplementaria 3.

Figura 6. Cambios longitudinales en el perfil férrico



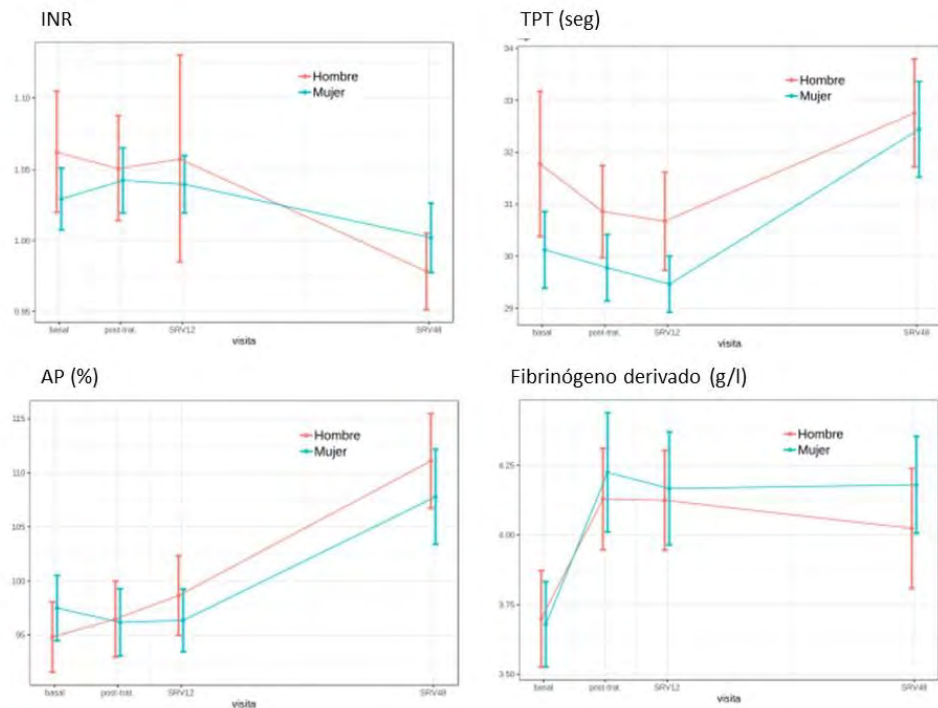
Durante el seguimiento, hubo una reducción a nivel de toda la cohorte en los niveles de ácido fólico ($p_{long} = 0.029$) y vitamina B12 ($p_{long} < 0.001$), acompañados por un aumento en los niveles de homocisteína ($p_{long} = 0.016$). Ninguno de estos parámetros presentó cambios en función del sexo durante sus trayectorias longitudinales (Figura 7). Las cifras pueden visualizarse en la Tabla Suplementaria 4.

Figura 7. Cambios longitudinales en los niveles de ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína



Por último, se evaluó el efecto del tratamiento con AAD en los parámetros de coagulación de nuestra cohorte. El ratio internacional normalizado (INR), el tiempo parcial de tromboplastina (TPT), la actividad de protrombina (AP) y el fibrinógeno derivado se modificaron significativamente durante el seguimiento en la cohorte completa (todos $p_{long} < 0.001$). Sin embargo, estos cambios ocurrieron en diferentes momentos del tiempo para cada variable estudiada (Figura 8). El fibrinógeno derivado se incrementó durante el tratamiento con AAD, mientras que el INR comenzó a disminuir en RVS12, de manera concomitante al aumento que se producía en el TPT y en la AP. No se observaron modificaciones en función del sexo en estas variables. Los datos completos pueden verse en la Tabla suplementaria 4.

Figura 8. Cambios longitudinales en los parámetros relacionados con la coagulación



6.4 Análisis de lipopartículas mediante DOSY-RMN y cromatografía

Del total de la cohorte se seleccionaron de manera aleatoria 83 pacientes (42 mujeres y 41 hombres) para el análisis de lipopartículas mediante DOSY-RM. Al igual que en la cohorte general, la mayoría presentaban niveles bajos de fibrosis (67.9% eran F1-F2), siendo solo un 12.3% F4 según la elastografía. Los datos clínicos basales de la cohorte analizada mediante DOSY-RM pueden verse en la Tabla 6.

Tabla 6. Estado clínico y antecedentes de los pacientes incluidos en el análisis mediante

DOSY-RMN

Variable	Todos N=83	Hombres N=41	Mujeres N=42	p-valor
Edad	56.4 (10.8)	54.5 (9.60)	58.2 (11.7)	0.123
FRCV	25 (30.1%)	11 (26.8%)	14 (33.3%)	0.684
Hipertensión	15 (18.1%)	5 (12.2%)	10 (23.8%)	0.276
DM	3 (3.61%)	3 (7.32%)	0 (0.00%)	0.116
Fumador				0.247
Nunca	48 (57.8%)	21 (51.2%)	27 (64.3%)	
Ex-fumador	18 (21.7%)	12 (29.3%)	6 (14.3%)	
Activo	17 (20.5%)	8 (19.5%)	9 (21.4%)	
Consumo de alcohol	14 (16.9%)	10 (24.4%)	4 (9.52%)	0.130
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24.8 [22.2;27.1]	25.0 [23.8;27.0]	24.2 [22.0;27.1]	0.387
Perímetro abdominal (cm)	92.3 (10.2)	93.8 (8.36)	90.8 (11.9)	0.330
Cirrosis hepática				1.000
No	75 (90.4%)	37 (90.2%)	38 (90.5%)	
Sí, sin HTP	5 (6.02%)	3 (7.32%)	2 (4.76%)	
Sí, con HTP	3 (3.61%)	1 (2.44%)	2 (4.76%)	
Fibrosis hepática (kPa)	7.40 [5.50;10.4]	8.05 [6.00;11.4]	6.30 [5.30;8.70]	0.061
Fibrosis hepática (elastografía)				0.115
F1	39 (48.1%)	14 (35.0%)	25 (61.0%)	
F2	16 (19.8%)	9 (22.5%)	7 (17.1%)	

F3	16 (19.8%)	11 (27.5%)	5 (12.2%)	
F4	10 (12.3%)	6 (15.0%)	4 (9.76%)	
Genotipo de APOE				0.491
E2	10 (12.5%)	7 (17.1%)	3 (7.69%)	
E3	57 (71.2%)	28 (68.3%)	29 (74.4%)	
E4	13 (16.2%)	6 (14.6%)	7 (17.9%)	

FRCV: Factores de riesgo cardiovascular; HTP: Hipertensión portal; DM: Diabetes Mellitus

Al igual que en la cohorte general, todos los pacientes eran naive y fueron tratados de acuerdo con las guías de práctica clínica vigentes. Las características relacionadas con la infección por el VHC y el tratamiento antiviral de esta cohorte se encuentran detallados en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de la infección por VHC y de su tratamiento de los pacientes incluidos en el análisis mediante DOSY-RMN

Variable	Todos N=83	Hombres N=41	Mujeres N=42	p-valor
Tratamiento para VHC				0.753
Sofosbuvir/Velpatasvir	34 (41.0%)	17 (41.5%)	17 (40.5%)	
Ledipasvir/Sofosbuvir	5 (6.02%)	2 (4.88%)	3 (7.14%)	
Glecaprevir/Pibrentasvir	33 (39.8%)	15 (36.6%)	18 (42.9%)	
Elbasvir/Grazoprevir	11 (13.3%)	7 (17.1%)	4 (9.52%)	
Duración del tratamiento				0.575
12 semanas	45 (54.2%)	24 (58.5%)	21 (50.0%)	
8 semanas	38 (45.8%)	17 (41.5%)	21 (50.0%)	
Genotipo viral				0.526
1	63 (75.9%)	33 (80.5%)	30 (71.4%)	
2	3 (3.61%)	1 (2.44%)	2 (4.76%)	

3	8 (9.64%)	2 (4.88%)	6 (14.3%)	
4	9 (10.8%)	5 (12.2%)	4 (9.52%)	
Carga viral (log)	6.05 [5.28;6.58]	6.30 [5.60;6.65]	5.89 [5.20;6.56]	0.194

6.4.1 Niveles de colesterol, apolipoproteínas y TG séricos:

En esta cohorte se han observado, al igual que en la cohorte general, cambios significativos en las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL, con algunas diferencias entre hombres y mujeres, como puede verse en la Tabla 8.

Tabla 8. Modificaciones en el perfil lipídico evaluados mediante técnica convencional de los pacientes de la cohorte RMN

Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 48 semanas
HOMBRES (n=40)			
TG (mg/dl)	107 [86.5;128] ^a	109 [94.7;124] ^a	132 [105;158] ^a
Colesterol total (mg/dl)	191 [178;203] ^a	207 [193;222] ^{a,b}	218 [202;233] ^b
Colesterol LDL (mg/dl)	122 [111;133] ^a	136 [125;148] ^a	138 [127;149] ^b
Colesterol HDL (mg/dl)	49.4 [45.7;53.0] ^a	49.5 [45.5;53.4] ^a	53.8 [49.3;58.2] ^a
APOE (mg/dl)	4.57 [4.09;5.05] ^a	4.27 [3.88;4.67] ^a	4.34 [3.92;4.76] ^a
APOA (mg/dl)	150 [141;158] ^{a,b}	140 [134;147] ^a	161 [151;172] ^b
APOB (mg/dl)	92.1 [83.3;101] ^a	99.7 [91.5;108] ^b	119 [108;131] ^c
MUJERES (n=43)			
TG (mg/dl)	82.7 [68.8;96.6] ^a	87.6 [72.3;103] ^a	84.5 [70.7;98.3] ^a
Total colesterol (mg/dl)	192 [177;206] ^a	214 [197;231] ^b	211 [196;227] ^b
Colesterol LDL (mg/dl)	111 [99.0;122] ^a	136 [122;149] ^b	131 [119;143] ^{a,b}
Colesterol HDL (mg/dl)	64.4 [59.2;69.5] ^a	61.1 [55.8;66.4] ^a	63.4 [58.6;68.2] ^a
APOE (mg/dl)	4.76 [4.37;5.15] ^a	4.40 [3.95;4.84] ^a	4.42 [4.01;4.83] ^a
APOA (mg/dl)	179 [165;193] ^a	153 [142;164] ^b	180 [167;194] ^a
APOB (mg/dl)	78.9 [69.7;88.0] ^a	89.9 [80.6;99.2] ^{a,b}	104 [94.2;113] ^c

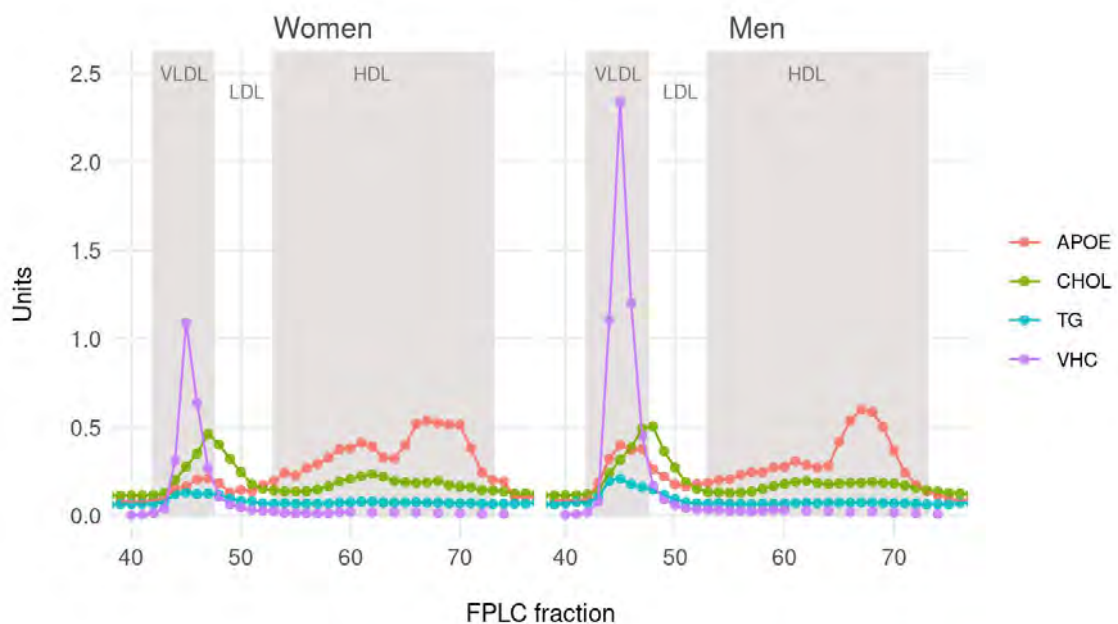
Los datos están presentados como media [Intervalo de confianza al 95%]. Las medias que no comparten una letra común son diferentes de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$, ANOVA y test de Tukey para comparaciones múltiples).

LDL: Low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; APOE apolipoproteína E; APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B

6.4.2 Lipopartículas y carga viral

Mediante el uso de la cromatografía y columnas de exclusión molecular, se ha obtenido un perfil de las lipopartículas. Para ello se han utilizado muestras de plasma combinadas de 4 pacientes (2 hombres y 2 mujeres) para cada genotipo de APOE. La cantidad de ARN del VHC en cada fracción se midió mediante PCR en tiempo real. El análisis de las lipoproteínas mostró que el VHC sólo se presentaba en la región VLDL y no se detectó carga viral asociada a otras lipoproteínas (Figura 9). Curiosamente, el pico de elución de estas partículas que contenían ARN del VHC coincidía con las fracciones más enriquecidas en APOE, lo que sugería la presencia del virus en VLDL enriquecidas en APOE.

Figura 9. Perfil basal de lipoproteínas y su relación con partículas virales, en función del sexo.



6.4.3 Evaluación de lipopartículas por DOSY-RMN

Mediante el análisis por DOSY-RMN (LipoScale®) se han evaluado las lipopartículas VLDL, LDL y HDL. A su vez, cada una de las tres poblaciones se ha subdividido en tres subclases (partículas

grandes, medianas y pequeñas). Para cada clase y subclase se cuantificaron el número total de partículas, así como el tamaño medio. También se midió la concentración de TG en las diferentes clases.

Como puede verse en la Tabla 9, se produjo un aumento significativo en el número de partículas LDL, lo que es congruente con el aumento observado de la concentración de colesterol LDL en suero medida por la técnica de bioquímica convencional.

En cuanto a las diferentes subclases, podemos ver que hubo un aumento significativo del número de partículas LDL pequeñas y medianas. También de las LDL grandes, aunque en este caso sin alcanzar la significación estadística. El aumento de las tres subpoblaciones es similar en términos porcentuales: 9.7% para las partículas LDL grandes, 14.6% para las partículas LDL medianas y 10.0% para las partículas LDL pequeñas. Estas modificaciones, semejantes en los tres grupos, dieron como resultado que el tamaño medio de las partículas LDL no sufriera variaciones significativas.

Tabla 9. Características de las lipopartículas y parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa

Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 48 semanas
<u>Metabolismo glucídico</u>			
Glucosa (mg/dl)	101 [97.7;104] ^a	98.0 [95.5;101] ^a	97.5 [95.3;99.7] ^a
Insulina	10.3 [8.98;11.6] ^a	9.21 [8.22;10.2] ^a	8.48 [7.41;9.56] ^a
HOMA	2.64 [2.26;3.01] ^a	2.27 [2.00;2.54] ^{a,b}	2.08 [1.79;2.37] ^b
<u>Contenido en colesterol</u>			
VLDL	11.3 [9.11;13.4] ^a	11.6 [9.64;13.7] ^a	13.5 [11.1;16.0] ^{a,*}
LDL	122 [115;128] ^a	137 [130;144] ^b	136 [129;143] ^{b,c}

HDL	53.1 [49.6;56.7] ^a	52.3 [48.9;55.7] ^a	54.2 [50.9;57.6] ^a
<u>Contenido en TG</u>			
VLDL	54.6 [46.6;62.7] ^a	57.3 [50.2;64.4] ^a	67.3 [53.6;81.0] ^a
LDL	16.5 [15.2;17.9] ^a	17.3 [16.0;18.5] ^a	17.0 [15.7;18.3] ^a
HDL	18.9 [17.0;20.8] ^a	15.3 [14.2;16.4] ^b	15.6 [14.2;17.0] ^{b,c}
<u>Número de partículas</u>			
VLDL total (nmol/l)	39.6 [33.9;45.3] ^a	41.4 [35.9;46.9] ^a	48.5 [39.5;57.5] ^{a,#}
VLDL grandes (nmol/l)	1.06 [0.94;1.18] ^a	1.07 [0.95;1.19] ^a	1.21 [1.05;1.38] ^a
VLDL medianas (nmol/l)	3.95 [2.91;4.99] ^a	4.32 [3.74;4.90] ^a	5.36 [3.45;7.27] ^a
VLDL pequeñas (nmol/l)	34.6 [29.8;39.5] ^a	36.0 [31.1;41.0] ^a	41.9 [34.5;49.4] ^a
LDL total (nmol/l)	1238 [1179;1297] ^a	1379 [1310;1448] ^b	1396 [1323;1469] ^{b,c}
LDL grandes (nmol/l)	175 [166;184] ^a	192 [183;201] ^b	184 [176;193] ^{a,b}
LDL medianas (nmol/l)	383 [352;414] ^a	439 [406;472] ^b	435 [401;468] ^{b,c}
LDL pequeñas (nmol/l)	680 [652;708] ^a	748 [711;784] ^b	777 [733;822] ^{b,c}
HDL total (umol/l)	27.9 [26.4;29.5] ^a	27.2 [25.8;28.6] ^a	28.2 [26.8;29.6] ^a
HDL grandes	0.27 [0.25;0.28] ^a	0.26 [0.25;0.27] ^a	0.26 [0.25;0.27] ^a
HDL medianas	9.78 [9.23;10.3] ^a	9.14 [8.70;9.58] ^b	9.07 [8.64;9.49] ^{b,c}
HDL pequeñas	17.9 [16.8;19.0] ^a	17.8 [16.7;18.8] ^a	18.9 [17.8;20.0] ^a

<u>Tamaño medio de las partículas</u>			
VLDL (nm)	42.0 [41.9;42.1] ^a	42.1 [42.1;42.2] ^{a,b}	42.1 [42.0;42.2] ^b
LDL (nm)	21.1 [21.0;21.2] ^a	21.1 [21.1;21.2] ^a	21.0 [21.0;21.1] ^a
HDL (nm)	8.30 [8.28;8.32] ^a	8.28 [8.26;8.30] ^{a,b}	8.25 [8.23;8.27] ^c

Los datos están presentados como media [Intervalo de confianza al 95%]. Las medias que no comparten una letra común son diferentes de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$, ANOVA y test de Tukey para comparaciones múltiples).

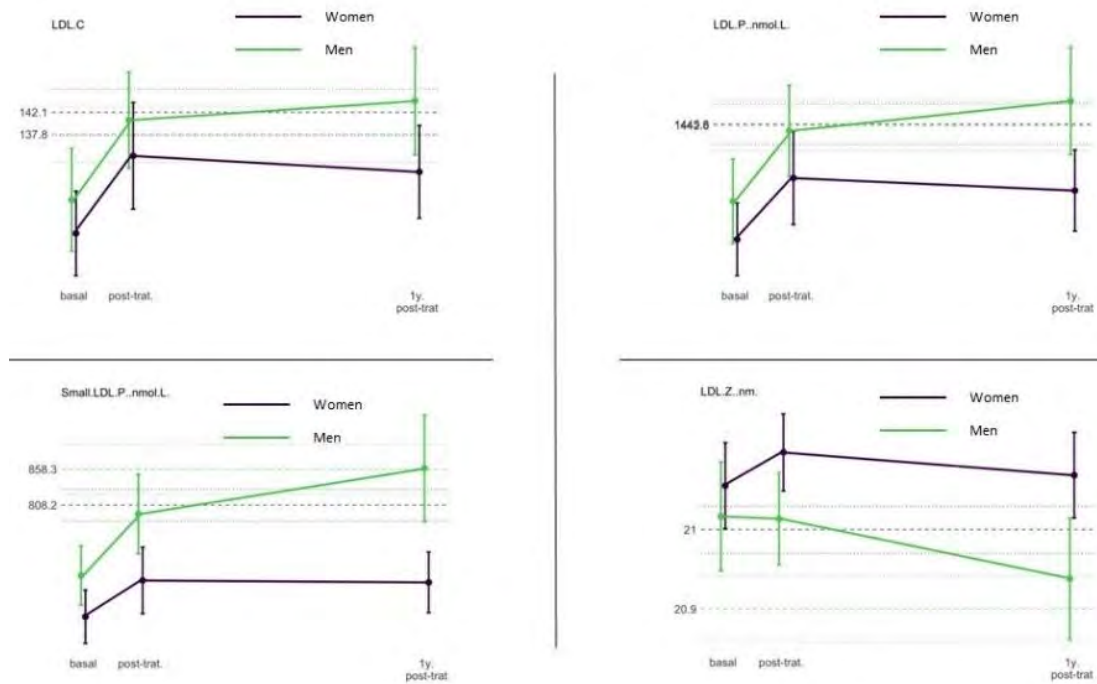
HOMA: Homeostatic model assessment; VLDL: Very Low density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein.

