



**Programa de Doctorado en
Ciencias de la Salud**

**CARACTERIZACIÓN INTEGRAL DE
LAS ALTERACIONES
MOLECULARES GENERADAS
DURANTE LA CIRROSIS
AVANZADA EN PACIENTES
COINFECTADOS POR EL VHC Y EL
VIH**

**Tesis Doctoral presentada por
SERGIO SALGÜERO FERNÁNDEZ**

2023



**Programa de Doctorado en
Ciencias de la Salud**

**CARACTERIZACIÓN INTEGRAL DE
LAS ALTERACIONES MOLECULARES
GENERADAS DURANTE LA CIRROSIS
AVANZADA EN PACIENTES
COINFECTADOS POR EL VHC Y EL
VIH**

**Tesis Doctoral presentada por
SERGIO SALGÜERO FERNÁNDEZ**

Directores:

DR. SALVADOR RESINO GARCÍA

DRA. MARIA ÁNGELES JIMÉNEZ SOUSA

Tutora:

DRA. MARÍA LOURDES LLEDÓ GARCÍA

Alcalá de Henares, 2023

Agradecimientos

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la colaboración y esfuerzo combinado de muchas personas. Me gustaría expresar mi agradecimiento sincero a todas ellas.

En primer lugar, a mis extraordinarios codirectores de tesis, por ser los motores de este proyecto.

Al Dr. Salvador Resino García, por su capacidad de contagiar seguridad y confianza en el desarrollo de esta tesis. Por saber cuándo hacía falta apretar y cuándo aflojar. Por combinar a la perfección dos cualidades imprescindibles para un buen investigador, como son la creatividad científica y la capacidad organizativa.

A la Dra. María Ángeles Jiménez Sousa, por su visión global y excelente capacidad comunicativa. Por sus certeras indicaciones, sugerencias y correcciones. Por su cercanía, empatía y calidez. Por su continua dirección y apoyo, máxime cuando todo parecía superfluo. Por su actitud y resiliencia.

A ambos, fuente inagotable de conocimiento, por confiar en mí para este proyecto, especialmente cuando surgió la necesidad de compaginarlo con otras oportunidades profesionales. Por contribuir activamente a mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra. María Lourdes Lledó García, por tutorizar este trabajo, velando por el desarrollo del mismo y responder siempre a mis múltiples dudas con extrema diligencia.

A todos los miembros de la Unidad de Infección Viral e Inmunidad por sus consejos, ayuda y apoyo desinteresado. En particular, me gustaría agradecer a Óscar Brochado Kith su participación y empeño en el análisis estadístico de los datos, así como a la Dra. Amanda Fernández Rodríguez por su colaboración experta para el desarrollo de estos trabajos.

Al Centro Nacional de Microbiología (CNM) y a la Universidad de Alcalá de Henares (UAH), por proporcionar los medios y recursos necesarios.

A todos los participantes de los estudios GeSIDA y ESCORIAL, ya sean pacientes, personal sanitario o gestores de datos, cuya implicación y esfuerzo ha permitido llevar a cabo múltiples trabajos de investigación, entre los que se encuentran los aquí incluidos.

Al biobanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por su generosa contribución mediante la cesión de las muestras necesarias para estos trabajos y por su trabajo y cuidado en la preparación y conservación de las mismas.

A los miembros del Centro de Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO), en especial al Dr. David Rojo Blanco y a la Dra. Coral Barbas Arribas, así como al personal del Centro de Regulación Genómica (CRG), por sus impecables trabajos en los experimentos de metabolómica no dirigida y en la preparación de librerías y secuenciación, respectivamente.

A mis compañeros de trabajo actuales del hospital de El Escorial, auxiliares, técnicos y F.E.As, del laboratorio y al resto de trabajadores del hospital, por ser fuente de motivación diaria para afrontar nuevos retos y seguir creciendo.

A mis compañeros de trabajo pasados por haber contribuido a mi desarrollo como analista. Especialmente, a todos aquellos grandes profesionales que se molestaron en enseñarme, corregirme y ayudarme, sin esperar nada a cambio.

A mis amigos, por ser cómplices de “chorradas varias” durante alguna “quedada de gente guapísima”, aunque seamos ya unos “senials”.

A mi familia, porque estuvieron, están y estarán siempre ahí. Porque nada es suficiente para agradecer todo lo que han hecho, hacen y harán por mí.

A todos aquellos que dan más de lo que reciben. A los que crean. A los que se esfuerzan por ver cuando miran.

A Lidia, por su risa en ocasiones descontrolada, por su paciencia impaciente conmigo, por combinar a la perfección la ternura de una niña y la firmeza de una mujer implacable. Por todos los buenos y malos momentos compartidos y por los que nos quedan por compartir.

A Sofía, por conquistarme con un llanto, por borrar de una mirada todos mis miedos, por ese sol que tiene de sonrisa. Por enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo.

A lo bueno por venir.

A todos, por todo lo anterior y mucho más: GRACIAS.

Financiación

Esta tesis fue realizada con el apoyo financiero del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) a través de proyectos específicos (Ref.: PI17CIII/00003 a SR, y CP17CIII/00007 y PI18CIII/00028 a MAJS) y del Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC; Ref.: CB21/13/00044).

Índices

Índice de contenido

Agradecimientos.....	I
Financiación	V
Índices	VII
Índice de contenido	VIII
Índice de tablas.....	X
Índice de figuras	XI
Abreviaturas	XIII
Resumen	XXI
Abstract	XXIII
Introducción	1
Introducción	2
Infección por el VHC	3
Epidemiología y transmisión.....	3
Ciclo viral.....	4
Diagnóstico de la infección	6
Historia natural de la infección	7
Respuesta inmune a la infección	9
Alteraciones metabólicas durante la infección.....	11
Patogénesis de la fibrosis	14
Progresión de la fibrosis	17
Marcadores de fibrosis	20
Modelos pronósticos.....	26
Tratamiento de la infección por el VHC	29
Tratamientos disponibles.....	29
El hígado tras la eliminación del virus	31
Coinfección por VHC/VIH	35
Hipótesis.....	39
Objetivos	41
Materiales y métodos	43
Sujetos de estudio.....	44
Cohorte GeSIDA 3603b	44
Cohorte ESCORIAL.....	44

Aspectos éticos	44
Variables de estudio recogidas	45
Muestras biológicas	45
Grupos de estudio	45
Ensayos de laboratorio	48
Biomarcadores plasmáticos	48
Metabólica	49
Transcriptómica	49
Análisis estadístico	51
Análisis descriptivo	51
Análisis exploratorio	51
Modelos lineales generalizados	52
Resultados	55
Los niveles plasmáticos de IP-10 y la IL-6 están relacionados con la clase B de Child-Pugh en pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el VHC: un estudio transversal	56
Huella metabólica plasmática de estadios avanzados de cirrosis en pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por VHC	67
Firma de expresión génica de la cirrosis avanzada con alto riesgo de hipertensión portal clínicamente significativa en CMSPs de pacientes coinfectados por VHC/VIH: un estudio transversal	81
Discusión	91
Biomarcadores plasmáticos vinculados a la inflamación se relacionan con la gravedad de la cirrosis hepática	92
El perfil metabólico plasmático de los pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por el VHC se altera durante los estadios avanzados de la cirrosis	95
Los pacientes mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada descompensada presentan alteraciones similares	100
Los pacientes coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada con alto riesgo para HPCS presentan un perfil de expresión génica diferencial	102
Biomarcadores accesibles distinguen a los pacientes con mayor disfunción hepática	108
Perspectivas futuras	112
Limitaciones	112
Conclusiones	115
Referencias bibliográficas	117
Apéndices	141

Índice de tablas

Tabla 1. Cálculo, interpretación y comparación de los sistemas de puntuación de CTP y MELD.	27
Tabla 2. Descripción de los pacientes incluidos en este trabajo de tesis.	46

Índice de figuras

Figura 1. Historia natural de la infección por el VHC.	9
Figura 2. Interacción celular en la fibrogénesis hepática.	16
Figura 3. Mecanismos de disfunción inmune asociada a la cirrosis.	20
Figura 4. Criterios de Baveno VII para la determinación no invasiva de enfermedad hepática crónica avanzada compensada e hipertensión portal clínicamente significativa.	23
Figura 5. Beneficios de la respuesta viral sostenida en la función hepática.	31
Figura 6. Destinos celulares de las células hepáticas estrelladas.	32
Figura 7. Biomarcadores plasmáticos evaluados de acuerdo a su función fisiopatológica. ..	93
Figura 8. Principales alteraciones metabólicas encontradas, asociadas a una mayor puntuación en la escala CTP.	100
Figura 9. Los pacientes mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH con daño hepático avanzado presentan alteraciones similares.	101
Figura 10. Hipotéticas funciones y aplicaciones de MDK durante el desarrollo de la enfermedad hepática crónica.	107
Figura 11. Aplicación de nuevos biomarcadores no invasivos para reducir el vacío diagnóstico con las recomendaciones actuales.	109
Figura 12. Los pacientes con cirrosis severa ($LSM \geq 25$ kPa y/o $CTP \geq 7$) presentan alteraciones a niveles plasmático y de CMSPs.	111

Abreviaturas

2D o 3D-SWE	Elastografía de ondas de corte bidimensional o tridimensional.
AADs	Antivirales de acción directa.
ABHD17B	Hidrolasa que contiene dominio alfa/beta 17B.
ACLF	Insuficiencia hepática aguda sobre crónica.
ACTB	Actina β .
ALT	Alanina aminotransferasa.
AMR	Razón de la media aritmética.
APACHE II	Índice de evaluación fisiológica aguda y crónica de la salud II.
APRI	Relación AST/plaquetas.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
AST	Aspartato aminotransferasa.
AUC	Área bajo la curva.
AUROC	AUC de la ROC.
BTM	Módulos transcripcionales sanguíneos.
cACLD	Enfermedad hepática crónica avanzada compensada.
CAID	Disfunción inmune asociada a cirrosis.
cART	Terapia antirretroviral combinada.
CCL-5	Ligando 5 de la quimiocina CC.
CD	Cúmulo de diferenciación.
CEMBIO	Centro de Excelencia Metabolómica y Bioanálisis.
CHC	Carcinoma hepatocelular.
CLIA	Inmunoensayos quimioluminiscentes.
CMSPs	Células mononucleares de sangre periférica.

CNM	Centro Nacional de Microbiología.
COVID-19	Enfermedad del coronavirus 2019.
CRG	Centro de Regulación Genómica.
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico.
CTP	Clasificación Child-Turcotte-Pugh.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EIA	Enzimoimmunoanálisis.
ELF	<i>Enhanced Liver Fibrosis</i> .
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EMB	Embigina.
EPH-A2	Receptor 2 de efrina tipo A.
FABP-2	Proteína de unión a ácidos grasos 2.
FC	Valor de la tasa de cambio.
FDR	Tasa de descubrimiento falso.
FOX-O1	Proteína de caja <i>forkhead</i> O1.
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas.
GeSIDA	Grupo de estudio del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
GLM	Modelos lineales generalizados.
GLUT-1	Transportador de glucosa 1.
GPR146	Receptor acoplado a proteína G 146.
GPVH	Gradiente de la presión venosa hepática.
GTF2A1	Subunidad 1 del TFIIA.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.

HLA-DR	Isotipo DR del antígeno leucocitario humano.
HPCS	Hipertensión portal clínicamente significativa.
IFN	Interferón.
IL	Interleuquina.
IL-1 RA	Antagonista del receptor de la IL-1.
iMELD	MELD integrado.
INR	Índice internacional normalizado.
IP-10	Proteína de 10 kilodalton inducida por IFN- γ .
ISGs	Genes estimulados por interferón.
Kb	Kilobases.
kPa	Kilopascal.
LBP	Proteína de unión al LPS.
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
lncARN	ARN de cadena larga no codificante.
LPC	Lisofosfatidilcolina.
LPE	Lisofosfatidiletanolamina.
LPS	Lipopolisacárido.
LSM	Medida de la rigidez del tejido hepático.
MAFLD	Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica.
MAVS	Proteína de señalización antiviral mitocondrial.
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1.
MDA-5	Gen asociado con la diferenciación del melanoma 5.
MDK	Midquina.

MELD	Modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal.
miARNs	microARNs.
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida.
NK	Células asesinas naturales.
NKT	Células T asesinas naturales.
NLR	Receptores de tipo NOD.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPG	Osteoprotegerina.
OR	Razón de probabilidades.
PAI-1	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno.
PCA	Análisis de componentes principales.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PD-1	Proteína de muerte programada 1.
PELD	MELD pediátrico.
PIIINP	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III.
PK-B	Proteína quinasa B.
PK-M2	Piruvato quinasa M2.
PK-R	Proteína quinasa R.
PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales.
PMADs	Patrones moleculares asociados a daño.
PMAPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisómicos.
pSWE	Elastografía de punto de onda de corte.

PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina.
RIG-1	Proteína codificada por el gen inducible por el ácido retinoico 1.
RIN	Número de integridad del ARN.
ROC	Curva característica operativa del receptor.
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa.
RVS	Respuesta viral sostenida.
SCAMP1	Proteína de membrana transportadora secretora 1.
sCD14	CD14 soluble.
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoendoplasmático.
sICAM-1	Molécula soluble de adhesión intercelular 1.
SOFA	Índice de evaluación secuencial de fallo orgánico.
sRANKL	Ligando soluble del receptor asociado del factor nuclear kappa B.
SRB1	Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I.
STAG3L2	Antígeno estromal 3 similar a 2.
STAT-3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
sTNF-R1	Receptor 1 del TNF soluble.
sVCAM-1	Molécula soluble de adhesión celular vascular 1.
sVEGF-R1	Receptor 1 para el VEGF soluble.
TFIIA	Factor de transcripción general IIA.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.
TLR	Receptor tipo Toll.
TMEM64	Proteína transmembrana 64.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.

Treg	Linfocitos T reguladores.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
VHB	Virus de la hepatitis B.
VHC	Virus de la hepatitis C.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.
VIP	Importancia de la variable en la proyección.
VITRO	Índice entre el antígeno del factor de von Willebrand y las plaquetas.
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.
ZFHx2-AS1	ARN antisentido 1 del homeobox dedo de zinc 2.

Resumen

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es capaz de causar una enfermedad hepática crónica que puede derivar en cirrosis y cuyo curso se altera por la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La enfermedad puede progresar hasta cirrosis avanzada, desarrollando hipertensión portal clínicamente significativa (HPCS). En este trabajo, hemos caracterizado alteraciones moleculares ocurrientes en pacientes coinfectados por el VHC y el VIH durante la cirrosis avanzada, que abarcan tanto marcadores plasmáticos, como alteraciones metabólicas y transcriptómicas.

En primer lugar, los marcadores plasmáticos de inflamación IP-10, IL-8, IL-6 y OPG, los de disfunción endotelial, sVCAM-1 y sICAM-1, y de riesgo trombótico como el dímero D, se encontraron más elevados en aquellos pacientes con una cirrosis más severa. En segundo lugar, los estadios avanzados de cirrosis se relacionaron con cambios en el perfil metabolómico. Por un lado, se encontraron aumentados los ácidos grasos, ácidos biliares, aminoácidos aromáticos y azufrados, derivados del butirato, fosfolípidos oxidados, y aquellos metabolitos relacionados con la energía y con la fermentación bacteriana. Por otro lado, las lisofosfatidilcolinas (LPC) y las lisofosfatidiletanolaminas, los aminoácidos ramificados y los metabolitos del ciclo del ácido tricarbóxico disminuyeron. Además, los pacientes con cirrosis avanzada mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH no presentaron grandes diferencias, tanto a nivel de biomarcadores plasmáticos como de alteraciones metabólicas. En tercer lugar, los pacientes con alto riesgo de desarrollar HPCS ($LSM \geq 25$ kPa) fueron caracterizados por una firma de expresión génica diferencial que englobaba 38 transcritos sobreexpresados y 22 infraexpresados. Por último, las distintas alteraciones moleculares estudiadas permitieron distinguir subgrupos de pacientes con interés clínico. La combinación de IL-6 e IP-10 y, separadamente, la de los metabolitos ácido glicólico, LPC (16:0) y ácido taurocólico diferenció a aquellos pacientes con cirrosis descompensada. Además, los transcritos *STAG3L2* y *MDK* mostraron buena capacidad para discriminar a los pacientes en alto riesgo de desarrollar HPCS.

En conjunto, este trabajo permite ampliar el conocimiento de los procesos subyacentes durante el curso de esta enfermedad y abre la puerta para nuevos desarrollos que faciliten y mejoren el manejo de estos pacientes.

Abstract

Infection with the hepatitis C virus (HCV) is able to cause a chronic liver disease that can lead to cirrhosis and whose course is altered by coinfection with the human immunodeficiency virus (HIV). The disease may progress to an advanced stage, developing clinically significant portal hypertension (CSPH). In this work, we have characterized molecular alterations occurring in patients coinfecting with HCV and HIV during advanced cirrhosis, which include plasmatic markers, as well as metabolic and transcriptomic alterations.

Firstly, the inflammation plasmatic markers IP-10, IL-8, IL-6, and OPG, those of endothelial dysfunction, sVCAM-1 and sICAM-1, and of thrombotic risk such as D-dimer, were found to be higher in those patients with more severe cirrhosis. Secondly, advanced stages of cirrhosis were associated with changes in the metabolomic profile. On the one hand, fatty acids, bile acids, aromatic and sulfur-containing amino acids, butyrate derivatives, oxidized phospholipids, and those metabolites related to energy and to bacterial fermentation were found to be increased. On the other hand, lysophosphatidylcholines (LPC) and lysophosphatidylethanolamines, branched-chain amino acids and tricarboxylic acid cycle metabolites decreased. In addition, patients with advanced cirrhosis monoinfected with HCV and those who are coinfecting with HCV/HIV do not show significant differences in terms of plasmatic biomarkers or metabolic alterations. Thirdly, patients at high risk for developing CSPH (LSM \geq 25 kPa) presented a differential expression signature comprising 38 overexpressed and 22 underexpressed transcripts. Lastly, the different molecular alterations studied made it possible to distinguish subgroups of patients of clinical interest. The combination of IL-6 and IP-10 and, separately, the metabolites glycolic acid, LPC (16:0), and taurocholic acid differentiated patients with decompensated cirrhosis. In addition, *STAG3L2* and *MDK* transcripts showed a good ability to discriminate patients at high risk of developing CSPH.

In conclusion, this work helps broaden our knowledge of the underlying processes of this disease. It opens the door for new developments that facilitate and improve the management of these patients.

Introducción

Introducción

Se estima que 56,8 millones de personas en todo el mundo están infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC) [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera estrategia global sobre la hepatitis viral en 2016, marcando como objetivos la reducción de nuevas infecciones en un 90% y las muertes por hepatitis virales en un 65% para 2030 [2]. En ausencia de una vacuna efectiva, un elemento crucial para la eliminación del VHC es el tratamiento con los antivirales de acción directa (AADs). Sin embargo, su alto coste hace necesario un enfoque integral que aúne esfuerzos de los distintos sectores políticos, científicos y asociaciones, entre otros.

En este sentido, España encuadra sus actuaciones dentro del Plan Estratégico de Abordaje de la Hepatitis C [3], aunque la pandemia por la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) ha ralentizado el proceso [4].

La infección por el VHC puede alargarse en el tiempo hasta constituir una hepatitis C crónica. La historia natural de esta enfermedad es muy heterogénea, y puede presentarse desde cambios mínimos hasta fibrosis avanzada o cirrosis. Además, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) acelera la progresión de la enfermedad hepática.

En las personas con cirrosis aparece una etapa inicial compensada, seguida de otra avanzada de cirrosis descompensada. La existencia de cirrosis descompensada se asocia con una mayor morbimortalidad y el daño hepático existente, incluso tras la erradicación del virus, puede tener consecuencias mortales.

Infección por el VHC

Epidemiología y transmisión

Se estima una prevalencia mundial de infección por el VHC del 0,7% [1]. En España, la prevalencia de infección activa por el VHC en población general es baja situándose en el 0,22% entre 2017 y 2018 [5]. Sin embargo, casi un 30% de las personas no había sido diagnosticado con anterioridad, lo que refuerza la necesidad de un cribado de la infección por el VHC [6]. Además, la prevalencia está aumentada en grupos de población de riesgo, incluyendo personas socialmente desfavorecidas y con menor nivel de estudios, lo que complica el abordaje.

Actualmente, se ha confirmado la existencia de ocho genotipos [7]. El genotipo 1 es responsable del 44% de las infecciones mundiales y alrededor del 60% en países de medio y alto desarrollo. En España, un 66,9% se asociaron al genotipo 1 (24,9% subtipo 1a y 37,9% subtipo 1b) en las infecciones estudiadas entre 2000 - 2015 [8].

La transmisión del VHC ocurre generalmente mediante la exposición a sangre contaminada. Los procedimientos médicos inseguros debido a un control deficiente y un cribado inadecuado de los productos sanguíneos, especialmente en aquellos países con nivel socioeconómico medio bajo, continúan representando un riesgo importante para la infección por VHC [7, 9].

En los países con un nivel alto la vía de infección principal es el uso de dispositivos contaminados para la inyección de drogas, siendo los usuarios de drogas por vía parenteral una clara población de riesgo. Otras fuentes de riesgo incluyen la exposición de sanitarios a accidentes biológicos con agujas y la realización de tatuajes sin un control adecuado [7, 9].

El empleo de drogas de abuso acarrea unos condicionantes socioeconómicos que pueden limitar el acceso a la asistencia sanitaria. Esto, unido a la alta incidencia en esta población, puede generar reservorios, que se conviertan en grandes obstáculos para la reducción efectiva de las tasas de infección. Además, existe riesgo de reinfección tras la eliminación del virus y las reinfecciones son frecuentes en estos pacientes [7]. Cada país debe elaborar planes de microeliminación enfocados a grupos de riesgo. Un ejemplo lo encontramos en la población reclusa que presenta mayores tasas de infección que la población general y cuya localización facilita la creación de estrategias sanitarias [10, 11]. Otro grupo de riesgo sería la población inmigrante, representando un sector importante de la población española. Éstos presentan una prevalencia mayor de la infección por el VHC, probablemente reflejando la del país de origen,

junto a una mayor exposición durante la migración. Sin embargo, la ausencia de datos censales y de salud en este grupo poblacional limitan los planes de micro-eliminación en este grupo [10, 11].

La distribución de genotipos en España refleja los cambios en las vías de transmisión del VHC a lo largo de los años. En pacientes jóvenes la frecuencia de los genotipos 1a, 3 y 4, que se relacionan con el uso de drogas, es mayor que en pacientes ancianos. En este último sector poblacional, el genotipo 1b es ampliamente el más común, debido a que la infección del VHC ocurría fundamentalmente a través de procedimientos médicos inseguros y transfusiones sanguíneas [11].

La transmisión sexual del VHC es poco frecuente, excepto en el caso de hombres infectados con el VIH que mantienen relaciones sexuales desprotegidas con otros hombres [12]. El riesgo de contraer el VIH y el VHC se incrementa debido a prácticas sexuales de riesgo como la penetración receptiva sin preservativo, el “*fisting*” o el “*chemsex*”; así como al uso concomitante de drogas de inyección, presencia de lesiones ulcerosas o una alta carga viral [7]. En parejas monógamas heterosexuales, negativas para la infección por el VIH, la incidencia máxima de transmisión sexual del VHC por año se ha estimado en un 0,07% [13]. La extensión en el uso de profilaxis preexposición para prevenir la infección por el VIH puede acarrear un aumento en el riesgo de infección por el VHC [7, 14].

Las mujeres gestantes con viremia tienen un riesgo alrededor del 5% de transmisión vertical, que se incrementa hasta cerca del 10% en pacientes coinfectadas con el VIH [15]. Para identificar mejor la población pediátrica en riesgo, en Estados Unidos se recomienda realizar pruebas rutinarias en las mujeres gestantes para detectar la infección por el VHC [16]. En España no está indicado el cribado para aquellas pacientes sin exposiciones o situaciones de riesgo [6].

Ciclo viral

El VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae* que, junto al virus GB tipo B y los hepacivirus equino, de roedores y de murciélagos, establecen el género *Hepacivirus*. Los viriones del VHC tienen un tamaño pequeño (unos 50 nm) y están rodeados por una envoltura que contiene dos glicoproteínas (E1 y E2). En su interior se encuentra la nucleocápside esférica, constituida por múltiples copias de la proteína *core* interactuando con el ácido ribonucleico (ARN) genómico

viral. Los viriones circulan asociados a lipoproteínas en forma de lo que se conoce como lipoviropartículas [9, 17].

El ARN es monocatenario, de polaridad positiva y de un tamaño alrededor de 9,6 kilobases (kb). Puede actuar como un ARN mensajero (ARNm) que codifica una única poliproteína de unos 3000 aminoácidos. Ésta es procesada por proteasas celulares para generar las proteínas estructurales que constituyen las partículas virales (*core*, E1, E2 y p7) y las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) [9, 17].

La proteína *core* conforma, junto al ARN, la nucleocápside, aunque podría tener funciones adicionales interaccionando con distintas vías de señalización celular. E1 y E2 tienen un papel fundamental para la entrada y fusión virales. La proteína p7 se encuentra entre las proteínas estructurales y no estructurales en el precursor de la poliproteína y parece constituir un canal iónico que podría actuar durante el ensamblaje del virión. Las proteínas no estructurales participan en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral. NS2 actúa como una cisteín-proteasa para catalizar una única escisión entre las proteínas NS2 y NS3 y, además, actúa como cofactor en el proceso de ensamblaje. NS3 tiene actividad serín-proteasa, siendo la responsable de la mayoría de escisiones que liberan las proteínas no estructurales a partir de la poliproteína, y también posee actividad helicasa, estando probablemente implicada en el desenrollamiento del ARN viral. NS4A desempeña un papel fundamental como cofactor de NS3. NS4B induce alteraciones en la membrana citoplásmica y media las interacciones entre el virus y el huésped. NS5A es un componente esencial del complejo de replicación e interactúa con otros elementos virales (NS4B, NS5B, ARN) y de la célula huésped para regular la replicación y el ensamblaje viral. NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN que actúa durante la replicación del ARN viral.

El VHC presenta una alta variabilidad genética y se puede clasificar en, al menos, ocho genotipos que difieren en sus nucleótidos en un 25 - 35% [18]. Los genotipos se pueden dividir a su vez en subtipos, que difieren entre ellos en un 15 - 25%, y éstos en distintos mutantes o cuasiespecies [18]. Esta heterogeneidad genética complica el desarrollo de una posible vacuna.

El ciclo viral comienza con la unión de baja afinidad de E1 y E2 de las lipoviropartículas a glucosaminoglucanos y/o el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la superficie celular. Seguidamente, la acción coordinada de, al menos, cuatro factores celulares es necesaria para permitir la entrada del virus: el receptor *scavenger* clase B tipo I (SRB1), la tetraespanina o cúmulo de diferenciación (CD) 81 y las proteínas de unión estrecha, claudina 1 y ocludina.

Las proteínas claudina 6, claudina 9, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor 2 de efrina tipo A (EPH-A2) posiblemente actúen como cofactores. Este conjunto multirreceptor define la especificidad de especie y de órgano. Después de la unión, las partículas son interiorizadas por endocitosis mediada por clatrina. A continuación, la envoltura y la membrana del endosoma se fusionan y la nucleocápside se libera al citoplasma. El ARN actúa como ARNm que es utilizado para sintetizar nuevos intermediarios de replicación o es encapsidado dentro de las nucleocápsides producidas en el citoplasma. Las partículas en formación adquieren las glicoproteínas de la envoltura mientras migran a través del retículo endoplasmático y los viriones, ya ensamblados, son liberados a través de la vía de secreción celular [9, 17].

Diagnóstico de la infección

Los análisis de laboratorio disponibles para el diagnóstico de la infección por el VHC se pueden clasificar en dos tipos: aquellos ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos frente al virus (pruebas indirectas); y aquellos que detectan componentes del virus, como el ARN o el antígeno *core* (pruebas directas).

Clásicamente, se ha empleado la detección de anticuerpos anti-VHC para el cribado primario de la infección. Unos de los métodos más empleados son los enzimoimmunoanálisis (EIA), como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se han ido desarrollando nuevos ensayos dependiendo de los antígenos virales empleados hasta llegar a la cuarta generación actual y que han ido reduciendo, progresivamente, el periodo ventana. Con los ensayos actuales, los anticuerpos se pueden detectar a partir de las 6 - 8 semanas desde el comienzo de la infección y persisten indefinidamente, salvo excepciones, como en situaciones de profunda inmunosupresión [19].

Los inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) han mostrado generalmente gran correlación con los EIA para la detección de anti-VHC. Debido a su mayor simplicidad y facilidad para la automatización, los ensayos CLIA están reemplazando a los EIA, particularmente en laboratorios clínicos que soportan un gran volumen de muestras [19].

Los ensayos de inmunoblot recombinante se han utilizado previamente como ensayos complementarios para confirmar la reactividad serológica de los EIA o CLIA dada su alta especificidad, pero están en desuso debido al aumento en la disponibilidad de las pruebas

moleculares. Actualmente, para la confirmación de detección de anticuerpos anti-VHC se recomienda analizar las mismas muestras positivas utilizando otro método serológico alternativo [19].