*; $p = 0.08$ para la comparación entre basal y RVS48 semanas.

#; $p = 0.09$ para la comparación entre basal y RVS48 semanas.

En la Figura 10 se pueden observar los cambios longitudinales en la concentración de LDL y en las características de sus partículas. Como puede verse, los pacientes parten de valores por debajo de la normalidad. El incremento observado durante el seguimiento hizo que los pacientes alcanzaran niveles en rango de normalidad, pero sin llegar a un punto que suponga un aumento del riesgo cardiovascular.

Figura 10. Variación en los niveles de LDL colesterol, partículas LDL, tamaño medio de las partículas LDL y número de partículas LDL pequeñas en función del sexo.



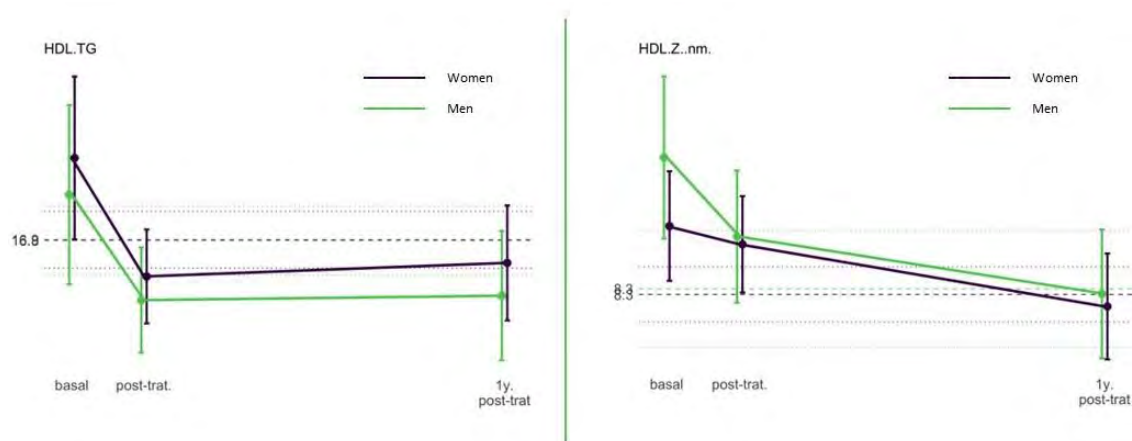
Se evaluó la variación del marcador sustitutivo de la resistencia a la insulina, HOMA, y sus componentes, la glucosa y la insulina, desde el inicio hasta un año de seguimiento (Tabla 12). Tanto la glucosa como la insulina mostraron trayectorias de descenso tras la erradicación del VHC, lo que dio lugar a un fuerte y significativo descenso del HOMA (-22%) durante el seguimiento.

En cuanto a las características de las lipoproteínas, las VLDL mostraron un aumento significativo respecto al valor basal del colesterol transportado en su interior (+19%), al igual que las LDL (+11%). Sin embargo, no se observaron cambios en su carga de TG. Este aumento del colesterol se reflejó en cambios en el número de partículas circulantes de VLDL (+22%) y LDL (+13%). Al final del seguimiento, esos cambios se tradujeron en un aumento significativo de la mediana del tamaño de las partículas de VLDL. En cambio, durante el seguimiento se observó una

disminución de la carga de TG transportados en las HDL (-18%) sin cambios en la cantidad de colesterol. Esta depleción de TG produjo una disminución significativa del número de partículas HDL medianas circulantes (-8%) y una disminución del tamaño mediano de estas partículas.

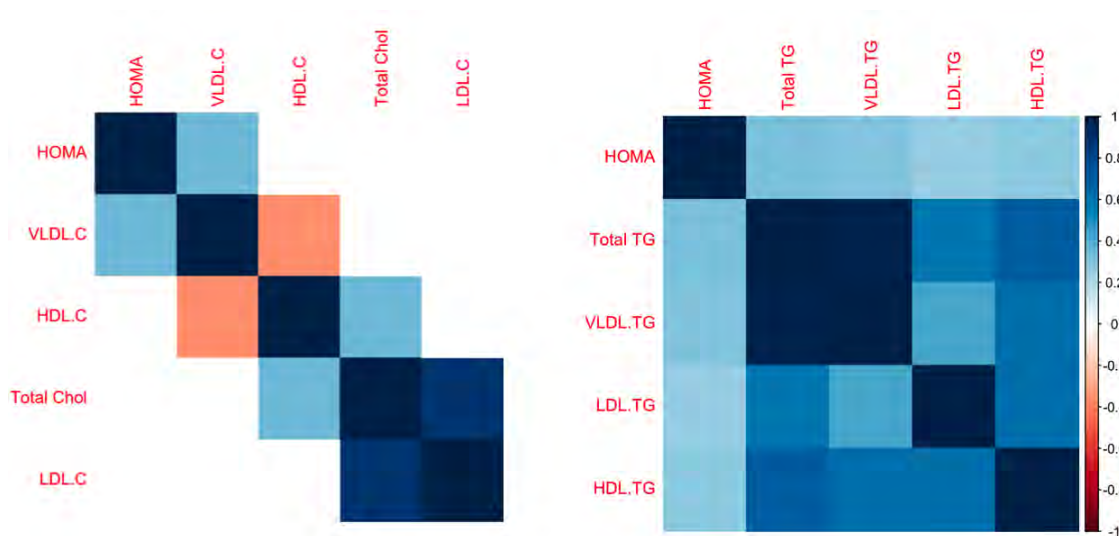
Por otra parte, en la Figura 11 se puede ver como los niveles de TG en las partículas HDL parten de niveles basales elevados, que se normalizan tras el tratamiento erradicador. Esto mismo ocurre con el tamaño medio de las partículas HDL, que también disminuye hasta alcanzar valores normales.

Figura 11. Tamaño medio y contenido en TG de las partículas HDL de acuerdo con el sexo.



Por último, investigamos la asociación entre el HOMA y la cantidad de lípidos (colesterol o TG) transportados por las lipoproteínas. La Figura 12A muestra una correlación positiva entre el colesterol VLDL y el HOMA. Por otra parte, se encontró una asociación positiva entre HOMA y todas las medidas de TG, tanto con los TG circulantes totales como con los TG transportados en VLDL, LDL y HDL (Fig. 12B).

Figura 12. Correlaciones entre el índice HOMA y los componentes lipídicos de las lipopartículas



6.5 Eventos clínicos durante el seguimiento

Se evaluaron la aparición, durante los dos años posteriores a la inclusión en el estudio, de eventos cardiovasculares (accidente cerebrovascular agudo, cardiopatía isquémica y/o vasculopatía periférica). Igualmente se recogieron los diagnósticos de DM, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia y el inicio de tratamiento farmacológico para dichas patologías.

Durante el seguimiento, dos pacientes presentaron un evento cardiovascular (1 infarto agudo de miocardio y 1 evento cardiovascular agudo). En cuanto a los nuevos diagnósticos, 6 pacientes (3.59%) presentaron un diagnóstico de diabetes, 29 (17.4%) de hipercolesterolemia y 6 (3.59%) de hipertrigliceridemia. Complementariamente, 8 pacientes (4.79%) iniciaron tratamiento antidiabético, 25 (15%) lo hicieron con estatinas y 5 (2.99%) iniciaron un fibrato como tratamiento para la hipertrigliceridemia. Esto incluye a aquellos pacientes con un diagnóstico previo al inicio del estudio que durante el desarrollo de este requirieron iniciar tratamiento

farmacológico por esta patología. Como puede verse en la Tabla 10, no se observaron diferencias en función del sexo en estos eventos.

Tabla 10. Eventos clínicos e inicios de tratamiento durante los 2 años de seguimiento

Variable	Todos (N=168)	Hombres (N=88)	Mujeres (N=80)	p-valor
DM	6 (3.59%)	3 (3.41%)	3 (3.80%)	1.000
Hipercolesterolemia	29 (17.4%)	11 (12.5%)	18 (22.8%)	0.122
Hipertrigliceridemia	6 (3.59%)	2 (2.27%)	4 (5.06%)	0.423
Eventos CVs	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	1.000
Inicio de tratamiento con estatinas	25 (15.0%)	11 (12.5%)	14 (17.7%)	0.467
Inicio de tratamiento con fibratos	5 (2.99%)	1 (1.14%)	4 (5.06%)	0.190
Inicio de tratamiento antidiabético	8 (4.79%)	3 (3.41%)	5 (6.33%)	0.478

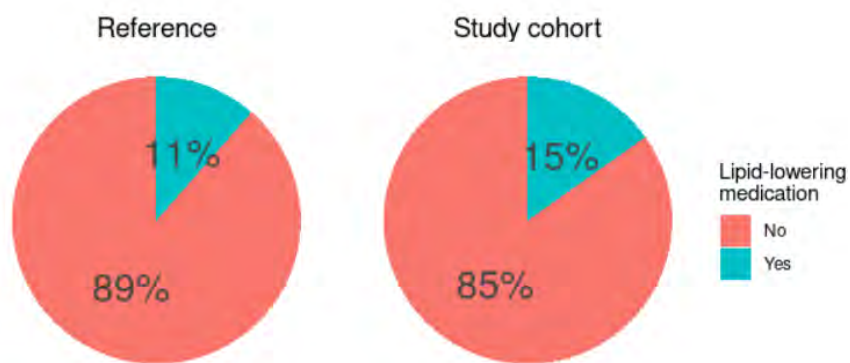
DM: Diabetes mellitus; CVs: Cardiovasculares

Al evaluar los posibles factores predictores para el desarrollo de estos eventos, ninguna variable clínica resultó significativa, incluyendo el sexo ($p=0.189$), el tipo de tratamiento con AAD ($p=0.771$), el diagnóstico de cirrosis hepática ($p=0.385$) o el grado de fibrosis hepática medido por elastografía ($p=0.682$). Sí que se observó sin embargo que aquellos pacientes que desarrollaron durante el seguimiento alguno de los tres factores de riesgo cardiovascular evaluados (DM, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) presentaban niveles basales más elevados de algunas variables bioquímicas. Estos parámetros fueron el colesterol total (206 [178;240] vs 176 [149;198], $p<0.001$), el colesterol LDL (131 [104;160] vs 104 [85.0;120], $p<0.001$), los TG (98.5 [72.0;124] vs 79.0 [61.0;111], $p=0.024$) y la apoB (96.5 [78.3;122] vs 77.0

[60.5;92.2], $p < 0.001$). Por el contrario, no se observaron diferencias en los niveles basales de glucosa ($p = 0.121$), insulina ($p = 0.275$), colesterol HDL ($p = 0.199$) ni apoA ($p = 0.240$).

Para evaluar la magnitud de estos cambios observados se utilizó la cohorte Sanitas Data4Good para comparar los datos de nuestra cohorte con una población de referencia española. Como puede verse en la Figura 13, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes en el porcentaje de individuos con tratamiento hipolipemiente ($p = 0.264$).

Figura 13. Comparativa en el porcentaje de uso de tratamiento hipolipemiente entre la cohorte del estudio y una cohorte de referencia



7. DISCUSIÓN

Presiento que este es el inicio de una gran amistad

7. DISCUSIÓN

7.1 Introducción

En este estudio, los AAD para la erradicación del VHC en pacientes sin tratamiento previo se asociaron a un aumento de los niveles de lípidos plasmáticos y de la homocisteína, a una mejora del control glucémico y de la homeostasis del hierro, así como a una reducción de AP durante el primer año después del tratamiento. Estos cambios se produjeron en ambos sexos. Se observaron 2 nuevos episodios cardiovasculares no mortales durante los 2 primeros años de seguimiento de una cohorte de 167 individuos con una edad media de 55.2 años.

La llegada de los AAD, con tasas de curación del 95-100%, cambió el paradigma de la enfermedad. A pesar de su altísima eficacia en la erradicación de la infección, el efecto de este tratamiento y de la curación del virus sobre el metabolismo del huésped sigue siendo una cuestión no del todo aclarada. Varios estudios han intentado evaluar el impacto del tratamiento con AAD, con resultados dispares. La mayoría de los estudios realizados son retrospectivos, lo que supone una importante limitación. Además, la inclusión de poblaciones especiales (pacientes coinfectados por VIH/VHB, pacientes cirróticos, receptores de trasplantes, etc.) puede dar lugar a resultados sesgados.

7.2 Cambios en el metabolismo

Por lo tanto, nuestro estudio pretendía identificar con la mayor pureza posible el efecto del tratamiento antiviral y la erradicación de la infección por el VHC. Por este motivo, se excluyeron del estudio los pacientes coinfectados, con consumo abusivo de alcohol, con otras causas de hepatopatía, trasplantados o no naive, así como los que recibían tratamientos hipolipemiantes o neurolépticos. Aunque no fue un criterio de exclusión, la proporción de pacientes con enfermedad hepática avanzada en nuestra cohorte es muy baja (9,6%). Además, nuestro estudio es uno de los que tiene un seguimiento más prolongado. Esto permite verificar la temporalidad

y la persistencia o no de los cambios observados en las primeras fases del seguimiento. Los cambios tempranos podrían ser un efecto directo de los tratamientos con AAD, mientras que los cambios a medio y largo plazo podrían explicarse por la erradicación del VHC y la mejoría del estado del hígado.

Se han establecido claramente las alteraciones en el perfil lipídico de los pacientes infectados por el VHC. Estos cambios se deben a la interacción entre el VHC y las vías de síntesis de colesterol del huésped. El virus secuestra estas vías para su propio ciclo replicativo (34,35), provocando así cambios en el metabolismo basal del paciente. Estas alteraciones del metabolismo lipídico conducen a un mayor riesgo de ECV en los pacientes infectados por el VHC, con un aumento de la morbilidad y la mortalidad por causas extrahepáticas (36,37). En nuestro estudio, todos los parámetros lipídicos aumentaron tras la erradicación del VHC. El colesterol total y el colesterol LDL fueron los que mostraron un aumento más temprano y pronunciado. Debido a su importancia y a su aparición justo después de los tratamientos con AAD, este fenómeno ha sido el más fácil de identificar en todos los estudios, incluidos los retrospectivos, con un seguimiento corto o con poblaciones heterogéneas. Este hallazgo fue descrito inicialmente por Meissner et al en 2015, en un estudio retrospectivo con un tamaño muestral de 54 pacientes, pero que les permitió observar un aumento significativo en los niveles de LDL séricos. Posteriormente estos hallazgos se intentaron confirmar en análisis post hoc de los ensayos clínicos disponibles, como son los trabajos de Inoue et al (149) y de Townsend et al (164). Cabe destacar que el estudio de Inoue et al no confirmó la elevación de los niveles de colesterol LDL tras la curación, cosa que sí hizo el grupo de Townsend.

Las primeras series prospectivas, como son la de Ichikawa et al (169) y Gitto et al (159) se realizaron con tamaños muestrales reducidos (39 y 100 pacientes respectivamente) y con un seguimiento a 6 meses. La principal limitación de la serie de Gitto et al es que solo aporta

resultados de colesterol total, mientras que el trabajo de Ichikawa no observó diferencias en triglicéridos ni colesterol HDL.

En cuanto a características relacionadas con el propio virus, varios estudios han centrado su investigación exclusivamente en pacientes con genotipo 1 (Sun et al(151), Ichikawa et al(169) y Cheng et al(196) de entre las series prospectivas). Sus resultados no fueron diferentes a los descritos en poblaciones con genotipos diferentes, por lo que no parece que haya un efecto dependiente del genotipo que afecte a las modificaciones del perfil lipídico.

Quizás la principal limitación general de los estudios publicados hasta la fecha es el tiempo de seguimiento. Los seguimientos inferiores pueden hacer que solo se lleguen a observar los cambios secundarios al tratamiento con AAD propiamente dicho, mientras que modificaciones secundarias a la recuperación de la función hepática tras la erradicación del virus podrían pasar desapercibidas, ya que podrían aparecer tras una ventana de tiempo superior.

Solamente uno de los estudios prospectivos alcanza el año de seguimiento, el publicado por Gonzalez-Colominas et al(154). En este estudio, con un 50% de pacientes con cirrosis hepática, se observó un aumento de los niveles de colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL, pero no evaluaron los niveles de triglicéridos.

A su vez, estos resultados fueron explorados en algunas poblaciones específicas, como por ejemplo en pacientes trasplantados. El estudio de Beig et al(160) observó resultados muy similares a los descritos en pacientes no trasplantados, con aumento de los niveles de LDL y del colesterol total.

Por otro lado, los TG y el colesterol HDL mostraron aumentos menos bruscos y más graduales. Además, en ambos casos se observó un efecto dependiente del sexo, siendo el aumento principalmente en los hombres. Teniendo en cuenta el HDL, estos resultados coincidieron con los observados por Inoue et al (149), González-Colominas et al (154) y Shimizu et al (170), todos

ellos estudios de seguimiento prolongado (48 semanas). Curiosamente, los estudios que no informaron de diferencias, como los de Cheng et al (171), Jain et al (172) e Ichikawa et al (169), tuvieron seguimientos más reducidos (< 6 meses). En cuanto a los TG, sólo los estudios de Doyle et al (168) y Cheng et al (171) observaron un aumento de los niveles séricos como en nuestro estudio. De nuevo, es probable que las diferentes metodologías de los estudios hayan influido en la disparidad de los resultados de los estudios anteriores. La mayoría de los estudios en los que no se observaron cambios en los niveles de TG tienen tamaños de muestra reducidos [39 pacientes en Ichikawa et al (169), 70 en Shimizu et al(170), 80 en El Sagheer et al(167)]. En nuestro trabajo hemos excluido a aquellos pacientes con coinfección por VIH. Esto se debe a que los tratamientos antirretrovirales para el VIH pueden provocar cambios significativos en los niveles de TG, que podrían haber enmascarado los cambios debidos al tratamiento del VHC. Sin embargo, algunos de los trabajos con mayor tamaño muestral(163, 166) sí que incluyeron a este grupo de pacientes, suponiendo un porcentaje significativo del total de la cohorte (30% y 60%; respectivamente). Por último, los trabajos de Inoue et al(149) y Mauss en al(166), con tamaños muestrales más amplios tenían un diseño retrospectivo, lo que también supone una importante limitación.

Los cambios en el metabolismo de la glucosa y la insulina que observamos en nuestro estudio fueron similares a los descritos previamente en la literatura (160, 197, 198). De manera similar a estos estudios antes comentados, en nuestros pacientes no observamos una reducción de los niveles de glucosa en suero, pero sí vimos una reducción de los niveles de insulina. Hay que tener en cuenta que la glucemia como parámetro aislado tiene un valor limitado, especialmente cuando se determina de manera puntual como en nuestro estudio. Estos resultados son similares a los que encontró el grupo de Thompson et al (199), que fue el trabajo que estableció estos hallazgos. A pesar de la ausencia de cambios significativos en los niveles de glucosa, las modificaciones sí que se reflejaron en una mejora significativa del índice HOMA-IR. Al igual que

con el metabolismo de los lípidos, algunos estudios previos no han encontrado tales cambios (163, 168, 200). Esto puede explicarse, al menos en parte, por un efecto dependiente del genotipo, según el cual se produce una mejora en el metabolismo de los carbohidratos en aquellos pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC (199). Aproximadamente un 70% de los pacientes de nuestra cohorte estaban infectados con este genotipo, lo que puede explicar por qué nosotros sí que observamos estos cambios.

La relación entre la vitamina B12 y la enfermedad hepática se ha descrito previamente (102, 201, 202). Varios estudios han postulado que los niveles elevados de B12 son un posible marcador de enfermedad hepática avanzada o de hepatocarcinoma (97, 101). Esta relación también se ha observado en pacientes con infección crónica por el VHC y se ha descrito la interacción de la vitamina B12 con el ciclo de replicación del VHC (113). En estos pacientes, los niveles más altos de B12 se asociaron con niveles más avanzados de fibrosis hepática. Nuestros resultados muestran una marcada disminución de los niveles de B12 tras el tratamiento con AAD paralela a la mejora del daño hepático, reflejada en la disminución de los marcadores de daño hepático durante el seguimiento y la mejora de los índices APRI y FIB-4, tal y como se ha descrito previamente (203). De forma similar a la vitamina B12, el metabolismo del hierro se ve modificado por la infección por el VHC, pero también influye en su ciclo de replicación (204). La infección por el VHC reduce los niveles de hepcidina, lo que altera el metabolismo del hierro (205). Además, la ferritina es un marcador inflamatorio que se eleva durante la infección crónica (205). Nuestros resultados mostraron un cambio en el perfil férrico, con una normalización generalizada de los parámetros, especialmente de la ferritina.

7.3 Análisis de las características de las lipopartículas:

Como ya se ha expuesto previamente, diferentes estudios prospectivos han demostrado que la curación del VHC produce una reducción en el riesgo cardiovascular, con una disminución en el número de eventos (206, 207). Sin embargo, esto ocurre a pesar de un aumento marcado en el

colesterol total y en el colesterol LDL, lo que supone, a priori, un empeoramiento del perfil lipídico y un aumento del riesgo cardiovascular (162, 208). Por el contrario, otros factores, como la mejoría de la resistencia a la insulina y la desaparición de la situación inflamatoria provocada por la infección crónica por el VHC participan en la balanza a favor de la disminución del riesgo cardiovascular.

Dada la contradicción entre el aumento de los niveles de colesterol total y, sobre todo LDL, y la reducción del riesgo, parece de especial interés la evaluación en profundidad de las características de las lipopartículas y sus modificaciones en tamaño y contenido tras el tratamiento erradicador del VHC.

Los pocos estudios que han evaluado las características de las lipopartículas han utilizado técnicas de ultracentrifugación y estandarización por APOB para el análisis. Meissner et al (75) investigaron el efecto del tratamiento con sofosbuvir y ribavirina en los lípidos, tanto periféricos como hepáticos, en 24 pacientes con infección crónica por VHC, todos ellos genotipo 1. Encontraron que la concentración de partículas LDL y su tamaño aumentaban durante la terapia, mientras que la concentración de TG y el tamaño de las partículas VLDL disminuía. De manera similar, Wheeler et al (209) describieron que, en pacientes coinfectados por VIH, la infección por el VHC se asociaba de manera independiente con niveles más bajos de partículas LDL y HDL pequeñas. Más recientemente, Cheng et al (196) observaron que no se producían variaciones netas en el contenido de TG y colesterol transportado por las partículas HDL un año después del tratamiento erradicador. Hay que destacar que en este trabajo no se cuantifica el tamaño de las lipopartículas. Sin esta medida, no puede obtenerse una imagen completa de las dinámicas del metabolismo lipídico tras la curación del VHC mediante AAD.

Nuestro hallazgo más reseñable en el análisis de las lipopartículas es quizás la observación de la reducción del contenido en TG transportado por las partículas HDL tras la terapia erradicadora y durante todo el seguimiento. El contenido en TG de las partículas HDL ha demostrado ser un

marcador independiente de riesgo cardiovascular, normalmente relacionado de manera directa con la concentración de TG séricos (186, 210, 211). Sin embargo, en nuestro trabajo, es notable que el descenso en los TG-HDL se ha producido a pesar de que no se observa una modificación significativa de los TG séricos. Esto podría indicar que este descenso es debido a un reajuste en el metabolismo lipídico del paciente tras la eliminación del VHC y no a una disminución en los niveles totales de TG.

Además, los niveles altos de TG-HDL se han relacionado con un aumento en la resistencia insulínica y un riesgo aumentado de la aparición de diabetes (212-214). En este sentido, hemos observado una correlación directa entre la cantidad de TG transportado en las diferentes clases de partículas (VLDL, LDL y HDL) y el índice HOMA. En contraste con nuestros resultados, Cheng et al no encontraron ninguna correlación entre el contenido en TG en las diferentes clases de partículas y los niveles de glucosa o el índice HOMA. Esta diferencia puede deberse a varios factores, incluyendo la etnia, el desbalance en la proporción de pacientes de ambos sexos o a la diferente técnica utilizada para la evaluación de las lipopartículas (ultracentrifugación vs DOSY-RM).

Nuestra hipótesis es que el VHC secuestra el metabolismo lipídico del paciente a nivel hepático, para la producción de partículas virales y su liberación como lipopartículas virales enriquecidas en APOE, alterando con ello el intercambio de productos lipídicos normal. Esta disrupción provoca 1) una reducción en el contenido de colesterol de las partículas VLDL y LDL y una reducción en el número de dichas partículas 2) un remodelado de las partículas HDL hacia una sobrecarga de TG en las mismas, para compensar la reducida capacidad de transporte de lípidos de las VLDL. Estas alteraciones en la funcionalidad de las lipoproteínas se asocian con un empeoramiento de la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. La erradicación del VHC mediante el tratamiento con AAD aumenta la secreción de partículas VLDL funcionales y cargadas de colesterol. Consecuentemente, ya no se producen esas partículas HDL

sobrecargadas de TG, dado que ya no son necesarias, y la reducción de estas lipopartículas deletéreas reduce el HOMA, como un marcador subrogado de la resistencia a la insulina. Esta hipótesis concuerda con la noción de que el aumento de la esteatosis pancreática (acumulación de colesterol en las células beta pancreáticas) modulada por las alteraciones de las lipopartículas (como un incremento en la proporción de lipopartículas ricas en TG) podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de DM (215-217). Por lo tanto, un aumento en la eliminación de los depósitos tisulares de colesterol (a nivel de hígado y páncreas) tras la curación del VHC, mediado por las modificaciones de las lipopartículas (menos TG en HDL, más colesterol en VLDL) podría ser uno de los mecanismos envueltos en la mejoría de la resistencia a la insulina en estos pacientes.

Para resumir nuestros principales hallazgos, los pacientes con infección crónica por el VHC presentaron niveles más bajos que la población sana de colesterol sérico (especialmente LDL) mientras que, tras la erradicación del VHC tanto los niveles de colesterol como de TG aumentaron. Sin embargo, este aumento debe considerarse como una vuelta a los valores normales según el sexo y la edad. Así, los valores medios de colesterol total fueron de 210 y 215 mg/dl para hombres y mujeres, respectivamente, en nuestra cohorte tras un año de seguimiento. Estos valores están en consonancia con los de 206 y 214 mg/dl para hombres y mujeres en la franja de edad de 45-64 años, según el estudio ENRICA (218), uno de los mayores datos poblacionales nacionales sobre lípidos plasmáticos en España. Además, aunque el 15% de los pacientes iniciaron tratamientos hipolipemiantes, este porcentaje no difiere de la prevalencia de uso de medicación hipolipemiente entre la población general emparejada por edad y sexo.

Ateniéndonos al análisis de las lipopartículas, los resultados principales son que no hay un aumento exagerado de las partículas de mayor potencial aterogénico (especialmente las LDL pequeñas) con respecto a las demás y que los niveles, al igual que lo explicado previamente,

ascienden solo hasta alcanzar el rango de la normalidad de acuerdo con la edad y sexo de los pacientes. Los cambios más destacados observados en la composición de dichas lipopartículas son la disminución en el contenido en TG en las partículas HDL y el aumento en el contenido en colesterol, sobre todo en las VLDL. Además, el contenido en TG de las diferentes lipopartículas se correlaciona con el índice HOMA. Estos cambios sugieren que las modificaciones en las características de las lipopartículas que se provocan cuando se elimina el VHC podrían explicar parte de la mejoría en la resistencia insulínica. Además, estos cambios descritos explican por qué el aumento en colesterol total y LDL no provoca un aumento en el riesgo cardiovascular de los pacientes.

Este trabajo tiene varios puntos fuertes. Los dos primeros son su diseño prospectivo y el tamaño de la muestra (que se encuentra bien balanceada en términos de inclusión de hombres y mujeres) para el tipo de estudio que se trata. Además, se trata de una cohorte sin coinfecciones (ni VHB ni VIH), con criterios de selección estrictos para evitar posibles factores de confusión y un porcentaje muy bajo de pacientes con cirrosis. También es muy importante el largo tiempo de seguimiento, que ha permitido evaluar los cambios a largo plazo. En cuanto a la metodología, este trabajo es el primero en utilizar la tecnología basada en RMN para la evaluación de las lipopartículas en pacientes con infección crónica por el VHC. Esto nos ha permitido describir cambios cualitativos en las lipoproteínas de los pacientes tras la erradicación del VHC. También tiene algunas debilidades: Se trata de un estudio unicéntrico, por lo que puede haber algún sesgo de inclusión. La fibrosis solo se ha evaluado mediante métodos no invasivos y no se ha realizado biopsia hepática. Sin embargo, la biopsia también presenta limitaciones como gold estándar, ya que solo se evalúa una pequeña fracción del tejido hepático, lo que puede conllevar una sobre o infraestimación de la fibrosis. Finalmente, no se ha dispuesto de un grupo control estrictamente hablando, pero debido a la efectividad del tratamiento con AAD, no era ético privar de dicho tratamiento a ningún grupo de pacientes.

8. CONCLUSIONES

Lo que hacemos en la vida, tiene su eco en la eternidad

8. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con infección crónica por el VHC presentan niveles más bajos que la población sana de colesterol y TG. Tras el tratamiento erradicador, el colesterol total y LDL aumenta en ambos sexos, mientras que los TG y el colesterol HDL lo hace solo en hombres.
2. La erradicación del VHC provoca una disminución del HOMA-IR merced a una disminución en los niveles séricos de insulina, independientemente del sexo.
3. Los cambios analíticos observados tienen repercusión clínica, provocando el inicio de tratamiento hipolipemiante en un 15% de los pacientes, aunque estos datos son similares a los de población de referencia.
4. La curación del VHC provoca modificaciones las características de las, con un aumento del contenido en colesterol transportado en las lipoproteínas y un descenso en el contenido en TG, sobre todo en HDL, que se correlaciona con un descenso en el índice HOMA.
5. Los cambios cualitativos observados en las lipoproteínas podrían explicar parte de la reducción de la resistencia insulínica y del riesgo cardiovascular evidenciado tras la curación del VHC.

9. ÍNDICE DE FIGURAS

Has olvidad quien eres, y con ello me has olvidado

Figura 1. Estructura del VHC

Figura 2. Tipos de lipoproteínas y su composición

Figura 3. Flujograma de inclusión de pacientes

Figura 4. Cambios longitudinales en el perfil lipídico de los pacientes

Figura 5. Cambios longitudinales en los niveles de glucosa, insulina y leptina

Figura 6. Cambios longitudinales en el perfil férrico

Figura 7. Cambios longitudinales en los niveles de ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína

Figura 8. Cambios longitudinales en los parámetros relacionados con la coagulación

Figura 9. Perfil basal de lipoproteínas y su relación con partículas virales, en función del sexo.

Figura 10. Variación en los niveles de LDL colesterol, partículas LDL, tamaño medio de las partículas LDL y número de partículas LDL pequeñas en función del sexo.

Figura 11. Tamaño medio y contenido en TG de las partículas HDL de acuerdo con el sexo.

Figura 12. Correlaciones entre el índice HOMA y los componentes lipídicos de las lipopartículas

Figura 13. Comparativa en el porcentaje de uso de tratamiento hipolipemiente entre la cohorte del estudio y una cohorte de referencia

10. ÍNDICE DE TABLAS

*Los protagonistas de esas historias se rendirían si quisieran. Pero no lo hacen: siguen adelante,
porque todos luchan por algo*

Tabla 1. Características de las familias de lipoproteínas

Tabla 2. Principales estudios sobre VHC, AAD y perfil lipídico

Tabla 3. Situación clínica y antecedentes de los pacientes

Tabla 4. Situación basal de los pacientes en relación con la infección por VHC

Tabla 5. Cambios longitudinales en función del sexo de los parámetros relacionados con la función y el daño hepático

Tabla 6. Estado clínico y antecedentes de los pacientes incluidos en el análisis mediante DOSY-RMN

Tabla 7. Características de la infección por VHC y de su tratamiento de los pacientes incluidos en el análisis mediante DOSY-RMN

Tabla 8. Modificaciones en el perfil lipídico de la cohorte en los pacientes con análisis mediante DOSY-RMN

Tabla 9. Cambios en el número de lipopartículas a lo largo del seguimiento

Tabla 10. Eventos clínicos e inicios de tratamiento durante los 2 años de seguimiento

11. ANEXOS

Bueno, nadie es perfecto

ANEXO I: Dictamen favorable del Comité de Ética en la Investigación Clínica de Aragón

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el **CEIC Aragón (CEICA)** en su reunión del día **27/12/2017**, **Acta Nº 22/2017** ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: Lipoprotein profiling 4 HCV infection

Investigador Principal: José Miguel Arbonés Mainar, IACS

Versión protocolo: v02 (18/12/2017)

Versión documento de información y consentimiento: Version 03 (18/12/2017)

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y los documentos para la obtención del consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza, a 27 de diciembre 2017

**GONZALEZ
HINJOS MARIA
DNI 03857456B**

Firmado digitalmente por
GONZALEZ HINJOS
MARIA - DNI 03857456B
Fecha: 2017.12.28
10:24:34 +01'00'

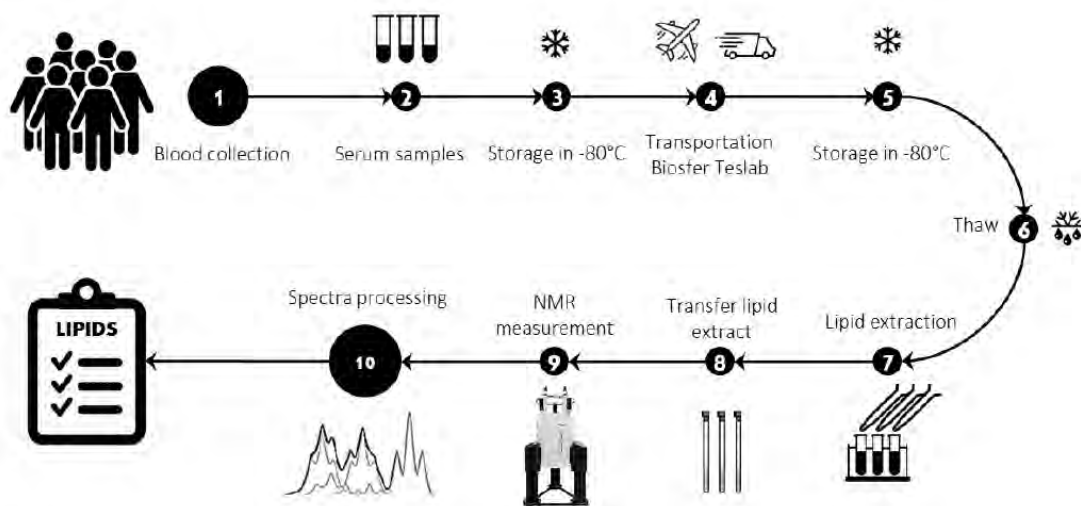
María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

ANEXO II METODOLOGÍA DE LA DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTÍCULAS LIPOPROTEICAS MEDIANTE LIPOSCALE

LIPID PROFILING WITH NMR

Biosfer offers lipid profiling services for serum, plasma and lipoprotein fractions samples using proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$). The advantages are fast screening of major lipid classes (fatty acids, glycerolipids, phospholipids and sterols) and some individual species, non-invasive quantification of lipids, and small sample volume required (250 μl).

High-throughput NMR workflow



Sample treatment

Serum or plasma samples are sent to Biosfer Teslab according to standard procedures. Lipids are extracted from biological matrixes using BUME method¹. This process can be automated with liquid handling robots ensuring sample reproducibility and high-throughput analysis. Lipid extracts are analysed using an Avance III-600 Bruker spectrometer.

Lipidic Extraction Procedure for $^1\text{H-NMR}$ Based Metabolomics Assays

As described by Lögfren et al. (1), 100 μ l of plasma sample are placed in 2 ml Eppendorff and 300 μ l of BUME (3:1) solution are added. White pellet is formed. 300 μ l of DIPE-EtAc (3:1) and 300 μ l of deionized H₂O are added. Mix the sample by shaking. Mixture is centrifuged 6 s at 1000 rpm and room temperature (MiniSpin[®]). Biphasic system is formed. Aqueous phase stays on the bottom whereas upper phase contains the lipid fraction. The lipid phase is separated into new Eppendorff and completely dried in N₂ stream. Froze (-80°C) until NMR measurement.

1H NMR Measurements

The Lipidic extraction NMR measurements and analysis protocol is previously described in Vinaixa et al. (Journal of Proteome Research 2010, 9, 2527-2538). Dried lipid extracts are reconstituted with 700 μ L of CDCl₃-CD₃OD-D₂O (16:7:1) containing 1.18 mM tetramethylsilane (TMS) and transferred to 5-mm NMR glass tubes for analysis.

One dimensional 1H-NMR spectra are obtained using a 90° pulse with pre-saturation sequence (zgpr). The measurements are performed at 286K, shifting the residual water signal to 4.65 ppm to allow the quantification of the characteristic glycerol-backbone signals. Besides, residual water is pre-saturated during a 8s recycling delay using a low irradiation power (10 Hz). A total of 256 FIDs of 12 kHz of spectral width are collected into 64 k data points and exponential line broadening of 0.3 Hz is applied before Fourier transformation. The frequency spectra is phased, baseline corrected, and then calibrated (TMS or TSP, 0 ppm) using inhouse software (LipSpin) developed by Barrilero et al.

Metabolite Identification and Quantification

Chemical shifts are identified as previously described (Journal of Proteome Research 2010, 9, 2527-2538). Briefly, after baseline correction, selected peaks are deconvoluted using inhouse LipSpin software, and the absolute concentration of single metabolites is assessed based in cholesterol signal and cholesterol concentration measured by enzymatic method.

ANEXO III: TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Concentraciones lipídicas en suero a lo largo del seguimiento							
Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 12 semanas	RVS 48 semanas	P long	Psex	Plong*sex
TG (mg/dl)	94.7 [87.3;102]	104 [95.5;112]	111 [99.3;123]	107 [94.5;120]	0.001	0.286	0.067
Colesterol total (mg/dl)	183 [176;189]	208 [201;215]	211 [204;218]	212 [203;220]	<0.001	0.161	0.877
Colesterol LDL (mg/dl)	111 [105;116]	135 [129;140]	135 [129;141]	132 [126;139]	<0.001	0.709	0.289
Colesterol HDL (mg/dl)	53.5 [51.1;55.9]	52.7 [50.5;54.9]	53.6 [51.5;55.7]	58.3 [55.5;61.2]	<0.001	<0.001	0.018
Colesterol no HDL (mg/dl)	129 [124;135]	155 [149;162]	157 [151;163]	154 [146;161]	<0.001	0.553	0.633
Ratio colesterol LDL/HDL	3.20 [2.70;4.30]	3.70 [3.20;4.40]	3.80 [3.10;4.80]	3.70 [3.20;4.60]	<0.001	<0.001	0.1
Apolipoproteína A (mg/dl)	155 [149;161]	145 [141;149]	149 [145;152]	169 [162;176]	<0.001	<0.001	0.164

Tabla suplementaria 2. Concentraciones de parámetros del metabolismo glucídico a lo largo del seguimiento

Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 12 semanas	RVS 48 semanas	P long	Psex	Plong*sex
Glucosa (mg/dl)	101 [98.9;104]	99.6 [97.4;102]	102 [98.6;104]	99.2 [96.5;102]	0.607	0.524	0.389
Insulina (mU/L)	10.6 [9.72;11.4]	9.98 [9.12;10.8]	10.0 [9.06;10.9]	9.19 [8.16;10.2]	0.144	0.362	0.498
Leptina (ng/ml)	16.0 [13.2;18.8]	18.3 [14.8;21.8]	17.8 [14.4;21.3]	17.7 [14.2;21.3]	0.016	<0.001	0.081

Los datos se muestran como media [intervalo de confianza al 95%]. plong: psex: plong*sex

Tabla suplementaria 3. Cambios longitudinales en las concentraciones de los parámetros del metabolismo férrico

Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 12 semanas	RVS 48 semanas	P long	Psex	Plong*sex
Hierro (mg/L)	108 [102;115]	103 [96.4;109]	98.3 [91.8;105]	94.4 [87.6;101]	<0.001	0.001	0.072
Ferritina (ng/mL)	217 [183;251]	131 [110;152]	126 [100;152]	143 [97.1;190]	<0.001	0.001	0.721
Transferrina (mg/dL)	290 [283;298]	278 [271;285]	281 [274;289]	277 [267;286]	0.133	0.003	0.05
Saturación de transferrina (%)	27.0 [25.2;28.7]	26.7 [24.9;28.5]	25.0 [23.3;26.6]	24.7 [22.8;26.6]	0.001	<0.001	0.026

Los datos se muestran como media [intervalo de confianza al 95%]. plong: psex: plong*sex

Tabla suplementaria 4. Concentraciones de los parámetros del metabolismo de la vitamina B12 a lo largo del seguimiento

Variable	Basal	Fin de tratamiento	RVS 12 semanas	RVS 48 semanas	P long	Psex	Plong*sex
Ac. Fólico (ng/mL)	8.93 [8.29;9.56]	7.55 [6.99;8.12]	7.94 [7.36;8.52]	8.36 [7.54;9.18]	0.017	0.53	0.194
Vitamina B12 (pg/mL)	349 [322;376]	305 [279;331]	290 [264;315]	295 [273;317]	0.049	0.058	0.386
Homocisteína (micomol/L)	11.1 [10.5;11.8]	11.3 [10.5;12.0]	11.8 [11.1;12.5]	11.7 [10.8;12.5]	0.005	0.333	0.123

Los datos se muestran como media [intervalo de confianza al 95%]. plong: psex: plong*sex



Article

Evaluation of Cardiovascular Risk Factors after Hepatitis C Virus Eradication with Direct-Acting Antivirals in a Cohort of Treatment-Naïve Patients without History of Cardiovascular Disease

Diego Casas-Deza ^{1,2}, Ana Martínez-Sapiña ³, Silvia Espina ^{1,2}, Beatriz Garcia-Rodriguez ^{2,4},
Eva M. Fernandez-Bonilla ¹, Alejandro Sanz-Paris ^{2,5}, Yolanda Gonzalez-Irazabal ^{2,4},
Vanessa Bernal-Monterde ^{1,2,*} and Jose M. Arbones-Mainar ^{2,6,7,*}

- ¹ Gastroenterology Department, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain; diegocasas8@gmail.com (D.C.-D.); silesipina@gmail.com (S.E.); evaferbo@yahoo.es (E.M.F.-B.)
- ² Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) Aragon, 50009 Zaragoza, Spain; bea_garcia_rodriguez@hotmail.com (B.G.-R.); sanzparisalejandro@gmail.com (A.S.-P.); yolgonira@gmail.com (Y.G.-I.)
- ³ Clinical Microbiology Department, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain; amartinezsa@salud.aragon.es
- ⁴ Clinical Biochemistry Department, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁵ Nutrition Department, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁶ Translational Research Unit, Miguel Servet University Hospital, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), 50009 Zaragoza, Spain
- ⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBn), Instituto Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: vbernal@gmail.com (V.B.-M.); jmarbones.iacs@aragon.es (J.M.A.-M.)