Una prueba positiva de anticuerpos indica una infección activa por el VHC (aguda o crónica), una infección pasada resuelta u, ocasionalmente, un resultado falso positivo. Se requiere la detección de ARN del VHC para determinar una infección activa [16, 19]. Idealmente, un resultado positivo de anticuerpos debería desencadenar una prueba refleja para la detección de ARN. De esta manera, en una única muestra se puede realizar el estudio necesario, lo que reduce el tiempo de acceso al tratamiento y mejora el seguimiento de los pacientes [16, 20, 21]. A este respecto, se suma que el genotipado no es esencial para el tratamiento con los fármacos pangenotípicos actuales [20] y la creación de ensayos comerciales capaces de detectar ARN viral en cada vez menos tiempo y su disponibilidad como pruebas a la cabecera del paciente [21, 22].

Algunos pacientes con ARN en suero o plasma indetectable presentan lo que se denomina una infección oculta por VHC, en la que se puede detectar ARN tras la ultracentrifugación del suero, en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) y/o en biopsias hepáticas [23].

También se han desarrollado pruebas capaces de detectar el antígeno *core* por ELISA o CLIA como alternativa a la carga viral. Aunque presentan una menor sensibilidad, su facilidad de uso las pueden hacer adecuadas para entornos con recursos limitados [23].

Historia natural de la infección

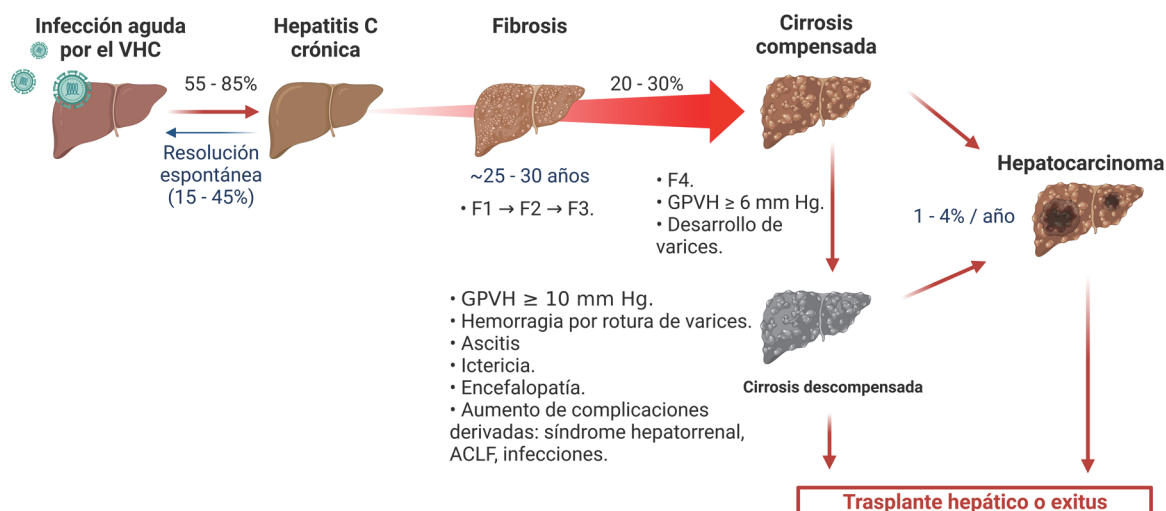
La infección inicial por el VHC cursa, habitualmente, de manera asintomática (alrededor del 75% de los casos). Los síntomas, cuando aparecen, incluyen la ictericia, fatiga, náuseas y vómitos y duran entre 2 - 12 semanas. La infección aguda se caracteriza por la detección del virus a los 2 - 14 días desde la exposición, incremento de la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) y la aparición gradual de anticuerpos específicos. El pico del incremento de ALT suele estar entre 400 - 1000 UI/L, aunque se dan casos de incrementos por encima y por debajo de esas cifras. La infección sintomática se asocia a un mayor nivel de ALT comparada con la asintomática. La aparición de hepatitis fulminante es extremadamente infrecuente (< 1%) y se asocia a factores de riesgo como la inmunosupresión o la coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) y/o VIH [7].

Cerca de un 25% de los pacientes aclaran espontáneamente el virus (presentan niveles indetectables de ARN en sangre), mientras que en el resto se establece una infección crónica. Distintos factores, relacionados tanto con el huésped (sexo femenino, respuesta inmune robusta, determinantes genéticos, etc.) como con el virus (diversidad genética reducida, baja carga viral, infección por el genotipo 1, etc.), se han asociado a una mayor probabilidad de eliminación espontánea de la infección. Uno de los factores genéticos del huésped más estudiados es el polimorfismo rs12979860 localizado en el gen *IFNL3* (anteriormente denominado *IL28B*), donde el alelo C/C se ha relacionado con un mayor aclaramiento del virus [7, 24].

El VHC es, al menos, un virus hepatotropo y linfotropo [25]. Su hepatotropismo es responsable de causar una hepatitis crónica. Una vez establecida, la hepatitis puede evolucionar a través de una serie de etapas consecutivas con un aumento progresivo de la lesión hepática, donde distintos grados de actividad inflamatoria dan paso a grados crecientes de fibrosis, que culminan con la aparición de cirrosis y complicaciones derivadas de una enfermedad hepática avanzada, como el hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) (**Figura 1**). La infección crónica progresa, de manera habitual, lentamente durante décadas, con daño hepático limitado durante los primeros 10 - 20 años de la infección. La progresión de la hepatitis C crónica se acelera en pacientes con factores de riesgo, como una mayor edad en el momento de la infección, sexo masculino, obesidad, alto consumo de alcohol, cafeína y/o cannabis, inmunosupresión, coinfección con VIH y/o el VHB, diabetes, esteatosis hepática, infección por el genotipo 3 y, posiblemente, factores genéticos, entre otros [7, 24].

El linfotropismo del VHC implica la desregulación de los linfocitos B, ya sea por la multiplicación viral dentro de los mismos o por la estimulación crónica derivada de la infección. Esto explica la crioglobulinemia mixta, que se detecta en aproximadamente un 50% de los pacientes, o la predisposición para la aparición de linfomas. Las manifestaciones extrahepáticas aparecen en hasta el 75% de los pacientes con hepatitis C crónica. Éstas incluyen trastornos autoinmunes, metabólicos y neuropsiquiátricos, así como enfermedades cardiovasculares, renales, cutáneas, tiroideas y oculares, que empeoran la calidad de vida de los pacientes [7, 26]. La existencia de estas manifestaciones sugiere un tropismo del VHC más complejo, capaz de extenderse a otros tejidos, y que aún queda por esclarecer.

Figura 1. Historia natural de la infección por el VHC.



Abreviaturas: VHC, virus de la hepatitis C; F1, F2 y F3 designa los estadios de fibrosis; GPVH, gradiente de presión venoso hepático; ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica. Imagen creada en Biorender.com, modificada a partir de [24, 27].

Respuesta inmune a la infección

La infección aguda por el VHC va a activar la respuesta inmune innata y la adaptativa. Los principales agentes de esta respuesta incluyen los interferones (IFN) tipos I y III, las células asesinas naturales (NK), los linfocitos T y las respuestas mediadas por anticuerpos.

Tanto los IFN del subgrupo tipo I (IFN α e IFN β) como tipo III (IFN λ) inducen la expresión de genes estimulados por IFN (ISGs), con funciones antivirales. El ARN viral es detectado en el citoplasma por la acción de varias proteínas, entre ellas la codificada por el gen inducible por el ácido retinoico 1 (RIG-1), la codificada por el gen asociado con la diferenciación del melanoma 5 (MDA-5) y la proteína quinasa R (PK-R). La PK-R interacciona con la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) para inducir los ISGs. El receptor tipo Toll (TLR) 3 (TLR3) también participa en la expresión de ISGs, detectando el ARN viral en endosomas. El VHC interfiere con la respuesta mediada por IFN. La serín-proteasa NS3/NS4A puede descomponer tanto la MAVS como distintos mediadores de transducción de señales inducidas por TLR3. A pesar de esta injerencia, la producción de IFN y la expresión de ISGs se mantiene durante la infección crónica. Sin embargo, esta expresión mantenida de ISGs tiene

efectos adversos en el aclaramiento espontáneo del virus y en la respuesta a la terapia combinada con IFN pegilado y ribavirina [28, 29].

La respuesta inmune innata celular contra el VHC está liderada por la acción de las células NK. Las células NK producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ (IFN tipo II), que inhiben la replicación viral y, además, ejercen una acción citolítica sobre las células infectadas por el virus. Las células NK sufren cambios funcionales durante el transcurso de la infección. En la infección aguda, se encuentran totalmente activadas con función citotóxica y con una producción aumentada de IFN- γ . A medida que la infección se cronifica, la producción de IFN- γ disminuye debido a la exposición crónica a IFN tipo I [28]. Las células T asesinas naturales (NKT), un subconjunto de las células T participantes en la respuesta innata, pueden actuar modulando la respuesta inmune en el seno de las enfermedades hepáticas [28, 29].

La acción de los linfocitos T, pese a ser más lenta que la rápida inducción de IFN, tiene un papel fundamental en el transcurso de la infección. Una fuerte respuesta por parte de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos está relacionada con la resolución espontánea de la infección aguda. La disponibilidad de linfocitos T CD8⁺ capaces de reconocer múltiples epítomos dificulta la aparición de mutantes de escape y, por tanto, de la persistencia del virus. En esta respuesta colaboran los linfocitos T CD4⁺ cooperadores y cuya ausencia impide el establecimiento de una respuesta efectora adecuada. Asimismo, las células dendríticas participan en el inicio de la respuesta inmune adaptativa al virus. Su disminución en número durante la infección por el VHC podría indicar una alteración de su función activadora de los linfocitos T [28, 29].

Durante la infección crónica, los linfocitos T se agotan y deterioran funcionalmente debido a la continua exposición a antígenos virales. Esta estimulación antigénica sostenida activa la expresión de receptores inhibitorios en los linfocitos T, incluyendo la proteína de muerte programada 1 (PD-1) y el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), entre otros controladores de reacciones inmunitarias. Además, los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ (linfocitos T reguladores o Treg) proliferan en el estado crónico, suprimiendo las funciones efectoras T [28, 29].

El papel de los anticuerpos específicos contra el VHC en el control natural de la infección es fuente de contradicción en la literatura. Los anticuerpos dirigidos frente a las proteínas de la envuelta E1 y E2 tienen actividad neutralizante, pero son de corta duración y no persisten durante las etapas crónicas de la infección. Asimismo, las mutaciones virales de escape y la

transmisión directa célula a célula pueden permitir al virus evadir la acción de estos anticuerpos. Su relevancia en la infección está aún por dilucidar [28, 29].

Alteraciones metabólicas durante la infección

El hígado es el principal órgano en la regulación del metabolismo energético con una multitud de funciones asociadas. Es posible que, a través de la alteración de las principales vías metabólicas del organismo, la infección por el VHC sea capaz de impulsar otros mecanismos de daño hepático, así como contribuir a la patogénesis de distintas manifestaciones extrahepáticas.

En primer lugar, el metabolismo de los hidratos de carbono está alterado en los pacientes con disfunción hepática. Las células hepáticas estrelladas utilizan la glucólisis aerobia, tanto durante su activación como al transdiferenciarse en miofibroblastos, acumulando lactato como producto final. En este sentido, se ha observado en estas células, procedentes de muestras de hígado fibrótico, una alta expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT-1), así como de enzimas claves de la glucólisis, como la piruvato quinasa M2 (PK-M2) y la fosfofructoquinasa. Los niveles tanto de lactato como de PK-M2 están incrementados en los pacientes con cirrosis y parecen correlacionar con la gravedad de la misma. Los pacientes cirróticos presentan un descenso en los niveles de glucógeno hepático y muscular. El descenso en la capacidad del hígado para almacenar glucógeno es compensado, parcialmente, por un aumento de la gluconeogénesis, la cual requiere energía que es obtenida a partir del metabolismo de aminoácidos y de ácidos grasos. El hígado cirrótico presenta menor actividad de la glucoquinasa hepática lo que puede contribuir a la disminución de las reservas de glucógeno hepático en estos pacientes [30]. Asimismo, la infección crónica por el VHC parece asociarse con un aumento en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 y la resistencia a la insulina. Incluso, se ha sugerido la asociación con diabetes mellitus tipo 1, por estimulación autoinmunitaria tras el tratamiento con IFN [31]. Los pacientes infectados presentan un nivel de glucosa sanguínea en ayunas superior a los controles [31]. A este respecto, la infección viral altera las vías de señalización que regulan la homeostasis de la glucosa hepática inhibiendo la acción de la proteína quinasa B (PK-B), que es inducida por insulina, así como del factor transcripcional proteína de caja *forkhead* O1 (FOX-O1). Se ha observado, también, una reducción en los niveles del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), que es un importante

regulador de la vía de la insulina. Además, PTEN es un conocido supresor de tumores que se encuentra mutado en varios de ellos, incluyendo el CHC [32].

En segundo lugar, se han observado alteraciones en el metabolismo de las proteínas. Los niveles plasmáticos de los aminoácidos esenciales de cadena ramificada, isoleucina, leucina y valina, están disminuidos; y los de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano, están aumentados en pacientes con enfermedad hepática avanzada. El cálculo de la relación entre estos aminoácidos (aminoácidos de cadena ramificada/aminoácidos aromáticos, índice de Fischer) fue propuesto ya en la década de los 70 como un indicador pronóstico, donde un valor bajo del índice se relacionaba con encefalopatía en pacientes cirróticos, y continúa usándose en la actualidad para valorar el metabolismo hepático y la severidad de la disfunción hepática [33]. El amonio es un producto de desecho, que es producido principalmente en el intestino, y que deriva del metabolismo de los productos nitrogenados de la dieta, la acción de la flora intestinal y el metabolismo de la glutamina por la glutaminasa intestinal. En condiciones fisiológicas casi la totalidad del amonio es metabolizado en el hígado y convertido en urea para su posterior eliminación renal. Sin embargo, en situación de cirrosis hepática, el músculo esquelético aumenta mucho su contribución ayudando en la eliminación mediante la síntesis de glutamina. Los niveles bajos de aminoácidos de cadena ramificada detectados en situación de cirrosis y en desórdenes del ciclo de la urea se deben al aumento en el consumo necesario para la detoxificación del amonio en glutamina. Estos aminoácidos de cadena ramificada actúan como sustratos y regulando varios procesos metabólicos, los cuales se ven afectados en los pacientes cirróticos. Además, los aminoácidos aromáticos y la metionina están aumentados en pacientes cirróticos debido a la aparición de conexiones anómalas entre la vena porta y la circulación sistémica (derivación portosistémica), así como a la capacidad reducida del hígado enfermo [30].

En tercer lugar, la infección viral va a causar la desregulación del metabolismo lipídico del huésped, lo que condiciona la patogénesis de la enfermedad hepática. La infección por VHC se asocia con factores de riesgo determinantes en la aparición del síndrome metabólico, como la hipolipidemia, la distribución alterada de la grasa corporal, la resistencia a la insulina o la hiperuricemia. Se ha detectado un aumento de la lipólisis y una disminución en los niveles plasmáticos de lípidos en los pacientes cirróticos, incluyendo triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), apoproteínas y ácidos grasos poliinsaturados [34]. Además, la afectación hepática altera el metabolismo de los ácidos biliares y de la vitamina A, ya que las células hepáticas estrelladas

acumulan el 50 - 60% de la reserva sistémica de retinoides [30]. El VHC está asociado al metabolismo lipídico del huésped desde el primer momento, ya que circula en plasma unido a las lipoproteínas en forma de lipovirionpartículas e interactúa con las VLDL del huésped. Las partículas virales se empaquetan en el retículo endoplasmático en los precursores de las VLDL y son secretadas usando la misma vía que las VLDL. Por tanto, la infección por VHC altera la vía de liberación de las VLDL, lo que favorece la acumulación de grasa celular [31]. Cerca del 55% de los pacientes infectados por el virus desarrollan esteatosis hepática, caracterizada por la acumulación de vacuolas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, especialmente en relación a la infección por el genotipo 3. El virus es capaz de inducir la esteatosis por sí solo, independientemente de la grasa visceral. MicroARNs (miARNs), tales como *miR146a5p* o *miR-21-5p*, parecen estar involucrados en este proceso [32]. Además, la infección suprime la beta-oxidación en los peroxisomas de los hepatocitos, lo que provoca la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga. En este sentido, la señalización mediada por el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3) suprime la expresión del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR) α , que presenta niveles reducidos en el hígado de estos pacientes [32]. Los PPAR también contribuyen a mantener las células hepáticas estrelladas en reposo, por lo que su baja expresión se relaciona con un aumento en la producción de matriz extracelular y la progresión de la fibrosis [30].

Finalmente, se pueden encontrar otras alteraciones metabólicas en los pacientes con hepatitis C crónica, como la afectación del metabolismo férrico y la disfunción de los tejidos muscular y adiposo. La reducción en la hormona reguladora hepcidina se ha relacionado con los altos niveles de ferritina detectados en estos pacientes, los cuales se vinculan a su vez con la sobrecarga hepática de hierro, que representa un factor de riesgo para el establecimiento de cirrosis. La hepatitis C crónica también se asocia a pérdida de músculo esquelético, sarcopenia e infiltración grasa en el músculo esquelético (mioesteatosis). Las causas se pueden trazar a la interacción entre distintos factores relacionados con la inflamación, el estrés oxidativo, el sistema endocrino (resistencia a la insulina, bajos niveles de testosterona) y a la esteatosis hepática, entre otros. La afectación directa del tejido adiposo puede alterar su función endocrina, como en la síntesis de adipoquinas, que se relacionan con múltiples complicaciones de la enfermedad, incluido el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular y trastornos neurodegenerativos [31].

Patogénesis de la fibrosis

La fibrosis hepática se caracteriza por la acumulación progresiva de matriz extracelular, la cual termina por dismantelar la arquitectura fisiológica del hígado.

En la arquitectura habitual, los hepatocitos, que son los constituyentes celulares fundamentales del hígado, se organizan en forma de cordones de una o dos células de grosor, separados por sinusoides. Éstos son capilares sanguíneos modificados, revestidos por células endoteliales fenestradas, que permiten un intercambio fácil entre la sangre y los hepatocitos, a través del compartimento denominado espacio perisinusoidal de Disse. Adheridas a la superficie de las células endoteliales, se encuentran las células de Kupffer, que son macrófagos específicos del hígado. En el espacio de Disse, se localizan las células hepáticas estrelladas (también denominadas células perisinusoidales, células de Ito o adipocitos hepáticos), actuando en el control del flujo sanguíneo sinusoidal, en el almacenamiento de vitamina A y en la fibrogénesis [35].

La fibrogénesis es considerada una respuesta protectora ante el daño hepático [36]. La agresión, ya sea viral, tóxica o metabólica, va a dañar a los hepatocitos, causar la infiltración de células del sistema inmune y la transdiferenciación de las células hepáticas estrelladas a miofibroblastos capaces de secretar colágeno. Durante el transcurso de la hepatitis C crónica, existe un desequilibrio de los mecanismos profibrogénicos y antifibrogénicos que estimula la activación y proliferación de miofibroblastos, ocasionando una producción excesiva de matriz extracelular.

La homeostasis de la matriz extracelular está regulada fisiológicamente por la acción coordinada de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que degradan el colágeno, y sus inhibidores, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Durante la fibrogénesis, este equilibrio se altera y aumenta la expresión tanto de MMPs como de TIMPs, pero con un exceso asociado de estos últimos, por lo que se inhibe la degradación de la matriz [37].

La infección por el VHC va a alterar la función celular activando o desregulando numerosas vías de señalización. Por un lado, la infección afecta a vías implicadas en el desarrollo de la fibrosis. Entre éstas, estimula la vía de Hedgehog, una vía central en el desarrollo y diferenciación del hígado, que es activada durante la reparación fibrogénica del daño hepático. Asimismo, activa la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que está involucrada tanto en la fibrogénesis, como en la progresión de la hepatitis C crónica. Induce, también, la vía de señalización mediada por STAT-3, que es activado por numerosas citoquinas,

incluyendo la citoquina proinflamatoria interleuquina (IL) 6 (IL-6). Su activación persistente está detrás de los efectos de la inflamación crónica y la fibrosis [32]. Por otro lado, la infección por el VHC incrementa el riesgo de cáncer debido a la desregulación de otras vías de señalización oncogénicas, como la iniciada por el EGFR activado, a través de la vía Ras/MAPK, o la vía de Wnt- β -catenina. Además, induce la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promoviendo la angiogénesis [32].

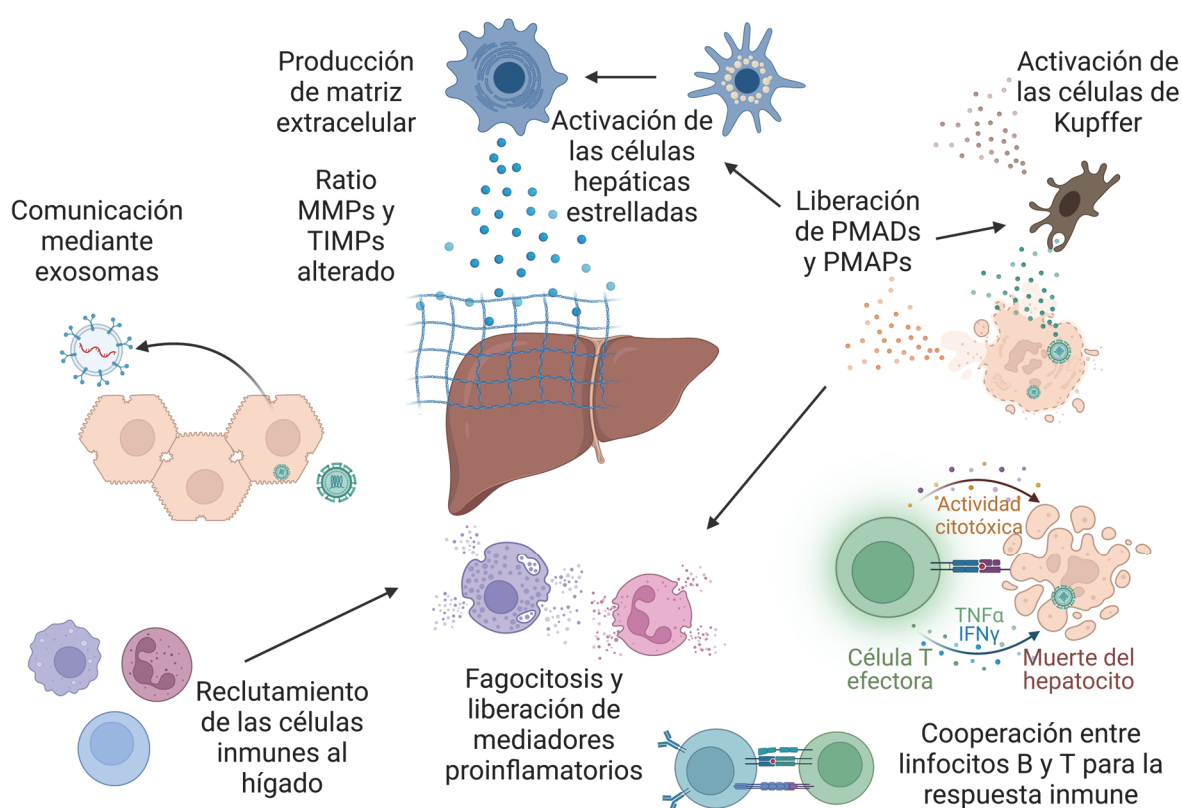
La infección por el VHC puede causar directamente la muerte de los hepatocitos, lo que provoca la liberación de compuestos intracelulares denominados patrones moleculares asociados a daño (PMADs). Los PMADs actúan como señales para desencadenar respuestas proinflamatorias que combatan la fuente del daño celular. Aunque en principio beneficiosos, la producción y liberación sin control de PMADs, sumada a la de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, activan cascadas de señalización inflamatorias que pueden llegar a exacerbar el daño hepático. Los PMADs han mostrado su capacidad de activar las células hepáticas estrelladas, la principal fuente de colágeno fibrilar en la fibrosis. Si bien la necrosis libera mayor cantidad de PMADs debido a la ruptura de la membrana, la apoptosis genera cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados por las células hepáticas estrelladas y células de Kupffer, induciendo a su vez la fibrogénesis [38, 39].

Más significativo en la patogénesis de la fibrosis se considera a la respuesta inmune del huésped, desencadenada frente a la infección viral. La inflamación persistente y descontrolada es la base de la inmunopatogenia de la enfermedad. La infección por el VHC estimula el ensamblaje del inflammasoma, probablemente mediado por las células de Kupffer. El inflammasoma es una estructura multiproteica implicada en la respuesta a estímulos intracelulares, como los virus, a través de los receptores de tipo NOD (NLR). De ese grupo, la familia NLRP3 es la más estudiada. Es capaz de reconocer tanto PMADs como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), para liberar citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β e IL-18 [40, 41]. La activación del inflammasoma por el VHC puede depender tanto del estímulo directo del virus como de sus efectos, tales como la generación de especies reactivas de oxígeno, la salida de potasio celular o la actividad de la proteína p7 viral [41, 42].

La interacción entre las distintas células hepáticas (hepatocitos, células de Kupffer, células hepáticas estrelladas, células endoteliales), así como las células inmunitarias reclutadas durante la infección, condiciona el microambiente hepático y media la señalización de la cascada inflamatoria (**Figura 2**). Al respecto, tanto los hepatocitos infectados, como las células de

Kupffer condicionadas tras la exposición al virus, inducen la expresión de genes relacionados con la fibrogénesis en las células hepáticas estrelladas, por ejemplo, mediante TGF- β 1 [41, 42]. Además, los hepatocitos infectados y las células de Kupffer activadas secretan quimiocinas, como el ligando 5 de la quimiocina CC (CCL-5), que reclutan células inmunes al lugar de la infección, exacerbando la respuesta inflamatoria. Por otro lado, también producen especies reactivas de oxígeno que, al acumularse, pueden generar estrés oxidativo, agravando la respuesta inflamatoria e induciendo la activación de las células hepáticas estrelladas [41, 42].

Figura 2. Interacción celular en la fibrogénesis hepática.



Abreviaturas: MMPs, metaloproteinasas de la matriz; TIMPs, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; PMADs, patrones moleculares asociados a daño; PMAPs, patrones moleculares asociados a patógenos; TNF, factor de necrosis tumoral; IFN, interferón. Imagen creada en Biorender.com.

Aunque las células hepáticas estrelladas sean el efector central de la fibrogénesis, su activación también puede contribuir a la regresión de la fibrosis a través de la liberación de proteasas

capaces de degradar la matriz extracelular. Por tanto, el conocimiento de sus mecanismos de activación puede ayudar al desarrollo de terapias dirigidas que permitan revertir la respuesta fibrótica [37].

En esta comunicación intercelular, fundamental para el desarrollo de fibrosis, pueden jugar un papel importante los exosomas, pequeñas vesículas que contienen proteínas, ARN y otras moléculas, que son liberadas al microambiente y capturadas posteriormente por otras células y que se ha visto que participan tanto en procesos fisiológicos, como durante la enfermedad hepática [43].

Aunque la fibrogénesis parece, en gran medida, condicionada por el estado de inflamación crónica, el propio VHC en sí mismo puede promover el proceso. Así, se ha relacionado la proteína *core* con la estimulación de la proliferación de células hepáticas estrelladas, mediante la activación de las vías RAS/ERK y PI3K/PK-B, y a las proteínas NS3 y NS5 con la activación de la vía de NFκB, que regula la transcripción de genes relacionados con la inflamación. Además, el VHC puede aumentar directamente el estrés oxidativo. La presencia de proteína *core* en hepatocitos se relaciona con una reducción de los niveles intracelulares y mitocondriales de glutatión, el principal antioxidante endógeno, y la proteína NS3 puede estimular la generación de especies reactivas de oxígeno a través de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) oxidasa en linfocitos T y células de Kupffer [39].

Progresión de la fibrosis

El tejido fibrótico cicatricial, incapaz de desempeñar ninguna función útil, va reemplazando las células hepáticas a medida que la fibrosis progresa. El estado cirrótico representa la fase final de la hepatitis C crónica, donde la estructura y función del hígado se ven profundamente alteradas.

Los pacientes con cirrosis se dividen entre aquellos en una fase inicial con una cirrosis estable y compensada, y aquellos en una fase avanzada o descompensada [44]. La subclasificación del proceso cirrótico en una sucesión de estadios clínicos proporciona una descripción más realista del curso de la enfermedad [45]. Se ha propuesto recientemente el término de enfermedad hepática crónica avanzada compensada (cACLD) para aquellos pacientes con enfermedad hepática crónica en riesgo de desarrollar hipertensión portal clínicamente significativa (HPCS), y que pretende reflejar mejor el hecho de que la fibrosis severa y la cirrosis forman parte del

mismo espectro continuo y, a menudo, son clínicamente indistinguibles en pacientes asintomáticos [46].

La descompensación viene caracterizada por la aparición de complicaciones derivadas de la insuficiencia hepatocelular y la hipertensión portal. Otras complicaciones de la cirrosis incluyen la peritonitis bacteriana espontánea y el síndrome hepatorenal.

La insuficiencia hepatocelular está causada por la muerte de los hepatocitos y su sustitución por tejido fibrótico, sin capacidad de desarrollar las funciones de síntesis y depuración propias del hígado intacto, por lo que aparece ictericia, trastornos de la coagulación, hipoalbuminemia, acumulación de productos tóxicos y/o encefalopatía.