Citation: Casas-Deza, D.; Martínez-Sapiña, A.; Espina, S.; Garcia-Rodriguez, B.; Fernandez-Bonilla, E.M.; Sanz-Paris, A.; Gonzalez-Irazabal, Y.; Bernal-Monterde, V.; Arbones-Mainar, J.M. Evaluation of Cardiovascular Risk Factors after Hepatitis C Virus Eradication with Direct-Acting Antivirals in a Cohort of Treatment-Naïve Patients without History of Cardiovascular Disease. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 4049. <https://doi.org/10.3390/jcm11144049>

Academic Editors: Yasuhiro Tanaka and Pierluigi Toniutto

Received: 12 May 2022

Accepted: 11 July 2022

Published: 13 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Hepatitis C virus (HCV) produces changes at multiple levels in host metabolism, especially in lipid profile and cardio-metabolic risk. It is unclear how HCV eradication by direct-acting antivirals (DAAs) modifies those changes. Objective: To evaluate the impact of DAA treatment on different risk factors associated with cardiovascular disease. Methods: Prospective study with two-year follow-up. All patients treated with DAAs in the Liver Clinic of a tertiary hospital were included. Patients co-infected with HBV or HIV, with other causes of liver disease, on lipid-lowering treatment, pregnant, or with previous HCV treatment were excluded. The results were analyzed using linear mixed models. Results: 167 patients (53% female, 9.6% cirrhosis) were included. Low plasma lipid levels were observed before initiating HCV eradication. During the first year after treatment with DAA, we observed a sustained increase in cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol (only in men), and LDL-cholesterol levels. An ameliorated glycemic control was also observed with a decrease in fasting insulin and reduced HOMA. Iron metabolism and coagulation function also improved with lower levels of serum ferritin and prothrombin activity; these biochemical changes resulted in a new diagnosis of hypercholesterolaemia in 17.4% of patients, requiring initiation of statins in 15%. Two non-fatal cardiovascular events were observed during the first 2 years of follow-up. Conclusions: DAA treatments returned plasma lipids to the normal range without increasing either the occurrence of cardiovascular events or the consumption of lipid-lowering medication beyond what is normal in a sex- and age-matched population.

Keywords: HCV; cholesterol; lipids

1. Introduction

The Hepatitis C Virus (HCV) is an RNA virus that is one of the main causes of liver morbidity and mortality. It is estimated that in the world there are about 71 million infected people, with a worldwide incidence of 1.75 million new cases per year [1]; however,

HCV does not cause a direct cytopathic effect on host cells and most of its extrahepatic manifestations of chronic infection are likely related to the virus-mediated alteration of host metabolisms, such as immune responses and several metabolic pathways [2].

Ample evidence indicates that HCV interferes with carbohydrate and lipid metabolism, ultimately causing liver steatosis, insulin resistance (IR), and cardiovascular disease (CVD) [3]. Elevated circulating homocysteine, as well as alterations in iron metabolism, through their association with inflammation and oxidative stress, are also considered independent risk factors for CVD (reviewed in Ref. [4]). Not surprisingly, individuals with HCV showed significantly higher serum levels of homocysteine than non-infected controls [5]. Alterations in vitamin B12 and folate pathways, both required for homocysteine remethylation into methionine, are also affected during HCV infection [6]; likewise, elevated serum ferritin and iron levels have been common findings in patients with HCV since described by Di Bisceglie et al. [7]. Lastly, there is also considerable evidence that HCV is able to activate hemostasis through several mechanisms (reviewed in Ref. [8]) creating a prothrombotic state which ultimately can increase the risk of future cardiovascular events.

Initially, therapeutic options for HCV eradication were based on combinations of pegylated interferon and ribavirin, with low response rates [9]; however, the approval of the first direct action antiviral (DAA) in 2013 was supposed an extraordinary breakthrough in antiviral therapy, reaching rates of sustained viral response (SVR) close to 100% [10,11]. The whole concept of the disease has been modified and, although not completely eliminated, the risk of all-cause mortality and hepatocellular carcinoma (HCC) development has been now substantially reduced [11,12]; this has also shifted the focus from the fight for patients' survival to preventing the long-term effects of the HCV-related metabolic complications beyond the virologic cure.

DAA treatments decrease liver inflammation, improve transaminase levels and reduce liver fibrosis progression [13]; however, HCV eradication produces a simultaneous increase in serum cholesterol and LDL levels [14], creating a combination of circumstances that might aggravate the risk of atherosclerosis and CVD. The results of the different studies are, conversely, quite often contradictory, since some show increases in HDL cholesterol levels [15–18], but this is not reported in other studies [19–21] or even a decrease is observed [21]. In the case of triglycerides, disparate results have also been reported, with minimal or absent changes [17,22] or even decreases [14,23]. The virological cure seems to produce an improvement in IR, although there is no evidence of its long-term effect or whether it only occurs in specific populations [24,25]. On the other hand, DAA treatments seem to reduce iron and ferritin levels [26], while their effects on homocysteine metabolism have not been evaluated in prospective studies. Reports regarding the impact of DAA on the coagulation function have shown a reversal of hypercoagulability in patients with HCV-related cirrhosis [27] or an improvement of both the individual pro- and anti-coagulants with a net effect that does not substantially modify their balance [28].

We hypothesize that those disparate results might be explained, at least partially, because all these studies have been carried out in populations with different racial or ethnic statuses, different DAA treatment schemes, and different proportions of patients with liver cirrhosis; from 25% to 80% [29,30] or coinfection with HIV, present in up to the 60% in some studies [19]; moreover, sex differences in the prevalence and burden of CVD may also account for some of the above disparities [31]. Accordingly, this study sought a holistic approach with a complete and simultaneous evaluation of different risk factors associated with CVD. From the baseline, through the DAA treatments up to 2-year follow-up. As a secondary aim, we investigated possible sex differences regarding those risk factors and their longitudinal trajectories.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Considerations

The clinical research ethics committee of Aragon (CEICA) evaluated and approved the project with study code PI17/0390. Informed consent was collected from all patients who agreed to participate in the study.

2.2. Design and Selection Criteria

This is a single-centre, prospective, longitudinal, non-interventional study carried out in the hepatology outpatient department of the Miguel Servet University Hospital, a tertiary hospital in Zaragoza (Spain). The design is a before-after study, in which each patient is their own control, assessing changes before and after treatment.

All treatment-naïve patients with a confirmatory serological diagnosis of chronic HCV infection who had been referred to hepatology clinics for evaluation of treatment with DAA were consecutively recruited. Patients co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) and/or hepatitis B virus (HBV) were excluded. Patients with previous alterations in their lipid or under pharmacological treatment (hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia) were also excluded. Pregnant patients and those previously treated for HCV were also excluded. Patients with other causes of liver disease, such as cholestatic diseases, Wilson's disease, hemochromatosis, or autoimmune hepatitis were also excluded. Patients with heavy alcohol use were excluded too. Finally, patients with severe neuropsychiatric comorbidity that prevented proper follow-up were also excluded.

Alcohol consumption was defined as consumption of at least 20 g/day for men and 10 g/day for women, without reaching a risky intake. Heavy alcohol use was defined as consumption of >40 g/day for men and/or >25 g/day for women or >28 units per week for men and >17 units per week for women and/or ≥ 6 units per occasion for males and ≥ 4 units per occasion for females [32].

Four visits were made throughout the study. During the initial (baseline) visit, personal and family history, as well as anthropometric variables were collected by interview with the patient. All patients underwent a non-invasive assessment of liver fibrosis by transient elastography (FibroScan 430 Mini, Echosens, France). For an elastography measurement to be considered valid, it had to have an IQR < 30% and a percentage of valid measurements above 60%. Liver cirrhosis was defined as a transient elastography score of >14 kPa, or liver biopsy showing Metavir fibrosis 4, or clinical evidence of liver cirrhosis.

In all four visits, serum samples were obtained to assess biochemical parameters. After the baseline visit, the remaining determinations were made at the end of antiviral treatment, at 12 weeks after the end of treatment (SVR 12), and at 48 weeks after the end of treatment (SVR 48). Subsequently, a clinical follow-up was performed two years after antiviral treatment. Biochemical determinations were performed at the Clinical Biochemistry Department in the Miguel Servet University Hospital at four follow-up points (baseline, end of treatment, 12 weeks after the end of treatment, and 48 weeks after the end of treatment). All extractions were performed after 8 h of fasting by the patient. Variables related to liver function and damage (AST, ALT, GGT, FA, bilirubin, pre-albumin and albumin), iron profile (iron, ferritin, and transferrin saturation index), vitamin B12 metabolism (homocysteine and vitamin B12), glycemic profile (glucose, insulin, HOMA-IR), blood count, and coagulation were assessed. The serological indices FIB-4 [33] and APRI [34] as non-invasive markers of fibrosis were calculated. Additionally, a study of lipid metabolism, including triglycerides (TG), total cholesterol (CHOL), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, apolipoprotein A (apoA) and apolipoprotein B (apoB) was performed.

During follow-up, the occurrence of major cardiovascular events (nonfatal stroke, nonfatal myocardial infarction, and cardiovascular death) was assessed, as well as the initiation of lipid-lowering medications (statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and fibrates). We used the cohort Sanitas Data4Good to investigate the prevalence of lipid-lowering drugs in a representative cohort of the population from Spain; this cohort collects clinical records, medications, and pre-existing conditions prior to hospital admission.

2.3. Statistical Analysis

Results are presented as means and SDs for normal variables or medians and interquartile ranges (IQRs) for non-normal data. For the longitudinal investigation, we used an intent-to-treat (ITT) approach as some patients did not complete their follow-up according to protocol. All DAA-treated patients were included in the analyses regardless of subsequent drop-outs before the conclusion of the study. The data were modeled using linear mixed models (LMM) to (1) take into consideration the repeated assessment of each variable and (2) account for the effects of covariates on the variables' change over time. Those LMM models were, hence, adjusted for age and protease inhibitors intake and produced different p -values which captured the variation over time of each variable for the entire cohort (p_{long}), overall sex differences (p_{sex}), and sex-specific longitudinal changes (the interaction between longitudinal changes and sex; $p_{\text{long*sex}}$). Statistical analysis was carried out in R 4.1.2. and the appropriate packages.

3. Results

Between December 2017 and June 2019, 248 patients received antiviral treatment with DAAs at our institution, of whom 167 met the inclusion criteria and were included in the study. The patients' flowchart is shown in Figure 1.

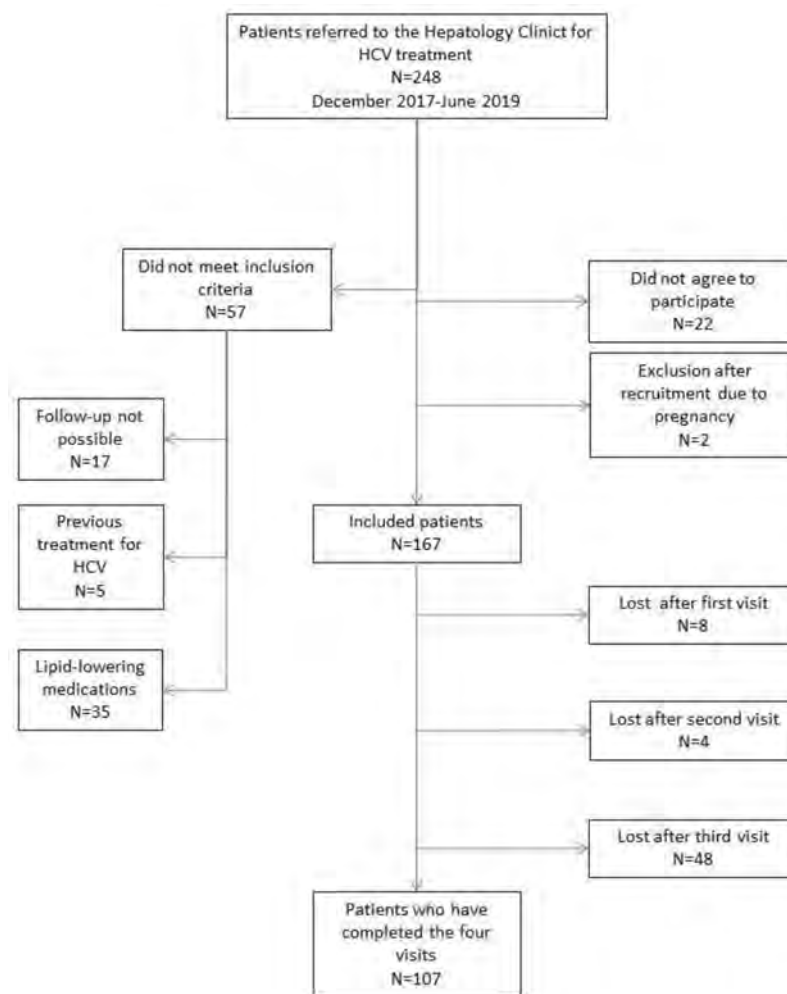


Figure 1. Patients' flowchart.

3.1. Baseline Characteristics

All patients were treatment-naïve and their characteristics are described in Table 1. Individuals' ages ranged from 21 to 88 years and women were slightly older than men

(57.3 y. vs. 53.3 y. on average respectively; $p = 0.039$). The most frequent viral genotype was 1, present in 70.9% of the patients. Characteristics related to HCV infection can be found in Table 2.

Table 1. Clinical status and patient background.

Variable	All n = 167	Men n = 88	Women n = 79	p-Value
Age	55.2 (12.4)	53.3 (10.8)	57.3 (13.6)	0.039
Personal history of CVD	3 (1.80%)	2 (2.28%)	1 (1.27%)	1.000
Stroke	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	1.000
Ischemic cardiopathy	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1.000
Peripheral vasculopathy	1 (0.60%)	1 (1.14%)	0 (0.00%)	1.000
Family history of CVD				0.091
None	122 (73.1%)	69 (78.4%)	53 (67.1%)	
Stroke	2 (1.20%)	1 (1.14%)	1 (1.27%)	
Ischemic cardiopathy	30 (18.0%)	10 (11.4%)	20 (25.3%)	
Peripheral vasculopathy	13 (7.78%)	8 (9.09%)	5 (6.33%)	
CV risk factors	51 (30.5%)	26 (29.5%)	25 (31.6%)	0.900
Hypertension	37 (22.2%)	19 (21.6%)	18 (22.8%)	1.000
Diabetes Mellitus	7 (4.19%)	5 (5.68%)	2 (2.53%)	0.448
Smoking				0.077
Never	84 (50.3%)	37 (42.0%)	47 (59.5%)	
Previously	30 (18.0%)	19 (21.6%)	11 (13.9%)	
Current	53 (31.7%)	32 (36.4%)	21 (26.6%)	
Alcohol use	23 (13.8%)	16 (18.2%)	7 (8.86%)	0.128
Body mass index (kg/m ²)	25.0 [22.6;27.1]	25.0 [23.4;27.1]	24.9 [22.0;27.3]	0.748
Abdominal perimeter (cm)	92.3 (11.2)	93.3 (10.1)	91.3 (12.3)	0.446
Liver fibrosis (kPa)	6.60 [5.40;10.2]	7.00 [5.50;11.3]	6.35 [5.15;8.80]	0.141
Liver fibrosis (Metavir)				0.384
1	87 (53.4%)	41 (48.2%)	46 (59.0%)	
2	26 (16.0%)	13 (15.3%)	13 (16.7%)	
3	27 (16.6%)	16 (18.8%)	11 (14.1%)	
4	23 (14.1%)	15 (17.6%)	8 (10.3%)	
Liver cirrhosis				0.670
No	151 (90.4%)	79 (89.8%)	72 (91.1%)	
Yes, without PHT	9 (5.39%)	6 (6.82%)	3 (3.80%)	
Yes, with PHT	7 (4.19%)	3 (3.41%)	4 (5.06%)	
Esophageal varices	7 (4.19%)	4 (3.41%)	3 (3.80%)	1.000
Ascites	1 (0.60%)	1 (1.14%)	0 (0.00%)	1.000

CVD: Cardiovascular Disease; CV: cardiovascular; PHT: Portal Hypertension.

Table 2. HCV infection characteristics and treatment details.

Variable	All n = 167	Men n = 88	Women n = 79	p-Value
Treatment				0.909
Sofosbuvir/Velpatasvir	66 (39.5%)	36 (40.9%)	30 (38.0%)	
Ledipasvir/Sofosbuvir	6 (3.59%)	3 (3.41%)	3 (3.80%)	
Glecaprevir/Pibrentasvir	65 (38.9%)	35 (39.8%)	30 (38.0%)	
Elbasvir/Grazoprevir	30 (18.0%)	14 (15.9%)	16 (20.3%)	
Treatment length				0.848
12 weeks	96 (57.8%)	52 (59.1%)	44 (56.4%)	
8 weeks	70 (42.2%)	36 (40.9%)	34 (43.6%)	
Viral genotype				0.352
1	5 (3.03%)	4 (4.65%)	1 (1.27%)	
1a	50 (30.3%)	29 (33.7%)	21 (26.6%)	
1b	62 (37.6%)	31 (36.0%)	31 (39.2%)	
2	4 (2.42%)	1 (1.16%)	3 (3.80%)	
2a/c	2 (1.21%)	0 (0.00%)	2 (2.53%)	
3	16 (9.70%)	8 (9.30%)	8 (10.1%)	
3a	2 (1.21%)	0 (0.00%)	2 (2.53%)	
4	21 (12.7%)	10 (11.6%)	11 (13.9%)	
4c/d	2 (1.21%)	2 (2.33%)	0 (0.00%)	
5	1 (0.61%)	1 (1.16%)	0 (0.00%)	
Viral load (log)	6.05 [5.36;6.54]	6.11 [5.62;6.53]	5.89 [5.16;6.55]	0.199

More than half of the patients had a low degree of fibrosis (F0–F1) and only 16 had liver cirrhosis (9.58%). Of the 16 patients with liver cirrhosis, 7 had portal hypertension, all of them with esophageal varices. Only one had ascites at the time of treatment. As for the total cohort, only 2 patients (1.20%) had a history of cardiovascular events. In terms of cardiovascular risk factors, 51 patients (30.5%) had some factor, the most prevalent being hypertension (22.2%), followed by diabetes (4.19%). Only 18% of patients were smokers at the time of the study and 13.8% of the cohort had some alcohol consumption at the time of treatment.

All patients were treated with DAA combinations: 56.9% with drugs with protease inhibitors (Glecaprevir/Pibrentasvir or Elbasvir/Grazoprevir) and 43.1% with drugs without protease inhibitors (Sofosbuvir/Velpatasvir or Sofosbuvir/Ledipasvir). The overall sustained virological response (SVR was 100%)

3.2. Longitudinal Hepatic Changes

At the 1-year follow-up, there was an overall reduction in mean total bilirubin ($p_{\text{long}} < 0.001$) (Table 3); however, a sex-specific effect showed an ~20% decrease in men, while women only experienced a 5% decrease in total bilirubin ($p_{\text{long}^* \text{sex}} = 0.032$). We also observed an increase in albumin and pre-albumin during the follow-up (both $p_{\text{long}} < 0.001$). Again, a sex-specific effect occurred, and men had an ~25% increase in pre-albumin while women only experienced a 5% increase in total pre-albumin ($p_{\text{long}^* \text{sex}} = 0.002$).

Table 3. Hepatic changes from baseline to SVR48.

Variable	Men				Women				P _{long}	P _{sex}	P _{long*sex}
	Basal n = 87	post-T n = 81	SVR12 n = 80	SVR48 n = 51	Basal n = 79	post-T n = 78	SVR12 n = 75	SVR48 n = 56			
Bilirubin (mg/dL)	0.74 [0.68;0.79]	0.65 [0.59;0.70]	0.63 [0.58;0.69]	0.60 [0.53;0.67]	0.65 [0.58;0.73]	0.59 [0.54;0.65]	0.58 [0.52;0.65]	0.62 [0.54;0.71]	<0.001	0.006	0.032
Albumin (g/dL)	4.25 [4.17;4.32]	4.28 [4.21;4.35]	4.34 [4.28;4.41]	4.34 [4.22;4.46]	4.11 [4.04;4.18]	4.12 [4.06;4.18]	4.17 [4.10;4.23]	4.26 [4.19;4.34]	<0.001	0.002	0.611
Pre-albumin (mg/dL)	22.3 [21.0;23.7]	26.2 [24.7;27.6]	27.1 [25.7;28.5]	28.1 [26.0;30.1]	18.4 [17.2;19.7]	20.4 [19.3;21.5]	21.7 [20.6;22.9]	22.0 [20.5;23.5]	<0.001	<0.001	0.002
Alkaline phosphatase (U/L)	84.7 [79.7;89.6]	85.0 [79.7;90.4]	82.3 [77.3;87.3]	79.2 [74.2;84.2]	93.0 [85.9;100]	91.5 [84.8;98.2]	88.8 [81.8;95.8]	89.8 [82.2;97.4]	<0.001	0.175	0.523
GGT (U/L)	91.9 [66.6;117]	29.1 [24.1;34.2]	30.5 [24.9;36.2]	36.4 [27.0;45.7]	60.3 [46.5;74.1]	26.3 [20.0;32.6]	25.8 [20.9;30.7]	23.9 [19.7;28.2]	<0.001	0.023	0.255
AST (U/L)	63.0 [51.7;74.3]	26.9 [24.3;29.4]	26.1 [23.7;28.4]	27.2 [23.1;31.2]	62.6 [43.1;82.2]	25.1 [22.1;28.1]	24.5 [19.7;29.4]	22.7 [20.8;24.7]	<0.001	0.379	0.786
ALT (U/L)	81.7 [65.8;97.5]	23.9 [20.3;27.5]	21.5 [18.7;24.4]	24.5 [17.7;31.4]	62.7 [45.7;79.7]	20.9 [16.3;25.6]	19.3 [12.4;26.2]	15.8 [14.0;17.5]	<0.001	0.036	0.447
APRI	1.08 [0.73;1.42]	0.44 [0.36;0.51]	0.41 [0.33;0.49]	0.39 [0.30;0.47]	1.07 [0.59;1.55]	0.41 [0.31;0.50]	0.37 [0.27;0.47]	0.33 [0.27;0.38]	<0.001	0.465	0.772
FIB-4	2.54 [2.03;3.06]	1.92 [1.67;2.17]	1.92 [1.66;2.17]	1.76 [1.52;2.01]	2.99 [2.23;3.76]	2.13 [1.73;2.54]	2.07 [1.72;2.43]	2.06 [1.66;2.46]	<0.001	0.922	0.636

Data are shown as the median and interquartile range (95% confidence interval); post-T: post-treatment, SVR12: 12 weeks after treatment, SVR 48: 28 weeks after treatment, APRI: AST to Platelet Ratio Index, FIB-4: Fibrosis-4 Index.

Liver function tests significantly improved from baseline to SVR48 irrespective of sex. Phosphatase alkaline steadily decreased during the follow-up ($p_{long} < 0.001$) while we observed an abrupt ~3-fold reduction in the transaminase values occurring mainly during DAAs treatments ($p_{long} < 0.001$ for GGT, ALT, and AST); this steep reduction paralleled the fibrosis scores based on laboratory parameters, APRI and FIB-4, which also showed a significant early improvement (both $p_{long} < 0.001$) during the treatment.

3.3. Longitudinal Extra-Hepatic Changes

The average levels of triglycerides (TG), total cholesterol (CHOL), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, apoA and apoB rose significantly during the follow-up for the entire cohort ($p_{long} = 0.003$ for TG and $p_{long} < 0.001$ for CHOL, LDL, HDL, apoA and apoB) (Figure 2 and Supplementary Table S1); this elevation was clearly visible at the end of treatment already for CHOL and LDL and was maintained for the entire follow-up (Figure 2). Compared to men, women had consistently lower levels of TG ($p_{sex} = 0.023$) and increased HDL ($p_{sex} < 0.001$) throughout the follow-up. We observed an interaction between sex and longitudinal changes by which the magnitude of the increase in HDL, from the basal analysis to the SVR48, was greater in men than in women (15% vs. 2.6% respectively, $p_{long*sex} = 0.018$).

Figure 3 illustrates that during 1-year of follow-up neither glucose nor leptin presented significant changes compared to baseline ($p_{long} = 0.077$) but we did observe a reduction of insulin upon DAA treatments ($p_{long} = 0.004$) which translated to an improved homeostatic model assessment (HOMA-IR) for the entire cohort ($p_{long} = 0.006$). Women consistently presented greater values of leptin ($p_{sex} < 0.001$) and reduced HOMA ($p_{sex} = 0.045$) over the course of the study, while none of these parameters presented sex-specific changes in their longitudinal trajectories.

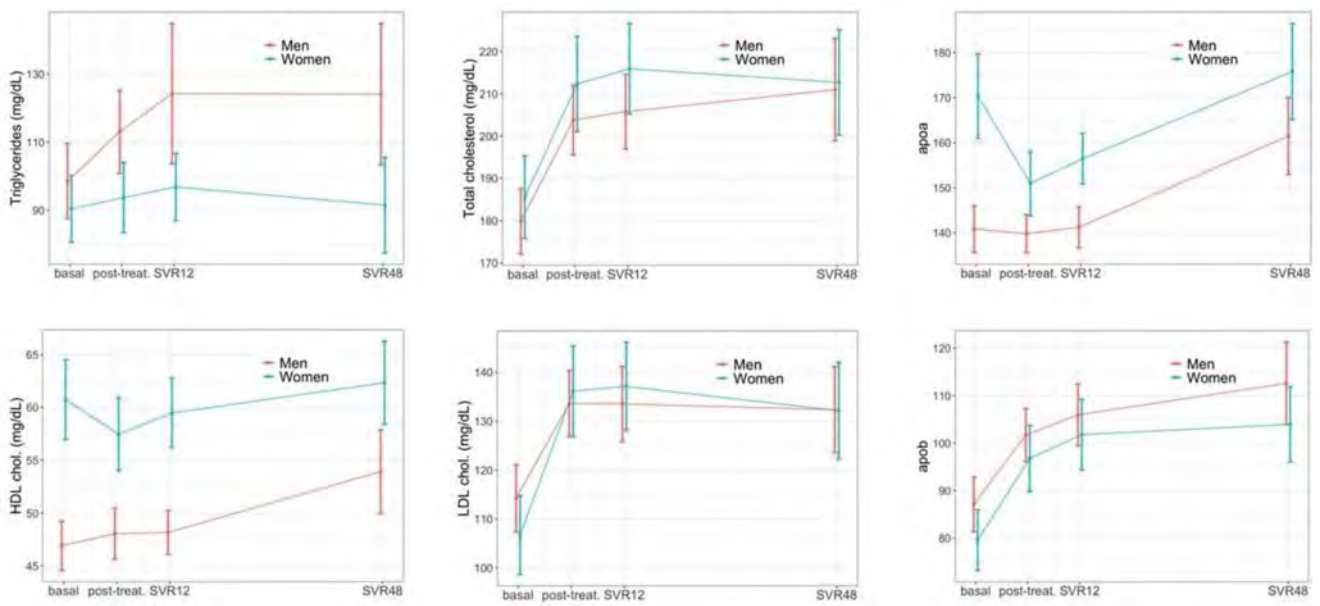


Figure 2. Lipid metabolism changes during follow-up.

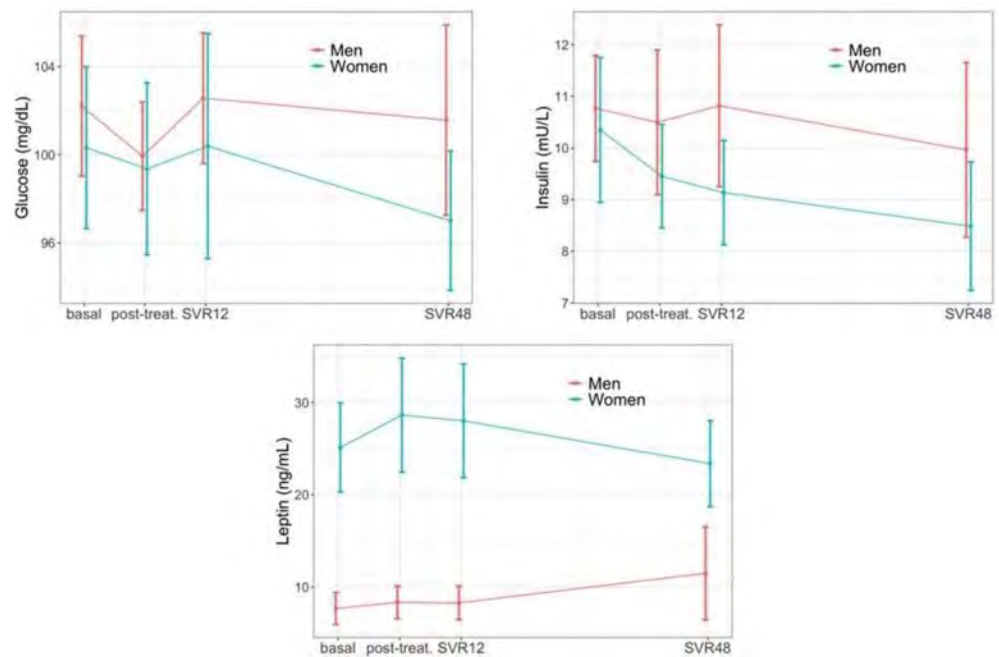


Figure 3. Glycemic profile changes during follow up.

The levels of serum iron, ferritin and transferrin saturation decreased significantly during follow-up (all $p_{\text{long}} < 0.001$), while transferrin was unaffected (Figure 4). It is worth noting that, compared to men, women had significant increased transferrin ($p_{\text{sex}} = 0.003$) and reduced values of serum iron ($p_{\text{sex}} = 0.005$), ferritin ($p_{\text{sex}} < 0.001$), and transferrin saturation ($p_{\text{sex}} < 0.001$) throughout the follow-up. We also observed a sex-specific effect in the magnitude of the reduction in the transferrin saturation (14% vs. 2.1% for men and women, respectively, $p_{\text{long} \times \text{sex}} = 0.025$).

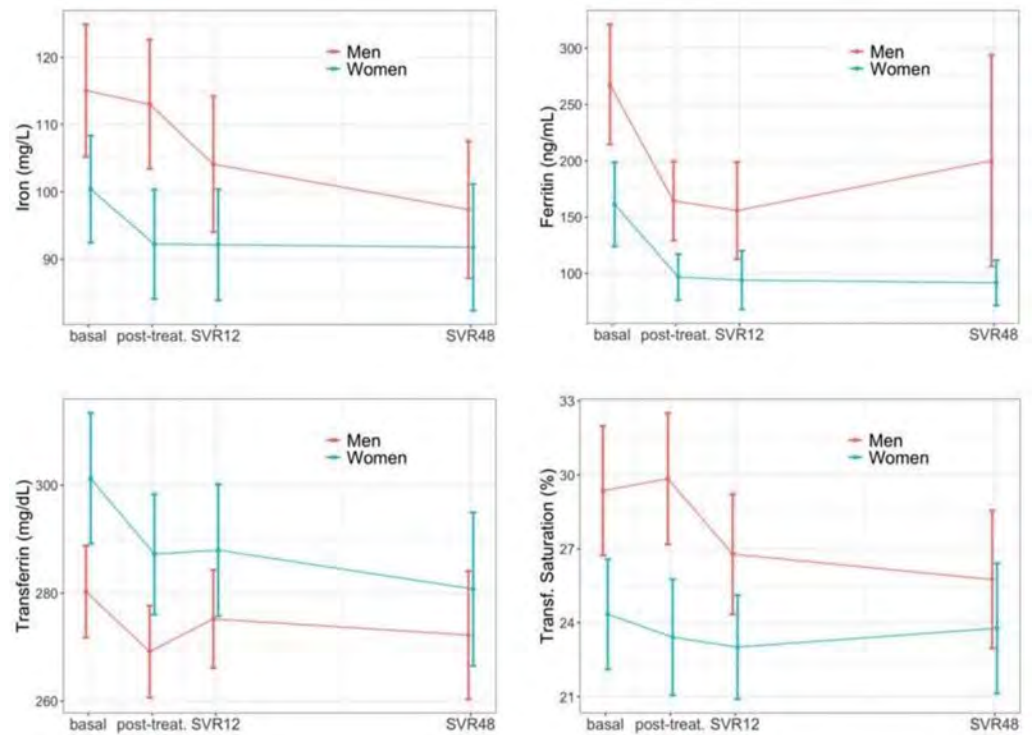


Figure 4. Iron metabolism changes during follow-up.

During the follow-up, there was an overall reduction in folic acid ($p_{\text{long}} = 0.029$) and vitamin B12 ($p_{\text{long}} < 0.001$) accompanied by an increase in homocysteine ($p_{\text{long}} = 0.016$). None of these parameters presented sex-specific changes in their longitudinal trajectories (Figure 5).

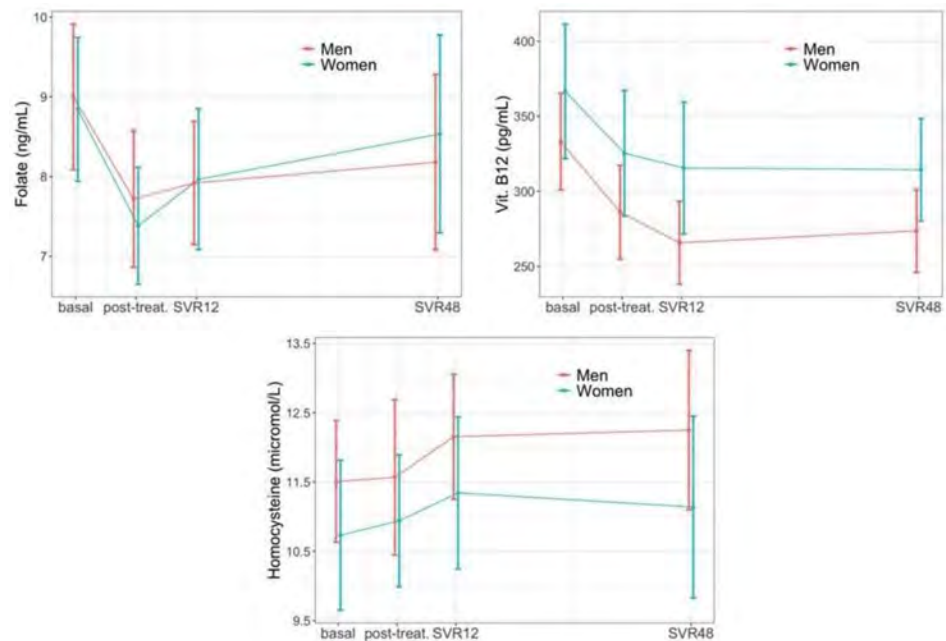


Figure 5. Vitamine B12, folate and homocysteine changes during follow-up.

Next, we sought to evaluate the effects of DAA on coagulation changes in our cohort. The international normalized ratio (INR), partial thromboplastin time (PTT), prothrombin activity (PA), and derived fibrinogen changed significantly during the follow-up for the entire cohort (all $p_{\text{long}} < 0.001$); however, those changes occurred at different times depending

on the studied variables. Thus, derived fibrinogen increased during DAA treatments while INR started to decline at SVR12 mirroring the increase in TTP and prothrombin activity. No sex-specific changes for those variables were observed in their longitudinal trajectories.

Cardiovascular events and initiation of lipid-lowering medications were assessed 2 years after DAA treatments. Two patients had non-fatal cardiovascular events (1 acute myocardial infarction and 1 stroke) and 25 patients (15%) had started lipid-lowering treatments during the 2-year follow-up. Finally, we investigated whether the use of these medications was greater than expected in the general population. For that, our study cohort was sex- and age-matched (1:3) with a large cohort of the hospitalized population from Spain in which drug usage before admission had been recorded (Figure 6). We did not observe significant differences between both cohorts in the percentage of individuals on lipid-lowering medication ($p = 0.264$).

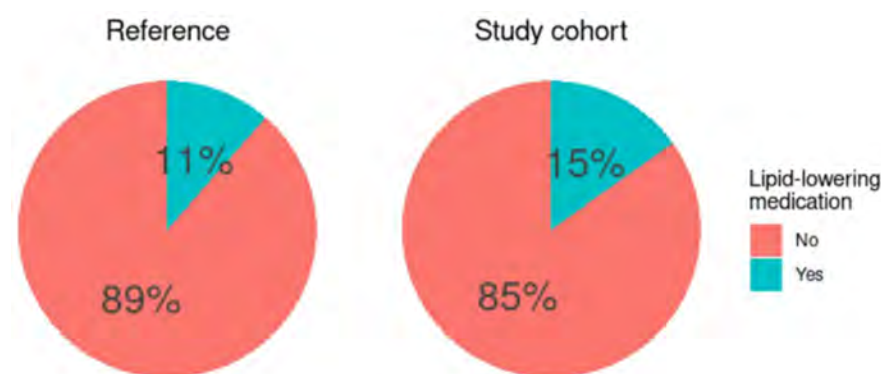


Figure 6. Comparison of the usage of lipid-lowering medication between the study cohort and a reference cohort.

4. Discussion

In this study, DAAs for HCV eradication in treatment-naïve patients was associated with increased plasma lipids and homocysteine, improved glycemic control and iron homeostasis, as well as reduced prothrombin activity during the first year post-treatment, and these changes occurred in both sexes. We observed 2 new non-fatal cardiovascular events during the first 2 years of follow-up of a cohort of 167 individuals with a median age of 55.2 years.

The advent of DAAs, with cure rates of 95–100%, changed the disease paradigm. Despite its very high effectiveness in eradicating the infection, the effect of this treatment and the cure of the virus on the host metabolism remains an issue that is not fully clarified. Several studies have tried to assess the impact of DAA treatment on host metabolism, with very mixed results. Most of the studies conducted were retrospective, which is an important limitation. In addition, the inclusion of special populations (HIV co-infected patients, cirrhotic patients, transplant recipients, etc.) may lead to biased results.

Therefore, our study sought to identify as purely as possible the effect of antiviral treatment and eradication of HCV infection. For this reason, co-infected, transplanted or non-naïve patients, as well as those on lipid-lowering treatments were excluded from the study. Although it was not an exclusion criterion, the proportion of patients with advanced liver disease in our cohort is very low (9.6%). Furthermore, our study is one of the studies with the longest follow-up (1 year analytically and 2 years clinically); this makes it possible to verify the temporality of the changes observed in the early stages of follow-up. Early changes might be a direct effect of DAA treatments, while medium- and long-term changes might be explained by the HCV eradication and liver status amelioration.

Alterations in the lipid profile of HCV-infected patients have been clearly established; these changes are due to the interaction between HCV and host cholesterol synthesis pathways. The virus hijacks these pathways for its own replicative cycle [35,36], thus causing changes in the patient's basal metabolism; these alterations in lipid metabolism

lead to an increased risk of CVD in HCV-infected patients, with increased morbidity and mortality from extra-hepatic causes [37,38]. Recently, HCV eradication by DAAs translated into a significant reduction of cardiovascular events in a prediabetic population [39] as well as in a large cohort with a high prevalence of advanced fibrosis (F3–F4: 70.5%) [40]. In our study, with a low prevalence of diabetes and advanced fibrosis, all lipid parameters increased after HCV eradication. Total cholesterol and LDL-cholesterol showed the earliest and most pronounced increase. Because of its importance and its occurrence right after DAA treatments, this phenomenon has been the easiest to identify in all studies, including those that are retrospective, with short follow-ups, or with heterogeneous populations.

On the other hand, triglycerides and HDL cholesterol showed less abrupt and more gradual increases. Furthermore, in both cases, a sex-dependent effect was observed, with the increase being mainly in men. Taking into account HDL, these results were in line with those observed by Inoue et al. [17], Gonzalez-Colominas et al. [22], and Shimizu et al. [41], all long follow-up studies. Interestingly, studies that reported no differences, such as those from Cheng et al. [42], Jain et al. [43], and Ichikawa et al. [44] had reduced follow-ups (<6 months). As for triglycerides, only the studies by Doyle et al. [45] and Cheng et al. [39] observed an increase in serum levels. Again, it is likely that the different methodologies of the studies have influenced the disparity in the results of the previous studies, although this parameter was not assessed in many of the studies. Most of the studies in which no changes in triglyceride levels were observed have reduced sample sizes and those with larger sample sizes had a significant percentage of HIV co-infected patients [21,46]. HIV antiretroviral treatments may cause significant changes in triglyceride levels, which may have masked changes due to HCV treatment.