La hipertensión portal se genera por el aumento de presión que provoca la cirrosis sobre la vena porta. Esta hipertensión va a provocar la aparición de ascitis y el desarrollo de varices esofagogástricas, cuya posible ruptura es capaz de causar una grave hemorragia aguda con riesgo vital. Como medida indirecta de la presión portal, se suele utilizar el gradiente de la presión venosa hepática (GPVH), que se define como la diferencia entre la presión venosa suprahepática al enclavar el catéter y la libre. El GPVH oscila habitualmente entre 2 y 5 mm Hg en individuos sanos. Un gradiente mayor o igual a 6 mm Hg se considera hipertensión portal y uno mayor o igual a 10 mm Hg se considera HPCS. El grado de hipertensión portal condiciona el desarrollo y ruptura de las varices esofagogástricas y su reducción representa un objetivo terapéutico. Se requiere un GPVH de al menos 10 mm Hg para que se desarrollen las varices y uno de al menos 12 mm Hg para que se rompan [47]. Aunque el GPVH es el método de referencia para el diagnóstico de la HPCS, es un método invasivo cuyo uso está limitado a centros especializados [48]. Por ello, se han desarrollado estrategias no invasivas como la utilización del recuento plaquetario y la medición por elastografía.

Durante la evolución de la fibrosis y establecimiento de la cirrosis, se van produciendo alteraciones progresivas de la respuesta inmune y cuyo grado de afectación es un reflejo de la gravedad de la enfermedad hepática. Estas alteraciones inmunológicas se han englobado bajo el término disfunción inmune asociada a cirrosis (CAID). La CAID representa un proceso dinámico caracterizado por la combinación de inflamación sistémica e inmunodeficiencia adquirida (**Figura 3**). Se produce un aumento inflamatorio inicial en el proceso cirrótico, que cambia a un estado fundamentalmente inmunodeficiente en la cirrosis descompensada y en la insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) [49].

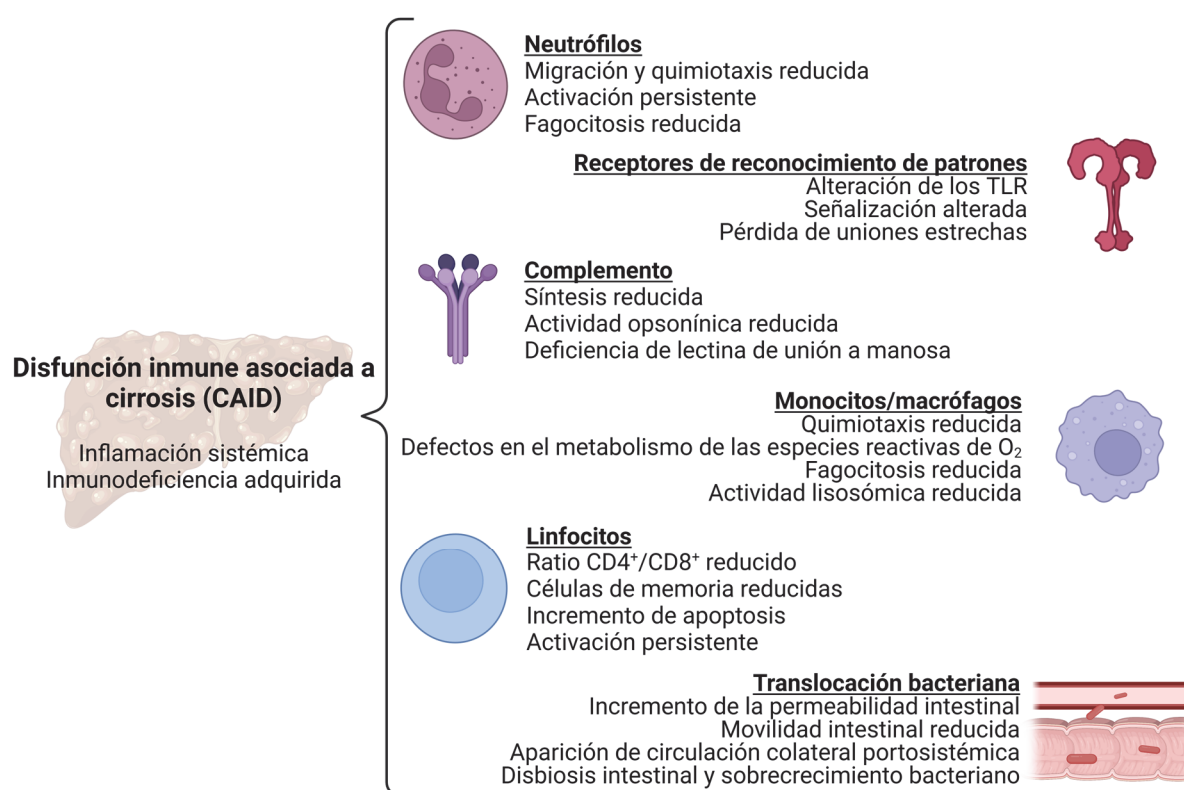
Se han descrito alteraciones tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Los principales sensores de la respuesta inmune innata son los receptores de reconocimiento de patrones, que son capaces de reconocer tanto PMADs como PMAPs, para después iniciar la respuesta inmune. El hígado es la principal fuente de estos receptores, tales como la proteína C reactiva, la proteína de unión al lipopolisacárido (LPS) (LBP), y expresa varios de ellos, como los TLR. La cirrosis entorpece la respuesta innata al limitar la capacidad de síntesis hepática de los receptores de reconocimiento de patrones, entre otras proteínas, y alterar las vías de señalización mediadas por los TLR. Además, el hígado también produce las proteínas del complemento, por lo que sus actividades de regulación del sistema inmune, citotóxicas y de opsonización se van a ver afectadas. Se observan bajos niveles de C3 y C4 en pacientes cirróticos debido a la síntesis reducida y al consumo aumentado de factores por la activación persistente [50].

También se han descrito alteraciones a nivel de los monocitos, con fallos en la quimiotaxis, fagocitosis o en la producción de especies reactivas de oxígeno. Se produce la pérdida de marcadores funcionales importantes, como el isotipo DR del antígeno leucocitario humano (HLA-DR) en monocitos, que es un marcador clásico de un estado de inmunoparálisis, una complicación conocida del shock séptico y de la ACLF, que también se ha descrito en la cirrosis. La inmunoparálisis se caracteriza por la sustitución de la producción de citoquinas proinflamatorias (como la IL-1 y el TNF- α) por citoquinas antiinflamatorias (como la IL-10). Otras células cruciales en la respuesta innata son los neutrófilos, cuyas funciones también se van a ver afectadas por el persistente estímulo inflamatorio, que se ve exacerbado por fenómenos de translocación bacteriana y/o de endotoxina [50].

La inmunidad adaptativa también se ve afectada en los pacientes cirróticos. Así, en la cirrosis avanzada, se ha observado una tendencia al establecimiento de un perfil inmunosupresor, con una disminución de la función citotóxica (respuestas Th1 y Th17) y un aumento de los linfocitos Treg [51], que puede contribuir al establecimiento del fenotipo disfuncional que se ha observado en los linfocitos T CD8⁺ de estos pacientes [52].

La CAID se asocia a un incremento de la permeabilidad intestinal y un descenso de la motilidad intestinal lo que favorece la translocación bacteriana, es decir, el paso de las bacterias y sus productos a través de la mucosa gastrointestinal. En consecuencia, aumenta el riesgo de sepsis y sus complicaciones derivadas [50, 53].

Figura 3. Mecanismos de disfunción inmune asociada a la cirrosis.



Abreviaturas: CAID, disfunción inmune asociada a la cirrosis; TLR, receptores tipo Toll.

Imagen creada en Biorender.com, modificada a partir de [49].

Finalmente, los pacientes cirróticos pueden desarrollar CHC a un ritmo anual del 2 al 4% [54]. En el hígado cirrótico existen una multitud de lesiones precursoras del CHC, con un alto riesgo de transformación maligna, lo cual explica el origen multifocal del tumor, frecuentemente observado en el contexto de la hepatitis C crónica [54].

Marcadores de fibrosis

Biopsia hepática

La determinación del grado de fibrosis hepática es importante para fijar el pronóstico y ajustar el manejo y tratamiento de la hepatitis C crónica. La evaluación histológica de los cambios estructurales asociados, mediante la biopsia hepática, continúa siendo la prueba de referencia

[55]. La biopsia aporta información no sólo sobre la fibrosis, sino también sobre el grado de inflamación, necrosis, esteatosis y siderosis, entre otras características con potencial pronóstico.

A lo largo de los años, se han ido estableciendo distintos sistemas de puntuación que clasifican el grado de fibrosis hepática, cada uno con sus ventajas e inconvenientes [56, 57]. Entre los más empleados se encuentran el Knodell, METAVIR, Ishak, Scheuer, Batts-Ludwig y Laennec. Los sistemas de estadificación histológica actualmente en uso se derivan del sistema inicial de Knodell. Así, por ejemplo, mientras que el sistema de puntuación Knodell fue diseñado para abordar de forma general la hepatitis crónica, el sistema METAVIR se diseñó y validó específicamente para pacientes con hepatitis C. En la mayoría de los estudios, se considera una fibrosis clínicamente significativa a un grado histológico de fibrosis mayor o igual a 2 sobre 4. La cirrosis corresponde al último estadio de clasificación en todos los sistemas [56, 57].

Sin embargo, la biopsia hepática presenta numerosas limitaciones. Aunque se considera una técnica relativamente segura, es un procedimiento invasivo y no está exenta de posibles complicaciones, como dolor y sangrado. Además, dado que sólo se toma una pequeña porción del órgano, puede presentar errores de muestreo y, también, puede estar sometida a variaciones de apreciación dependientes del observador [56, 57].

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos no invasivos para estimar la fibrosis. Entre estos podemos encontrar aquellos basados en pruebas de imagen, como la elastografía, y los que emplean la determinación de biomarcadores séricos.

Elastografía

La elastografía es una prueba de imagen que evalúa la elasticidad del tejido, es decir, su capacidad para deformarse cuando se aplica una fuerza extrínseca y luego volver a la forma inicial. A medida que se desarrolla más fibrosis, el hígado se torna cada vez más rígido y, por tanto, menos elástico.

Los métodos elastográficos se pueden clasificar en aquellos basados en la resonancia magnética y en los que emplean ultrasonidos [58].

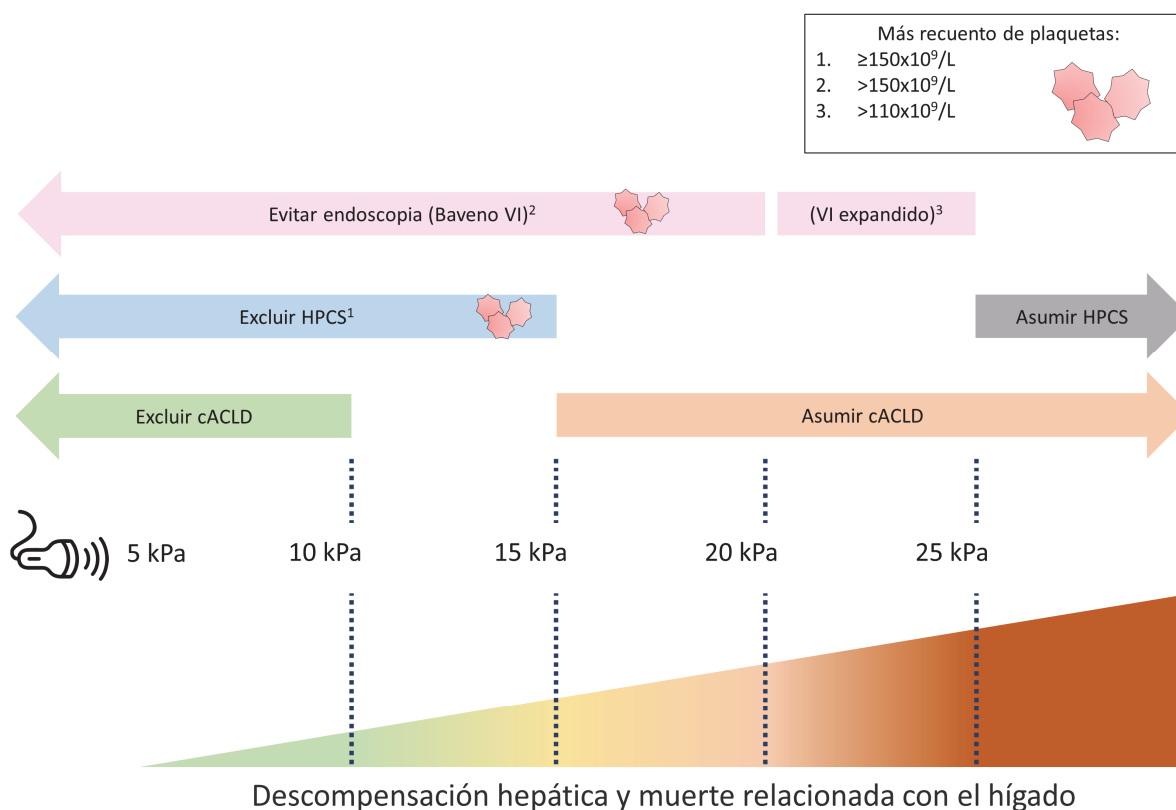
La elastografía de transición fue el primer método de elastografía desarrollado [59] y es la prueba de imagen más estudiada y extendida para estimar la fibrosis, cuyo método comercializado recibe el nombre de Fibroscan® (Echosens, Francia). Emplea una sonda de ultrasonidos que mide la velocidad de propagación de una onda elástica, previamente generada por un pulso mecánico de vibración, que se relaciona proporcionalmente con la rigidez del

tejido [58]. Así, la medida de la rigidez del tejido hepático (LSM) es un marcador subrogado de la severidad de la fibrosis hepática. Actualmente, además de la medición de fibrosis, Fibroscan[®] es capaz de ofrecer simultáneamente información sobre el nivel de esteatosis hepática mediante la medición de la atenuación del ultrasonido.

Su medición es continua, expresándose el resultado en unidades de kilopascal (kPa). Sus valores aumentan a medida que lo hace la gravedad de la enfermedad hepática crónica. Se pueden categorizar sus resultados de acuerdo a su correlación con la escala histológica METAVIR a través de puntos de corte bien establecidos: < 7,1 kPa (de F0, sin fibrosis, a F1, fibrosis leve portal sin septos); 7,1 - 9,4 kPa (F2, fibrosis significativa portal con algunos septos), 9,5 - 12,4 kPa (F3, fibrosis portal con septos numerosos) y $\geq 12,5$ kPa (F4, cirrosis) [60]; siendo ≥ 25 kPa predictivo para el desarrollo de varices esofágicas [61]. Un LSM ≥ 10 kPa es sugestivo de cACLD y uno de ≥ 15 kPa es altamente sugestivo de cACLD [46, 62] (**Figura 4**). Un valor de LSM ≥ 25 kPa se puede utilizar para determinar, de forma no invasiva, la presencia de HPCS en los pacientes con cACLD [48, 62, 63]. Aunque los criterios originales en el consenso Baveno VI y en el reciente Baveno VII mantienen la necesidad de endoscopia para la detección de varices esofágicas en pacientes con LSM > 20 kPa, se ha propuesto subir el punto de corte a ≥ 25 kPa para mejorar la eficiencia (Baveno VI expandido) [64].

La elastografía de transición presenta una alta reproducibilidad, permitiendo obtener un resultado en un tiempo corto. Sin embargo, esta técnica mide la rigidez del tejido, de la cual la fibrosis puede representar sólo un pequeño componente de la misma en ciertas situaciones. La existencia de inflamación por hepatitis aguda, colestasis por obstrucción del tracto biliar, síndrome de Budd-Chiari y la ingesta reciente de alimentos, reducen la precisión de la elastografía de transición para evaluar la fibrosis [58]. Además, la aplicación de esta técnica puede ser difícil en pacientes que presentan obesidad, ascitis y espacios intercostales estrechos [58].

Figura 4. Criterios de Baveno VII para la determinación no invasiva de enfermedad hepática crónica avanzada compensada e hipertensión portal clínicamente significativa.



Abreviaturas: cACLD, enfermedad hepática crónica avanzada compensada; HPCS, hipertensión portal clínicamente significativa; kPa, kilopascales. Adaptado y modificado de [62].

Otras técnicas cuantitativas basadas en ultrasonidos, de más reciente desarrollo, son los métodos de elastografía de punto de onda de corte (pSWE) o la elastografía de ondas de corte bidimensional o tridimensional (2D o 3D-SWE), que se diferencian en la fuerza de excitación empleada. 2D o 3D-SWE representa el sistema más novedoso permitiendo obtener resultados en tiempo real de un área tisular completa, y no de un único punto como en la pSWE, mostrando mapas de color según rangos de rigidez. Aunque estas técnicas presentan gran sensibilidad y especificidad en detectar los distintos grados de fibrosis, no está claro que sean capaces de desbancar a la elastografía de transición como la técnica de elección en la práctica clínica [65, 66].

La elastografía por resonancia magnética también analiza las ondas mecánicas que se propagan a través del hígado. La disponibilidad de datos sobre su uso clínico es más escasa que en las técnicas de ultrasonidos, pero los existentes muestran un rendimiento excelente en la evaluación del grado de fibrosis. Su mayor limitación técnica se da en pacientes con un acúmulo de hierro excesivo en el hígado. Además, presenta actualmente menor accesibilidad que los otros métodos lo que limita, en gran medida, su uso [58, 66].

Biomarcadores

Se han investigado y propuesto numerosos biomarcadores en diferentes contextos de la enfermedad hepática. Entre sus ventajas se incluyen: que no son invasivos, que presentan una gran disponibilidad con menor coste que otras estrategias y que pueden ser muy útiles para la monitorización de la enfermedad. Entre sus principales desventajas se encuentran: que los marcadores directos no son específicos de un órgano, que la mayoría funcionan mejor en estadios de fibrosis bien establecidos y no discriminan tan bien los estadios intermedios, que su aclaramiento se ve influenciado por la función biliar y/o renal, que presentan una precisión mejorable y que se requiere profundizar en la validación en determinados contextos clínicos [58, 67].

Los biomarcadores se pueden dividir en dos categorías. Los de clase I son marcadores directos del recambio de la matriz extracelular, mientras que los de clase II son marcadores indirectos, que reflejan cambios en la función hepática.

Los marcadores directos están involucrados en el metabolismo de la matriz extracelular por parte de las células hepáticas estrelladas y otras células. Sus niveles se elevan progresivamente junto con la fibrosis y tienden a bajar en respuesta al tratamiento. Se pueden subdividir, a su vez, de acuerdo a su estructura molecular en: colágenos (como el propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) y el nivel del colágeno IV); glicoproteínas y polisacáridos (como el ácido hialurónico, laminina y la glicoproteína 39 del cartílago humano); colagenasas y sus inhibidores (MMPs y TIMPs); y citoquinas y marcadores proteicos (TGF- β 1, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, proteína asociada a microfibrillas 4, y los niveles de los fragmentos de la citoqueratina 18) [58, 67].

Los marcadores indirectos miden la función hepática, reflejando indirectamente el grado de fibrosis. Son utilizados rutinariamente dentro de la práctica clínica. Entre ellos, podemos encontrar enzimas hepáticas (como la AST, ALT, gamma-glutamyl transferasa y fosfatasa

alcalina), marcadores de síntesis (tiempo de protrombina, bilirrubina, albúmina y otras proteínas como haptoglobina o lipoproteínas), y otros marcadores indirectos (como el recuento de plaquetas). Aunque estos marcadores son baratos y ampliamente disponibles, no presentan tan buen rendimiento como los directos para evaluar el grado de fibrosis [58, 67].

La combinación de varios biomarcadores puede mejorar el rendimiento de estos análisis en términos de sensibilidad y especificidad. Entre ellos destacan el cálculo de la relación AST/ALT, la relación AST/plaquetas (APRI), NFS (que se utiliza específicamente en la enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica, MAFLD) y FIB-4. FIB-4, como su nombre indica, se basa en cuatro variables: recuento de plaquetas, edad, AST y ALT. Su resultado va a indicar el grado de fibrosis, siendo $< 1,45$ bajo riesgo para fibrosis avanzada (F0 - F1) y $> 3,25$ alto riesgo (F3 - F4), con riesgo intermedio entre estos valores [58, 68].

Se han desarrollado paneles de marcadores más complejos que presentan mejor precisión diagnóstica, pero con un mayor coste asociado. Los más usados son el *Enhanced Liver Fibrosis* (ELF[®]), el Fibrotest/Fibrosure[®] y el Hepascore[®]. Todos tienen un buen valor predictivo negativo para descartar fibrosis avanzada. Mientras que el ELF[®] se usa fundamentalmente en Europa, en Estados Unidos se suele emplear el Fibrotest/Fibrosure[®] y el Hepascore[®] [58, 68]. El ELF[®], originalmente diseñado para pacientes con hepatitis C crónica, emplea la medición de tres biomarcadores directos como son el ácido hialurónico, el TIMP-1 y el PIIINP.

Además, la progresión de la fibrosis hepática es multifactorial, imbricándose tanto factores genéticos como ambientales. En los últimos años, se ha ido generando evidencia creciente sobre la contribución fibrótica de ciertos marcadores genéticos. En este sentido, se han asociado distintos polimorfismos relacionados con la respuesta inmune mediada por IFN y citoquinas en la progresión de la fibrosis y en la aparición de CHC [69]. Además, las alteraciones epigenéticas causadas por el virus, incluyendo modificaciones de histonas y la hipermetilación o hipometilación de ciertos genes, puede estar detrás del riesgo incrementado de CHC. Esta marca podría permanecer incluso tras la cura virológica [70]. Por otro lado, los miARNs, que actúan regulando la expresión génica, se han visto alterados durante la infección por el VHC [71]. Su perfil puede desregularse, tanto en pacientes mono infectados con el VHC [72], como en coinfectados con VHC/VIH [43]. La evaluación de este perfil viral tras la curación virológica podría tener importancia para el seguimiento de estos pacientes, incluso teniendo consecuencias específicas dependiendo del sexo del paciente [73].

Modelos pronósticos

Los modelos pronósticos son útiles para estimar la gravedad y mortalidad y, por tanto, tomar decisiones clínicas al respecto. Los sistemas de puntuación de Child-Turcotte, modificado posteriormente por Pugh (CTP), y el modelo establecido para la enfermedad hepática en etapa terminal (MELD) se han utilizado clásicamente para la evaluación pronóstica de la cirrosis hepática (**Tabla 1**).

La escala CTP asigna entre 1 y 3 puntos, según el nivel de alteración, a las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, el tiempo de protrombina, y el grado de encefalopatía y ascitis. Además, designa tres clases de acuerdo a la puntuación obtenida, A (5 - 6 puntos), B (7 - 9 puntos) y C (10 - 15 puntos). La clase A representa una enfermedad compensada, en la clase B aparece la disfunción hepática con un grado de descompensación moderado y en la clase C la enfermedad está gravemente descompensada. Estas clases correlacionan con las tasas de supervivencia a uno y dos años: clase A: 100 y 85%; clase B: 80 y 60%; y clase C: 45 y 35%, respectivamente.

Este sistema empírico de estadificación está validado y consolidado para evaluar el grado de disfunción hepática y, dado su fácil uso, está ampliamente extendido en la práctica clínica. Sin embargo, presenta una serie de desventajas, como utilizar parámetros subjetivos (ascitis y encefalopatía hepática) que, además, pueden ser modificados por el tratamiento médico y la existencia de un suelo y un techo en su capacidad discriminatoria, ya que a partir de un determinado valor la puntuación asignada ya no cambia [74].

Para intentar superar estas limitaciones, se desarrolló el modelo MELD. Es un índice pronóstico de mortalidad objetivo, calculado a partir de tres variables analíticas rutinarias de laboratorio: bilirrubina, creatinina y el índice internacional normalizado (INR), calculado a partir del tiempo de protrombina. Sus valores oscilan entre 6 y 40, representando un mejor pronóstico cuanto más bajo es el resultado. Debe emplearse en pacientes mayores de 12 años, mientras que para los menores de esa edad se emplea el índice MELD pediátrico (PELD). La escala MELD es usada como base para el orden de asignación de órganos en la lista de trasplante (excluyendo a los estadios que se consideran urgencias), aunque puede haber situaciones clínicas cuya representación por este modelo no sea del todo adecuada [74].

La capacidad predictiva del MELD para predecir mortalidad a corto plazo se sitúa alrededor del 85%, lo que significa que cerca de un 15% de los pacientes presenta alta mortalidad con un bajo puntaje del MELD [75]. Para intentar mejorar la capacidad pronóstica, se han propuesto

nuevos modelos a partir de la modificación del MELD como el MELD-Na, MELD integrado (iMELD), Refit MELD y Refit MELD-Na. Dado que la gravedad de la hipertensión portal se relaciona inversamente con la concentración de sodio, debido al acúmulo de agua libre, en ellos se ha incorporado la determinación de la concentración sérica de sodio [74].

Tabla 1. Cálculo, interpretación y comparación de los sistemas de puntuación de CTP y MELD.

Puntuación de la clasificación Child-Pugh-Turcotte (CTP)				Interpretación CTP	Comparación entre ambas puntuaciones		
Criterios clínicos y de laboratorio	1 punto	2 puntos	3 puntos			CTP	MELD
Encefalopatía	No	Grado 1 - 2	Grado 3 - 4	<ul style="list-style-type: none"> • 5 a 6 puntos: Clase A. Enfermedad bien compensada. • 7 a 9 puntos: Clase B. Compromiso funcional significativo. • 10 a 15 puntos: Clase C. Enfermedad descompensada. 	Número de variables (cuantitativas)	5 (3)	3 (3)
Ascitis	Ausente	Leve a moderada	Grave		Selección de las variables	Empírica	Estadística
Bilirrubina total (mg/dL)	< 2	2 - 3	> 3		Peso diferente de las variables según su influencia	No	Sí
Albúmina (g/dL)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8		Efecto techo de las variables	Sí	No
Tiempo de protrombina -Segundos sobre el control	< 4	4 - 6	> 6		Transformación logarítmica de variables	No	Sí
-Índice internacional normalizado (INR)	< 1,7	1,7 - 2,3	> 2,3				
Puntuación del modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal (MELD)				Interpretación MELD (Mortalidad a los 3 meses)	Variables influenciadas por valoración subjetiva	Sí	No
Puntuación MELD = $9,57 \times \ln(\text{creatinina sérica, en mg/dL}) + 3,78 \times \ln(\text{bilirrubina total sérica, en mg/dL}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 6,43$				<ul style="list-style-type: none"> ≥ 40: 71,3 % 30 - 39: 52,6 % 20 - 29: 19,6 % 10 - 19: 9,0 % < 9: 1,9 % 	Tipo de sistema de puntuación	Categorico	Continuo

Modificado a partir de [76].

Ambos sistemas de puntuación, MELD y CTP, presentan habilidades pronósticas similares en la mayoría de los casos, con estudios apuntando a favor de ambas direcciones. Sin embargo, bajo ciertas condiciones clínicas, puede que sea más favorable el uso de uno respecto al otro [77].

Estos sistemas de puntuación han mostrado sus carencias en el contexto de la ACLF. La ACLF es un subconjunto de la insuficiencia hepática caracterizado por una descompensación aguda de una hepatopatía crónica, acompañada de fallo multiorgánico y asociada a una elevada

mortalidad [78]. La capacidad pronóstica de las escalas tradicionales, como MELD y CTP, se ve muy restringida debido a que no tiene en consideración el fallo de otros órganos clave en pacientes críticos, como la afectación vascular, cerebral y de la función respiratoria [79]. El uso del iMELD que integra el MELD, la edad y la natremia parece que es capaz de mejorar, al menos en parte, esta capacidad pronóstica [79].

Alternativamente, se han empleado índices generales de clasificación pronóstica, como el índice de evaluación fisiológica aguda y crónica de la salud II (APACHE II) y el índice de evaluación secuencial de fallo orgánico (SOFA). Estos índices mejoran sus prestaciones, pero los elementos que los constituyen obvian las características fisiopatológicas y clínicas de la cirrosis. Por ello, se han desarrollado recientemente nuevos sistemas de puntuación, modificados a partir de los generales, como son los sistemas CLIF-OF, CLIF-SOFA y RFH (*Royal Free Hospital*) [79]. Aunque se requieren más estudios que permitan conocer en profundidad el desempeño de estas escalas, el sistema CLIF-C ACLF, que simplifica y mejora la capacidad pronóstica del CLIF-SOFA, ha mostrado una mayor precisión en la predicción de la mortalidad en pacientes con ACLF [80].

Dadas las limitaciones de la escala MELD en demostrar la necesidad de trasplante hepático en pacientes con ACLF y el aumento de la prevalencia de la misma, puede ser necesario reevaluar su uso actual como el sistema considerado más objetivo para la asignación de injertos [81].

Tratamiento de la infección por el VHC

Tratamientos disponibles

A diferencia del VHB o el VIH, la replicación del VHC es totalmente citoplasmática y no integra su genoma en la célula huésped. Esto ha permitido hablar de curación de la infección por el VHC, definida como respuesta viral sostenida (RVS). La RVS se describe, con los tratamientos actuales, como una carga viral indetectable tras 12 semanas después del final del tratamiento. Por supuesto, esto sólo se refiere a la curación virológica, la cual debe diferenciarse de la curación de la enfermedad hepática que el paciente haya podido desarrollar, lo cual será tratado más extensamente en este trabajo.

El IFN ha sido, tradicionalmente, la principal herramienta para el tratamiento de la infección por el VHC debido a sus propiedades antivirales e inmunoestimulantes. El uso de su forma pegilada junto con la ribavirina, un análogo sintético de nucleósidos (guanosina e inosina), produce una RVS en cerca del 50% de los infectados, en el mejor de los casos. Su uso no está carente de efectos adversos, siendo los más habituales los síntomas seudogripales, la depresión o las alteraciones hematológicas (neutropenia, trombopenia), así como, menos frecuentemente, la exacerbación de enfermedades autoinmunes o las alteraciones tiroideas [25].