The changes in glucose and insulin metabolism that we observed in our study were similar to those previously described in the literature [47–49]. Although we did not see a reduction in serum glucose levels, we did see a reduction in insulin levels. These changes were reflected in an improved HOMA-IR index, which is consistent with a recent report of significant reductions in HOMA-insulin resistance and an increase in HOMA-insulin sensitivity following HCV clearance by DAA treatment [50]; however, as with lipid metabolism, some studies have found no such changes [25,45,46], which can be explained, at least partially, by a genotype-dependent effect whereby an improvement in carbohydrate metabolism occurs in those patients infected with HCV genotype 1 [51]. In our cohort ~70% of the patients were infected with this genotype, which may explain why we observed these changes.

The relationship between vitamin B12 and liver disease has been previously described [52–54]. Several studies have postulated elevated B12 levels as a possible marker of advanced liver disease or hepatocarcinoma [55,56]; this relationship has also been observed in patients with chronic HCV infection and the interaction of vitamin B12 with the HCV replication cycle has been described [6]. In these patients, higher B12 levels were associated with more advanced levels of liver fibrosis. Our results show a marked decrease in B12 levels after DAA treatment paralleling the improvement of liver damage, reflected in the decrease of liver damage markers during follow-up and the improvement of APRI and FIB-4 indices, as it has been previously described [57]. In a similar way to vitamin B12, iron metabolism is modified by HCV infection but also influences its replication cycle [58]. HCV infection reduces hepcidin levels, which alters iron metabolism [59]; moreover, ferritin is an inflammatory marker elevated during chronic infection [60]. Our results showed a change in the ferric profile, with a generalized normalization of the parameters, especially ferritin.

To summarize our main findings, chronic HCV infection reduced plasma lipids, and both cholesterol and triglyceride levels increased after HCV eradication; however, this increase should be considered as a return to normal values according to sex and age. Thus, median values of total cholesterol were 210 and 215 mg/dL for men and women respectively in our cohort after 1-year follow-up; these values are in line with those of 206 and 214 mg/dL for men and women in the age range of 45–64 years, as reported in the ENRICA study [61], one of the largest national population data on plasma lipid in Spain.

In addition, although 15% of patients started lipid-lowering treatments, this percentage is not different from the prevalence of lipid-lowering medication use among the general population matched by age and sex. In our opinion, the prevention of cardiovascular risk in these patients is essential. Close surveillance should be implemented in patients with previous cardiovascular risk factors or with alterations during follow-up. We propose that such monitoring should probably be performed by the primary care physician and integrated into the routine follow-up of the patient.

Our work has, in our view, several strengths. The first two are its prospective design and the large sample size. In addition, it is a cohort without co-infections (neither HBV nor HIV), with strict selection criteria and a very low percentage of patients with cirrhosis; moreover, the 2-year follow-up time is also very important, as this has allowed long-term changes to be assessed. It can be argued that 2 years may be too short to demonstrate any meaningful changes in cardiovascular outcomes; however, two recent studies reported a significant reduction of cardiovascular events after HCV clearance by DAAs with median follow-ups of 24 and 28 months [39,40]. Weaknesses include loss to follow-up and the absence of biopsy assessment of fibrosis. Other limitations are the observational nature of the study which prevents establishing a cause–effect relationship between DAA therapy and the observed results. In addition, the study is monocentric, which may lead to a bias in the selection of patients.

5. Conclusions

Eradication of HCV with DAAs causes long-lasting changes in the patient's lipid, glycaemic and ferric profiles, as well as in vitamin B12 metabolism, even in an otherwise healthy cohort of patients; these changes were not trivial because they led to the start of new treatments in almost a fifth of the patients; however, we should note that DAA treatments returned plasma lipids to the normal range without increasing the occurrence of cardiovascular events beyond normal in an age-matched population.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11144049/s1>, Table S1: Serum lipid concentrations during follow up.

Author Contributions: Conceptualization, S.E., V.B.-M., A.M.-S. and J.M.A.-M.; Data curation, J.M.A.-M.; Formal analysis, J.M.A.-M.; Investigation, D.C.-D., A.M.-S., A.S.-P., Y.G.-I., B.G.-R. and E.M.F.-B.; Supervision, V.B.-M. and J.M.A.-M.; Writing-original draft, D.C.-D.; Writing-review and editing, D.C.-D., V.B.-M. and J.M.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from Gilead Fellowship Program 2017 (project: "Lipoprotein profiling 4 HCV infection"). D.C.-D. is partially supported by a Rio-Hortega fellowship from Instituto de Salud Carlos III. J.M.A.-M. also has support from the regional government of Aragón (B03_20R) co-financed with the FEDER Aragón: "Construyendo Europa desde Aragón".

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the clinical research ethics committee of Aragón (CEICA) evaluated and approved the project with study code PI17/0390.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request to the corresponding author with prior authorization of our Ethical Committee that can be obtained at <https://www.iacs.es/investigacion/comite-de-etica-de-la-investigacion-de-aragon-ceica/ceica-evaluaciones-y-otras-presentaciones> (accessed on 10 May 2022).

Acknowledgments: We want to acknowledge the contribution of C. Strawberry and P. Kurtz to cirrhosis awareness.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. WHO. *WHO Global Hepatitis Report*; WHO, World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017; 83p.
2. Chang, M.-L. Metabolic alterations and hepatitis C: From bench to bedside. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 1461–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Negro, F.; Craxì, A.; Sulkowski, M.S.; Feld, J.J.; Manns, M.P. Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 1345–1360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Baggott, J.E.; Tamura, T. Homocysteine, Iron and Cardiovascular Disease: A Hypothesis. *Nutrients* **2015**, *7*, 1108–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Petta, S.; Bellia, C.; Mazzola, A.; Cabibi, D.; Cammà, C.; Caruso, A.; Di Marco, V.; Craxì, A.; Ciaccio, M. Methylenetetrahydrofolate reductase homozygosity and low-density lipoproteins in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **2011**, *19*, 465–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lott, W.B.; Takyar, S.S.; Tuppen, J.; Crawford, D.H.G.; Harrison, M.; Sloots, T.P.; Gowans, E.J. Vitamin B12 and hepatitis C: Molecular biology and human pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4916–4921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Di Bisceglie, A.M.; Axiotis, C.A.; Hoofnagle, J.H.; Bacon, B.R. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* **1992**, *102*, 2108–2113. [[CrossRef](#)]
8. González-Reimers, E.; Quintero-Platt, G.; Martín-González, C.; Pérez-Hernández, O.; Romero-Acevedo, L.; Santolaria-Fernández, F. Thrombin activation and liver inflammation in advanced hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 4427–4437. [[CrossRef](#)]
9. Borroni, G.; Andreoletti, M.; Casiraghi, M.A.; Ceriani, R.; Guerzoni, P.; Omazzi, B.; Terreni, N.; Salerno, F. Effectiveness of pegylated interferon/ribavirin combination in ‘real world’ patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27*, 790–797. [[CrossRef](#)]
10. Asselah, T.; Marcellin, P.; Schinazi, R.F. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver Int.* **2018**, *38*, 7–13. [[CrossRef](#)]
11. Carrat, F.; Fontaine, H.; Dorival, C.; Simony, M.; Diallo, A.; Hezode, C.; De Ledinghen, V.; Larrey, D.; Haour, G.; Bronowicki, J.-P.; et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: A prospective cohort study. *Lancet* **2019**, *393*, 1453–1464. [[CrossRef](#)]
12. Rinaldi, L.; Perrella, A.; Guarino, M.; De Luca, M.; Piai, G.; Coppola, N.; Pafundi, P.C.; Ciardiello, F.; Fasano, M.; Martinelli, E.; et al. Incidence and risk factors of early HCC occurrence in HCV patients treated with direct acting antivirals: A prospective multicentre study. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 292. [[CrossRef](#)]
13. Ioannou, G.N.; Feld, J.J. What are the benefits of a sustained virologic response to direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection? *Gastroenterology* **2019**, *156*, 446–460. [[CrossRef](#)]
14. Meissner, E.G.; Lee, Y.-J.; Osinusi, A.; Sims, Z.; Qin, J.; Sturdevant, D.; McHutchison, J.; Subramanian, M.; Sampson, M.; Naggie, S.; et al. Effect of sofosbuvir and ribavirin treatment on peripheral and hepatic lipid metabolism in chronic hepatitis C virus, genotype 1–infected patients. *Hepatology* **2015**, *61*, 790–801. [[CrossRef](#)]
15. Chida, T.; Kawata, K.; Ohta, K.; Matsunaga, E.; Ito, J.; Shimoyama, S.; Yamazaki, S.; Noritake, H.; Suzuki, T.; Suda, T.; et al. Rapid Changes in Serum Lipid Profiles during Combination Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir in Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1b. *Gut Liver* **2018**, *12*, 201–207. [[CrossRef](#)]
16. Endo, D.; Satoh, K.; Shimada, N.; Hokari, A.; Aizawa, Y. Impact of interferon-free antiviral therapy on lipid profiles in patients with chronic hepatitis C genotype 1b. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 2355–2364. [[CrossRef](#)]
17. Inoue, T.; Goto, T.; Iio, E.; Matsunami, K.; Fujiwara, K.; Shinkai, N.; Matsuura, K.; Matsui, T.; Nojiri, S.; Tanaka, Y. Changes in serum lipid profiles caused by three regimens of interferon-free direct-acting antivirals for patients infected with hepatitis C virus. *Hepatol. Res.* **2018**, *48*, E203–E212. [[CrossRef](#)]
18. Graf, C.; Welzel, T.; Bogdanou, D.; Vermehren, J.; Beckel, A.; Bojunga, J.; Friedrich-Rust, M.; Dietz, J.; Kubesch, A.; Mondorf, A.; et al. Hepatitis C Clearance by Direct-Acting Antivirals Impacts Glucose and Lipid Homeostasis. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2702. [[CrossRef](#)]
19. Townsend, K.; Meissner, E.G.; Sidharthan, S.; Sampson, M.; Remaley, A.T.; Tang, L.; Kohli, A.; Osinusi, A.; Masur, H.; Kotttilil, S. Interferon-Free Treatment of Hepatitis C Virus in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Subjects Results in Increased Serum Low-Density Lipoprotein Concentration. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2016**, *32*, 456–462. [[CrossRef](#)]
20. Sun, H.-Y.; Cheng, P.-N.; Tseng, C.-Y.; Tsai, W.-J.; Chiu, Y.-C.; Young, K.-C. Favouring modulation of circulating lipoproteins and lipid loading capacity by direct antiviral agents grazoprevir/elbasvir or ledipasvir/sofosbuvir treatment against chronic HCV infection. *Gut* **2017**, *67*, 1342–1350. [[CrossRef](#)]
21. Mauss, S.; Berger, F.; Wehmeyer, M.H.; Ingiliz, P.; Hueppe, D.; Lutz, T.; Simon, K.G.; Schewe, K.; Rockstroh, J.K.; Baumgarten, A.; et al. Effect of Antiviral Therapy for HCV on Lipid Levels. *Antivir. Ther.* **2017**, *22*, 81–88. [[CrossRef](#)]
22. González-Colominas, E.; Batlle, M.; Monge-Escartín, I.; Duran, X.; Viu, A.; de Antonio-Cuscó, M.; Grau, S.; Bessa, X.; Carrión, J.A. Impact of HCV cure with drug-acting antivirals in the use of concomitant medication and lipid profile: Follow-up data 2 years after the sustained virological response. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *32*, 214–222. [[CrossRef](#)]
23. El Sagheer, G.; Soliman, E.; Ahmad, A.; Hamdy, L. Study of changes in lipid profile and insulin resistance in Egyptian patients with chronic hepatitis C genotype 4 in the era of DAAs. *Libyan J. Med.* **2018**, *13*, 1435124. [[CrossRef](#)]

24. Drazilova, S.; Janicko, M.; Skladany, L.; Kristian, P.; Oltman, M.; Szantova, M.; Krkoska, D.; Mazuchova, E.; Piesecka, L.; Vahalova, V.; et al. Glucose Metabolism Changes in Patients with Chronic Hepatitis C Treated with Direct Acting Antivirals. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *2018*, 6095097. [[CrossRef](#)]
25. Li, J.; Gordon, S.C.; Rupp, L.B.; Zhang, T.; Trudeau, S.; Holmberg, S.D.; Moorman, A.C.; Spradling, P.R.; Teshale, E.H.; Boscarino, J.A.; et al. Sustained virological response does not improve long-term glycaemic control in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Liver Int.* **2018**, *39*, 1027–1032. [[CrossRef](#)]
26. Carvalho, J.R.; Velosa, J.; Serejo, F. Lipids, glucose and iron metabolic alterations in chronic hepatitis C after viral eradication—comparison of the new direct-acting antiviral agents with the old regimens. *Scand. J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 857–863. [[CrossRef](#)]
27. Russo, F.P.; Zanetto, A.; Campello, E.; Bulato, C.; Shalaby, S.; Spiezia, L.; Gavasso, S.; Franceschet, E.; Radu, C.; Senzolo, M.; et al. Reversal of hypercoagulability in patients with HCV-related cirrhosis after treatment with direct-acting antivirals. *Liver Int.* **2018**, *38*, 2210–2218. [[CrossRef](#)]
28. Tripodi, A.; D'Ambrosio, R.; Padovan, L.; Tosetti, G.; Aghemo, A.; Primignani, M.; Chantarangkul, V.; Peyvandi, F.; Colombo, M. Evaluation of coagulation during treatment with directly acting antivirals in patients with hepatitis C virus related cirrhosis. *Liver Int.* **2017**, *37*, 1295–1303. [[CrossRef](#)]
29. Morales, A.L.; Junga, Z.; Singla, M.B.; Sjogren, M.; Torres, D. Hepatitis C eradication with sofosbuvir leads to significant metabolic changes. *World J. Hepatol.* **2016**, *8*, 1557–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gitto, S.; Cicero, A.F.; Loggi, E.; Giovannini, M.; Conti, F.; Grandini, E.; Guarneri, V.; Scuteri, A.; Vitale, G.; Cursaro, C.; et al. Worsening of Serum Lipid Profile after Direct Acting Antiviral Treatment. *Ann. Hepatol.* **2018**, *17*, 64–75. [[CrossRef](#)]
31. Mosca, L.; Barrett-Connor, E.; Wenger, N.K. Sex/ gender differences in cardiovascular disease prevention: What a difference a decade makes. *Circulation* **2011**, *124*, 2145–2154. [[CrossRef](#)]
32. Ministerio de Sanidad. *Límites de Consumo de Bajo Riesgo de Alcohol. Actualización del Riesgo Relacionado con los Niveles de Consumo de Alcohol, el Patrón de Consumo y el Tipo de Bebida*; Ministerio de Sanidad: Madrid, Spain, 2020.
33. Sterling, R.K.; Lissen, E.; Clumeck, N.; Sola, R.; Correa, M.C.; Montaner, J.; Sulkowski, M.S.; Torriani, F.J.; Dieterich, D.T.; Thomas, D.L.; et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* **2006**, *43*, 1317–1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wai, C.-T.; Greenson, J.K.; Fontana, R.J.; Kalbfleisch, J.D.; Marrero, J.A.; Conjeevaram, H.S.; Lok, A.S.-F. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **2003**, *38*, 518–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Thi, V.L.D.; Granier, C.; Zeisel, M.B.; Guérin, M.; Mancip, J.; Granio, O.; Penin, F.; Lavillette, D.; Bartenschlager, R.; Baumert, T.F.; et al. Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31242–31257. [[CrossRef](#)]
36. Diamond, D.L.; Syder, A.J.; Jacobs, J.M.; Sorensen, C.M.; Walters, K.-A.; Proll, S.C.; McDermott, J.E.; Gritsenko, M.A.; Zhang, Q.; Zhao, R.; et al. Temporal Proteome and Lipidome Profiles Reveal Hepatitis C Virus-Associated Reprogramming of Hepatocellular Metabolism and Bioenergetics. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000719. [[CrossRef](#)]
37. Voulgaris, T.; Sevastianos, V.A. Atherosclerosis as Extrahepatic Manifestation of Chronic Infection with Hepatitis C Virus. *Hepat. Res. Treat.* **2016**, *2016*, 7629318. [[CrossRef](#)]
38. Williams-Nguyen, J.; Hawes, S.E.; Nance, R.M.; Lindström, S.; Heckbert, S.R.; Kim, H.N.; Mathews, W.C.; Cachay, E.R.; Budoff, M.; Hurt, C.B.; et al. Association between chronic Hepatitis C virus infection and myocardial infarction among people living with HIV in the United States. *Am. J. Epidemiol.* **2020**, *189*, 554–563. [[CrossRef](#)]
39. Sasso, F.C.; Pafundi, P.C.; Caturano, A.; Galiero, R.; Vetrano, E.; Nevola, R.; Petta, S.; Fracanzani, A.L.; Coppola, C.; Di Marco, V.; et al. Impact of direct acting antivirals (DAAs) on cardiovascular events in HCV cohort with pre-diabetes. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2021**, *31*, 2345–2353. [[CrossRef](#)]
40. Adinolfi, L.E.; Petta, S.; Fracanzani, A.L.; Coppola, C.; Narciso, V.; Nevola, R.; Rinaldi, L.; Calvaruso, V.; Staiano, L.; Di Marco, V.; et al. Impact of hepatitis C virus clearance by direct-acting antiviral treatment on the incidence of major cardiovascular events: A prospective multicentre study. *Atherosclerosis* **2020**, *296*, 40–47. [[CrossRef](#)]
41. Shimizu, K.; Soroida, Y.; Sato, M.; Hikita, H.; Kobayashi, T.; Endo, M.; Sato, M.; Gotoh, H.; Iwai, T.; Tateishi, R.; et al. Eradication of hepatitis C virus is associated with the attenuation of steatosis as evaluated using a controlled attenuation parameter. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7845. [[CrossRef](#)]
42. Cheng, P.-N.; Chen, J.-Y.; Chiu, Y.-C.; Chiu, H.-C.; Tsai, L.-M. Augmenting central arterial stiffness following eradication of HCV by direct acting antivirals in advanced fibrosis patients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11584. [[CrossRef](#)]
43. Jain, A.; Kalra, B.S.; Srivastava, S.; Chawla, S. Effect of sofosbuvir and daclatasvir on lipid profile, glycemic control and quality of life index in chronic hepatitis C, genotype 3 patients. *Indian J. Gastroenterol.* **2019**, *38*, 39–43. [[CrossRef](#)]
44. Ichikawa, T.; Miyaaki, H.; Miuma, S.; Taura, N.; Motoyoshi, Y.; Akahoshi, H.; Nakamura, J.; Takahashi, Y.; Honda, T.; Yajima, H.; et al. Changes in serum LDL, PCSK9 and microRNA 122 in patients with chronic HCV infection receiving Daclatasvir/Asunaprevir. *Biomed. Rep.* **2019**, *10*, 156–164. [[CrossRef](#)]
45. Doyle, M.-A.; Galanakis, C.; Mulvihill, E.; Crawley, A.; Cooper, C.L. Hepatitis C Direct Acting Antivirals and Ribavirin Modify Lipid but not Glucose Parameters. *Cells* **2019**, *8*, 252. [[CrossRef](#)]