El gran avance en el conocimiento en la biología del VHC ha permitido el desarrollo de inhibidores específicos frente a proteínas virales o AADs. Estos nuevos agentes han modificado completamente el tratamiento de la infección por el VHC. Se clasifican en tres familias distintas de fármacos: los inhibidores de la proteasa NS3/NS4 (que se designan con la terminación -previr), los inhibidores de NS5A (que reciben la terminación -asvir) y los inhibidores de la polimerasa NS5B (que acaban en -buvir). La combinación de fármacos de distintas familias permite incidir en distintas fases del proceso replicativo [25, 82].

Los esquemas de tratamiento con AADs, globalmente, son capaces de curar con éxito la infección por el VHC en > 95% de personas tratadas [83, 84]. La curación virológica se asocia a una mejoría de la calidad de vida, con un descenso de las tasas de mortalidad, evolución a cirrosis, descompensación hepática, aparición de CHC y manifestaciones extrahepáticas. Por ello, se recomienda el tratamiento con AADs para todos los adultos con infecciones agudas o crónicas por el VHC, salvo aquellos casos con una expectativa de vida limitada [16, 84]. El tratamiento se debe considerar prioritario en el caso de pacientes con: fibrosis significativa

(puntuación METAVIR F2 o F3) o cirrosis (METAVIR F4), manifestaciones extrahepáticas clínicamente significativas, recurrencia del VHC después de un trasplante hepático, riesgo de una evolución rápida de la enfermedad hepática debido a comorbilidades y en riesgo de ser transmisores del VHC [84]. En pacientes con CHC activo, las tasas de obtención de RVS tras AADs parecen no afectarse y el aumento en la supervivencia de estos pacientes, probablemente se deba a la reducción en las descompensaciones hepáticas [85]. En línea con Europa y Estados Unidos, en España se han ido incorporando de forma progresiva nuevos esquemas de tratamiento con AADs desde 2014 [23, 86].

La indicación de tratamiento en los pacientes coinfectados por VHC/VIH es la misma que en los pacientes monoinfectados con el VHC [86]. La terapia es segura y altamente efectiva en estos pacientes coinfectados, sin embargo, se deben considerar las posibles interacciones medicamentosas entre los AADs y la terapia antirretroviral antes de iniciar el tratamiento [87].

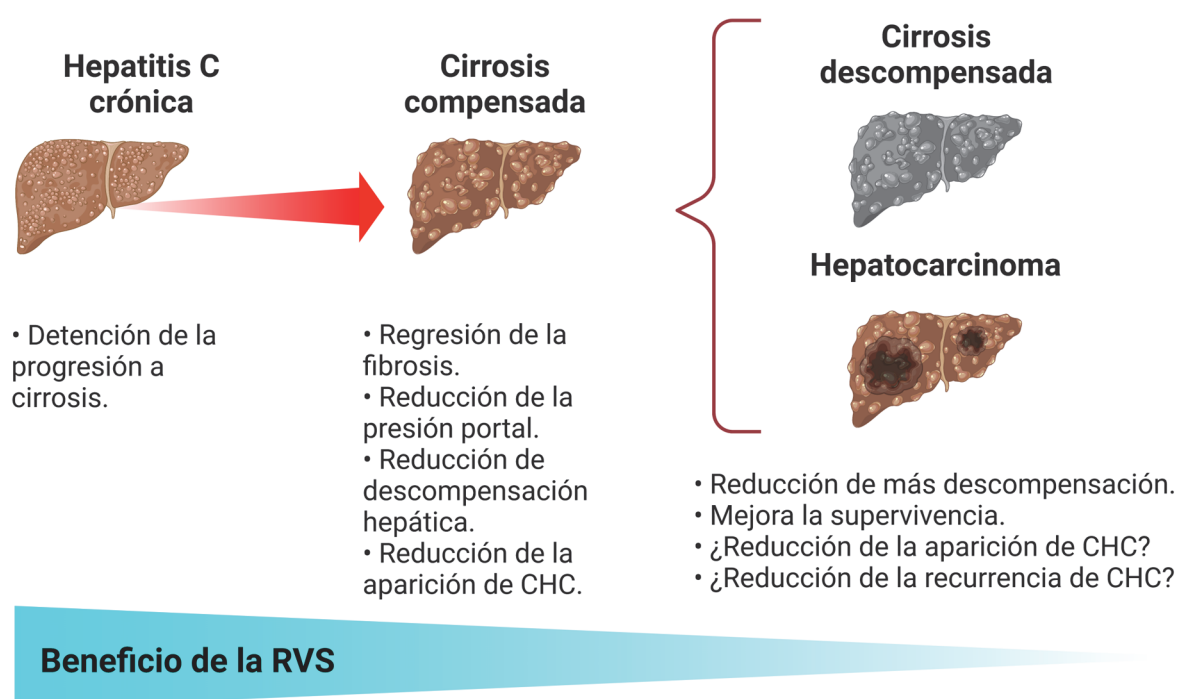
Los fallos de tratamiento, aunque poco frecuentes (2 - 5%), pueden ocurrir y afectar a un número significativo de pacientes, dada la prevalencia de la enfermedad. Entre las posibles causas se incluyen la no adherencia, interacciones farmacológicas, problemas relacionados con la farmacodinamia y/o farmacocinética, polimorfismos genéticos del huésped y sustituciones virales asociadas a resistencias [88].

La disponibilidad de tratamientos eficaces, seguros y de fácil aplicación, permiten avanzar hacia el objetivo de eliminación del VHC. Con la idea de facilitar el acceso al tratamiento, se están desarrollando algoritmos simplificados que permitan a un mayor número de sanitarios administrar el tratamiento antiviral a adultos, sin tratamiento previo, y sin cirrosis o con cirrosis compensada [16]. Además, el genotipado del VHC ya no es un requisito universal antes del inicio del tratamiento y no es necesario para pacientes sin tratamiento previo y sin cirrosis, en los cuales se emplea un régimen capaz de tratar todos los genotipos distintos, es decir, pangnotípico. Actualmente, hay tres regímenes que combinan AADs y que son pangnotípicos: sofosbuvir más velpatasvir, glecaprevir más pibrentasvir y sofosbuvir más velpatasvir más voxilaprevir. El tratamiento para la infección por VHC está en continua evolución a medida que aparecen nuevos fármacos y datos sobre los mismos [16].

El hígado tras la eliminación del virus

Los beneficios obtenidos tras la eliminación del virus, tanto en términos de supervivencia como de calidad de vida, son mayores si ésta ocurre en las primeras etapas de la enfermedad hepática [89]. La RVS reduce, pero no elimina, el riesgo de complicaciones derivadas en aquellos con una fibrosis significativa, especialmente en estadio de cirrosis y, más aún, en cirrosis descompensada (**Figura 5**).

Figura 5. Beneficios de la respuesta viral sostenida en la función hepática.



Abreviaturas: RVS, respuesta viral sostenida; CHC, carcinoma hepatocelular. Imagen creada en Biorender.com, modificada a partir de [89].

Aunque originalmente se pensaba que el proceso de fibrosis era irreversible, ahora se considera un proceso dinámico resultante de la interacción entre fibrogenesis y fibrolisis. Sin embargo, la estimulación por daño crónico y la progresión hacia cirrosis reduce las posibilidades de revertir el daño, incluso tras eliminar la infección. Los mecanismos de reversión de la fibrosis están relacionados con las células hepáticas estrelladas, dado su papel central en la fibrogenesis. Entre los destinos celulares que favorecen la resolución fibrótica están el paso de éstas a su estado

previo quiescente, la destrucción de las mismas mediante autofagia o apoptosis, o la entrada en un estado senescente (**Figura 6**). La participación del sistema inmune también puede ser importante en la reversión de la fibrosis. Así, las células de Kupffer residentes y los macrófagos de perfil inflamatorio (IL-1 β y TNF- α) y profibrogénicos (TGF- β) pueden ser sustituidos por células de Kupffer secretoras de citoquinas antiinflamatorias y MMPs, y de macrófagos con función restauradora (como los macrófagos Ly-6C^{low}) [90].

Figura 6. Destinos celulares de las células hepáticas estrelladas.

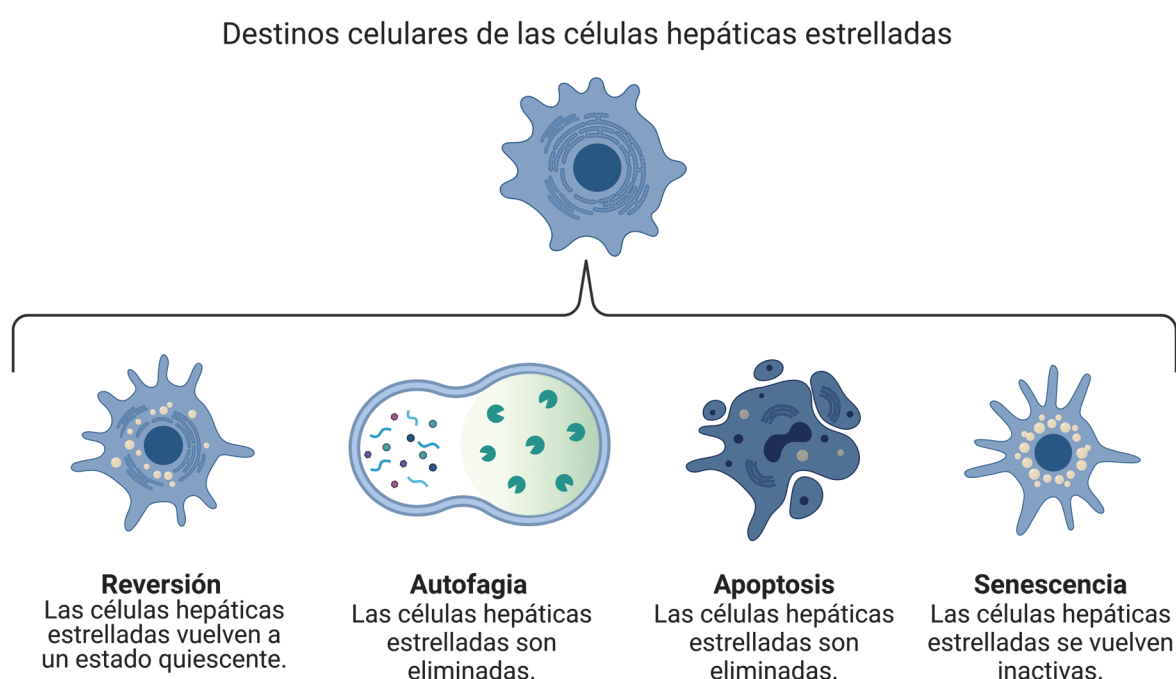


Imagen creada en Biorender.com, modificada a partir de [90].

En pacientes con fibrosis leve o moderada, el tratamiento de pacientes con AADs, cuyo objetivo es evitar la progresión continuada hasta la cirrosis o el CHC, consigue reducir la mortalidad de una manera significativa. La situación se dificulta en pacientes con enfermedad hepática avanzada. Las complicaciones derivadas de la cirrosis, a menudo, continúan siendo significativas incluso tras la cura virológica. En pacientes con cirrosis compensada, la obtención de una RVS se ha relacionado con la regresión de la fibrosis y con la reducción en la hipertensión portal, la frecuencia de las descompensaciones y el riesgo de aparición de CHC. En pacientes con cirrosis descompensada, aunque la RVS parece mejorar la supervivencia

global, sólo se ha asociado débilmente a la prevención de nuevas descompensaciones o a la aparición de CHC [89].

La curación virológica puede tener una consecuencia paradójica. Los pacientes con cirrosis descompensada pueden mejorar de tal manera que, a medida que su puntuación MELD disminuye, también lo hace su elegibilidad para un posible trasplante hepático. De esta manera, los pacientes pueden no tener acceso al trasplante con una consiguiente mala calidad de vida, pese a que su esperanza de vida haya aumentado en el corto plazo [91].

La RVS puede acarrear, también, una reducción significativa de las manifestaciones extrahepáticas, que en ausencia de enfermedad hepática terminal que curse con síntomas hepáticos claros, suele ser la causa de la mayor parte de las molestias atribuidas a la infección por el VHC. Notablemente, esta asociación fue originalmente descrita en pacientes coinfectados con el VIH [91]. Por ello, el grado de enfermedad hepática no debería ser el único aspecto a considerar en la indicación de tratamiento [91]. De hecho, las guías actuales recogen la recomendación de tratamiento con AADs a todos los adultos, con preferencia en ciertos grupos, como se ha explicado en apartados previos.

El riesgo de CHC se mantiene tras la curación virológica, tanto en pacientes con antecedente de CHC como sin él, debido a las consecuencias de la enfermedad hepática crónica. Sin embargo, el riesgo parece disminuir con el tiempo [85]. La persistencia de las marcas epigenéticas, inducidas por la infección viral, tras la curación virológica puede implicar la desregulación de vías de señalización prooncogénicas que sean parcialmente responsables del riesgo aumentado para la aparición y/o recurrencia del CHC [32]. La identificación de marcadores moleculares y epigenéticos, así como otras comorbilidades asociadas, que se relacionen con el riesgo aumentado de CHC puede ser muy útil para distinguir a los pacientes que requieran programas específicos de cribado tras la RVS [92]. Además, el desarrollo de fármacos quimiopreventivos eficaces abre una perspectiva optimista en el tratamiento de las enfermedades hepáticas avanzadas [93].

Dado que la eliminación del virus no cura la enfermedad hepática, puede ser necesario un tratamiento adicional específico para revertir la fibrosis y la recuperación del daño hepático. El tratamiento estaría dirigido a conseguir la inhibición del entrecruzamiento entre las fibras de colágeno y la deposición de elastina, la degradación de estos elementos, la inhibición del proceso de contracción - retracción del tejido fibrótico y la estimulación de la apoptosis de las células hepáticas estrelladas [94]. En este sentido, podrían tener cabida el desarrollo de terapias

dirigidas a controlar la función de las MMPs y los TIMPS, actores clave en la mediación entre los procesos de fibrinogénesis y fibrinólisis [37].

En relación a las alteraciones metabólicas, el tratamiento con AADs y la curación viral es capaz de mejorar la función metabólica hepática, tanto a nivel del control glucémico como la esteatosis hepática. En pacientes diabéticos se detecta una mejora en el estatus diabético [31]. Sin embargo, muchos genes permanecen desregulados, como los relacionados con la función peroxisomal [32]. En relación al riesgo cardiovascular se han descrito datos contradictorios. Los pacientes con RVS adquieren un perfil lipídico desfavorable tras la reversión de la esteatosis hepática y de la hipocolesterolemia asociada [95]. Sin embargo, a pesar de este perfil lipídico, los pacientes mejoran sus factores de riesgo, recuperando su función endotelial y un metabolismo de los carbohidratos adecuado, lo que se traduce en una reducción del 43% en la incidencia de eventos cardiovasculares [96].

Coinfección por VHC/VIH

La coinfección por el VIH y el VHC es común, debido principalmente a que comparten vías de transmisión. La prevalencia de infección activa por el VHC en pacientes coinfectados por el VIH en España se estimó en un 2,2% a finales de 2019, con una bajada del 90% respecto a las cifras de 2015 [97]. Esta reducción drástica probablemente sea debida, fundamentalmente, al tratamiento con AADs. Aun así, la cirrosis relacionada con el VHC sigue siendo significativa en esta población. La intersección entre ambas epidemias tiene importantes consecuencias clínicas.

Aunque el VIH infecta principalmente células del sistema inmune, también es capaz de infectar hepatocitos y células hepáticas estrelladas [98]. La desregulación inmune generada durante la coinfección se acrecienta, lo que dificulta el control espontáneo de la infección por el VHC y disminuye sus tasas.

Los pacientes coinfectados presentan una tasa acelerada de progresión de la fibrosis en comparación con los mono infectados con el VHC [98]. La progresión acusada de la fibrosis en estos pacientes conlleva unas mayores tasas asociadas de descompensación hepática y mortalidad. Además, la prevalencia del CHC está incrementada en los pacientes coinfectados VHC/VIH respecto a los mono infectados con el VHC [99].

La inmunopatogenia de esta progresión acelerada parece ser una combinación de múltiples factores.

En primer lugar, la respuesta celular en los pacientes coinfectados puede debilitarse debido a la reducción en el número de los linfocitos T CD4⁺, tan característica de la infección por el VIH, que a su vez interfiere con la respuesta de los linfocitos T CD8⁺, que es crucial ante las infecciones virales. Están involucrados tanto la ratio CD4⁺/CD8⁺ reducida, como las respuestas antivirales deficientes por parte de los linfocitos T [98]. La desregulación del sistema inmune, acentuada por la infección por el VIH, afecta también a las vías inmunomediadas por citoquinas, tales como IL-1, IL-6 o la proteína de 10 kilodalton inducida por IFN- γ (IP-10) [100].

En segundo lugar, la infección por el VIH puede favorecer una activación crónica del sistema inmune [98]. Esta activación puede estar mediada, al menos parcialmente, por fenómenos de translocación bacteriana. En los pacientes con VIH se produce el deterioro de la integridad de la barrera epitelial que, junto con la depleción de la población linfocitaria CD4⁺ intestinal, favorece el paso de las bacterias y sus productos. Sin embargo, la translocación bacteriana no

parece estar detrás de la progresión de la cirrosis en pacientes coinfectados y con enfermedad hepática avanzada [101].

En tercer lugar, las propias proteínas virales del VIH pueden estar involucradas. Se ha asociado la glicoproteína gp120 del VIH tanto a la inducción de la apoptosis en hepatocitos como a la inducción de la replicación del VHC en los mismos. El VIH puede estar también activando directamente las células hepáticas estrelladas o a través de mediadores proinflamatorios [98].

En cuarto lugar, la alteración en el balance entre MMPs y TIMPs es más evidente en pacientes coinfectados, particularmente en aquellos con una mayor depleción de CD4⁺. Tanto la desregulación de las citoquinas, como el aumento en LPS derivado de la translocación bacteriana, se han postulado como contribuidores de esta alteración [100].

Finalmente, las alteraciones metabólicas también se ven acrecentadas por el VIH y por el tratamiento antirretroviral, siendo ambos capaces de inducir resistencia a la insulina y de promover la esteatosis hepática. La infección por el VIH es capaz de provocar directamente alteraciones a nivel mitocondrial, que contribuyan al establecimiento de la esteatosis [100]

La mejora en la eficacia y seguridad de la terapia antirretroviral combinada (cART) ha permitido tratar a los pacientes infectados de una forma más efectiva. El empleo de cART puede ayudar a mitigar la aceleración de la fibrogénesis. Aunque ralentizada, clásicamente estos pacientes continuaban con una mayor progresión, debido a la existencia de comorbilidades, como factores metabólicos [99]. Recientemente, se ha descrito que los pacientes coinfectados no presentan mayor riesgo de CHC o descompensación hepática tras el tratamiento con cART, sin embargo, mantienen una mayor tasa de mortalidad, probablemente debido a causas no hepáticas [102].

Debido a la fibrogénesis acelerada, los pacientes coinfectados por VHC/VIH se han considerado clásicamente una población especial entre aquellos con hepatitis C crónica [103]. Sin embargo, la coinfección no disminuye la efectividad del tratamiento con AADs para el VHC, alcanzando tasas de RVS similares [103, 104]. Además, ambos subgrupos presentan una recuperación de la función hepática similar [105]. Así, las guías actuales de tratamiento se aplican a ambas poblaciones, con la salvedad del riesgo de interacción medicamentosa entre la cART y los AADs. Esto ha permitido eliminar el VIH como contraindicación para el enfoque de tratamiento simplificado de la última actualización de la guía de tratamiento frente al VHC [106].

Los beneficios asociados a la RVS también se recogen por parte de esta población. Así, en pacientes coinfectados con cirrosis avanzada, la erradicación del VHC tras la terapia con AADs se asoció a una mejora en la gravedad de la enfermedad hepática y los biomarcadores plasmáticos (inflamación, coagulopatía y angiogénesis) [107], así como en la expresión génica relacionada con la respuesta antiviral e inflamatoria, particularmente en los niveles de varias quimiocinas y de los ISGs [108].

No obstante, los datos limitados de los que se disponen sugieren que la curación virológica del VHC no reduce la persistencia del VIH [109]. Además, pese a la mejora en la función hepática tras los AADs, muchos pacientes siguen muriendo o requiriendo trasplante y la incidencia de CHC entre los coinfectados por VHC/VIH sigue subiendo [104].

En conclusión, se conoce que la RVS no elimina por completo las alteraciones acumuladas y que la infección por el VIH contribuye, en sí misma, a la inflamación hepática. Debido a esto, se requieren nuevos estudios que incidan sobre esta población (coinfectados VHC/VIH) y que indaguen en la fisiopatología de estos procesos, así como en la identificación de posibles nuevos biomarcadores de utilidad. El manejo y seguimiento de estos pacientes se beneficiaría del establecimiento de biomarcadores que puedan estratificar mejor a los pacientes con cirrosis, de acuerdo a distintos estadios pronósticos.

En este trabajo se aborda un estudio transversal y global de pacientes con enfermedad hepática avanzada, tanto a nivel de análisis de biomarcadores plasmáticos, de alteraciones metabólicas y transcripcionales en pacientes mono infectados por el VHC y coinfectados por VHC/VIH. Esto permitirá ahondar en el conocimiento de los profundos y complejos cambios que se producen en la progresión de la hepatitis C crónica. Estos estudios, seguidos de una evaluación longitudinal para estudiar la respuesta en los mismos de la terapia con AADs, serán muy útiles para mejorar el seguimiento y el tratamiento de estos pacientes.

Hipótesis

A medida que la fibrosis progresa, también lo hacen el número de complicaciones, con una elevada morbimortalidad asociada. La mejora del conocimiento sobre los mecanismos que subyacen a las alteraciones encontradas durante la progresión de la hepatitis C crónica puede ayudar a perfeccionar el seguimiento y tratamiento de los pacientes coinfectados con el VHC y el VIH. Asimismo, la atención clínica se beneficiaría con el desarrollo de herramientas que permitan estratificar adecuadamente a los pacientes, de acuerdo a sus alteraciones moleculares.

En este sentido, el estudio de biomarcadores plasmáticos relacionados con los distintos procesos alterados durante la cirrosis avanzada (inflamatorios, de disfunción endotelial, de coagulopatía, angiogénesis y de translocación bacteriana) podría fomentar el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados y, en última instancia, ayudar al manejo clínico de los pacientes con hepatitis C crónica.

Por otro lado, las alteraciones metabólicas son frecuentes durante la enfermedad hepática, dado el papel central del hígado en el metabolismo del organismo. Tanto la infección por el VHC como el VIH son causantes de diversas alteraciones metabólicas, y el estudio del perfil metabólico en pacientes cirróticos coinfectados por VHC/VIH puede contribuir a dilucidar potenciales mecanismos e identificar biomarcadores de progresión desfavorable.

Finalmente, el análisis de la expresión génica en estadios clínicos determinados permite explorar los mecanismos moleculares relevantes durante la patogénesis, pudiendo llegar a identificar nuevos biomarcadores y/o rutas involucradas en el pronóstico de los distintos grupos de pacientes. La aparición de HPCS puede conducir a complicaciones graves y, por tanto, a la necesidad de un manejo y tratamiento reforzados.

Objetivos

El objetivo global de este trabajo es obtener información sobre los posibles mecanismos subyacentes implicados en el curso clínico de la enfermedad hepática crónica y la identificación de biomarcadores asociados en pacientes cirróticos mono infectados por el VHC y coinfectados por VHC/VIH.

Los objetivos específicos son:

-Evaluar la asociación de marcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, coagulopatía y angiogénesis con la gravedad de la cirrosis hepática en base a la puntuación CTP, en pacientes con cirrosis avanzada infectados por el VHC, con y sin VIH.

-Identificar los metabolitos plasmáticos asociados con las características clínicas y epidemiológicas más relevantes, la puntuación CTP y la descompensación hepática en pacientes con cirrosis avanzada coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por el VHC.

-Analizar el perfil de la expresión génica de la cirrosis en CMSPs de pacientes coinfectados por VHC/VIH, así como establecer marcadores de expresión génica que permitan distinguir a los pacientes con cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS ($LSM \geq 25$ kPa).

Materiales y métodos

Sujetos de estudio

Los tres artículos de este trabajo de tesis [110-112] incluyen pacientes procedentes de dos cohortes prospectivas (**Tabla 2**), pero aquí solo se analizaron datos basales de estas dos cohortes (diseño transversal). Todos los pacientes coinfectados habían sido tratados con cART \geq 6 meses y presentaban carga viral plasmática del VIH indetectable (< 50 copias/mL).

Cohorte GeSIDA 3603b

Esta cohorte del grupo de estudio del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (GeSIDA) está formada por pacientes coinfectados por VHC/VIH (Estudio GeSIDA 3603b), que comenzaron tratamiento frente a la hepatitis C crónica con interferón y ribavirina, entre febrero de 2012 y junio de 2014, en 18 centros del territorio español. Los criterios de inclusión de los pacientes están descritos en Salgüero *et al.* [112].

Cohorte ESCORIAL

Esta cohorte del estudio ESCORIAL está formada por pacientes coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada que comenzaron tratamiento libre de interferón con AADs, entre enero de 2015 y junio de 2016, en cuatro centros de la Comunidad de Madrid. Los criterios de inclusión de los pacientes están descritos en Salgüero *et al.* [110-112].

Aspectos éticos

Los datos clínicos y epidemiológicos fueron recogidos con un cuaderno de recogida de datos electrónico online que cumplió con todos los requerimientos de confidencialidad de datos. Estos datos fueron posteriormente tratados respetando, en todo momento, los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal; Ley 41/2002, reguladora de la autonomía del paciente y Ley 14/1986, general de sanidad). Se respetaron los principios éticos de investigación recogidos en la Declaración de Helsinki y en el informe Belmont, así como los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano. De igual manera, se aplicó la Ley Orgánica 5/1992, de regulación del tratamiento automatizado de los datos de carácter personal.

La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética del Instituto de Salud Carlos III, así como por el Comité Ético Científico del Biobanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado por escrito para la inclusión en el estudio.

Variables de estudio recogidas

- i. Variables sociodemográficas.
- ii. Consumo de alcohol de forma habitual.
- iii. Consumo de otras drogas.
- iv. Determinaciones de laboratorio.
- v. Variables relativas al tratamiento antirretroviral.
- vi. Variables relacionadas con la infección por los virus causantes de hepatitis.
- vii. Variables relacionadas con la hepatopatía.

Muestras biológicas

Las muestras de sangre se recogieron por venopunción en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, en los diferentes hospitales incluidos en el estudio. Las muestras se enviaron dentro de las primeras 24 horas desde la extracción al Biobanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, donde se procesaron por gradiente de densidad utilizando Ficoll-PaqueTM, para la obtención de plasma y CMSPs, que fueron posteriormente almacenados por separado hasta su uso.

Grupos de estudio

Para los estudios de biomarcadores plasmáticos mediante inmunoensayo y de metabolómica, se emplearon muestras de pacientes procedentes de la cohorte ESCORIAL al inicio del estudio, previo al tratamiento, con sus correspondientes criterios de inclusión y exclusión propios de la cohorte y de los que se disponía tanto de muestras de plasma como de los datos de puntuación CTP.

Tabla 2. Descripción de los pacientes incluidos en este trabajo de tesis.

Estudio	Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study. [110]	Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients. [111]	PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfected patients: A cross-control study. [112]
Metodología	Inmunoensayo	Metabolómica	Transcriptómica
Material empleado	Plasma	Plasma	CMSPs
Número de pacientes (n)	97	90	114
Monoinfectados por el VHC (n)	32	28	NA
Coinfectados por VHC/VIH (n)	65	62	68 (entrenamiento) 46 (validación)
Cohorte de origen	ESCORIAL	ESCORIAL	GeSIDA 3603b (n = 63) ESCORIAL (n = 51)

Para el estudio de transcriptómica se emplearon muestras de pacientes coinfectados por VHC/VIH procedentes de las dos cohortes (ESCORIAL y GeSIDA 3603b). Los criterios de inclusión empleados en este estudio abarcan: la presencia de infección activa por VHC y VIH demostrable por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cART durante al menos 6 meses

o sin necesidad de cART de acuerdo con las guías actuales utilizadas en el período de estudio, células T CD4⁺ \geq 200 células/ μ L, carga viral plasmática de ARN del VIH indetectable ($<$ 50 copias/mL) y disponibilidad tanto de muestras de CMSPs como de datos de LSM. Se excluyeron los pacientes con hepatitis C aguda, coinfección con el VHB y aquellos con diagnóstico previo de CHC.

Ensayos de laboratorio

Biomarcadores plasmáticos

La preparación y análisis de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Microbiología (CNM) en Majadahonda (Madrid). Se emplearon 1,5 mL de plasma por paciente para determinar biomarcadores plasmáticos mediante ELISA multiplex o, cuando fue necesario, ELISA simple.

Los siguientes biomarcadores fueron evaluados mediante inmunoensayo múltiple de ProcartaPlex™, de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un analizador Luminex™ 200 (Invitrogen™, Estados Unidos):

-Respuesta inflamatoria: IP-10, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), IL-8, IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 RA), ligando soluble del receptor asociado al factor nuclear kappa B (sRANKL) y osteoprotegerina (OPG).

-Disfunción endotelial: molécula soluble de adhesión celular vascular 1 (sVCAM-1), molécula soluble de adhesión intercelular 1 (sICAM-1) y receptor 1 del TNF soluble (sTNF-R1).

-Coagulopatía: inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y dímero D.