46. Chaudhury, C.S.; Sheehan, J.; Chairez, C.; Akoth, E.; Gross, C.; Silk, R.; Kattakuzhy, S.; Rosenthal, E.; Kottlil, S.; Masur, H.; et al. No Improvement in Hemoglobin A1c Following Hepatitis C Viral Clearance in Patients with and without HIV. *J. Infect. Dis.* **2017**, *217*, 47–50. [[CrossRef](#)]
47. Beig, J.; Orr, D.; Harrison, B.; Gane, E. Hepatitis C Virus Eradication with New Interferon-Free Treatment Improves Metabolic Profile in Hepatitis C Virus-Related Liver Transplant Recipients. *Liver Transplant.* **2018**, *24*, 1031–1039. [[CrossRef](#)]
48. Ikeda, A.; Ikeda, K.; Takai, A.; Takahashi, K.; Ueda, Y.; Marusawa, H.; Seno, H.; Inagaki, N.; Kokuryu, H. Hepatitis C Treatment with Sofosbuvir and Ledipasvir Accompanied by Immediate Improvement in Hemoglobin A1c. *Digestion* **2017**, *96*, 228–230. [[CrossRef](#)]
49. Ciancio, A.; Bosio, R.; Bo, S.; Pellegrini, M.; Sacco, M.; Vogliotti, E.; Fassio, G.; Degerfeld, A.G.F.B.M.; Gallo, M.; Giordanino, C.; et al. Significant improvement of glycemic control in diabetic patients with HCV infection responding to direct-acting antiviral agents. *J. Med. Virol.* **2017**, *90*, 320–327. [[CrossRef](#)]
50. Adinolfi, L.E.; Petta, S.; Fracanzani, A.L.; Nevola, R.; Coppola, C.; Narciso, V.; Rinaldi, L.; Calvaruso, V.; Pafundi, P.C.; Lombardi, R.; et al. Reduced incidence of type 2 diabetes in patients with chronic hepatitis C virus infection cleared by direct-acting antiviral therapy: A prospective study. *Diabetes Obes. Metab.* **2020**, *22*, 2408–2416. [[CrossRef](#)]
51. Thompson, A.J.; Patel, K.; Chuang, W.-L.; Lawitz, E.J.; Rodriguez-Torres, M.; Rustgi, V.K.; Flisiak, R.; Pianko, S.; Diago, M.; Arora, S.; et al. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut* **2012**, *61*, 128–134. [[CrossRef](#)]
52. Czul, F.; Bhamidimarri, K.R. Noninvasive markers to assess liver fibrosis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2016**, *50*, 445–457. [[CrossRef](#)]
53. Ermens, A.; Vlasveld, L.; Lindemans, J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 585–590. [[CrossRef](#)]
54. Mahamid, M.; Mahroum, N.; Bragazzi, N.L.; Shalaata, K.; Yavne, Y.; Adawi, M.; Amital, H.; Watad, A. Folate and B12 Levels Correlate with Histological Severity in NASH Patients. *Nutrients* **2018**, *10*, 440. [[CrossRef](#)]
55. Frémont, S.; Champigneulle, B.; Gérard, P.; Felden, F.; Lambert, D.; Guéant, J.; Nicolas, J. Blood Transcobalamin Levels in Malignant Hepatoma. *Tumor Biol.* **1991**, *12*, 353–359. [[CrossRef](#)]
56. Kane, S.P.; Murray-Lyon, I.M.; Paradinas, F.J.; Johnson, P.J.; Williams, R.; Orr, A.H.; Kohn, J. Vitamin B12 binding protein as a tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Gut* **1978**, *19*, 1105–1109. [[CrossRef](#)]
57. Przekop, D.; Klapaczynski, J.; Grytczuk, A.; Gruszewska, E.; Gietka, A.; Panasiuk, A.; Golaszewski, S.; Cylwik, B.; Chrostek, L. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3951. [[CrossRef](#)]
58. Bartolomei, G.; Cevik, R.E.; Marcello, A. Modulation of hepatitis C virus replication by iron and hepcidin in Huh7 hepatocytes. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2072–2081. [[CrossRef](#)]
59. Nishina, S.; Hino, K.; Korenaga, M.; Vecchi, C.; Pietrangelo, A.; Mizukami, Y.; Furutani, T.; Sakai, A.; Okuda, M.; Hidaka, I.; et al. Hepatitis C Virus-Induced Reactive Oxygen Species Raise Hepatic Iron Level in Mice by Reducing Hepcidin Transcription. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 226–238. [[CrossRef](#)]
60. Metwally, M.A.; Zein, C.O.; Zein, N.N. Clinical Significance of Hepatic Iron Deposition and Serum Iron Values in Patients with Chronic Hepatitis C Infection. *Am. J. Gastroenterol.* **2004**, *99*, 286–291. [[CrossRef](#)]
61. Guallar-Castillón, P.; Gil-Montero, M.; León-Muñoz, L.M.; Graciani, A.; Bayán-Bravo, A.; Taboada, J.M.; Banegas, J.R.; Rodríguez-Artalejo, F. Magnitude and Management of Hypercholesterolemia in the Adult Population of Spain, 2008–2010: The ENRICA Study. *Rev. Esp. Cardiol.* **2012**, *65*, 551–558. [[CrossRef](#)]

13. BIBLIOGRAFÍA

Es la calidad de las convicciones y no el número de seguidores lo que determina el éxito

REFERENCIAS

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
2. Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:1-15.
3. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 2006 Sep;55(9):1350-9.
4. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Apr;13(2):223-35.
5. WHO. Global hepatitis report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017.
6. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*. 2000 Mar;31(3):777-82.
7. 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 May;21 Suppl 1:5-33.
8. Saraswat V, Norris S, de Knecht RJ, Sanchez Avila JF, Sonderup M, Zuckerman E, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in select countries - volume 2. *J Viral Hepat*. 2015 Jan;22 Suppl 1:6-25.
9. Liakina V, Hamid S, Tanaka J, Olafsson S, Sharara AI, Alavian SM, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in select countries - volume 3. *J Viral Hepat*. 2015 Dec;22 Suppl 4:4-20.
10. Pépin J, Abou Chakra CN, Pépin E, Nault V, Valiquette L. Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. *PLoS One*. 2014 Jun 9;9(6):e99677.
11. Mitruka K, Tsertsvadze T, Butsashvili M, Gamkrelidze A, Sabelashvili P, Adamia E, et al. Launch of a Nationwide Hepatitis C Elimination Program--Georgia, April 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Jul 24;64(28):753-7.
12. Zibbell JE, Iqbal K, Patel RC, Suryaprasad A, Sanders KJ, Moore-Moravian L, et al. Increases in hepatitis C virus infection related to injection drug use among persons aged ≤30 years - Kentucky, Tennessee, Virginia, and West Virginia, 2006-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 May 8;64(17):453-8.
13. Suryaprasad AG, White JZ, Xu F, Eichler BA, Hamilton J, Patel A, et al. Emerging epidemic of hepatitis C virus infections among young nonurban persons who inject drugs in the United States, 2006-2012. *Clin Infect Dis*. 2014 Nov 15;59(10):1411-9.

14. Van Handel MM, Rose CE, Hallisey EJ, Kolling JL, Zibbell JE, Lewis B, et al. County-Level Vulnerability Assessment for Rapid Dissemination of HIV or HCV Infections Among Persons Who Inject Drugs, United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016 Nov 1;73(3):323-31.
15. Harris AM, Iqbal K, Schillie S, Britton J, Kainer MA, Tressler S, et al. Increases in Acute Hepatitis B Virus Infections - Kentucky, Tennessee, and West Virginia, 2006-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan 29;65(3):47-50.
16. Chan DP, Sun HY, Wong HT, Lee SS, Hung CC. Sexually acquired hepatitis C virus infection: a review. *Int J Infect Dis*. 2016 Aug;49:47-58.
17. Ingiliz P, Martin TC, Rodger A, Stellbrink HJ, Mauss S, Boesecke C, et al. HCV reinfection incidence and spontaneous clearance rates in HIV-positive men who have sex with men in Western Europe. *J Hepatol*. 2017 Feb;66(2):282-7.
18. Salazar-Vizcaya L, Kouyos RD, Zahnd C, Wandeler G, Battegay M, Darling KE, et al. Hepatitis C virus transmission among human immunodeficiency virus-infected men who have sex with men: Modeling the effect of behavioral and treatment interventions. *Hepatology*. 2016 Dec;64(6):1856-69.
19. Dore GJ. Hepatitis C treatment as prevention among HIV-infected men who have sex with men: Feasible? *Hepatology*. 2016 Dec;64(6):1834-6.
20. Grupo de trabajo del estudio de prevalencia de la infección por hepatitis C en población general en España; 2017-2018. Resultados del 2o Estudio de Seroprevalencia en España (2017-2018). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2019. Disponible en: https://www.msbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/INFORME_INFECCION_VHC_ESPANA2019.pdf.
21. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 4;110(23):9505-10.
22. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*. 2002 Jul;76(14):6919-28.
23. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol*. 1992;181(5):293-300.
24. Thomssen R, Bonk S, Thiele A. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol*. 1993 Dec;182(6):329-34.
25. Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses*. 2014 Mar 11;6(3):1149-87.
26. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13783-93.

27. Meunier JC, Russell RS, Engle RE, Faulk KN, Purcell RH, Emerson SU. Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol*. 2008 Oct;82(19):9647-56.
28. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol*. 2006 Mar;80(5):2418-28.
29. Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):3018-32.
30. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011 Feb;19(2):95-103.
31. Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:199-218.
32. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998 Oct 30;282(5390):938-41.
33. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*. 2002 Oct 1;21(19):5017-25.
34. Niepmann M. Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:143-66.
35. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:167-98.
36. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1577-81.
37. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003056.
38. Ferraris P, Blanchard E, Roingard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol*. 2010 Sep;91(Pt 9):2230-7.
39. Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10612-27.
40. Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters KA, Proll SC, et al. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog*. 2010 Jan;6(1):e1000719.
41. Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2182-95.

42. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007 Sep;9(9):1089-97.
43. Zhu Y, Chen S. Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy. *World J Gastroenterol.* 2013 Dec 21;19(47):8963-73.
44. Zhang F. Pegylated interferons in the treatment of chronic hepatitis C. *Chin Med J (Engl).* 2003 Apr;116(4):495-8.
45. Zeuzem S. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis. *J Viral Hepat.* 2000 Sep;7(5):327-34.
46. Zaman A, Fennerty MB, Keeffe EB. Systematic review: peginterferon vs. standard interferon in the treatment of chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Oct 1;18(7):661-70.
47. Yau AH, Yoshida EM. Hepatitis C drugs: the end of the pegylated interferon era and the emergence of all-oral interferon-free antiviral regimens: a concise review. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Sep;28(8):445-51.
48. Zeuzem S. Decade in review-HCV: hepatitis C therapy-a fast and competitive race. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Nov;11(11):644-5.
49. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2014 May 15;370(20):1889-98.
50. Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, Asselah T, Ruane PJ, Gruener N, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med.* 2015 Dec 31;373(27):2599-607.
51. Forns X, Lee SS, Valdes J, Lens S, Ghalib R, Aguilar H, et al. Glecaprevir plus pibrentasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4, 5, or 6 infection in adults with compensated cirrhosis (EXPEDITION-1): a single-arm, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2017 Oct;17(10):1062-8.
52. Kwo P, Gane EJ, Peng CY, Pearlman B, Vierling JM, Serfaty L, et al. Effectiveness of Elbasvir and Grazoprevir Combination, With or Without Ribavirin, for Treatment-Experienced Patients With Chronic Hepatitis C Infection. *Gastroenterology.* 2017 Jan;152(1):164,175.e4.
53. Surendra M, Raju SB, Sridhar N, Vijay Kiran B, Rajesh G, Anvesh G, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection in end stage renal disease patients: A prospective observational study. *Hemodial Int.* 2018 Apr;22(2):217-21.
54. Zeuzem S, Ghalib R, Reddy KR, Pockros PJ, Ben Ari Z, Zhao Y, et al. Grazoprevir-Elbasvir Combination Therapy for Treatment-Naive Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 4, or 6 Infection: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2015 Jul 7;163(1):1-13.
55. Zeuzem S, Foster GR, Wang S, Asatryan A, Gane E, Feld JJ, et al. Glecaprevir-Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *N Engl J Med.* 2018 Jan 25;378(4):354-69.

56. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 1998 May 29;93(5):693-704.
57. Giammanco A, Cefalù AB, Noto D, Averna MR. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol*. 2015 Mar 20;6:61.
58. Gill JM, Brown JC, Bedford D, Wright DM, Cooney J, Hughes DA, et al. Hepatic production of VLDL1 but not VLDL2 is related to insulin resistance in normoglycaemic middle-aged subjects. *Atherosclerosis*. 2004 Sep;176(1):49-56.
59. Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem*. 1995 Jan;41(1):153-8.
60. Cohn JS, Marcoux C, Davignon J. Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct;19(10):2474-86.
61. Rosenson RS, Brewer HB, Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011 Mar;57(3):392-410.
62. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):33053-8.
63. Barter P, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein: its role in plasma lipid transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994 Sep;21(9):663-72.
64. Grow TE, Fried M. Interchange of apoprotein components between the human plasma high density lipoprotein subclasses HDL2 and HDL3 in vitro. *J Biol Chem*. 1978 Nov 25;253(22):8034-41.
65. O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation*. 2004 Nov 2;110(18):2881-8.
66. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med*. 1995 Jan;237(1):5-12.
67. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum*. 1999 Oct;42(10):2204-12.
68. Zignego AL, Giannini C, Monti M, Gragnani L. Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Dig Liver Dis*. 2007 Sep;39 Suppl 1:S38-45.
69. Hofer H, Bankl HC, Wrba F, Steindl-Munda P, Peck-Radosavljevic M, Osterreicher C, et al. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol*. 2002 Nov;97(11):2880-5.

70. Dai CY, Yeh ML, Huang CF, Hou CH, Hsieh MY, Huang JF, et al. Chronic hepatitis C infection is associated with insulin resistance and lipid profiles. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 May;30(5):879-84.
71. Bassendine MF, Nielsen SU, Bridge SH, Felmler DJ, Sheridan DA, Packard CJ, et al. Hepatitis C virus and atherosclerosis: A legacy after virologic cure? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017 Feb;41(1):25-30.
72. Huang H, Kang R, Zhao Z. Is hepatitis C associated with atherosclerotic burden? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Sep 3;9(9):e106376.
73. Ichikawa T, Miyaaki H, Miura S, Motoyoshi Y, Narita S, Toda S, et al. Carotid Intima-media Thickness and Small Dense Low-density Lipoprotein Cholesterol Increase after One Year of Treatment with Direct-acting Antivirals in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Intern Med*. 2019 May;58(9):1209-15.
74. Drazilova S, Gazda J, Janicko M, Jarcuska P. Chronic Hepatitis C Association with Diabetes Mellitus and Cardiovascular Risk in the Era of DAA Therapy. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Aug 13;2018:6150861.
75. Meissner EG, Lee YJ, Osinusi A, Sims Z, Qin J, Sturdevant D, et al. Effect of sofosbuvir and ribavirin treatment on peripheral and hepatic lipid metabolism in chronic hepatitis C virus, genotype 1-infected patients. *Hepatology*. 2015 Mar;61(3):790-801.
76. Nishimura M, Yamamoto H, Yoshida T, Seimiya M, Sawabe Y, Matsushita K, et al. Decreases in the serum VLDL-TG/non-VLDL-TG ratio from early stages of chronic hepatitis C: alterations in TG-rich lipoprotein levels. *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17309.
77. Bridge SH, Sheridan DA, Felmler DJ, Crossey MM, Fenwick FI, Lanyon CV, et al. PCSK9, apolipoprotein E and lipoviral particles in chronic hepatitis C genotype 3: evidence for genotype-specific regulation of lipoprotein metabolism. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(4):763-70.
78. Serfaty L, Capeau J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int*. 2009 Mar;29 Suppl 2:13-25.
79. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology*. 2004 Mar;126(3):840-8.
80. Fabiani S, Fallahi P, Ferrari SM, Miccoli M, Antonelli A. Hepatitis C virus infection and development of type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of the literature. *Rev Endocr Metab Disord*. 2018 Dec;19(4):405-20.
81. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1695-704.
82. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, et al. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):739-44.

83. Desbois A, Cacoub P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. *World journal of gastroenterology*. 2017 mar;23(9):1697-711.
84. Romero-Gómez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005 Mar;128(3):636-41.
85. Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, Planas R, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2008 May;48(5):721-7.
86. Simó R, Lecube A, Genescà J, Esteban JI, Hernández C. Sustained virological response correlates with reduction in the incidence of glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Diabetes Care*. 2006 Nov;29(11):2462-6.
87. Giordanino C, Bugianesi E, Smedile A, Ciancio A, Abate ML, Olivero A, et al. Incidence of type 2 diabetes mellitus and glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection by response to treatment: results of a cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2008 Oct;103(10):2481-7.
88. Qing S, Ji D, Li B, Li F, Wang Y, Niu X, et al. Improvement of glucose and lipid metabolism with pegylated interferon- α plus ribavirin therapy in Chinese patients chronically infected with genotype 1b hepatitis C virus. *Ann Saudi Med*. 2015 Jul-Aug;35(4):293-7.
89. Pavone P, Tieghi T, d'Ettorre G, Lichtner M, Marocco R, Mezzaroma I, et al. Rapid decline of fasting glucose in HCV diabetic patients treated with direct-acting antiviral agents. *Clin Microbiol Infect*. 2016 May;22(5):462.e1,462.e3.
90. Alsebaey A, Elhelbawy M, Abdel-Razek W, Hashim M, Elshenawy H, Waked I. HCV treatment with direct acting antivirals improves the insulin sensitivity. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2019 aug:1-6.
91. Cacoub P, Desbois AC, Comarmond C, Saadoun D. Impact of sustained virological response on the extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C: a meta-analysis. *Gut*. 2018 nov;67(11):2025-34.
92. Drazilova S, Janicko M, Skladany L, Kristian P, Oltman M, Szantova M, et al. Glucose Metabolism Changes in Patients with Chronic Hepatitis C Treated with Direct Acting Antivirals. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018 oct;2018:1-10.
93. Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, et al. Sustained virological response does not improve long-term glycaemic control in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2019 Jun;39(6):1027-32.
94. Okuda K. Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Apr;14(4):301-8.
95. JOSKE RA. the Vitamin B12 Content of Human Liver Tissue Obtained By Aspiration Biopsy. *Gut*. 1963;4(1960):231-5.

96. Baker H, Leevy CB, DeAngelis B, Frank O, Baker ER. Cobalamin (vitamin B12) and holotranscobalamin changes in plasma and liver tissue in alcoholics with liver disease. *J Am Coll Nutr.* 1998 Jun;17(3):235-8.
97. Frémont S, Champigneulle B, Gérard P, Felden F, Lambert D, Guéant JL, et al. Blood transcobalamin levels in malignant hepatoma. *Tumour Biol.* 1991;12(6):353-9.
98. Goel A, Ramakrishna B, Muliyl J, Madhu K, Sajith KG, Zachariah U, et al. Use of Serum Vitamin B12 Level as a Marker to Differentiate Idiopathic Noncirrhotic Intrahepatic Portal Hypertension from Cryptogenic Cirrhosis. . 2013:179-87.
99. Goel A, Ramakrishna B, Job V, Zachariah U, Eapen CE. Vitamin B 12 Deficiency in Patients with Unexplained Portal Hypertension Indicates Absence of Severe Liver Fibrosis. *J Clin Gastroenterol.* 2019;53(3):E126-7.
100. Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, et al. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia).* 2005;20(9):1448-55.
101. Kane SP, Murray-Lyon IM, Paradinas FJ, Johnson PJ, Williams R, Orr AH, et al. Vitamin B12 binding protein as a tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Gut.* 1978 Dec;19(12):1105-9.
102. Mahamid M, Mahroum N, Bragazzi NL, Shalaata K, Yavne Y, Adawi M, et al. Folate and B12 levels correlate with histological severity in NASH patients. *Nutrients.* 2018;10(4):1-9.
103. Sugihara T, Koda M, Okamoto T, Miyoshi K, Matono T, Oyama K, et al. Falsely elevated serum vitamin B12 levels were associated with the severity and prognosis of chronic viral liver disease. 2017;60(1):31-9.
104. Wheeler K, Pritchard J, Luck W, Rossiter M. Transcobalamin I as a "marker" for fibrolamellar hepatoma. *Med Pediatr Oncol.* 1986;14(4):227-9.
105. Gimsing P. Cobalamin metabolism in chronic myelogenous leukemia. *Dan Med Bull.* 1998 Nov;45(5):459-79.
106. Gauchan D, Joshi N, Gill AS, Patel V, Debari VA, Guron G, et al. Does an elevated serum vitamin B(12) level mask actual vitamin B(12) deficiency in myeloproliferative disorders? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Aug;12(4):269-73.
107. Gimsing P, Hippe E. Increased concentration of transcobalamin I in a patient with metastatic carcinoma of the breast. *Scand J Haematol.* 1978 Sep;21(3):243-9.
108. Zulfiqar AA, Sebaux A, Dramé M, Andres E. Hypervitaminemia B12 and malignant diseases: report of a cross-sectional study in an acute geriatric unit. *Ann Biol Clin (Paris).* 2017 Apr 1;75(2):193-203.

109. Sussman D, Greensides D, Reilly K, Wilson C. Preliminary characterization of crystals of an in vitro evolved cyanocobalamin (vitamin B12) binding RNA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1999 Jan;55(Pt 1):326-8.
110. Lorsch JR, Szostak JW. In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*. 1994 Feb 1;33(4):973-82.
111. Sussman D, Nix JC, Wilson C. The structural basis for molecular recognition by the vitamin B 12 RNA aptamer. *Nat Struct Biol*. 2000 Jan;7(1):53-7.
112. Takyar SS, Gowans EJ, Lott WB. Vitamin B12 stalls the 80 S ribosomal complex on the hepatitis C internal ribosome entry site. *J Mol Biol*. 2002;319(1):1-8.
113. Lott WB, Takyar SS, Tuppen J, Crawford DH, Harrison M, Sloots TP, et al. Vitamin B12 and hepatitis C: molecular biology and human pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):4916-21.
114. Rocco A, Compare D, Coccoli P, Esposito C, Di Spirito A, Barbato A, et al. Vitamin B12 supplementation improves rates of sustained viral response in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Gut*. 2013 May;62(5):766-73.
115. Hézode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, et al. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol*. 1999 Dec;31(6):979-84.
116. Price L, Kowdley KV. The role of iron in the pathophysiology and treatment of chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2009 Dec;23(12):822-8.
117. Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology*. 1992 Jun;102(6):2108-13.
118. Winter WE, Bazydlo LA, Harris NS. The molecular biology of human iron metabolism. *Lab Med*. 2014 Spring;45(2):92-102.
119. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090-3.
120. Miura K, Taura K, Kodama Y, Schnabl B, Brenner DA. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*. 2008 Nov;48(5):1420-9.
121. Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):226-38.
122. Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H, et al. Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med*. 2007 Jan-Feb;13(1-2):97-104.