-Angiogénesis: VEGF-A y receptor 1 para el VEGF soluble (sVEGF-R1).

En estos ensayos, una alta proporción de las muestras analizadas estaban por debajo del límite inferior de detección, por lo que se emplearon los valores de intensidad de fluorescencia medidos, sin restar el blanco, como una cuantificación relativa de las abundancias de analito [113]. Los valores obtenidos en unidades arbitrarias se normalizaron mediante la transformación logarítmica de base 10 (\log_{10}).

Los biomarcadores plasmáticos que fueron medidos por ELISA simple correspondieron a los relativos a marcadores de translocación bacteriana como la LBP (R&D Systems®, Estados Unidos), el CD14 soluble (sCD14) y la proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP-2) (Raybiotech®, Estados Unidos). El LPS se cuantificó mediante un ensayo cromogénico de lisado de amebocitos de *Limulus* (Hycult Biotech®, Países Bajos).

Metabolómica

La inactivación viral y desproteínización de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del CNM mediante el uso de solventes orgánicos. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al Centro de Excelencia Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO) en Madrid, donde fueron procesadas y analizadas por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS) por el personal del CEMBIO.

El análisis metabolómico se realizó siguiendo una metodología previamente utilizada [114]. Por un lado, se empleó un cromatógrafo de gases con ionización de impacto electrónico acoplado a un detector selectivo de masas con cuadrupolo simple (GC-EI-Q-MS). Por otro lado, se empleó cromatografía líquida con ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con sistema de tiempo de vuelo con cuadrupolo (LC-ESI-QTOF-MS). Con esta última tecnología, las muestras se analizaron en modos de ionización positiva y negativa para capturar una mayor cantidad de metabolitos diferentes. Las muestras correspondientes al control de calidad se prepararon de forma independiente para cada plataforma analítica, agrupando y mezclando volúmenes iguales de cada muestra. Se usaron dichos controles para estabilizar el sistema y monitorizar las variaciones en la señal durante el procesado analítico.

Los archivos de datos resultantes se limpiaron de ruido de fondo e iones no relacionados. Cada compuesto (características metabólicas) fue descrito por la masa, el tiempo de retención y la abundancia. Posteriormente, se filtraron aquellos metabolitos con una desviación estándar relativa para los controles de calidad $< 40\%$ y que aparecían en al menos el 60% de las muestras de cada grupo experimental. Para la identificación de compuestos significativos, se usaron bases de datos disponibles, como METLIN (<https://metlin.scripps.edu/>), HMDB (<https://hmdb.ca/>), KEGG (<https://genome.jp/kegg/>) y LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org/>), o programas específicos como CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>).

Transcriptómica

La preparación de las muestras y extracción del ARN de las CMSPs se llevó a cabo en las instalaciones del CNM. Se utilizó el kit de purificación *RNeasy Micro* (Qiagen®, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó, por un lado, la cantidad de ARN obtenido mediante su cuantificación utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo

Scientific™, Estados Unidos) y, por otro lado, su calidad mediante el chip *RNA Nano* en el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®, Estados Unidos), con el que se obtuvo el número de integridad del ARN (RIN). Solo se seleccionaron muestras con RIN > 7,5 para la preparación de las librerías.

La preparación de las librerías y la secuenciación se realizaron en el Centro de Regulación Genómica (CRG) en Barcelona. Se utilizó el kit de preparación de muestras de ARN monocatenario TruSeq™ v2 (Illumina®, Estados Unidos) en 500 ng de ARN total. Se multiplexaron y agruparon diez librerías en cada línea del secuenciador HiSeq2500 (Illumina®, Estados Unidos) y 50 nucleótidos (1 x 50) fueron secuenciados en modo de lectura única, para obtener un promedio de 25 millones de lecturas por muestra.

La validación de las variaciones de expresión génica detectadas tras el análisis de los resultados de transcriptómica se realizó mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR). Para ello, el ARN total extraído se retrotranscribió a ADN complementario usando el kit de transcripción inversa de gran capacidad (Applied Biosystems™, Estados Unidos). A continuación, se emplearon los ensayos de expresión génica Taqman™ (Applied Biosystems™, Estados Unidos) para cuantificar, por triplicado, los transcritos de midquina (*MDK*; Hs00171064_m1) y el antígeno estromal 3 similar a 2 (*STAG3L2*; Hs00414793_m1). Para normalizar los niveles de ARN entre las diferentes muestras se empleó la actina β (*ACTB*; Hs99999903_m1) como control interno. Las muestras se cuantificaron relativamente respecto a una mezcla aleatoria de muestras de seis pacientes infectados por el VIH como referencia.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó una combinación de programas estadísticos generales, como Stata (v15-17), SPSS (v22), R (v3.4.3-3.6.1) y GraphPad Prism (v7.04). Además, para el estudio de los datos de metabolómica se empleó MetaboAnalyst (v4.0) (<https://www.metaboanalyst.ca/>), una plataforma integral dedicada específicamente al análisis de este tipo de datos.

Análisis descriptivo

Para los análisis descriptivos en los diferentes estudios y con objeto de determinar si existían asociaciones significativas, se emplearon las siguientes pruebas no paramétricas: i) la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas; ii) la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas entre dos grupos; iii) la prueba de Kruskal Wallis para variables continuas cuando se compararon más de dos grupos. Las pruebas se realizaron bilaterales de dos colas y la significación estadística se estableció como $p \leq 0,05$.

Análisis exploratorio

Para el análisis exploratorio de los datos se usaron métodos de análisis no supervisado, con los cuales se puede determinar si existe alguna agrupación intrínseca dentro de las muestras, ya sea deseada (por ejemplo, con relevancia biológica) o no (por ejemplo, sesgos metodológicos) y exponer posibles valores atípicos. Entre ellos, el más utilizado suele ser el análisis de componentes principales (PCA). El PCA es capaz de transformar un conjunto de variables originales correlacionadas en un nuevo conjunto de variables subyacentes no correlacionadas, conocidas como componentes principales. El PCA permite, por tanto, condensar la información aportada por múltiples variables en tan solo unos pocos de dichos componentes principales.

Además, existen métodos de análisis supervisados que se aprovechan de conocer previamente la pertenencia de las muestras a un grupo u otro para entrenar modelos capaces de clasificar adecuadamente a otros pacientes desconocidos. Entre los distintos métodos, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se utiliza comúnmente para analizar datos -ómicos, con alta dimensionalidad y un número limitado de muestras, como los procedentes de los análisis metabolómicos y transcriptómicos. Estos conjuntos de datos se caracterizan por poseer un gran volumen y muchas variables, con alta colinearidad, ruido y datos faltantes [115]. El cálculo de la importancia de la variable en la proyección (VIP) se puede

usar como una medida de la contribución de cada variable en el modelo del PLS-DA. Uno de los problemas del uso del PLS-DA es la tendencia a ajustar demasiado los resultados de manera que el modelo sufre al generalizarlo a muestras diferentes de las del estudio [116]. Para minimizar esto y validar los resultados del PLS-DA, se puede emplear la validación cruzada cuando el número de muestras disponibles es limitado. Ésta consiste en realizar iteraciones sucesivas con distintas particiones de los datos en subconjuntos de entrenamiento y prueba. Existen varias estrategias de validación cruzada, como la validación cruzada dejando una fuera, donde el subconjunto de entrenamiento está compuesto por todas las muestras menos una, que se utiliza para la validación. Otra aproximación para la validación estadística del modelo es realizar un test de permutación, donde se produce una asignación aleatoria de las variables de clasificación entre las distintas muestras y se comparan los resultados obtenidos con los nuevos modelos. Se calculan la bondad de ajuste (R^2) y la capacidad predictiva (Q^2) de los modelos aleatorios, esperando como resultado que sus rendimientos sean significativamente peores al del modelo original.

Modelos lineales generalizados

La asociación de los marcadores de laboratorio con la variación de los marcadores clínicos se evaluó mediante la aplicación de modelos lineales generalizados (GLMs), que cubren los modelos estadísticos más utilizados. Entre ellos, los que fueron empleados en nuestros estudios incluyen:

-Distribución gamma: se utiliza para modelar variables continuas que siempre son positivas, pudiendo adoptar una serie bastante amplia de formas.

-Logística binaria: se emplea para modelar variables dependientes dicotómicas con sólo dos alternativas posibles. Por ejemplo: pertenecer a un grupo de estudio (grado B Child-Pugh si/no, coinfectado VHC/VIH si/no).

-Logística ordinal: Se emplea cuando la variable dependiente tiene más de dos categorías ordenadas jerárquicamente. Por ejemplo: puntuación CTP.

-Binomial negativa: La distribución se emplea para modelar datos de conteo. Se ha demostrado que es el mejor modelo para capturar la dispersión excesiva de los datos de conteo que se generan en los experimentos de secuenciación del ARN [117].

Por otro lado, los GLMs se pueden emplear con una sola variable independiente (modelos no ajustados) o ajustando el efecto mediante la inclusión de otras variables independientes o

covariables, tales como edad, sexo u otras variables que pudieran actuar como factores de confusión (modelos ajustados). Para la selección de las variables más relevantes a incluir en el modelo se utilizó un método de selección de variables *stepwise*. Este método comienza sin predictores y va añadiendo secuencialmente los más contribuyentes y, tras agregar cada variable, elimina las que ya no mejoran el ajuste del modelo.

Los GLMs proporcionan la razón de la media aritmética (AMR) o diferencia entre grupos, la razón de probabilidades (OR) o probabilidad de ocurrencia de un evento, y el valor de la tasa de cambio (FC) o una medida del cambio de una cantidad, en función del modelo utilizado. A su vez, nos dan el valor de p como una medida de la significación estadística. Dado que se realizan muchas pruebas a la vez, se deben corregir estos valores utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR), descrito por primera vez por Benjamini y Hochberg [118]. De esta manera obtenemos los valores q , que representan a los valores p tras ajustarlos utilizando un enfoque de FDR, lo que minimiza el número de falsos positivos.

Hay varias formas de evaluar el rendimiento de los modelos predictivos [119]. Para cuantificar la capacidad de discriminación del modelo se suele utilizar el área bajo la curva (AUC) de la curva característica operativa del receptor (ROC) (o AUROC). La curva ROC proporciona una representación gráfica de la sensibilidad de una prueba diagnóstica en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad). Para evaluar el rendimiento con una sola métrica se suele usar el AUC. Generalmente, a mayor AUC, mejor es el rendimiento del clasificador. El punto de corte de una escala continua que determina la sensibilidad y especificidad conjuntamente más alta es aquel que presenta el mayor índice de Youden que, gráficamente, corresponde al punto de la curva ROC más cercano al ángulo superior-izquierdo. La prueba de DeLong se utiliza para proporcionar una prueba estadística de si existe o no una diferencia entre dos curvas ROC [120].

Resultados

Los niveles plasmáticos de IP-10 y la IL-6 están relacionados con la clase B de Child-Pugh en pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el VHC: un estudio transversal

Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study [110]

Introducción y objetivos. Nuestro objetivo fue evaluar la asociación de biomarcadores plasmáticos vinculados a la inflamación (translocación bacteriana, respuesta inflamatoria y disfunción endotelial), coagulopatía y angiogénesis, con la gravedad de la cirrosis hepática (evaluada por la puntuación de Child-Turcotte-Pugh, CTP) y Child-Pugh clase B (CTP 7 - 9) en pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el virus de la hepatitis C (VHC).

Métodos. Para ello, llevamos a cabo un estudio transversal en 97 pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el VHC (32 mono infectados por el VHC y 65 coinfectados por VHC/VIH). Los biomarcadores plasmáticos se midieron mediante inmunoensayos multiplex ProcartaPlex™. La variable respuesta fue la puntuación CTP y la cirrosis Child-Pugh B (CTP 7 - 9).

Resultados. Los pacientes coinfectados por VHC/VIH y los mono infectados por el VHC con cirrosis avanzada presentaron valores de biomarcadores plasmáticos casi equivalentes. Valores más altos de biomarcadores plasmáticos vinculados a una respuesta inflamatoria (IP-10, IL-8, IL-6 y OPG), disfunción endotelial (sVCAM-1 y sICAM-1) y coagulopatía (dímero D) se relacionaron con valores más altos de CTP. Los biomarcadores más significativos para detectar la presencia de cirrosis Child-Pugh clase B (CTP 7 - 9) fueron IP-10 (valor de $p = 0,008$) e IL-6 (valor de $p = 0,002$). El AUROC de IP-10, IL-6 y ambos biomarcadores combinados (IP-10 + IL-6) fueron 0,78, 0,88 y 0,96, respectivamente.

Conclusiones. En conclusión, la infección por el VIH no parece tener un impacto significativo en los biomarcadores plasmáticos analizados en pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el VHC. Sin embargo, los biomarcadores plasmáticos vinculados a la inflamación (respuesta inflamatoria y disfunción endotelial) se relacionaron con la gravedad de la cirrosis hepática (puntuación CTP), principalmente IP-10 e IL-6, que discriminaron a aquellos pacientes con Child-Pugh clase B de aquellos con Child-Pugh clase A.



OPEN

Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study

Sergio Salgüero^{1,2,9}, Luz Maria Medrano^{1,9}, Juan González-García³, Juan Berenguer^{4,5}, María L. Montes³, Cristina Diéz^{4,5}, Pilar Garcia-Broncano^{1,6}, Elba Llop-Herrera⁷, Leire Pérez-Latorre^{4,5}, José María Bellón⁸, María Ángeles Jiménez-Sousa¹✉ & Salvador Resino¹✉

We aimed to evaluate the association of plasma biomarkers linked to inflammation (bacterial translocation, inflammatory response, and endothelial dysfunction), coagulopathy, and angiogenesis with the severity of liver cirrhosis (assessed by the Child-Pugh-Turcotte score, CTP) and Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) in patients with advanced hepatitis C virus (HCV)-related cirrhosis. We carried out a cross-sectional study in 97 patients with advanced HCV-related cirrhosis (32 HCV-monoinfected and 65 HIV/HCV-coinfected). Plasma biomarkers were measured by ProcartaPlex multiplex immunoassays. The outcome variable was the CTP score and the Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9). HIV/HCV-coinfected patients and HCV-monoinfected patients with advanced HCV-related cirrhosis had near-equivalent values of plasma biomarkers. Higher values of plasma biomarkers linked to an inflammatory response (IP-10, IL-8, IL-6, and OPG), endothelial dysfunction (sVCAM-1 and sICAM-1), and coagulopathy (D-dimer) were related to higher CTP values. The most significant biomarkers to detect the presence of Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) were IP-10 (p -value = 0.008) and IL-6 (p -value = 0.002). The AUC-ROC values of IP-10, IL-6, and both biomarkers combined (IP-10+IL-6) were 0.78, 0.88, and 0.96, respectively. In conclusion, HIV infection does not appear to have a significant impact on the analyzed plasma biomarkers in patients with advanced HCV-related cirrhosis. However, plasma biomarkers linked to inflammation (inflammatory response and endothelial dysfunction) were related to the severity of liver cirrhosis (CTP score), mainly IP-10 and IL-6, which discriminated patients with Child-Pugh B concerning Child-Pugh A.

The hepatitis C virus (HCV) has a prevalence of active infection of around 1% worldwide (71 million people)¹. HCV-infected patients progress slowly during decades (10 to 20 years), developing liver fibrosis and cirrhosis, which can evolve into decompensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma². Chronic hepatitis C causes chronic liver inflammation that accelerates the development of cirrhosis and other comorbidities^{3,4}. The cirrhosis-associated immune dysfunction (CAID) is a pathophysiological process that appears in cirrhosis and is enhanced in advanced cirrhosis. The CAID is characterized by higher levels of inflammation, immune activation, and deregulation of the immune system, which are related to the progression to hepatic decompensation^{5,6}. Patients with hepatic decompensation (Child–Turcotte–Pugh, CTP class B or C) could develop complications

¹Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain. ²Unidad de Análisis Clínicos, Fundación Hospital Alcorcón, Alcorcón, Madrid, Spain. ³Unidad de VIH; Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario “La Paz”, Madrid, Spain. ⁴Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH; Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, Madrid, Spain. ⁵Instituto de Investigación Sanitaria del Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁶Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA. ⁷Departamento de Gastroenterología; Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain. ⁸Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain. ⁹These authors contributed equally: Sergio Salgüero and Luz Maria Medrano. ✉e-mail: jimenezsosa@isciii.es; sresino@isciii.es

related to portal hypertension². Additionally, chronic hepatitis C patients have an increased risk of thrombotic events because hepatocytes produce most blood proteins, and their concentration may be altered during cirrhosis progression⁷.

On the one hand, HCV infection is common among patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) infection⁸. HIV/HCV coinfection influences the natural history of chronic hepatitis C, accelerating the progression to cirrhosis and end-stage liver disease in comparison to HCV-monoinfected patients^{9,10}. This seems to be due to HIV infection that increases immune activation, HCV replication, HCV-induced hepatic inflammation, hepatocyte apoptosis, and microbial translocation^{5,11}, which, in turn, contribute to the pathogenesis of both acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS related diseases^{12,13}. Moreover, while suppressive antiretroviral therapy (ART) reduces the HIV impact on the body, it is unable to eradicate the virus. Thus, HIV-infected patients on suppressive ART still show increased bacterial translocation, immune activation, inflammation, and coagulopathy, which are linked to increased morbidity and mortality¹².

On the other hand, HCV clearance with direct-acting antiviral agents (DAAs) promotes a decrease of liver disease severity and plasma biomarkers linked to bacterial translocation, immune activation, inflammation and coagulopathy in HIV/HCV-coinfected patients^{14–18} and HCV-monoinfected patients^{16,17,19,20}. However, a percentage of patients maintain the risk of cirrhosis progression after HCV clearance with DAAs^{21,22}. Besides, HIV/HCV-coinfected patients must face drug-drug interactions and hurdles with antiviral treatments, which support that patients coinfecting with HIV/HCV might still be regarded as a particular population²³.

Objective

We aimed to evaluate the association of plasma biomarkers linked to inflammation (bacterial translocation, inflammatory response, and endothelial dysfunction), coagulopathy, and angiogenesis with the severity of liver cirrhosis (assessed by the CTP score) and Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) in patients with advanced HCV-related cirrhosis.

Patients and methods

Patients. We carried out a cross-sectional study in 97 patients with advanced HCV-related cirrhosis who were selected from the ESCORIAL cohort (see Acknowledgements), which is a prospective cohort of patients with advanced HCV-related cirrhosis initiating anti-HCV therapy with all-oral DAAs at four tertiary referral hospitals in Madrid, Spain. All patients were enrolled between January and December 2015.

The inclusion criteria of the ESCORIAL cohort were: 1) plasma HCV RNA detectable by polymerase chain reaction; 2) one or more clinical criteria related to advanced cirrhosis (prior history of liver decompensation (ascites, bleeding esophageal varices, hepatic encephalopathy), or liver stiffness measurement (LSM) ≥ 25 kilopascals (kPa), or hepatic venous pressure gradient (HVPG) ≥ 10 mmHg, or CTP ≥ 7); 3) Initiation of all-oral DAA therapy; 4) a biological sample to carry out immunological assays. The exclusion criteria were: i) the previous diagnosis of hepatocellular carcinoma, ii) hepatitis B virus coinfection. The presence of HIV infection was not an exclusion criterion for the study.

In the present study, we only included patients with advanced HCV-related cirrhosis at baseline, when they had not yet started the HCV treatment. The ESCORIAL study included 112 patients, but 15 of them did not have a plasma sample at baseline, leaving only 97 patients available for the study (32 HCV-monoinfected patients and 65 HIV/HCV-coinfected patients).

The ESCORIAL study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and the Research Ethics Committee of the Instituto de Salud Carlos III (CEI PI 41_2014) approved this study. Written informed consent was obtained by all the participants in the study.

Clinical data. Clinical and laboratory data were recorded using a standard database via an online form within each center, which satisfied local requirements of data confidentiality. This process was monitored to verify that all the information in the database was consistent with the patient's records.

LSM was evaluated by trained operators by transient elastography (FibroScan, Echosens, Paris, France), as we previously described²⁴, and results were reported in kPa, with a range of 2.5 to 75 kPa. The CTP score was calculated from five factors (total bilirubin, albumin, international normalized ratio, ascites, and encephalopathy) and range between 5 and 15 points²⁵. CTP values serve to classify the patient into one of three severity classes of liver cirrhosis: A – Least severe liver disease (5–6 points), B – Moderately severe liver disease (7–9 points), and C – Most severe derangement (10–15 points). All HIV/HCV-coinfected patients were on ART and had undetectable plasma HIV viral load (< 50 copies/mL) at least one year before the study.

Enzyme-linked immunosorbent assays. The Spanish HIV HGM BioBank collected plasma samples, which were stored until use at -80 °C. We evaluated plasma biomarkers by ProcartaPlex multiplex immunoassay (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) according to the manufacturer's specifications using a Luminex 200 analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, United States). The plasma biomarkers measured by multiplex ELISA were: i) inflammatory response: IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), IL-8, IL-1 β , IL-18, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (sRANKL) and osteoprotegerin (OPG); ii) endothelial dysfunction: soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), soluble intercellular cell adhesion molecule 1 (sICAM-1); and soluble tumor necrosis factor receptor 1 (sTNF-R1); iii) coagulopathy: plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and d-dimer; iv) angiogenesis/fibrosis: vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and soluble receptors for vascular endothelial growth factor (sVEGF-R1). In these assays, a high proportion of the analyzed samples were below the lower limit of detection (LOD), and the analysis software censored calculated biomarker levels. The measured fluorescence intensity (FI) values are an alternative

to alleviate the concern of determining levels of LOD. Because of this, we did the data analysis using the raw FI values, without subtracting blank, as a relative quantification of the analyte abundances²⁶. With this approach, there were no missing values, it was not necessary to specify a LOD, and we can analyze the low FI signals, which added more statistical power to the data analysis^{26,27}. All measured FI (arbitrary units, a.u.) values were normalized using log₁₀ transformation (log₁₀ transformed).

The plasma biomarkers measured by simple ELISA were lipopolysaccharide-binding protein (LBP; (R&D Systems, Minneapolis, USA), sCD14, and fatty acid-binding protein 2 (FABP-2) (Raybiotech, Georgia, USA)). The lipopolysaccharide was evaluated by a *Limulus* amoebocyte lysate chromogenic endpoint ELISA (LPS; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands).

Statistical analysis. The statistical analysis was performed with Stata 15.0 (StataCorp, Texas, USA) and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA). All *p*-values were two-tailed, and statistical significance was defined as *p* < 0.05.

For the descriptive analysis, categorical variables were analyzed by the chi-squared test or Fisher's exact test, as required, and the Mann-Whitney test was used to analyze continuous data.

In this study, the outcome variables were the severity of liver cirrhosis, evaluated with the CTP score, and the presence of severe cirrhosis with Child-Pugh B (CTP 7–9). For the statistical association analysis, Generalized Linear Models (GLM) with a gamma distribution (log-link) were used to analyze the relationship among plasma biomarkers and the CTP score. Besides, GLM with binomial distribution was used to analyze the differences in plasma biomarkers between study groups. These tests give us: i) the arithmetic mean ratio (AMR) and the odds ratio (OR), and ii) significance levels (*p*-values), which were corrected for multiple testing using the false discovery rate (*FDR*) with Benjamini and Hochberg (*q*-values) procedure to reduce the risk of spurious results. GLM models were also adjusted by clinical and epidemiological co-variables: age, gender, smoker, alcohol intake, intravenous drug user (IVDU), previous IFN α therapy, statins treatment, HCV genotype, and log₁₀ HCV RNA. Each plasma biomarker was included by forced entry (Enter algorithm), and the most significant co-variables were selected by a stepwise algorithm (at each step, co-variables are considered for entry with a *p*-value < 0.20), allowing to avoid the over-fitting of the regression.

The accuracy of the biomarkers to separate the study groups was evaluated by the area under the ROC curve (AUC-ROC). Youden's index was used to select the best cut-off.

Ethics approval and consent to participate. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and patients gave their written consent. The Institutional Review Board and the Research Ethic Committee of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) approved the study.

Results

Patients. The characteristics of the 97 patients with advanced HCV-related cirrhosis (32 HCV-monoinfected patients and 65 HIV/HCV-coinfected patients) are shown in Table 1. HIV/HCV-coinfected patients had the lowest values of age (*p*-value < 0.001) and CTP score (*p*-value = 0.012), lower percentages of previously treated with IFN α therapy (*p*-value = 0.037), and Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) (*p*-value = 0.009); while they had the highest percentages of males (*p*-value = 0.037) and IVDUs (*p*-value \leq 0.001). The percentage of prior history of liver decompensation was similar in both groups (*p* = 0.375). Among patients with Child-Pugh A cirrhosis (CTP < 7), 11 had LSM < 25 kPa, and five had HVPG < 10 mmHg. All patients with Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) had LSM \geq 25 kPa and HVPG \geq 10 mmHg. No patients were in Child-Pugh C cirrhosis.

HIV/HCV-coinfected patients vs. HCV-monoinfected patients. HIV/HCV-coinfected patients had lower values of sCD14 (*p*-value = 0.046), IL-1RA (*p*-value = 0.049) and sRANKL (*p*-value = 0.019) than HCV-monoinfected patients in adjusted regression analyses. However, all these significant differences disappeared after adjusting by multiple comparisons (see Supplementary Table 1). Therefore, HIV/HCV-coinfected patients on suppressive ART had quite similar values of plasma biomarkers than HCV-monoinfected patients.

Relationship between plasma biomarkers and CTP score. Figure 1 shows the adjusted association values between plasma biomarkers and CTP score (full description in Supplementary Table 2). For all patients, higher values of plasma biomarkers linked to inflammatory response [IP-10 (*q*-value = 0.044), IL-8 (*q*-value = 0.005), IL-6 (*q*-value < 0.001), and OPG (*q*-value = 0.003)], endothelial dysfunction [sVCAM-1 (*q*-value = 0.006), sICAM-1 (*q*-value < 0.001), and sTNF-R1 (*q*-value = 0.006)] were related to higher CTP values. When patients were stratified by HIV infection, HCV-monoinfected patients had association with CTP score for IL-8 (*q*-value = 0.001), IL-6 (*q*-value = 0.002), OPG (*q*-value = 0.001), sVCAM-1 (*q*-value < 0.001), sICAM-1 (*q*-value < 0.001), and sTNF-R1 (*q*-value = 0.002); while HIV/HCV-coinfected patients only showed significant association with CTP score for IL-6 (*q*-value = 0.007) and sICAM-1 (*q*-value = 0.007).

Patients with Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) had higher plasma values of IP-10, IL-6, OPG, sVCAM-1, sICAM-1, and D-dimer (*p*-value < 0.05 and *q*-value < 0.1) than patients with Child-Pugh A cirrhosis (CTP < 7) (Table 2). The AUC-ROC values of these biomarkers to separate the study groups (CTP < 7 vs CTP 7–9) were higher than 0.70 and significant for IP-10 (*q*-value = 0.012), IL-6 (*q*-value < 0.001), OPG (*q*-value = 0.012), sVCAM-1 (*q*-value = 0.036), sICAM-1 (*q*-value = 0.023), and D-dimer (*q*-value = 0.036) (Table 2). We also selected, by a multivariate logistic regression with stepwise algorithm, IP-10 (*p*-value = 0.008) and IL-6 (*p*-value = 0.002) as the most significant biomarkers. The AUC-ROC of IP-10, IL-6, and both biomarkers combined (IP-10+IL-6) were 0.78, 0.88, and 0.96; respectively (Fig. 2). The value of 0.15 of IP-10 and IL-6 combined in a logistic regression model was the best cut-off (Youden's index = 0.846), which showed a sensitivity and specificity of 92.3%, positive predictive value of 98.6% and negative predictive value of 66.7%.

	All	HCV	HIV/HCV	p-values
No.	97	32	65	
Gender (male) (n = 97)	68 (70.1%)	18 (56.3%)	50 (76.9%)	0.037
Age (years) (n = 97)	53 (48.8; 56.5)	59.5 (52.6; 70)	51.8 (48.7; 53.8)	<0.001
Smoker (n = 96)				
Never	19 (19.8%)	11 (34.4%)	8 (12.5%)	0.589
Previously (≥ 6 months)	25 (26%)	10 (31.3%)	15 (23.4%)	0.988
Nowadays	52 (54.2%)	11 (34.4%)	41 (64.1%)	0.153
Alcohol intake (n = 97)				
Never	49 (50.5%)	22 (68.8%)	27 (41.5%)	0.105
Previously (≥ 6 months)	40 (41.2%)	9 (28.1%)	31 (47.7%)	0.507
Nowadays	8 (8.2%)	1 (3.1%)	7 (10.8%)	0.120
IVDU (n = 97)				
Never	40 (41.2%)	27 (84.4%)	13 (20%)	<0.001
Previously (≥ 6 months)	57 (58.8%)	5 (15.6%)	52 (80%)	0.009
Current	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
Treatments				
Previous IFN α therapy (n = 97)	49 (50.5%)	21 (65.6%)	28 (43.1%)	0.037
Statins (n = 97)	11 (11.3%)	1 (3.1%)	10 (15.4%)	0.073
Antiretroviral therapy (n = 65)				
NRTI + NNRTI-based	—	—	7 (10.8%)	
NRTI + II-based	—	—	34 (52.3%)	
NRTI + PI-based	—	—	9 (13.8%)	
PI + II + others-based	—	—	4 (6.2%)	
Others	—	—	11 (16.9%)	
HIV markers				
Prior AIDS (n = 65)	—	—	23 (35.4%)	
Nadir CD4 + T-cells (cells/mm 3) (n = 60)	—	—	129 (70; 243.5)	
Nadir CD4 + < 200 cells/mm 3 (n = 60)	—	—	40 (66.7%)	
CD4 + T-cells (cells/mm 3) (n = 65)	—	—	444 (234; 719)	
CD4 + < 500 cells/mm 3 (n = 65)	—	—	38 (58.5%)	
Undetectable HIV-RNA (n = 65)	—	—	65 (100%)	
HCV markers				
HCV genotype (n = 95)				
1	65 (68.4%)	25 (78.1%)	40 (63.5%)	0.335
3	14 (14.7%)	4 (12.5%)	10 (15.9%)	0.503
4	16 (16.8%)	3 (9.4%)	13 (20.6%)	0.708
Log $_{10}$ HCV-RNA (IU/mL) (n = 96)	6.1 (5.5; 6.5)	6.1 (5.4; 6.4)	6.2 (5.6; 6.6)	0.287
HCV-RNA ≥ 850.000 IU/mL	60 (62.5%)	19 (59.4%)	41 (64.1%)	0.655
Liver disease (n = 94)				
LSM (kPa)	30.6 (24.5; 41.6)	29.9 (26.3; 48)	31 (22.3; 39.3)	0.208
<25 kPa	24 (25.5%)	6 (19.4%)	18 (28.6%)	0.926
25–40 kPa	45 (47.9%)	14 (45.2%)	31 (49.2%)	0.941
≥ 40 kPa	25 (26.6%)	11 (35.5%)	14 (22.2%)	0.774
Child-Pugh Score (n = 91)	5 (5; 6)	5 (5; 7)	5 (5; 5)	0.012
Child-Pugh B (7–9)	13 (14.3%)	8 (28.6%)	5 (7.9%)	0.009
Prior history of liver decompensation	30 (31%)	8 (22.8%)	22 (33.8%)	0.375

Table 1. Summary of epidemiological and clinical characteristics in HCV-monoinfected patients and HIV/HCV-coinfected patients who had advanced HCV-related cirrhosis. Statistics: Values expressed as absolute number (percentage) and median (interquartile range). P-values were calculated by Chi-square, Fisher's exact test, and Mann-Whitney tests, as required. The statistically significant differences are shown in bold. **Abbreviations:** HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; IVDU, intravenous drug user; IFN α , interferon-alpha; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; II, integrase inhibitor; AIDS, acquired immune deficiency syndrome; HIV-RNA, HIV plasma viral load; HCV-RNA, HCV plasma viral load; LSM, liver stiffness measure; kPa, kilopascal.

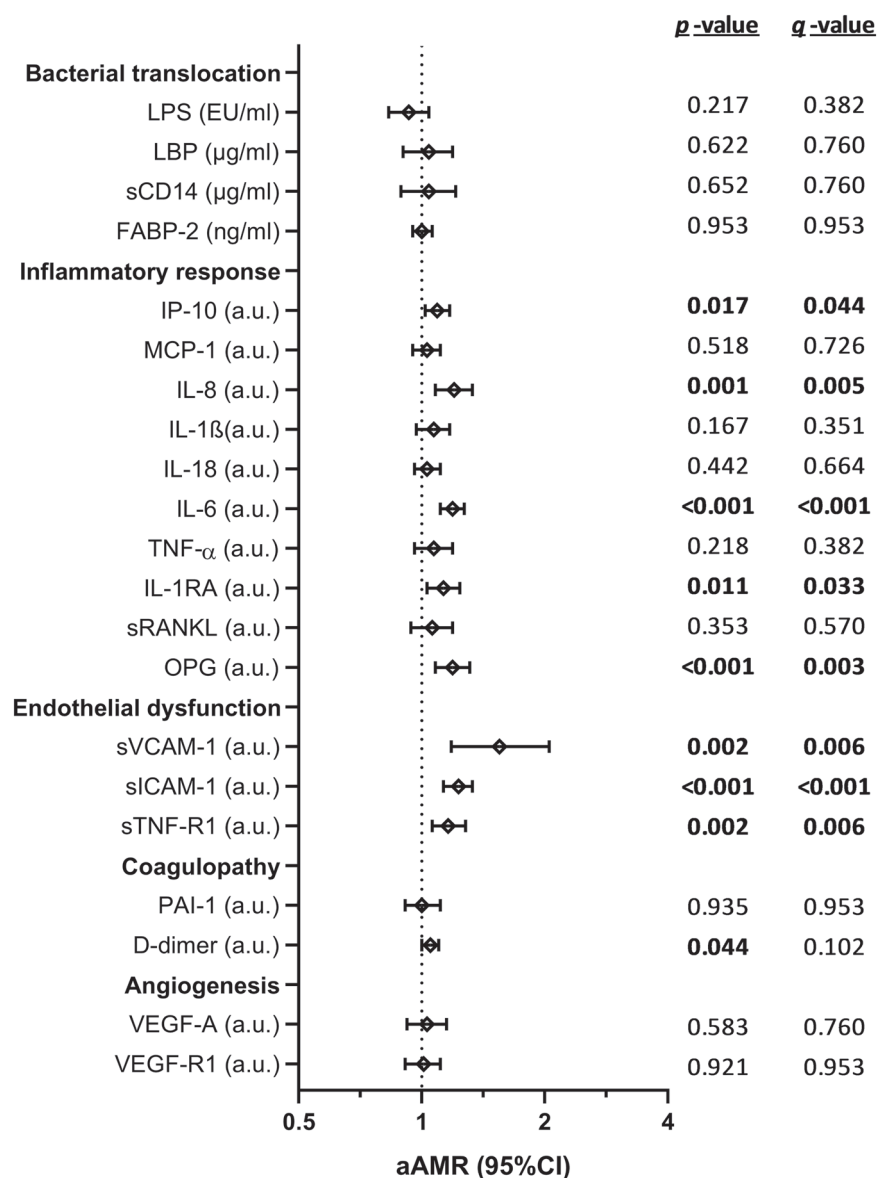


Figure 1. Association between values of plasma biomarkers (fluorescence intensity, arbitrary units) and Child-Pugh-Turcotte (CTP) score in patients with advanced HCV-related cirrhosis. **Statistics:** Values were expressed as arithmetic mean ratio (aAMR) and 95% confidence interval (95%CI). *P*-values were calculated by GLM models unadjusted and adjusted by the main clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). *P*-values, raw *p*-values; *q*-values, *p*-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) with Benjamini and Hochberg procedure. The statistically significant differences are shown in bold. **Abbreviations:** HCV, hepatitis C virus; -1, human immunodeficiency virus type 1; a.u., arbitrary units of fluorescence; sCD14, soluble CD14; LPS, lipopolysaccharide; FABP2, fatty acid-binding protein 2; LBP, lipopolysaccharide binding protein; IL, interleukin; IL-1RA, interleukin-1 receptor antagonist; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IP-10, IFN-γ-inducible protein 10; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; OPG, osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor-κB ligand; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular cell adhesion molecule 1; sTNF-R1, soluble tumor necrosis factor receptor 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; VEGF-A; vascular endothelial growth factor A; sVEGF-R1, soluble receptors for vascular endothelial growth factor.

Discussion

In this study, we have evaluated the profile of plasma biomarkers (inflammation, endothelial dysfunction, coagulopathy, and angiogenesis) in patients with advanced HCV-related cirrhosis. We found that HIV/HCV-coinfected patients on suppressive ART and HCV-monoinfected patients had near-equivalent values of plasma biomarkers. We also found that higher values of plasma biomarkers (IP-10, IL-8, IL-6, OPG, sVCAM-1, sICAM-1, and D-dimer) were related to higher values of liver disease severity (CTP), but only IP-10 and IL-6 had high accuracy in separating patients with Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9).

	All patients		GLM (binomial)		ROC curve		q-value
	CTP < 7	CTP ≥ 7	p-value	q-value	AUC-ROC (95%CI)	p-value	
Bacterial translocation							
LPS (EU/ml)	1.04 (0.81; 1.51)	0.92 (0.68; 1.23)	0.124	0.258	0.39 (0.23; 0.56)	0.214	0.281
LBP (µg/ml)	0.97 (0.67; 1.28)	0.83 (0.69; 1.34)	0.667	0.778	0.5 (0.32; 0.68)	0.991	0.991
sCD14 (µg/ml)	2.23 (1.72; 3.08)	3.26 (2.19; 3.8)	0.135	0.258	0.65 (0.49; 0.82)	0.075	0.169
FABP-2 (ng/ml)	0.47 (0.23; 0.91)	0.65 (0.32; 1.25)	0.787	0.870	0.56 (0.39; 0.74)	0.478	0.558
Inflammatory response							
IP-10 (a.u.)	1077.7 (724; 1573)	2218.5 (1340; 2551.5)	0.005	0.035	0.78 (0.63; 0.93)	0.001	0.012
MCP-1 (a.u.)	427 (205.5; 651.5)	553.5 (294; 714.5)	0.316	0.474	0.58 (0.41; 0.74)	0.373	0.461
IL-8 (a.u.)	100 (64; 147.5)	154 (81; 220)	0.054	0.142	0.65 (0.49; 0.82)	0.081	0.169
IL-1β (a.u.)	15 (14; 22)	17.5 (15; 28)	0.277	0.447	0.66 (0.5; 0.81)	0.067	0.169
IL-18 (a.u.)	857.5 (496; 1536)	1024 (541; 1216)	0.973	0.973	0.48 (0.34; 0.62)	0.829	0.871
IL-6 (a.u.)	68.25 (36; 129)	265 (167.5; 360)	<0.001	0.006	0.88 (0.78; 0.98)	<0.001	<0.001
TNF-α (a.u.)	10 (7.5; 12)	11 (9; 14)	0.493	0.610	0.63 (0.48; 0.78)	0.140	0.227
IL-1RA (a.u.)	37.5 (31; 51)	62 (42; 77)	0.437	0.574	0.67 (0.53; 0.82)	0.049	0.147
sRANKL (a.u.)	25 (20; 35)	36 (24.5; 58)	0.048	0.142	0.64 (0.44; 0.84)	0.102	0.179
OPG (a.u.)	188 (135.5; 277)	347.5 (288; 486)	0.016	0.066	0.76 (0.63; 0.9)	0.002	0.012
Endothelial dysfunction							
sVCAM-1 (a.u.)	10482 (8946; 11558.5)	11956.5 (10603; 12554.5)	0.019	0.066	0.72 (0.59; 0.86)	0.010	0.036
sICAM-1 (a.u.)	87.75 (59; 130)	198 (108.5; 288.5)	0.002	0.023	0.77 (0.63; 0.91)	0.002	0.012
TNF-R1 (a.u.)	28.75 (19; 41)	38 (31; 57.5)	0.186	0.326	0.62 (0.47; 0.78)	0.156	0.234
Coagulopathy							
PAI-1 (a.u.)	1026 (812; 1287)	955 (815; 1187)	0.883	0.927	0.48 (0.3; 0.65)	0.794	0.871
D-dimer (a.u.)	1632.7 (602; 3825.5)	5443 (4542.5; 7582)	0.017	0.066	0.73 (0.58; 0.87)	0.009	0.036
Angiogenesis/Fibrosis							
VEGF-A (a.u.)	75.5 (55.5; 106)	88 (72; 95)	0.437	0.574	0.61 (0.47; 0.76)	0.192	0.269
VEGF-R1 (a.u.)	44 (35; 68)	52 (44.5; 129)	0.104	0.243	0.65 (0.47; 0.82)	0.093	0.178

Table 2. Summary of plasma biomarkers (fluorescence intensity, arbitrary units) in patients with advanced HCV-related cirrhosis according to CTP score. Statistics: Values expressed as median (P25th; P75th), area under the ROC curve (AUC-ROC), and 95% of confidence interval (95%CI). P-values were calculated by GLMs adjusted by the main clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). P-values, raw p-values; q-values, p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) with Benjamini and Hochberg procedure. The statistically significant differences are shown in bold. **Abbreviations:** HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; a.u., arbitrary units of fluorescence; sCD14, soluble CD14; LPS, lipopolysaccharide; FABP2, fatty acid-binding protein 2; LBP, lipopolysaccharide binding protein; IL, interleukin; IL-1RA, interleukin-1 receptor antagonist; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IP-10, IFN-γ-inducible protein 10; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; OPG, osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor-κB ligand; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular cell adhesion molecule 1; sTNF-R1, soluble tumor necrosis factor receptor 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; sVEGF-R1, soluble receptors for vascular endothelial growth factor.

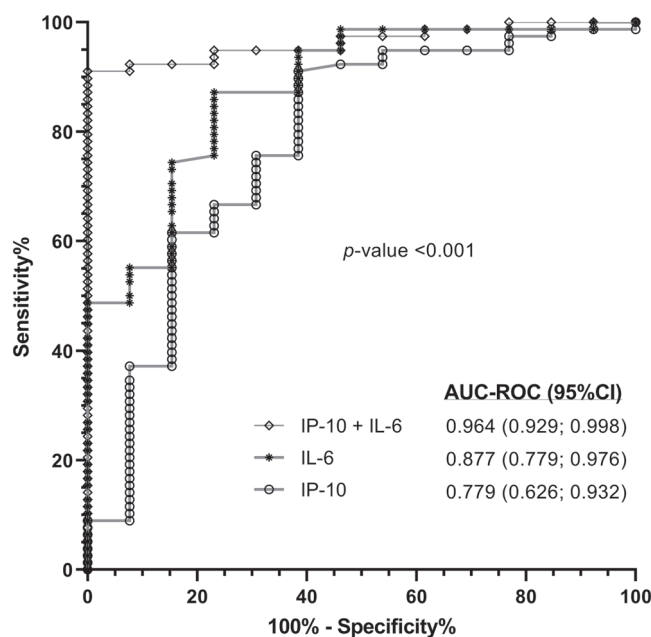


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curves of plasma biomarkers for predicting Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) in patients with advanced HCV-related cirrhosis. **Statistics:** Values were expressed as area under the receiver operating characteristic (AUC-ROCs) and 95% confidence interval (95%CI). **Abbreviations:** IP-10, IFN- γ -inducible protein 10; IL-6, interleukin 6.

HIV/HCV-coinfected patients usually have a faster progression of chronic hepatitis C²⁸ and higher levels of plasma biomarkers of bacterial translocation, immune activation, inflammation, and coagulation, despite suppressive ART²⁹. In our study, plasma values of biomarkers were very similar in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients with advanced HCV-related cirrhosis. This may be because our patients had advanced cirrhosis, where elevated immune activation, inflammation, and dysregulation of the innate immune system is usually present^{5,6}. Thus, we could suggest that the weight of cirrhosis was so important that the impact of HIV infection, if any, was eclipsed. Another argument could be that HIV/HCV-coinfected patients were on suppressive ART, with long-term optimal control of HIV replication and significant immune recovery, as shown by the difference between the values of CD4⁺ T-cells nadir and current count.

Both HIV and HCV infections are characterized by an increased inflammatory response, which raises the severity of the liver disease progresses^{4,24,30}. Inflammation is also linked to endothelial dysfunction, which is related to the higher severity of liver disease³¹. Besides, inflammation (inflammatory response and endothelial dysfunction) is associated with increased risk of AIDS progression in HIV-infected patients, the development of comorbidities, chronic hepatitis C progression, and death^{30,32–34}. In our study, we found a significant association between plasma biomarkers linked to inflammation [inflammatory response (IP-10, IL-8, IL-6, and OPG) and endothelial dysfunction (sVCAM-1 and sICAM-1)] and CTP score in all patients with advanced HCV-related cirrhosis so that the highest levels of these biomarkers were found in patients with greater severity of cirrhosis, suggesting a more pronounced inflammatory CAID phenotype, which is in line with previously published data in patients with severe cirrhosis^{5,6}. Moreover, a large number of blood proteins are produced in the liver, and their blood levels may be altered in advanced stages of cirrhosis, leading to increased thrombotic risk⁷. Coagulopathy is related to increased risk of disease progression and death in people infected with HIV³⁵ and HCV³⁶. In this study, we found a significant association between D-dimer and the CTP score in all patients, but this disappeared when the population was stratified by HIV-infection, possibly because the association was affected by the decreased sample size when the sample was stratified by HIV infection. In any case, there are indications that higher levels of D-dimer are found in patients with a greater stage of cirrhosis. Besides systemic inflammation, the main reason for elevated D-dimer levels in decompensated cirrhosis (more precisely, patients with ascites) is systemic hyperfibrinolysis due to the intraperitoneal activation of the coagulation cascade by tissue factor-bearing extracellular vesicles³⁷.

In our study, HIV infection seems to have had a significant impact on the association between plasma biomarkers and the CTP score. However, the associations had the same sense in the two study groups, although they were weaker in HIV/HCV-coinfected patients, possibly because CTP values had a narrower range in HIV/HCV-coinfected patients than in HCV-monoinfected patients. Thereby, HCV-monoinfected patients showed a significant association of plasma biomarkers of the inflammatory response (IL-8, IL-6, and OPG) and endothelial dysfunction (sVCAM-1, sICAM-1, and sTNF-R1) with CTP score; while HIV/HCV-coinfected patients showed only a significant association of IL-6 and sICAM-1 with CTP score. It is therefore complicated to state that, in our study, HIV infection had a relevant impact on the relationship between biomarkers and the CTP score; nevertheless, it seems clear that the association between inflammation and CTP score remains, independently of HIV infection.

High levels of inflammation is a feature of patients with advanced CAID, particularly in patients with hepatic decompensation^{5,6}. In our study, we found patients who had Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) showed higher plasma values of biomarkers linked to the inflammatory response (IP-10, IL-6, and OPG) endothelial dysfunction (sVCAM-1 and sICAM-1) and coagulopathy (D-dimer). These biomarkers were practically the same as those discussed in the previous paragraphs. However, only IP-10 and IL-6 were independently associated with Child-Pugh B cirrhosis (CTP 7–9) with high accuracy. Increased plasma IL-6 and IP-10 levels are related to liver disease severity in HCV-infected patients^{11,38} and HIV/HCV-coinfected patients²⁴, but in the current study, we found plasma IL-6 and IP-10 levels discriminated with great accuracy the presence of severe cirrhosis with Child-Pugh B (CTP 7–9). The severe cirrhosis seems to be the result of an inflammatory syndrome, which increases the risk of acute-on-chronic liver failure (ACLF)³⁹. Besides, systemic inflammation could also be implicated in the pathogenesis of extrahepatic organ dysfunctions³⁹. However, severe cirrhosis is easy to detect in the clinical setting by physical examination and abdominal ultrasound. This means the use of inflammatory serological markers to identify patients with Child-Pugh B (CTP 7–9) may be of little use in the clinic. Despite this, the AUROC analysis provides helpful information for these two significant inflammatory biomarkers (IL-6 and IP-10), because these two biomarkers also show distinctive elevated levels in Child-Pugh B (CTP 7–9) compared to Child-Pugh A (CTP 5–6), which can aid proper classification.

Limitations of the study

Firstly, this is a cross-sectional study with a low sample size, which may entail a lack of uniformity and could limit the possibility of finding statistical significance in some subgroups. However, despite this, we systematically find inflammation biomarkers associated with the CTP score values, which gives consistency to our results. Furthermore, the potential clinical translation may be limited by the cross-sectional design of our study. A different research design would be necessary to determine if the possible pathogenic factors evaluated in our study are involved in the progression of the liver disease since it cannot be revealed by a cross-sectional approach that does not describe the course of the disease over time. Secondly, all selected patients met a set of criteria for our study, and this may have introduced a selection bias. Longitudinal studies with a higher number of subjects, and with less restrictive criteria, would be necessary to generalize our conclusions to patients with advanced HCV-related cirrhosis and whether the IP-10 and/or IL-6 could predict the patients progressing from CTP A to CTP B.

Conclusions

Plasma biomarker values were quite similar in HIV/HCV-coinfected patients on suppressive ART and HCV-monoinfected patients. Besides, values of plasma biomarkers linked to inflammation (inflammatory response and endothelial dysfunction) were related to the severity of liver cirrhosis (CTP score), mainly IP-10 and IL-6, which discriminated patients with Child-Pugh B concerning Child-Pugh A.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study may be available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 2 January 2020; Accepted: 3 June 2020;

Published online: 25 June 2020

References

1. WHO. Global Hepatitis Report. *World Health Organization* (2017).
2. Westbrook, R. H. & Dusheiko, G. Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology* **61**, S58–68, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012> (2014).
3. Naggie, S. Hepatitis C Virus, Inflammation, and Cellular Aging: Turning Back Time. *Top Antivir Med* **25**, 3–6 (2017).
4. Shin, E. C., Sung, P. S. & Park, S. H. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol* **16**, 509–523, <https://doi.org/10.1038/nri.2016.69> (2016).
5. Irvine, K. M., Ratnasekera, I., Powell, E. E. & Hume, D. A. Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. *Frontiers in immunology* **10**, 293, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00293> (2019).
6. Albillos, A., Lario, M. & Alvarez-Mon, M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *Journal of hepatology* **61**, 1385–1396, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.010> (2014).
7. Gonzalez-Reimers, E. *et al.* Thrombin activation and liver inflammation in advanced hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology* **22**, 4427–4437, <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i18.4427> (2016).
8. Koziel, M. J. & Peters, M. G. Viral hepatitis in HIV infection. *The New England journal of medicine* **356**, 1445–1454, <https://doi.org/10.1056/NEJMra065142> (2007).
9. López-Díéguez, M. *et al.* The natural history of liver cirrhosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* **25**, 899–904, <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283454174> (2011).
10. Macias, J. *et al.* Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology* **50**, 1056–1063, <https://doi.org/10.1002/hep.23136> (2009).
11. Del Campo, J. A., Gallego, P. & Grande, L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. *World journal of hepatology* **10**, 1–7, <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i1.1> (2018).
12. Hunt, P. W., Lee, S. A. & Siedner, M. J. Immunologic Biomarkers, Morbidity, and Mortality in Treated HIV Infection. *The Journal of infectious diseases* **214**(Suppl 2), S44–50, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw275> (2016).
13. Hunt, P. W. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* **9**, 139–147, <https://doi.org/10.1007/s11904-012-0118-8> (2012).
14. Schwabl, P. *et al.* Interferon-free regimens improve portal hypertension and histological necroinflammation in HIV/HCV patients with advanced liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **45**, 139–149, <https://doi.org/10.1111/apt.13844> (2017).
15. Kostadinova, L. *et al.* Soluble Markers of Immune Activation Differentially Normalize and Selectively Associate with Improvement in AST, ALT, Albumin, and Transient Elastography During IFN-Free HCV Therapy. *Pathog Immun* **3**, 149–163, <https://doi.org/10.20411/pai.v3i1.242> (2018).

16. Fernandes, F. F. *et al.* Effectiveness of direct-acting agents for hepatitis C and liver stiffness changing after sustained virological response. *J Gastroenterol Hepatol*, <https://doi.org/10.1111/jgh.14707> (2019).
17. Macias, J. *et al.* Similar recovery of liver function after response to all-oral HCV therapy in patients with cirrhosis with and without HIV coinfection. *Journal of viral hepatitis* **26**, 16–24, <https://doi.org/10.1111/jvh.12990> (2019).
18. Lopez-Cortes, L. F. *et al.* Eradication of Hepatitis C Virus (HCV) Reduces Immune Activation, Microbial Translocation, and the HIV DNA Level in HIV/HCV-Coinfected Patients. *The Journal of infectious diseases* **218**, 624–632, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy136> (2018).
19. Laursen, T. L. *et al.* Time-dependent improvement of liver inflammation, fibrosis, and metabolic liver function after successful direct-acting antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*, <https://doi.org/10.1111/jvh.13204> (2019).
20. Mandorfer, M. *et al.* Changes in Hepatic Venous Pressure Gradient Predict Hepatic Decompensation in Patients Who Achieved Sustained Virologic Response to Interferon-Free Therapy. *Hepatology* **71**, 1023–1036, <https://doi.org/10.1002/hep.30885> (2020).
21. Conti, F. *et al.* Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* **65**, 727–733, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.015> (2016).
22. Forner, A., Reig, M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2) (2018).
23. Sulikowski, M. S. HCV-HIV coinfecting patients: no longer a 'special' population? *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* **36**(Suppl 1), 43–46, <https://doi.org/10.1111/liv.13021> (2016).
24. Medrano, L. M. *et al.* Elevated liver stiffness is linked to increased biomarkers of inflammation and immune activation in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients. *AIDS* **32**, 1095–1105, <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001787> (2018).
25. Durand, F. & Valla, D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *Journal of hepatology* **42**(Suppl), S100–107, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.11.015> (2005).
26. Breen, E. J., Tan, W. & Khan, A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays. *Sci Rep* **6**, 26996, <https://doi.org/10.1038/srep26996> (2016).
27. Breen, E. J., Polaskova, V. & Khan, A. Bead-based multiplex immuno-assays for cytokines, chemokines, growth factors and other analytes: median fluorescence intensities versus their derived absolute concentration values for statistical analysis. *Cytokine* **71**, 188–198, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.030> (2015).
28. Lo, R. V. 3rd *et al.* Hepatic decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: a cohort study. *Annals of internal medicine* **160**, 369–379, <https://doi.org/10.7326/M13-1829> (2014).
29. Abutaleb, A. & Sherman, K. E. A changing paradigm: management and treatment of the HCV/HIV-co-infected patient. *Hepatol Int* **12**, 500–509, <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9896-4> (2018).
30. Younas, M., Psomas, C., Reynes, J. & Corbeau, P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV medicine* **17**, 89–105, <https://doi.org/10.1111/hiv.12310> (2016).
31. Akcam, F. Z., Tigli, A., Kaya, O., Ciris, M. & Vural, H. Cytokine levels and histopathology in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* **32**, 570–574, <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0048> (2012).
32. Lagathu, C. *et al.* Basic science and pathogenesis of ageing with HIV: potential mechanisms and biomarkers. *AIDS* **31**(Suppl 2), S105–S119, <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001441> (2017).
33. Marquez, M., Fernandez Gutierrez del Alamo, C. & Giron-Gonzalez, J. A. Gut epithelial barrier dysfunction in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus coinfecting patients: Influence on innate and acquired immunity. *World journal of gastroenterology* **22**, 1433–1448, <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1433> (2016).
34. Lin, W., Weinberg, E. M. & Chung, R. T. Pathogenesis of accelerated fibrosis in HIV/HCV coinfection. *The Journal of infectious diseases* **207**(Suppl 1), S13–18, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis926> (2013).
35. Leeanayah, E., Malone, D. F., Anthony, D. D. & Sandberg, J. K. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Current opinion in HIV and AIDS* **8**, 117–124, <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32835c7134> (2013).
36. Sherman, K. E. Advanced liver disease: what every hepatitis C virus treater should know. *Top Antivir Med* **19**, 121–125 (2011).
37. Mandorfer, M. *et al.* in *The International Liver Congress 2019 Vol. 70* (ed EASL) e625–e853 (Journal of Hepatology, Vienna, 2019).
38. Ferrari, S. M. *et al.* Immunomodulation of CXCL10 Secretion by Hepatitis C Virus: Could CXCL10 Be a Prognostic Marker of Chronic Hepatitis C? *J Immunol Res* **2019**, 5878960, <https://doi.org/10.1155/2019/5878960> (2019).
39. Bernardi, M., Moreau, R., Angeli, P., Schnabl, B. & Arroyo, V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *Journal of hepatology* **63**, 1272–1284, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.004> (2015).

Acknowledgements

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients, medical and nursing staff and data managers who have taken part in the ESCORIAL study: a) Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain): Cristina Díez, Luis Ibáñez, Leire Pérez-Latorre, Diego Rincón, Teresa Aldámiz-Echevarría, Vega Catalina, Pilar Miralles, Francisco Tejerina, María C Gómez-Rico, Esther Alonso, José M Bellón, Rafael Bañares, and Juan Berenguer. b) Hospital Universitario La Paz/IdiPAZ (Madrid, Spain): José Arribas, José I Bernardino, Carmen Busca, Javier García-Samaniego, Víctor Hontañón, Luz Martín-Carbonero, Rafael Micán, María L Montes-Ramírez, Victoria Moreno, Antonio Oliveira, Ignacio Pérez-Valero, Eulalia Valencia, and Juan González-García. c) Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid, Spain): Elba Llop and José Luis Calleja. d) Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain): Javier Martínez and Agustín Albillos. e) Fundación SEIMC/GeSIDA (Madrid, Spain): Marta de Miguel, María Illescas, and Herminia Esteban. We want to particularly acknowledge the support of the HIV BioBank, which is integrated into the Spanish AIDS Research Network and all collaborating Centres for the generous contribution with clinical samples for the present work. The HIV BioBank, is supported by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant n° RD06/0006/0035, RD12/0017/0037 and RD16/0025/0019) as part of the Plan Nacional R + D + I and cofinanced by ISCIII- Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)”. The RIS Cohort (CoRIS) is funded by the Instituto de Salud Carlos III through the Red Temática de Investigación Cooperativa en SIDA (RIS C03/173, RD12/0017/0018 and RD16/0002/0006) as part of the Plan Nacional R + D + I and co-financed by ISCIII-Subdirección General de Evaluación y e Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; grant numbers PI14/01094 and PI17/00657 to JB, PI14/01581 and PI17/00903 to JGG, CP17CIII/00007 and PI18CIII/00028 to MAJS, and PI14CIII/00011 and PI17CIII/00003 to SR). The study was also funded by the RD16CIII/0002/0002, RD16/0025/0017, and RD16/0025/0018 projects as part of the Plan Nacional R + D + I and co-funded by ISCIII- Subdirección General de Evaluación and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). JB is an investigator from the Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora en el Sistema Nacional de Salud (I3SNS), Refs INT15/00079 and INT16/00100.