123. Girelli D, Pasino M, Goodnough JB, Nemeth E, Guido M, Castagna A, et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2009 Nov;51(5):845-52.
124. Ma L, Zou T, Yuan Y, Lv J, Dong X, Yang G, et al. Duodenal ferroportin is up-regulated in patients with chronic hepatitis C. *PLoS One.* 2014 Oct 20;9(10):e110658.
125. Carvalho JR, Velosa J, Serejo F. Lipids, glucose and iron metabolic alterations in chronic hepatitis C after viral eradication - comparison of the new direct-acting antiviral agents with the old regimens. *Scand J Gastroenterol.* 2018 Jun-Jul;53(7):857-63.
126. Inomata S, Anan A, Yamauchi E, Yamauchi R, Kunimoto H, Takata K, et al. Changes in the Serum Heparin-to-ferritin Ratio with Erythroferrone after Hepatitis C Virus Eradication Using Direct-acting Antiviral Agents. *Intern Med.* 2019 Oct 15;58(20):2915-22.
127. Voulgaris T, Sevastianos VA. Atherosclerosis as Extrahepatic Manifestation of Chronic Infection with Hepatitis C Virus. *Hepat Res Treat.* 2016;2016:7629318.
128. Wernly B, Wernly S, Niederseer D, Datz C. Hepatitis C virus (HCV) infection and cardiovascular disease: Hepatologists and cardiologists need to talk! *Eur J Intern Med.* 2020 Jan;71:87-8.
129. Boddi M, Abbate R, Chellini B, Giusti B, Solazzo V, Soft F, et al. HCV infection facilitates asymptomatic carotid atherosclerosis: preliminary report of HCV RNA localization in human carotid plaques. *Dig Liver Dis.* 2007 Sep;39 Suppl 1:S55-60.
130. Adinolfi LE, Zampino R, Restivo L, Lonardo A, Guerrera B, Marrone A, et al. Chronic hepatitis C virus infection and atherosclerosis: clinical impact and mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2014 Apr 7;20(13):3410-7.
131. Wu VC, Chen TH, Wu M, Cheng CW, Chen SW, Chang CW, et al. Comparison of cardiovascular outcomes and all-cause mortality in patients with chronic hepatitis B and C: A 13-year nationwide population-based study in Asia. *Atherosclerosis.* 2018 Feb;269:178-84.
132. Williams-Nguyen J, Hawes SE, Nance RM, Lindström S, Heckbert SR, Kim HN, et al. Association Between Chronic Hepatitis C Virus Infection and Myocardial Infarction Among People Living With HIV in the United States. *Am J Epidemiol.* 2020 Jun 1;189(6):554-63.
133. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, You SL, Wang LY, et al. Chronic hepatitis C virus infection increases mortality from hepatic and extrahepatic diseases: a community-based long-term prospective study. *J Infect Dis.* 2012 Aug 15;206(4):469-77.
134. Maruyama S, Koda M, Oyake N, Sato H, Fujii Y, Horie Y, et al. Myocardial injury in patients with chronic hepatitis C infection. *J Hepatol.* 2013 Jan;58(1):11-5.
135. Zignego AL, Gragnani L, Giannini C, Laffi G. The hepatitis C virus infection as a systemic disease. *Intern Emerg Med.* 2012 Oct;7 Suppl 3:S201-8.
136. Saadoun D, Resche-Rigon M, Thibault V, Piette JC, Cacoub P. Antiviral therapy for hepatitis C virus--associated mixed cryoglobulinemia vasculitis: a long-term followup study. *Arthritis Rheum.* 2006 Nov;54(11):3696-706.

137. Kawamura Y, Ikeda K, Arase Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, et al. Viral elimination reduces incidence of malignant lymphoma in patients with hepatitis C. *Am J Med.* 2007 Dec;120(12):1034-41.
138. Lee YH, Ji JD, Yeon JE, Byun KS, Lee CH, Song GG. Cryoglobulinaemia and rheumatic manifestations in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis.* 1998 Dec;57(12):728-31.
139. Oliveira ÍX, Silva RDSUD. Rheumatological Manifestations Associated with Viral Hepatitis B or C. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019 Dec 2;52:e20180407,8682-0407-2018. eCollection 2019.
140. Tiwari V, Bergman MJ. Viral Arthritis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2020.
141. Zignego AL, Bréchet C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol.* 1999 Aug;31(2):369-76.
142. Zeron PB, Retamozo S, Bové A, Kostov BA, Sisó A, Ramos-Casals M. Diagnosis of Liver Involvement in Primary Sjögren Syndrome. *J Clin Transl Hepatol.* 2013 Dec;1(2):94-102.
143. Zegans ME, Anninger W, Chapman C, Gordon SR. Ocular manifestations of hepatitis C virus infection. *Curr Opin Ophthalmol.* 2002 Dec;13(6):423-7.
144. 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 Jun;150(7):1599-608.
145. Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Cervera R, Rosas J, Trejo O, de la Red G, et al. Hepatitis C virus infection mimicking primary Sjögren syndrome. A clinical and immunologic description of 35 cases. *Medicine (Baltimore).* 2001 Jan;80(1):1-8.
146. Meissner EG, Lee YJ, Osinusi A, Sims Z, Qin J, Sturdevant D, et al. Effect of sofosbuvir and ribavirin treatment on peripheral and hepatic lipid metabolism in chronic hepatitis C virus, genotype 1-infected patients. *Hepatology.* 2015 Mar;61(3):790-801.
147. Chida T, Kawata K, Ohta K, Matsunaga E, Ito J, Shimoyama S, et al. Rapid Changes in Serum Lipid Profiles during Combination Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir in Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1b. *Gut Liver.* 2018 Mar 15;12(2):201-7.
148. Endo D, Satoh K, Shimada N, Hokari A, Aizawa Y. Impact of interferon-free antiviral therapy on lipid profiles in patients with chronic hepatitis C genotype 1b. *World J Gastroenterol.* 2017 Apr 7;23(13):2355-64.
149. Inoue T, Goto T, Iio E, Matsunami K, Fujiwara K, Shinkai N, et al. Changes in serum lipid profiles caused by three regimens of interferon-free direct-acting antivirals for patients infected with hepatitis C virus. *Hepatol Res.* 2018 Feb;48(3):E203-12.
150. Townsend K, Meissner EG, Sidharthan S, Sampson M, Remaley AT, Tang L, et al. Interferon-Free Treatment of Hepatitis C Virus in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Subjects

Results in Increased Serum Low-Density Lipoprotein Concentration. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016 May;32(5):456-62.

151. Sun HY, Cheng PN, Tseng CY, Tsai WJ, Chiu YC, Young KC. Favouring modulation of circulating lipoproteins and lipid loading capacity by direct antiviral agents grazoprevir/elbasvir or ledipasvir/sofosbuvir treatment against chronic HCV infection. *Gut*. 2018 Jul;67(7):1342-50.

152. Mauss S, Berger F, Wehmeyer MH, Ingiliz P, Hueppe D, Lutz T, et al. Effect of antiviral therapy for HCV on lipid levels. *Antivir Ther*. 2017;21(1):81-8.

153. Morales AL, Junga Z, Singla MB, Sjogren M, Torres D. Hepatitis C eradication with sofosbuvir leads to significant metabolic changes. *World J Hepatol*. 2016 Dec 18;8(35):1557-63.

154. Gonzalez-Colominas E, Batlle M, Monge-Escartin I, Duran X, Viu A, de Antonio-Cusco M, et al. Impact of HCV cure with drug-acting antivirals in the use of concomitant medication and lipid profile: follow-up data 2 years after the sustained virological response. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 16.

155. El Sagheer G, Soliman E, Ahmad A, Hamdy L. Study of changes in lipid profile and insulin resistance in Egyptian patients with chronic hepatitis C genotype 4 in the era of DAAs. *Libyan J Med*. 2018 Dec;13(1):1435124.

156. Chaudhury CS, Sheehan J, Chairez C, Akoth E, Gross C, Silk R, et al. No Improvement in Hemoglobin A1c Following Hepatitis C Viral Clearance in Patients With and Without HIV. *J Infect Dis*. 2017 Dec 27;217(1):47-50.

157. Doyle MA, Galanakis C, Mulvihill E, Crawley A, Cooper CL. Hepatitis C Direct Acting Antivirals and Ribavirin Modify Lipid but not Glucose Parameters. *Cells*. 2019 Mar 15;8(3):10.3390/cells8030252.

158. Chang S, Cheng M, Shiao M, Yeh C, Wang C, Fan C, et al. Recovery of lipid metabolic alterations in hepatitis C patients after viral clearance: Incomplete restoration with accelerated omega-oxidation. *Journal of clinical lipidology*. 2018 may;12(3):756-66.

159. Gitto S, Cicero AFG, Loggi E, Giovannini M, Conti F, Grandini E, et al. Worsening of Serum Lipid Profile after Direct Acting Antiviral Treatment. *Ann Hepatol*. 2018 January-February;17(1):64-75.

160. Beig J, Orr D, Harrison B, Gane E. Hepatitis C Virus Eradication with New Interferon-Free Treatment Improves Metabolic Profile in Hepatitis C Virus-Related Liver Transplant Recipients. *Liver Transpl*. 2018 Aug;24(8):1031-9.

161. Shimizu A, Maeda K, Honda T, Ishida Y, Ueshima J, Nagami S, et al. Comparison between the Global Leadership Initiative on Malnutrition and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism definitions for the prevalence of malnutrition in geriatric rehabilitation care. *Geriatr Gerontol Int*. 2020 Dec;20(12):1221-7.

162. Meissner EG, Lee YJ, Osinusi A, Sims Z, Qin J, Sturdevant D, et al. Effect of sofosbuvir and ribavirin treatment on peripheral and hepatic lipid metabolism in chronic hepatitis C virus, genotype 1-infected patients. *Hepatology*. 2015 Mar;61(3):790-801.

163. Chaudhury CS, Sheehan J, Chairez C, Akoth E, Gross C, Silk R, et al. No Improvement in Hemoglobin A1c Following Hepatitis C Viral Clearance in Patients With and Without HIV. *J Infect Dis.* 2017 Dec 27;217(1):47-50.
164. Townsend K, Meissner EG, Sidharthan S, Sampson M, Remaley AT, Tang L, et al. Interferon-Free Treatment of Hepatitis C Virus in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Subjects Results in Increased Serum Low-Density Lipoprotein Concentration. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016 may;32(5):456-62.
165. Carvalho JR, Velosa J, Serejo F. Lipids, glucose and iron metabolic alterations in chronic hepatitis C after viral eradication – comparison of the new direct-acting antiviral agents with the old regimens. *Scand J Gastroenterol.* 2018 jul;53(7):857-63.
166. Mauss S, Berger F, Wehmeyer MH, Ingiliz P, Hueppe D, Lutz T, et al. Effect of antiviral therapy for HCV on lipid levels. *Antivir Ther (Lond).* 2017;21(1):81-8.
167. El Sagheer Ghada, Soliman E, Ahmad A, Hamdy L. Study of changes in lipid profile and insulin resistance in Egyptian patients with chronic hepatitis C genotype 4 in the era of DAAs. *The Libyan journal of medicine.* 2018 dec;13(1):1435124.
168. Doyle M, Galanakis C, Mulvihill E, Crawley A, Cooper C. Hepatitis C Direct Acting Antivirals and Ribavirin Modify Lipid but not Glucose Parameters. *Cells.* 2019 mar;8(3):252.
169. Ichikawa T, Miyaaki H, Miuma S, Taura N, Motoyoshi Y, Akahoshi H, et al. Changes in serum LDL, PCSK9 and microRNA-122 in patients with chronic HCV infection receiving Daclatasvir/Asunaprevir. *Biomed Rep.* 2019 Mar;10(3):156-64.
170. Shimizu K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Kobayashi T, Endo M, et al. Eradication of hepatitis C virus is associated with the attenuation of steatosis as evaluated using a controlled attenuation parameter. *Sci Rep.* 2018 May 18;8(1):7845,018-26293-9.
171. Cheng PN, Chen JY, Chiu YC, Chiu HC, Tsai LM. Augmenting central arterial stiffness following eradication of HCV by direct acting antivirals in advanced fibrosis patients. *Sci Rep.* 2019 Feb 5;9(1):1426,018-37829-4.
172. Jain A, Kalra BS, Srivastava S, Chawla S. Effect of sofosbuvir and daclatasvir on lipid profile, glycemic control and quality of life index in chronic hepatitis C, genotype 3 patients. *Indian J Gastroenterol.* 2019 Feb;38(1):39-43.
173. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Barbara M, Licata A, Craxì A, et al. Hepatitis C Virus Infection Is Associated With Increased Cardiovascular Mortality: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Gastroenterology.* 2016 Jan;150(1):145,155.e4; quiz e15-6.
174. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-88.
175. Ferrari R, Aguiar C, Alegria E, Bonadonna RC, Cosentino F, Elisaf M, et al. Current practice in identifying and treating cardiovascular risk, with a focus on residual risk associated with atherogenic dyslipidaemia. *Eur Heart J Suppl.* 2016 Apr 12;18(Suppl C):C2-C12.

176. Fruchart JC, Davignon J, Hermans MP, Al-Rubeaan K, Amarenco P, Assmann G, et al. Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Jan 24;13:26,2840-13-26.
177. Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, Assmann G, Brown WV, Ceska R, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 2008 Nov 17;102(10 Suppl):1K-34K.
178. Rosenson RS, Underberg JA. Systematic review: Evaluating the effect of lipid-lowering therapy on lipoprotein and lipid values. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013 Oct;27(5):465-79.
179. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007 Oct 16;116(16):1832-44.
180. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Oct;27(5):473-83.
181. Pintó X, Masana L, Civeira F, Real J, Ibarretxe D, Candas B, et al. Consensus document of an expert group from the Spanish Society of Arteriosclerosis (SEA) on the clinical use of nuclear magnetic resonance to assess lipoprotein metabolism (Liposcale®). *Clin Investig Arterioscler*. 2020 Sep-Oct;32(5):219-29.
182. Otvos JD, Mora S, Shalaurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC, Jr. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol*. 2011 Mar-Apr;5(2):105-13.
183. Cantey EP, Wilkins JT. Discordance between lipoprotein particle number and cholesterol content: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018 Apr;25(2):130-6.
184. Tehrani DM, Zhao Y, Blaha MJ, Mora S, Mackey RH, Michos ED, et al. Discordance of Low-Density Lipoprotein and High-Density Lipoprotein Cholesterol Particle Versus Cholesterol Concentration for the Prediction of Cardiovascular Disease in Patients With Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *Am J Cardiol*. 2016 Jun 15;117(12):1921-7.
185. Cantey EP, Wilkins JT. Discordance between lipoprotein particle number and cholesterol content: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018 Apr;25(2):130-6.
186. Mora S, Caulfield MP, Wohlgemuth J, Chen Z, Superko HR, Rowland CM, et al. Atherogenic Lipoprotein Subfractions Determined by Ion Mobility and First Cardiovascular Events After Random Allocation to High-Intensity Statin or Placebo: The Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) Trial. *Circulation*. 2015 Dec 8;132(23):2220-9.
187. Toth PP, Grabner M, Punekar RS, Quimbo RA, Cziraky MJ, Jacobson TA. Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. *Atherosclerosis*. 2014 Aug;235(2):585-91.

188. Cromwell WC, Otvos JD, Keyes MJ, Pencina MJ, Sullivan L, Vasan RS, et al. LDL Particle Number and Risk of Future Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study - Implications for LDL Management. *J Clin Lipidol*. 2007 Dec;1(6):583-92.
189. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 May;34(5):1069-77.
190. Bermudez-Lopez M, Perpiñan H, Amigo N, Castro E, Alonso N, Mauricio D, et al. Advanced lipoprotein parameters could better explain atheromatosis in non-diabetic chronic kidney disease patients. *Clin Kidney J*. 2021 Jul 6;14(12):2591-9.
191. Pichler G, Amigo N, Tellez-Plaza M, Pardo-Cea MA, Dominguez-Lucas A, Marrachelli VG, et al. LDL particle size and composition and incident cardiovascular disease in a South-European population: The Hortega-Liposcale Follow-up Study. *Int J Cardiol*. 2018 Aug 1;264:172-8.
192. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015 Mar;56(3):737-46.
193. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. . World Health Organization. 2019.
194. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
195. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988 Jan-Feb;8(1):1-21.
196. Cheng P, Sun H, Feng I, Chiu Y, Wang S, Tan DC, et al. Interdependence of glycemic and lipid modulation in cured chronic hepatitis C patients by direct-acting antiviral agents. *J Microbiol Immunol Infect*. 2022 Jul 6.
197. Ikeda A, Ikeda K, Takai A, Takahashi K, Ueda Y, Marusawa H, et al. Hepatitis C Treatment with Sofosbuvir and Ledipasvir Accompanied by Immediate Improvement in Hemoglobin A1c. *Digestion*. 2017 Nov;96(4):228-30.
198. Ciancio A, Bosio R, Bo S, Pellegrini M, Sacco M, Vogliotti E, et al. Significant improvement of glycemic control in diabetic patients with HCV infection responding to direct-acting antiviral agents. *J Med Virol*. 2018 Feb;90(2):320-7.
199. Thompson AJ, Patel K, Chuang WL, Lawitz EJ, Rodriguez-Torres M, Rustgi VK, et al. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut*. 2012 Jan;61(1):128-34.
200. Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, et al. Sustained virological response does not improve long-term glycaemic control in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Liver International*. 2019 Jun;39(6):1027-32.

201. Czul F, Bhamidimarri KR. Noninvasive Markers to Assess Liver Fibrosis. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(6):445-57.
202. Ermens AA, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin Biochem*. 2003 Nov;36(8):585-90.
203. Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, et al. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *J Clin Med*. 2021 Aug 31;10(17):3951. doi: 10.3390/jcm10173951.
204. Bartolomei G, Cevik RE, Marcello A. Modulation of hepatitis C virus replication by iron and hepcidin in Huh7 hepatocytes. *J Gen Virol*. 2011 Sep;92(Pt 9):2072-81.
205. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol*. 2004 Feb;99(2):286-91.
206. Butt AA, Yan P, Chew KW, Currier J, Corey K, Chung RT, et al. Risk of Acute Myocardial Infarction Among Hepatitis C Virus (HCV)-Positive and HCV-Negative Men at Various Lipid Levels: Results From ERCHIVES. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017 aug;65(4):557-65.
207. Adinolfi LE, Petta S, Fracanzani AL, Coppola C, Narciso V, Nevola R, et al. Impact of hepatitis C virus clearance by direct-acting antiviral treatment on the incidence of major cardiovascular events: A prospective multicentre study. *Atherosclerosis*. 2020 Mar;296:40-7.
208. Mauss S, Berger F, Wehmeyer MH, Ingiliz P, Hueppe D, Lutz T, et al. Effect of antiviral therapy for HCV on lipid levels. *Antivir Ther*. 2017;21(1):81-8.
209. Wheeler AL, Scherzer R, Lee D, Delaney JAC, Bacchetti P, Shlipak MG, et al. HIV/hepatitis C virus coinfection ameliorates the atherogenic lipoprotein abnormalities of HIV infection. *AIDS*. 2014 Jan 2;28(1):49-58.
210. Mackey RH, Greenland P, Goff DC, Jr, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2012 Aug 7;60(6):508-16.
211. Girona J, Amigó N, Ibarretxe D, Plana N, Rodríguez-Borjabad C, Heras M, et al. HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 27;20(13):3151. doi: 10.3390/ijms20133151.
212. Natali A, Baldi S, Bonnet F, Petrie J, Trifirò S, Tricò D, et al. Plasma HDL-cholesterol and triglycerides, but not LDL-cholesterol, are associated with insulin secretion in non-diabetic subjects. *Metabolism*. 2017 Apr;69:33-42.
213. Pantoja-Torres B, Toro-Huamanchumo CJ, Urrunaga-Pastor D, Guarnizo-Poma M, Lazaro-Alcantara H, Paico-Palacios S, et al. High triglycerides to HDL-cholesterol ratio is associated with insulin resistance in normal-weight healthy adults. *Diabetes Metab Syndr*. 2019 Jan-Feb;13(1):382-8.

214. Sokooti S, Flores-Guerrero JL, Heerspink HJL, Connelly MA, Bakker SJL, Dullaart RPF. Triglyceride-rich lipoprotein and LDL particle subfractions and their association with incident type 2 diabetes: the PREVEND study. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Jul 28;20(1):156,021-01348-w.
215. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):7-18.
216. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes*. 2007 Sep;56(9):2328-38.
217. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatoh S, Kato T, Kumadaki S, Inoue N, et al. Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2008 Dec;49(12):2524-34.
218. Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, Graciani A, Bayán-Bravo A, Taboada JM, et al. Magnitude and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012 Jun;65(6):551-8.