Author contributions

Conceptualization: S.R., J.B., and J.G.G. Data curation: J.B., J.G.G., M.L.M., L.P.L., E.L.H. P.G.B., L.I.S. Formal analysis: S.S., L.M.M., J.M.B., S.R., and M.A.J.S. Funding acquisition: J.B., J.G.G., M.A.J.S, and S.R. Investigation and methodology: S.S., and L.M.M. Project Administration: J.B. Supervision and visualization: S.R. Writing – original draft preparation: M.A.J.S., S.R. Writing – Review & Editing: S.S., J.G.G., J.B.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67159-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.Á.J.-S. or S.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Huella metabólica plasmática de estadios avanzados de cirrosis en pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por VHC

Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients [111]





Introducción y objetivos. El virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la cirrosis inducen trastornos metabólicos. Nuestro objetivo fue evaluar la asociación de metabolitos plasmáticos con la puntuación de Child-Turcotte-Pugh (CTP) y la descompensación hepática en pacientes con cirrosis avanzada coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por el VHC.

Métodos. Se realizó un estudio transversal en 62 pacientes coinfectados por VHC/VIH y 28 pacientes mono infectados por el VHC. El análisis metabólico se realizó por cromatografía de gases y cromatografía líquida, acopladas a espectrometría de masas. El análisis de asociación estadística se ejecutó mediante el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y aplicando un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial (para analizar coinfección por el VIH, consumo elevado de alcohol, tratamiento con estatinas, fracaso previo del tratamiento contra el VHC y descompensación hepática); y mediante modelos de regresión logística ordinal (OLR) para analizar diferentes etapas de la cirrosis (puntuación CTP).

Resultados. El análisis estadístico identificó metabolitos plasmáticos asociados a la coinfección con el VIH, ingesta elevada de alcohol, puntuación CTP y descompensación hepática. En conjunto, los ácidos grasos, ácidos biliares, aminoácidos aromáticos y azufrados, derivados del butirato, fosfolípidos oxidados, metabolitos relacionados con la energía y con la fermentación bacteriana aumentaron en estadios de cirrosis más avanzados; mientras que las lisofosfatidilcolinas (LPC) y lisofosfatidiletanolaminas, los aminoácidos de cadena ramificada y metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico, entre otros, se redujeron. La mayoría de los metabolitos significativos mostraron una tendencia similar después de estratificar en pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por el VHC. El ácido glicólico, la LPC (16:0) y el ácido taurocólico tuvieron una alta precisión para discriminar pacientes con cirrosis descompensada (CTP \geq 7).

Conclusiones. La alteración del perfil metabólico plasmático se asoció con estadios avanzados de cirrosis en pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por VHC.

Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients

Sergio Salgüero^{1,2} | David Rojo³ | Juan Berenguer^{4,5}  | Juan González-García^{6,7} | Amanda Fernández-Rodríguez¹ | Oscar Brochado-Kith¹ | Cristina Díez^{4,5} | Victor Hontañón^{6,7} | Ana Virseda-Berdices¹ | Javier Martínez⁸ | Luis Ibañez-Samaniego⁹  | Elba Llop-Herrera¹⁰ | Coral Barbas³ | Salvador Resino¹  | María A. Jiménez-Sousa¹  | the Escorial Study Group

¹Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

²Unidad de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain

³Centre for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO), Department of Chemistry and Biochemistry, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities, Urbanización Montepríncipe, Madrid, Spain

⁴Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain

⁵Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain

⁶Servicio de Medicina Interna-Unidad de VIH, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

⁷Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

⁸Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁹Servicio de Aparato Digestivo, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain

¹⁰Departamento de Gastroenterología, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

Abstract

Background & Aims: Hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) and cirrhosis induce metabolic disorders. Here, we aimed to evaluate the association of plasma metabolites with Child-Turcotte-Pugh (CTP) score and hepatic decompensation in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients with advanced cirrhosis.

Methods: A cross-sectional study was carried out in 62 HIV/HCV-coinfected and 28 HCV-monoinfected patients. Metabolomics analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The statistical association analysis was performed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and generalized linear model (GLM) with binomial distribution (to analyse HIV coinfection, high alcohol intake, treatment with statins, previous HCV therapy failure and decompensation) and ordinal logistic regression (OLR) models to analyse different stages of cirrhosis (CTP score).

Results: The statistical analysis identified plasma metabolites associated with HIV coinfection, high alcohol intake, CTP score and hepatic decompensation. Overall, fatty acids, bile acids, aromatic and sulphur amino acids, butyrate derivatives, oxidized phospholipids, energy-related metabolites and bacterial fermentation-related metabolites were increased in more advanced cirrhosis stages; while lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines, branched-chain amino acids (BCAA) and metabolites of tricarboxylic acid cycle, among others, were decreased in more advanced cirrhosis. Most of the significant metabolites displayed a similar trend after

Abbreviations: BCAA, Branched-chain amino acids; CAID, Cirrhosis-associated immune dysfunction; cART, Combination antiretroviral therapy; CHC, Chronic hepatitis C; CTP, Child-Turcotte-Pugh score; DAAs, Direct-acting antivirals; FDR, False discovery rate; GC-MS, Gas chromatography-mass spectrometry; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus; HSCs, Hepatic stellate cells; INR, International normalized ratio; IVDU, Intravenous drug user; LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometry; LOOCV, Leave-one-out cross-validation; LPC, Lysophosphatidylcholine; LPE, Lysophosphatidylethanolamine; MELD, Model for End-stage Liver Disease; OLR, Ordinal logistic regression; OR, Odds ratio; PC, Phosphatidylcholine; PCA, Principal component analysis; PCR, Polymerase chain reaction; PE, Phosphatidylethanolamine; PLS-DA, Partial least squares discriminant analysis; QC, Quality control; RSD, Relative standard deviation; VIP, Variable importance in projection.

María Angeles Jiménez-Sousa and Salvador Resino authors contributed equally to this work.

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Correspondence

Maria A. Jiménez-Sousa, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Campus Majadahonda), Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km 2.2; 28220 Majadahonda (Madrid).
Email: jimenezsousa@isciii.es

Funding information

This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; grant numbers CP17CIII/00007 (MPY407/18) and PI18CIII/00028 (MPY385/18) to MAJS, PI14/01094 and PI17/00657 to JB, PI14/01581 and PI17/00903 to JGG, and PI14CIII/00011 and PI17CIII/00003 to SR) and Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (grant number EC11-241). JB is an investigator from the Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora en el Sistema Nacional de Salud (I3SNS), Refs INT16/00100. CB and DR acknowledge funding from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-095166-B-I00).

Handling Editor: Stefano Romeo

stratifying for HIV/HCV- and HCV-infected patients. Glycolic acid, LPC (16:0) and taurocholic acid had high accuracy for discriminating patients according to decompensated cirrhosis (CTP \geq 7).

Conclusion: Altered plasma metabolomic profile was associated with advanced stages of cirrhosis in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients.

KEYWORDS

Child-Turcotte-Pugh, Chronic hepatitis C, cirrhosis, HIV, metabolomics

1 | BACKGROUND

An estimated 71 million people have hepatitis C virus (HCV) infection worldwide, with a prevalence of 1.5% in the World Health Organization (WHO) European Region.¹ Besides, owing to the shared routes of transmission, about 6.2% of people living with human immunodeficiency virus (HIV) have serological evidence of HCV infection.¹ Cirrhosis is a common outcome in chronic hepatitis C (CHC) patients and supposes an important risk for liver failure and hepatocellular carcinoma,² being the progression of the liver disease faster in HIV/HCV-coinfected patients, who have increased rates of liver failure and liver-related mortality.³

Cirrhosis is an advanced stage of liver disease whose pathophysiology is determined by multiple factors, including oxidative stress, systemic inflammation and organ dysfunction.^{4,5} Excessive inflammation can coexist with an immunodeficiency, as part of the cirrhosis-associated immune dysfunction (CAID). The Child-Turcotte-Pugh (CTP) score is a tool widely used for the classification of the cirrhosis severity and to predict the prognosis of patients with chronic liver disease, having a higher sensitivity for liver failure in comparison to other scores.⁶ Currently, although there is a reduction in the incidence of HCV-related cirrhosis by the effectiveness of new direct-acting antivirals (DAAs), a subgroup of patients remain at risk of progression and developing hepatocellular carcinoma.⁷ Additionally, about 40% of patients with HCV infection might be undiagnosed and be identified at a late, decompensated stage, when the therapy of the HCV infection might be less effective to regress the liver disease.⁸

Lay summary

Altered plasma metabolite levels have been found at more advanced stages of the HCV-related cirrhosis, which contribute to a better understanding of the cirrhosis in HIV/HCV coinfected and HCV-monoinfected patients.

Both HCV and HIV infection induce metabolic disorders in cirrhotic patients. The life cycle of HCV is closely associated with lipid metabolism, and this association includes entry into naïve cells, infection, RNA replication, viral assembly and viral exocytosis.^{9,10} Similarly, HIV infection is linked to specific metabolic signatures related to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression, microbial translocation and hepatic function, as well as response to antiretroviral therapy.^{11,12} Since cirrhosis may manifest through many different ways, most of the current literature on the identification of key metabolic changes associated with cirrhosis contain heterogeneous studies including both viral and non-viral aetiology. Besides, to our knowledge, there are no studies about the metabolic profile in different stages of cirrhosis, stratified by CTP score, in HIV/HCV-coinfected and HCV-infected patients. A better understanding of the pathophysiology of the cirrhosis progression produced by HCV may provide a novel insight for the management of these patients.

In this study, we aimed to evaluate the association of plasma-specific metabolites with the CTP score and hepatic decompensation in

HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients with advanced cirrhosis. As secondary objectives, we aimed to assess the association between plasma metabolites and HIV/HCV coinfection, high alcohol intake, treatment with statins and previous anti-HCV therapy.

2 | METHODS

2.1 | Study subjects

We performed a cross-sectional study in patients with advanced HCV-related cirrhosis from the cohort ESCORIAL (see **Appendix**) enrolled from January 2015 to June 2016 in Madrid, Spain. This study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Institute of Health Carlos III (CEI41_2014/CEI42_2020). Before enrolment, participants gave their written informed consent.

The selection criteria were as follows: (a) demonstrable active HCV infection by polymerase chain reaction (PCR); (b) one or more clinical criteria related to advanced cirrhosis (prior history of liver decompensation (ascites, bleeding esophageal varices, hepatic encephalopathy) or liver stiffness measurement ≥ 25 kPa, or CTP ≥ 7 , or hepatic venous pressure gradient ≥ 10 mmHg) and (c) available CTP score and plasma sample to perform metabolomics analysis. HIV/HCV-coinfected patients had stable combination antiretroviral therapy (cART) ≥ 6 months and undetectable plasma HIV viral load (<50 copies/mL).

2.2 | Clinical data

The most relevant epidemiological, clinical and virological characteristics were collected prospectively using an online form within each centre, which fulfilled requirements of data confidentiality. The information stored in the database was monitored for all centres to check that it was in accordance with the patient's medical records.

Our primary outcome was the CTP score, which was calculated from five routine laboratory parameters and clinical measures of liver disease (total bilirubin, serum albumin, international normalized ratio (INR), ascites and hepatic encephalopathy) and hepatic decompensation, which was defined as CTP score ≥ 7 . CTP score can range from 5 to 15 points. As secondary outcomes, we analysed the differences in the metabolic profile regarding HIV/HCV coinfection (vs HCV monoinfection), current high alcohol intake (>50 g/day vs never), treatment with statins (vs never) and previous anti-HCV therapy (vs never).

2.3 | Non-targeted metabolomics

2.3.1 | Reagents and standards for metabolomics

The list of reagents and standards is available in File S1.

2.3.2 | Metabolite extraction and sample preparation

Firstly, samples were inactivated for viruses by mixing methanol with plasma (3:1, v/v). Next, plasma samples were vortexed (15 seg), maintained in cold for 5 min, centrifuged (16 000 g, 20 min, 4°C) and frozen at -80°C before the shipment of samples to the Center for Metabolomics and Bioanalysis (San Pablo-CEU University, Pozuelo de Alarcón, Spain). On the day of analysis, the samples were processed for their subsequent measurement by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Quality controls (QCs) samples were prepared independently for each analytical platform by pooling and mixing equal volumes of each corresponding sample (full description in File S1).

2.3.3 | Data acquisition

Metabolomic analysis was performed by two complementary analytical platforms according to a methodology previously used.¹³ A GC system (Agilent Technologies 7890A) was used consisting of an autosampler (Agilent Technologies 7693) and an inert mass selective detector (MSD) with quadrupole (Agilent Technologies 5975). The derivatized samples were injected through a GC-Column DB5-MS (30 m length, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μm film 95% dimethylpolysiloxane/ 5% diphenylpolysiloxane) with a precolumn (10 m J&W integrated with Agilent 122-5532G). To increase the metabolite coverage, a LC system consisting of a degasser, a binary pump and an autosampler (1290 infinity II, Agilent) was also used. The samples were injected into a reversed-phase column (Zorbax Extend C18 50 x 2.1 mm, 1.8 μm ; Agilent). The mobile phases were solvent A (H_2O containing 0.1% FA) and solvent B (acetonitrile containing 0.1% FA). Data were collected in positive and negative electrospray ionization (ESI) modes in separate runs using Q-TOF (Agilent 6550 iFunnel) (full description in File S1).

2.3.4 | Data treatment and quality assurance

In GC-MS, the deconvolution and identification were performed using MassHunter Quantitative Unknowns Analysis (B.07.00, Agilent), alignment with MassProfiler Professional software (version 13.0, Agilent) and peak integration using MassHunter Quantitative Analysis (version B.07.00, Agilent). In LC-MS, the Molecular Feature Extraction and the Recursive Feature Extraction algorithms in the MassHunter Profinder software (B.08.00, Agilent) were used for deconvolution and alignment of the raw data. After data reprocessing, the metabolic features were subsequently filtered (quality assurance details are available in File S1).

2.4 | Markers of bacterial translocation and infection

The following plasma biomarkers were measured by ELISA: (a) lipopolysaccharide by a Limulus amoebocyte lysate chromogenic endpoint ELISA (LPS; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands); (b) lipopolysaccharide-binding protein (LBP) (R&D Systems, Minneapolis, USA) and (c) Interleukin 6 (IL6) by ProcartaPlex™ immunoassay (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) according to the manufacturer's specifications using a Luminex 200™ analyser (Luminex Corporation, Austin, TX, United States).

2.5 | Statistical analysis

The statistical analysis was carried out with MetaboAnalyst 4.0 software (<http://www.metaboanalyst.ca/>), Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0 software (IBM Corp., Chicago, USA) and R statistical package version v3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

For the descriptive study, categorical data were analysed using the chi-square test, and continuous variables using the Kruskal-Wallis test. For the metabolomic analysis, before performing the differential analysis, variables were log-transformed (\log_2) and auto-scaled. Study reliability was analysed by plotting patients and quality controls together via unsupervised principal component analysis (PCA). Next, we performed a supervised multivariate analysis by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), which models all biomarkers together. The optimal number of components for the model was determined by cross-validation with leave-one-out cross-validation (LOOCV) method using R^2 and Q^2 values as performance measures. The PLS-DA model provides the variable importance in projection (VIP) score for each metabolite. Permutation was carried out by separation distance (B/W) with a permutation number of 1000 to confirm the validity of the model.

For analysis of association, we used generalized linear model (GLM) with binomial distribution (logit-link) and ordinal logistic regression (OLR) models to analyse the association of metabolites with dichotomous (HIV coinfection, high alcohol intake, treatment with statins, hepatic decompensation and previous HCV therapy failure) ('glm function' in R) and ordinal (CTP score) ('ordinal package' in R) outcome variables respectively. These tests provide the odds ratio (OR) and its level of significance. P-values were corrected for multiple testing by using the false discovery rate (FDR) with Benjamini and Hochberg procedure ('qvalue package' in R). Those metabolites with q-value < 0.1 in the univariate model were analysed by multivariate models adjusted by the main clinical and epidemiological baseline characteristics (age, gender, tobacco, alcohol, intravenous drug user (IVDU), previous anti-HCV therapy, treatment with statins, HCV genotype 3, HCV-RNA > 850 000 IU/mL, CTP score and HIV coinfection), which were previously selected by a stepwise method (forward). When some of these covariates were included in the model as outcome, they were omitted as covariates.

In the adjusted models, P-values were also corrected for multiple testing by using the FDR procedure.

Metabolites associated significantly with CTP score in the adjusted model were analysed also for hepatic decompensation (CTP < 7 vs CTP ≥ 7) by GLM with binomial distribution. Next, we analysed the diagnostic performance of significant metabolites resulting from adjusted GLM model by stepwise algorithm for predicting decompensation using the area under the receiver-operating characteristic (AUROC) curve. The following criteria for levels of accuracy were taken into account: >0.90-1 = excellent, >0.80-0.90 = good, >0.70-0.80 = fair and > 0.60-0.70 = poor. Delong test was carried out to compare the AUROC curves.

Finally, we used the list of metabolites resulting from the PLS-DA (VIP ≥ 1) and adjusted OLR (q-value < 0.05) to make a heatmap of metabolites significantly related to CTP score (distance measure: Euclidean; clustering algorithm: ward).

Spearman correlation was carried out to investigate the relationship between bacteria-related metabolites and markers of bacterial translocation and infection.

2.6 | Metabolite identification

The significant metabolites were identified based on FiehnLib,¹⁴ NIST 14 libraries and CEU Mass Mediator search tool (<http://ceuma.ss.eps.uspceu.es>).¹⁵ The metabolites are reported in agreement with the criteria of the Metabolomics Standards Initiative.^{16,17} Further details are available in File S1.

3 | RESULTS

3.1 | Patient characteristics

Clinical and epidemiological characteristics of 90 patients with advanced HCV-related cirrhosis (62 HIV/HCV-coinfected and 28 HCV-monoinfected patients) are shown in Table 1. Overall, the median age was 52.9 years, 70% were male, 8.9% reported a current high intake of alcohol, 58.9% were IVDU and 48.9% had previously failed antiviral therapy (25% interferon (IFN)+ribavirin (RBV); 79.5% pegylated IFN + RBV; 22.7% telaprevir and 6.8% boceprevir; note that some patients received several previous HCV treatments). When patients were stratified by CTP score, patients in more advanced stages had higher values of Model for End-stage Liver Disease (MELD), liver stiffness, hepatic liver pressure gradient, hepatic decompensation as well as higher percentage of HCV genotype 3 and HCV-RNA viral load > 850,000 IU/mL.

3.2 | Reliability analysis

PCA showed that quality control (QC) samples were tightly clustered together in the middle of the plot, confirming the signal stability and

TABLE 1 Clinical and epidemiological characteristics of patients with advanced HCV-related cirrhosis according to Child-Turcotte-Pugh (CTP) score

	All patients	Child-Turcotte-Pugh strata				P
		Score 5	Score 6	Score 7	Score 8	
No.	90	63	14	8	5	—
Age (years)	52.9 (48.9-56.4)	53.1 (50.5-56.5)	52.9 (48.9-54.6)	50 (45.7-57.9)	52.1 (48.8-53.8)	.786
Gender (male)	63 (70.0%)	43 (68.3%)	8 (57.1%)	8 (100.0%)	4 (80.0%)	.182
BMI (kg/m ²)	24.5 (22.4-27.7)	24.1 (22.1-27.4)	25.6 (21.7-31.2)	25.6 (23.3-26.9)	27.3 (25.0-28.4)	.490
Smoker (n = 89)						
Never	17 (19.1%)	13 (21.0%)	3 (21.4%)	1 (12.5%)	0 (0.0%)	0.108
Previously (≥ 6 months)	22 (24.7%)	15 (24.2%)	2 (14.3%)	1 (12.5%)	4 (80.0%)	
Nowadays	50 (56.2%)	34 (54.8%)	9 (64.3%)	6 (75.0%)	1 (20.0%)	
Alcohol intake (>50 g/day)						
Never	44 (48.9%)	33 (52.4%)	6 (42.9%)	3 (37.5%)	3 (60.0%)	0.421
Previously (≥ 6 months)	38 (42.2%)	24 (38.1%)	8 (57.1%)	3 (37.5%)	3 (60.0%)	
Nowadays	8 (8.9%)	6 (9.5%)	0 (0%)	2 (25.0%)	0 (0%)	
IVDU	53 (58.9%)	39 (61.9%)	6 (42.9%)	5 (62.5%)	3 (60.0%)	0.622
Previous anti-HCV therapy	44 (48.9%)	31 (49.2%)	6 (42.9%)	4 (50.0%)	3 (60.0%)	0.928
Treatment with statins	9 (10%)	8 (12.7%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.556
Other liver markers						
MELD	9 (8-11)	8 (7-10)	10 (9-12)	12 (11-13)	13 (11-13)	<0.001
LSM	30.4 (23.6-41.6)	27.4 (21.3-36.3)	43.5 (21.5-49.6)	36.1 (28.1-45.8)	47.2 (35.3-52.2)	0.028
HVPG	15.5 (13.0-18.0)	14.3 (10.0-17.0)	17.0 (15.5-21.0)	17.0 (16.0-18.0)	18.5 (18.0-20.0)	0.008
Ascites	27 (30.0%)	16 (25.4%)	5 (35.7%)	4 (50.0%)	2 (40.0%)	0.455
Bleeding esophageal varices	8 (8.9%)	6 (9.5%)	1 (7.1%)	1 (12.5%)	0 (0%)	0.873
Hepatic encephalopathy	8 (9.0%)	7 (11.3%)	0 (0%)	1 (12.5%)	0 (0%)	0.494
Carcinoma hepatocellular	1 (1.1%)	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.932
HCV markers						
HCV genotype (n = 88)						
1	60 (68.2%)	41 (65.1%)	12 (85.7)	3 (50.0%)	4 (80.0%)	0.041
2	1 (1.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (16.7%)	0 (0%)	
3	12 (13.6%)	9 (14.3%)	1 (7.1%)	1 (16.7%)	1 (20.0%)	
4	15 (17.0%)	13 (20.6%)	1 (7.1%)	1 (16.7%)	0 (0%)	
Log ₁₀ HCV-RNA (IU/mL) (n = 89)	6.2 (5.5-6.6)	6.3 (5.8-6.7)	5.8 (5.4-6.3)	5.5 (5.2-5.9)	6.2 (5.2-6.2)	0.059
HCV-RNA > 850,000 IU/mL (n = 89)	55 (61.8%)	18 (29.0%)	6 (42.9%)	2 (25.0%)	3 (60.0%)	0.030
HIV markers						
HIV coinfection	62 (68.9%)	48 (76.2%)	9 (64.3%)	3 (37.5%)	2 (40.0%)	0.062
Previous AIDS (n = 62)	21 (33.9%)	15 (31.3%)	4 (44.4%)	1 (33.3%)	1 (50.0%)	0.842
Nadir CD4 ⁺ T cells (n = 57)	130 (70-242)	110.4 (54.0-223.0)	130 (72.0-247.0)	300 (99-478)	175.5 (144-207)	0.388
Nadir CD4 ⁺ T cells < 200 cells/mm ³ (n = 57)	38 (66.7%)	31 (72.1%)	5 (55.6%)	1 (33.3%)	1 (50%)	0.420
Baseline CD4 ⁺ T cells (n = 62)	447 (234-719)	452 (238-722)	444 (372-558)	378 (150-685)	439 (164-714)	0.897

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	All patients	Child-Turcotte-Pugh strata				P
		Score 5	Score 6	Score 7	Score 8	
Baseline CD4 ⁺ T cells < 500 cells/mm ³ (n = 62)	36 (58.1%)	28 (58.3%)	5 (55.6%)	2 (66.7%)	1 (50.0%)	0.982
Antiretroviral therapy (n = 61)						
NRTI + NNRTI	7 (11.5%)	5 (10.4%)	2 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0.426
NRTI + II	34 (55.7%)	28 (58.3%)	3 (37.5%)	2 (66.7%)	1 (50.0%)	
NRTI + PI	6 (9.8%)	6 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
PI + II+NNRTI/MVC	4 (6.6%)	2 (4.2%)	1 (12.5%)	0 (0%)	1 (50.0%)	
Others	10 (16.4%)	7 (14.6%)	2 (25%)	1 (33.3%)	0 (0%)	

Note: **Statistics:** Values are expressed as absolute number (percentage) and median (interquartile range). P-values were calculated by Chi-square tests and Kruskal-Wallis tests.

Abbreviations: AIDS, acquired immune deficiency syndrome; BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; HCV-RNA, HCV plasma viral load; HIV, human immunodeficiency; HVP, hepatic venous pressure gradient; II, integrase inhibitor; IV, intravenous drug user; LSM, liver stiffness measurement; MELD, model for end-stage liver disease; MVC, maraviroc; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor

technical reproducibility (see File S2). The percentage of absences in QC samples was lower than 10% for all platforms.

3.3 | Association analysis

3.3.1 | A) HIV/HCV-coinfected patients vs HCV-monoinfected patients

A supervised multivariate analysis by PLS-DA was performed for features detected in GC-MS ($R^2 = 0.619$ and $Q^2 = 0.336$; four components), LC-MS ESI+ ($R^2 = 0.536$ and $Q^2 = 0.102$; three components) and LC-MS ESI- ($R^2 = 0.107$ and $Q^2 = -0.015$; one component). However, PLS-DA was validated by permutation only for GC-MS ($P = .002$) (see File S3). Lower levels of cholesterol (OR = 0.06; $q = 0.023$), stearic acid (OR = 0.08; $q = 0.023$), lysophosphatidylcholine (LPC) (18:0) (OR = 2.78; $q = 0.023$), phosphatidylcholine (PC)(16:0/9:0(CHO)) (OR = 0.15; $q = 0.023$) and acetylcarnitine (OR = 0.22; $q = 0.023$) were significantly associated with HIV coinfection in GLM models (File S4).

3.3.2 | B) Current high alcohol intake

We investigated the role of high alcohol intake (>50 g/day) on the metabolic fingerprint of patients with advanced HCV-related cirrhosis by comparing patients with current high alcohol intake vs patients who never had high consumption. The multivariate analysis by PLS-DA was only validated by permutation for GC-MS ($R^2 = 0.777$ and $Q^2 = 0.539$ with three components and $P = .030$ in the validation) (File S5). 2,3-butanediol, 2-hydroxy-3-methylbutyric acid and threonic acid showed a trend to significance in the unadjusted regression model [OR = 6.68 ($q = 0.058$), OR = 16.63 ($q = 0.085$) and OR = 0.17 ($q = 0.058$) respectively]. 2-hydroxy-3-methylbutyric acid showed significantly higher

levels in those patients with high alcohol intake in the adjusted regression model, when FDR was applied (OR = 15.50, $P = .028$) (File S6).

3.3.3 | C) Treatment with statins

Ten per cent of patients were treated with statins. We found no differences in plasma metabolites when comparing statin-treated vs untreated patients by PLS-DA and an GLM with binomial distribution (data not shown).

3.3.4 | D) Previous HCV therapy failure

When we carried out a multivariate analysis by PLS-DA, we found no differences in plasma metabolites between patients who failed previously to HCV therapy and who did not fail (data not shown). When we carried out GLM models, two features had $q < 0,1$, however, none of them could be identified (File S7).

3.3.5 | E) CTP score

A supervised multivariate analysis by PLS-DA was performed for features detected in GC-MS ($R^2 = 0.670$ and $Q^2 = 0.117$; five components), LC-MS ESI+ ($R^2 = 0.533$ and $Q^2 = 0.025$; three components) and LC-MS ESI- ($R^2 = 0.560$ and $Q^2 = 0.101$; three components). PLS-DA was validated by permutation for GC-MS ($P = .045$) and LC-MS ESI+ ($P = .025$) (see File S8). Next, 20 and 11 metabolites with $VIP \geq 1$ could be identified for GC-MS and LC-MS ESI + respectively (Figure 1; File S9).

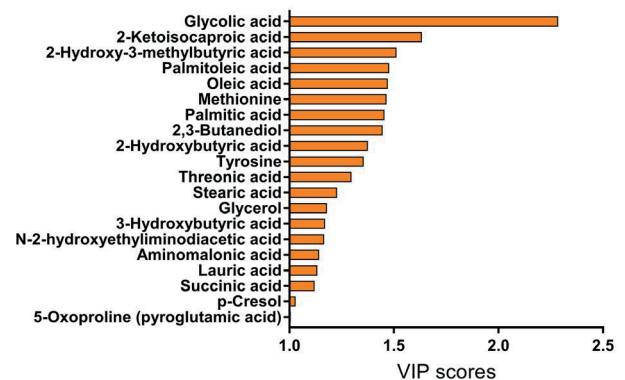
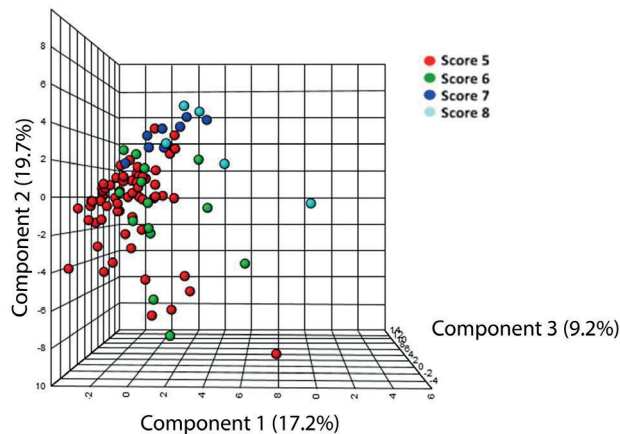
OLR analyses were performed for each of the metabolites detected and 51 significant features were found, of which 16

had q -value < 0.1 after controlling by multiple testing. Of them, 15 features remained significant when adjusted OLR analyses were carried out and only eight metabolites could be identified (File S10). Briefly, glycolic acid and taurocholic acid were significantly associated with an elevated CTP score [aOR = 2.66 ($q = 0.001$) and aOR = 3.62 ($q = 0.001$)] respectively). On the contrary, LPC (20:3), LPC (18:0), LPC (16:0), LPC (20:4), LPC (22:6) and LPE (22:6) were significantly associated with a decreased CTP score [aOR = 0.36 ($q = 0.002$); aOR = 0.42 ($q = 0.002$); aOR = 0.32 ($q = 0.001$); aOR = 0.39 ($q = 0.003$); aOR = 0.32 ($q = 0.001$) and aOR = 0.46 ($q = 0.006$) respectively] (Table 2). When patients were stratified by HIV coinfection (Figure 2), all metabolites except glycolic acid remained significant for HIV/HCV-coinfected patients, and glycolic acid and taurocholic acid remained significant for HCV-monoinfected patients, and LPC (20:3), LPC (20:4), LPC (22:6) and LPE (22:6) tended to the significance (Figure 2).

Besides, we also evaluated significant metabolites resulting from OLR model according to decompensated cirrhosis (CTP ≥ 7) (File S11). Higher levels of glycolic acid and taurocholic acid (aOR = 6.28, $q = 0.020$ and aOR = 4.52, $q = 0.023$ respectively) and lower levels of LPC(20:3), LPC(16:0) and LPC(20:4) (aOR = 0.06, $q = 0.032$; aOR = 0.11, $q = 0.020$; aOR = 0.03, $q = 0.032$ respectively) were associated with decompensated cirrhosis. Next, we selected by adjusted GLM model with stepwise algorithm, glycolic acid, LPC(16:0) and taurocholic acid as the most significant metabolites. The AUROC of these three metabolites individually was 0.730, 0.689 and 0.769 respectively. However, the AUROC of the three metabolites combined together was 0.879, which was significantly higher than the value obtained for glycolic acid and LPC (16:0) separately ($P = .012$ and $P = .009$ respectively) (Figure 3).

In summary, fatty acids, bile acids, aromatic and sulphur amino acids, butyrate derivatives, oxidized phospholipids, energy-related metabolites and bacterial fermentation-related metabolites

(A) GC-MS



(B) LC-MS ESI+

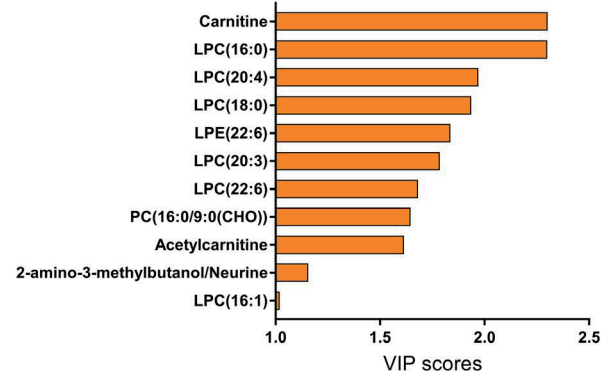
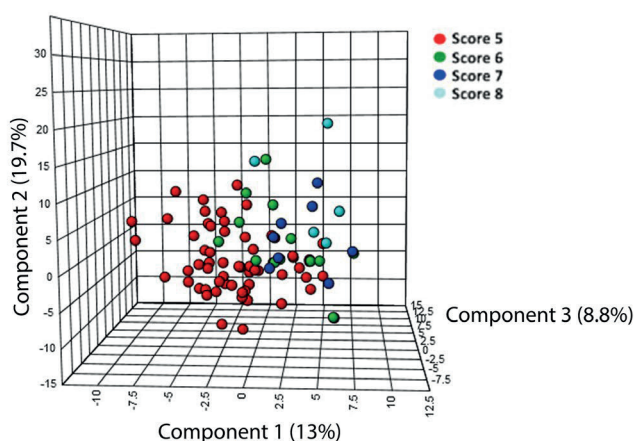


FIGURE 1 Multivariate analysis for cirrhosis progression according to CTP score, in HIV/HCV- and HCV-infected patients. (A) PLS-DA plot resulting from GC-MS data and metabolites with the highest VIP score (≥ 1); (B) PLS-DA resulting from LC-MS ESI+ data and metabolites with the highest VIP score (≥ 1). **Statistics:** Multivariate analysis was performed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The VIP score measures the variable's importance and allows metabolites to be ranked according to their importance. GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; ESI, electrospray ionization; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine

TABLE 2 Summary of associations between metabolites and the Child-Turcotte-Pugh (CTP) score

Metabolite	Technology	Unadjusted model			Adjusted model		
		OR (95%CI)	P-value	q-value	aOR (95%CI)	P-value	q-value
Glycolic acid	GC-MS	2.35 (1.44-3.98)	.001	0.058	2.66 (1.56; 4.87)	6.8×10^{-4}	0.001
LPC(20:3)	LC-MS ESI+	0.45 (0.25-0.75)	.004	0.082	0.36 (0.18-0.65)	.001	0.002
LPC(18:0)	LC-MS ESI+	0.47 (0.28-0.76)	.003	0.072	0.42 (0.24-0.70)	.001	0.002
LPC(16:0)	LC-MS ESI+	0.37 (0.21-0.63)	4.7×10^{-4}	0.027	0.32 (0.16-0.59)	4.8×10^{-4}	0.001
LPC(20:4)	LC-MS ESI+	0.39 (0.21-0.67)	.001	0.044	0.39 (0.21-0.69)	.002	0.003
LPC(22:6)	LC-MS ESI+	0.44 (0.25-0.73)	.002	0.064	0.32 (0.17-0.57)	2.4×10^{-4}	0.001
LPE (22:6)	LC-MS ESI+	0.48 (0.29-0.76)	.003	0.067	0.46 (0.26-0.78)	.005	0.006
Taurocholic acid	LC-MS ESI-	2.63 (1.58-4.65)	4.1×10^{-4}	0.084	3.62 (1.96-7.30)	1.1×10^{-4}	0.001

Note: **Statistics:** Values are expressed as odds ratio and 95% confidence interval. P-values were calculated by ordinal logistic regression analysis; q-values represent p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Adjusted models were adjusted by the most significant clinical and epidemiological characteristics (see Statistical analysis section). Statistically significant differences are shown in bold.

Abbreviations: 95%CI, 95% of confidence interval; aOR, adjusted odds ratio; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; OR, odds ratio; P-value, level of significance; q-value, corrected level of significance.

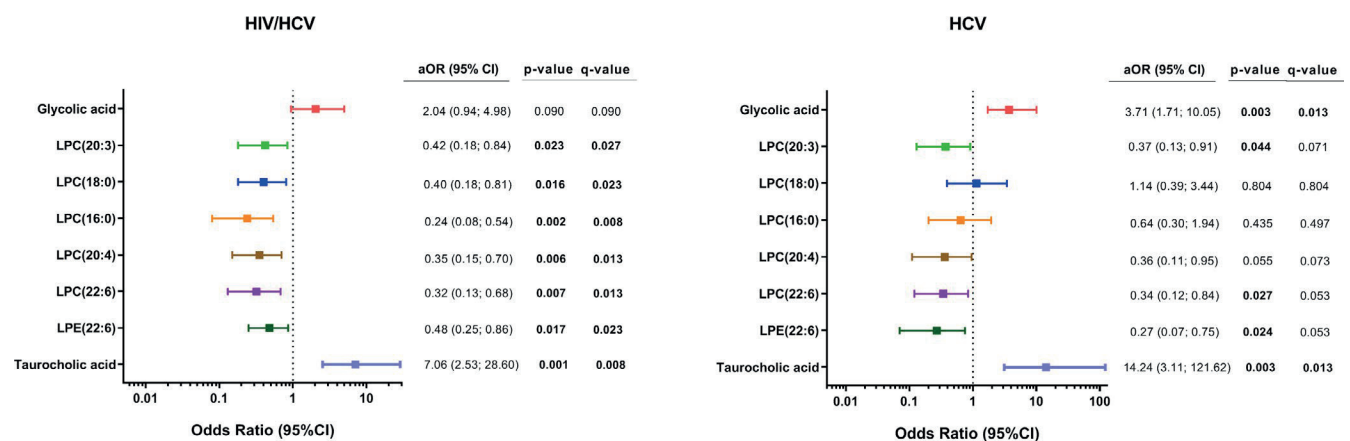


FIGURE 2 Association of significant metabolites resulting from univariate analysis with the CTP score, stratifying by HIV coinfection. **Statistics:** Adjusted odd ratio (aOR) and 95% of confidence interval (95%CI) were calculated by ordinal regression models adjusted by the main baseline characteristics of patients (see Statistical analysis in Patients and Methods section). P-values were adjusted by FDR correction for multiple comparisons (Benjamini and Hochberg). HIV, human immunodeficiency virus; HCV, hepatitis C virus; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine

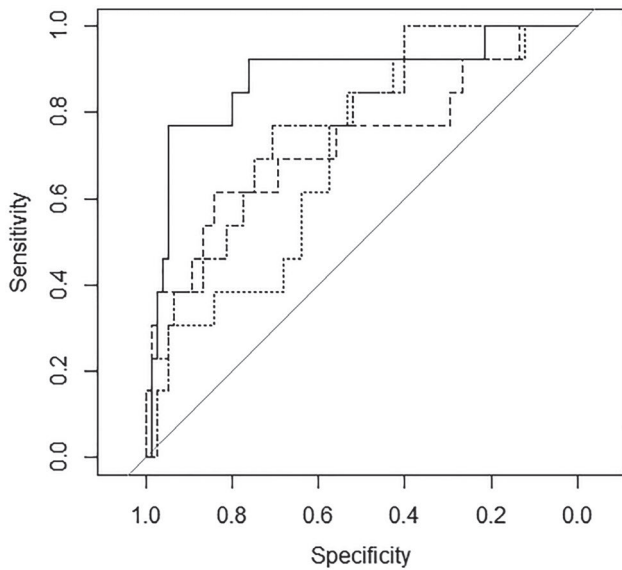
were increased in more advanced cirrhosis stages. In contrast, LPCs and lysophosphatidylethanolamines (LPEs), branched-chain amino acids (BCAA) and metabolites of tricarboxylic acid cycle, among others, were decreased in more advanced cirrhosis (Figure 4).

3.3.6 | F) Correlation between bacteria-related metabolites and markers of bacterial translocation and infection

N-(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid was correlated with LPS ($P = .016$) and 3-hydroxybutyric acid with LBP ($P = .012$). 2-Hydroxy-3-methylbutyric acid and 2,3-Butanediol were correlated with IL6 ($P = .008$ and $P < .001$ respectively) (File S12).

4 | DISCUSSION

To date, there is scarce information about how the metabolomic profile changes during different stages of HCV-related cirrhosis. In this study, we evaluated the plasma metabolomic profile of patients with advanced HCV-related cirrhosis, finding multiple metabolites that could be involved in biological processes related to liver disease progression. Similar trend, with different strength, was observed for most of the significant metabolites in HIV/HCV-coinfected patients and HCV-monoinfected patients. Glycolic acid, LPC(16:0) and taurocholic acid had high accuracy for discriminating patients according to decompensated cirrhosis ($CTP \geq 7$). To our knowledge, this is the first study investigating the plasma metabolome among cirrhotic HIV/HCV-coinfected patients.



Metabolite	AUC-ROC (95% CI)	<i>p</i>
— Glycolic acid + LPC(16:0) + Taurocholic acid	0.879 (0.757-1.000)	REF
- - - Glycolic acid	0.730 (0.554-0.907)	0.012
..... LPC(16:0)	0.689 (0.534-0.845)	0.009
- · - · Taurocholic acid	0.769 (0.641-0.897)	0.175

FIGURE 3 ROC curves of plasma biomarkers for predicting decompensated cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis. **Statistics:** Values were expressed as area under the receiver operating characteristic (AUROC) and 95% confidence interval (95%CI). ROC, receiver operating characteristic; AUC-ROC, area under the curve ROC; CI, confidence interval; LPC, lysophosphatidylcholine; *P*, level of significance

When we compared HIV/HCV-coinfected patients vs HCV-monoinfected patients, we found that HIV/HCV coinfected had lower cholesterol, stearic acid, PC (16:0/9:0(CHO)) and acetylcarnitine and higher LPC (18:0) levels than HCV-monoinfected patients. Both HIV and HCV can alter lipid metabolism. Specifically, hypocholesterolemia has been described both in HIV/HCV-coinfected and in HCV-monoinfected patients, however, lower level has been found in HIV/HCV-coinfected compared to HCV-monoinfected patients,¹⁸ as observed in our study. Besides, previous studies have described lower plasma carnitine levels in HIV-infected patients¹⁹ and higher level of the saturated stearic acid isomer LPC (18:0) in cART/HIV-exposed infants.²⁰ All of the above supports the results found in this study. Additionally, note that HIV patients included in this study were patients with long-term suppressive ART and an important immune recovery.

By multivariate analysis, three metabolites were linked to high alcohol intake with an elevated VIP score among patients with advanced HCV-related cirrhosis. It was corroborated by adjusted regression models, with which a significantly higher level of 2-Hydroxy-3-methylbutyric acid was found in those patients with high alcohol intake. To our knowledge, this is the first study that identifies the association of 2-Hydroxy-3-methylbutyric acid with

alcohol intake. This metabolite has been correlated with procalcitonin,²¹ which identifies cell injury in acute liver failure.²²

LPCs are decisive signalling molecules implicated in controlling cellular proliferation and inflammation.²³ In our study, LPC(16:0), LPC(16:1), LPC(18:0), LPC(20:3), LPC(20:4) and LPC(22:6) were downregulated in patients with higher CTP scores. These findings are in agreement with previous studies, in which a lipidomic profile with generalized decrease in circulating LPC species has been described in other inflammatory/immune diseases, such as obesity,²⁴ type 2 diabetes,²⁵ chronic ischemic stroke²³ and Alzheimer's disease.²³ Moreover, increased lysophospholipase levels have been observed in advanced cirrhosis and hepatocellular carcinoma in previous studies,^{26,27} so the decreased LPCs level observed in our study could illustrate a higher consumption of LPCs by lysophospholipase enzyme as the molecular mechanism for lower LPCs in advanced HCV-related cirrhosis. Also, we found a similar profile for LPE (22:6), which is an additional metabolite associated with abnormal phospholipid metabolism.

Oxidative stress, defined as the imbalance between oxidant and antioxidant agents, has been involved in the progression of liver disease.²⁸ Similarly, both HCV replication and HIV infection contribute to oxidative stress.^{29,30} In our study, several significant metabolites are involved in the misbalance between the production of free radicals and antioxidant defences. Both threonic acid and glycolic acid are derived from dehydroascorbic acid by oxidation.^{31,32} Oxidized phospholipids, such as PC(16:0/9:0(CHO)), are generated under conditions of oxidative stress. Tyrosine isomers are biological markers of oxidative stress and their accumulation can alter cellular homeostasis and promote disease pathogenesis.³³ Additionally, other significant metabolites involved in oxidative stress, such as 5-oxoproline and aminomalonic acid, are also implicated in the cirrhosis progression.^{34,35} Thus, redox imbalance seems a key mechanism in the progression of HCV-related cirrhosis among HIV/HCV- and HCV-infected patients.

Higher free fatty acids (palmitic acid, oleic acid, stearic acid, palmitoleic acid and lauric acid) and glycerol levels were detected in patients with the highest CTP scores. In this setting, HCV-infected cells seem to have an impaired peroxisomal function, leading to an accumulation of fatty acid and facilitating HCV viral replication.³⁶ Regarding liver disease, it has been described that chronic hepatic disease itself alters fatty acid metabolism promoted by gut microbiota,³⁷ among others. Additionally, increased glycerol levels have been previously found in advanced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma.³⁸ Thus, according to our results, cirrhotic HIV/HCV- and HCV-infected patients showed a similar profile to that described for advanced cirrhosis of different aetiologies.

Although the role of butyrate derivatives has not been previously described in the HCV-related cirrhosis, they seem to have an important role in the cirrhosis progression, since several derivatives were found elevated in patients with higher CTP scores. The 2-hydroxybutyrate is a biomarker for insulin resistance,³⁹ whose increase might suggest a more dysregulated glucose metabolism in more advanced HCV-related cirrhosis, according to our results. 3-hydroxybutyrate is a ketone body synthesized in the liver from fatty acids,⁴⁰

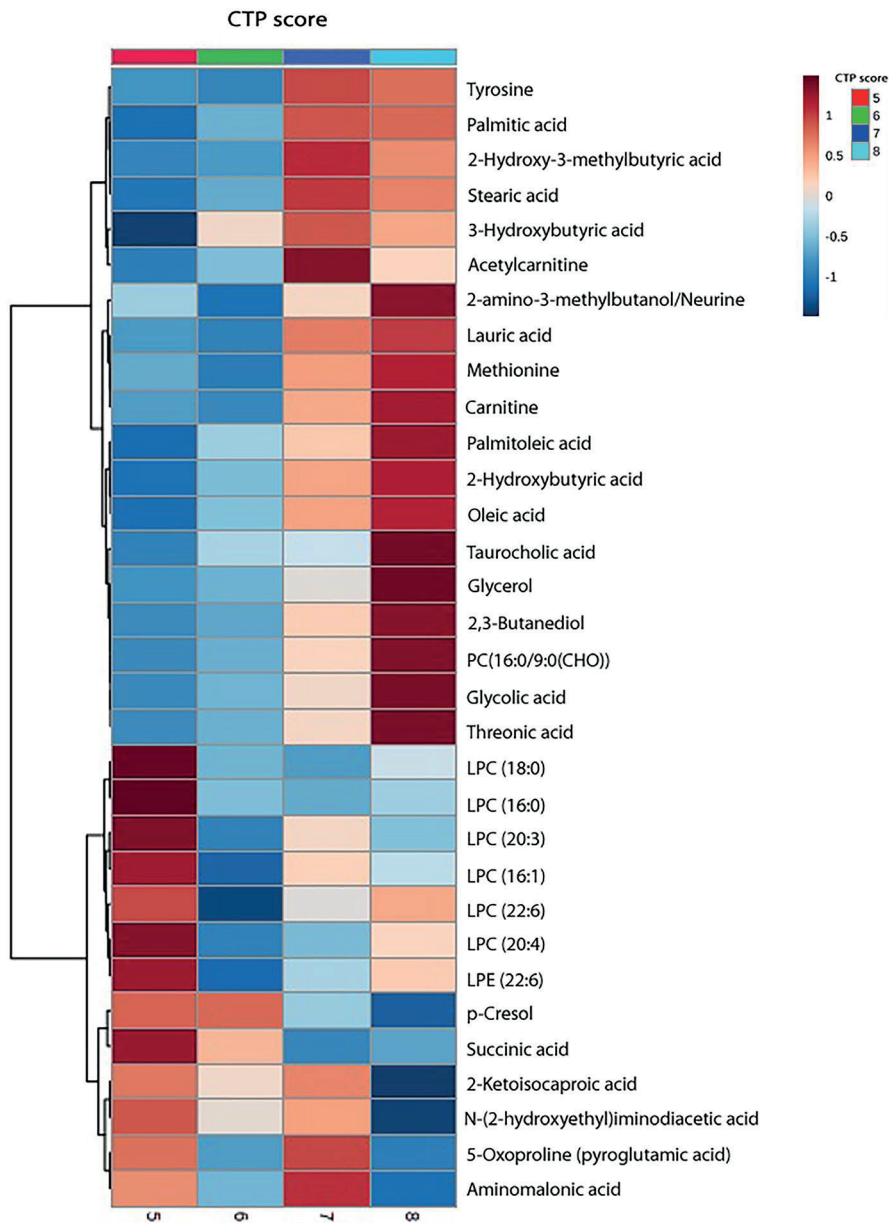


FIGURE 4 Heatmap of metabolites significantly related to the progression of advanced cirrhosis (distance measure using Euclidean, clustering algorithm using ward). Scores 5, 6, 7 and 8 of CTP are represented by columns

which has been used as marker of multi-organ failure in patients with alcoholic hepatitis,⁴¹ but it has not been previously described in HCV-related cirrhosis. Additionally, 2,3-butanediol, a bacterial fermentation product mainly found in *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* and *Serratia* genera,⁴² was increased in patients with more advanced cirrhosis. This metabolite may reflect changes in microbiota diversity and disease susceptibility. In fact, increased abundance of *Klebsiella* in blood has been found in patients with hepatocellular carcinoma.⁴³ Besides, N-(2-hydroxyethyl)-iminodiacetic acid, other significant metabolite in our study, has been correlated with a specific microbiota community.⁴⁴ In this study, N-(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid and 3-hydroxybutyric acid were correlated with LPS and LBP, respectively, which are markers of bacterial translocation. This process is a significant complication in HCV-infected patients with cirrhosis, where intestinal permeability, gut-associated lymphatic tissue and bacterial overgrowth are altered and damaged. Besides,

2-Hydroxy-3-methylbutyric acid and 2,3-butanediol were correlated with IL6, which has been described as a marker with a high diagnostic value for the differentiation of bacterial infection in patients with cirrhosis.⁴⁵

Regarding amino acids, we found an elevated level of methionine and tyrosine in patients with advanced stages of cirrhosis, which is in concordance with previous studies.⁴⁶ In fact, higher values of tyrosine have been associated with an increased mortality in patients with end-stage liver disease.⁴⁷ Moreover, methionine is a precursor of succinyl-CoA, which is converted into succinic acid. In our study, lower succinic acid level was found with higher CTP scores. This fact seems to be in concordance with previous clinical trials that describe the succinate-containing infusion acts as hepatoprotective, promoting the transition from higher to lower values in the CTP score.⁴⁸ Moreover, p-cresol, a decreased metabolite in patients with higher CTP scores in our

study, is produced from tyrosine by several bacteria. However, to our knowledge, there are no previous studies describing the level of these metabolites in HCV-related cirrhosis. Additionally, lower levels of BCAAs have been described in cirrhosis.⁴⁹ Ketoisocaproic acid is an intermediate in the leucine metabolism, with decreased levels as CTP increased, probably by its enhanced incorporation into proteins via enhancement of transamination to leucine.⁵⁰ This transamination is necessary to stimulate insulin secretion.⁵¹ Besides, 2-keto-n-caproic acid (also called 2-ketohexanoic acid) is also a potent insulin secretagogue.⁵² Therefore, since glucose metabolism is altered in HCV-infected patients⁵³ and insulin resistance is associated with hepatic fibrosis,⁵⁴ the decreased level of BCAAs observed in our study could indicate a more damaged insulin and glucose metabolism in patients with higher CTP scores.

Carnitin, an amino acid derived naturally from lysine and methionine, plays a critical role in cellular energy production processes. Carnitin transfers long-chain fatty acids from cytosol into the mitochondrial for subsequent β -oxidation. Increased carnitin and acetylcarnitin levels have been described in patients with different types of cirrhosis, probably as a result of enhanced carnitin biosynthesis,⁵⁵ showing an association independently of the cirrhosis aetiology.⁵⁶ However, to our knowledge, the association of these metabolites with advanced stages of cirrhosis in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients has not been described so far.

In our study, taurocholic acid was the metabolite that had the strongest positive association with the CTP score. Taurocholic acid has been described as the most changed bile acid in cirrhotic patients, mainly as a result of increased bile acid biosynthesis. It plays a crucial role in cirrhosis progression probably by the activation of the hepatic stellate cells (HSCs), being involved in the functional liver progenitor cells biliary differentiation with induction of chemokines that promote HSC recruitment.⁵⁷ Besides, taurocholic acid has been associated with hepatic inflammation and fibrosis, in addition to the induction of multiple pathways related to immune cells and cytokine signalling.⁵⁸

A similar trend in the association of individual metabolites for HIV/HCV-coinfected patients and HCV-monoinfected patients was observed, except for LPC(16:0) and LPC(18:0). However, the association strength was different, being higher in HIV/HCV-coinfected patients. In the adjusted OLR model, all LPCs were significant for HIV/HCV-coinfected patients, with a protective role for liver disease. However, only LPC(20:3) and LPC(22:6) were significant and LPC(20:4) showed a trend in HCV-monoinfected patients, although significance was lost after controlling by multiple comparisons. This lack of significance is probably caused by the more limited sample size in the HCV group, which could alter the ability to achieve statistically significant associations. According to our results, although it is well known that HIV infection promotes inflammation, immune activation, oxidative stress and metabolic disorders, the effect of HIV infection on the metabolic profile in different stages of cirrhosis seems to be diluted by the advanced liver damage that is suffered by these patients. This could lead to the similar trend observed in both

groups. Additionally, it is important to note as limitation that the multivariate models for studying the association of plasma metabolites with CTP for HIV/HCV and HCV groups could not be performed separately as a result of the limited sample size.

Glycolic acid, LPC(16:0) and taurocholic acid were the metabolites most significantly associated with decompensated cirrhosis (CTP score ≥ 7). When these three metabolites were combined together, they discriminated with great accuracy the presence of decompensated cirrhosis, suggesting that it could have an important role in the process of decompensation. They could be used as markers of decompensated cirrhosis; however, further studies are needed among HCV-infected patients.

The limited sample size together with the low frequency of certain outcomes (eg treatment with statins, among others) could have limited the statistical power for some comparisons. Additionally, the limited sample size might also have increased the rate of false positives. However, positive findings were upheld with multiple testing correction, which gives robustness to our results.

5 | CONCLUSIONS

In summary, altered plasma metabolomic profile was associated with advanced stages of cirrhosis in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients. Several metabolic processes changed with the advanced cirrhosis progression, including biosynthesis of fatty acids and phospholipids, cellular energy, oxidative stress, microbial fermentation, bile acids, insulin metabolism and amino acid accumulation. Our findings contribute to a better understanding of the physiopathology of cirrhosis in HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients, medical and nursery staff and data managers who have taken part in the project. We want to particularly acknowledge the support of the HIV BioBank, which is integrated in the Spanish AIDS Research Network and all collaborating Centres for the generous contribution with clinical samples for the present work (see Appendix). The HIV BioBank is supported by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant n° RD06/0006/0035, RD12/0017/0037 and RD16/0025/0019), as part of the Plan Nacional R + D + I and cofinanced by ISCIII- Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)". The RIS Cohort (CoRIS) is funded by the Instituto de Salud Carlos III through the Red Temática de Investigación Cooperativa en SIDA (RIS C03/173, RD12/0017/0018 and RD16/0002/0006) as part of the Plan Nacional R + D+I and cofinanced by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

CONFLICTS OF INTERESTS


The authors declare that they have no competing interests.

ORCID

Juan Berenguer  <https://orcid.org/0000-0001-8541-8200>

Luis Ibañez-Samaniego  <https://orcid.org/0000-0002-0309-2727>

Salvador Resino  <https://orcid.org/0000-0001-8783-0450>

María A. Jiménez-Sousa  <https://orcid.org/0000-0002-1945-6169>

REFERENCES

1. WHO. Global Hepatitis Report. World Health Organization. 2017.
2. Dietrich CG, Gotze O, Geier A. Molecular changes in hepatic metabolism and transport in cirrhosis and their functional importance. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):72-88.
3. Abutaleb A, Sherman KE. A changing paradigm: management and treatment of the HCV/HIV-co-infected patient. *Hepatol Int*. 2018;12(6):500-509.
4. Arroyo V, Garcia-Martinez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;61(2):396-407.
5. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-851.
6. Peng Y, Qi X, Guo X. Child-pugh versus MELD score for the assessment of prognosis in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(8):e2877.
7. Roche B, Coilly A, Duclos-Vallee JC, Samuel D. The impact of treatment of hepatitis C with DAAs on the occurrence of HCC. *Liver Int*. 2018;38(Suppl 1):139-145.
8. Berzigotti A. Advances and challenges in cirrhosis and portal hypertension. *BMC Med*. 2017;15(1):200.
9. Crouchet E, Lefevre M, Verrier ER, Oudot MA, Baumert TF, Schuster C. Extracellular lipid-free apolipoprotein E inhibits HCV replication and induces ABCG1-dependent cholesterol efflux. *Gut*. 2017;66(5):896-907.
10. Douglas DN, Pu CH, Lewis JT, et al. Oxidative stress attenuates lipid synthesis and increases mitochondrial fatty acid oxidation in hepatoma cells infected with hepatitis C virus. *J Biol Chem*. 2016;291(4):1974-1990.
11. Cassol E, Misra V, Holman A, Kamat A, Morgello S, Gabuzda D. Plasma metabolomics identifies lipid abnormalities linked to markers of inflammation, microbial translocation, and hepatic function in HIV patients receiving protease inhibitors. *BMC Infect Dis*. 2013;13:203.
12. Rodríguez-Gallego E, Gómez J, Pacheco YM, et al. A baseline metabolomic signature is associated with immunological CD4+ T-cell recovery after 36 months of antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *AIDS*. 2018;32(5):565-573.
13. Binek A, Rojo D, Godzien J, et al. Flow cytometry has a significant impact on the cellular metabolome. *J Proteome Res*. 2019;18(1):169-181.
14. Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(24):10038-10048.
15. Gil-de-la-Fuente A, Godzien J, Saugar S, et al. Mass mediator 3.0: a metabolite annotation tool. *J Proteome Res*. 2019;18(2):797-802.
16. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, et al. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007;3(3):175-178.
17. Salek RM, Steinbeck C, Viant MR, Goodacre R, Dunn WB. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *Gigascience*. 2013;2(1):13.
18. Langohr K, Sanvisens A, Fuster D, et al. Liver enzyme alterations in HCV-monoinfected and HCV/HIV-coinfected patients. *Open AIDS J*. 2008;2:82-88.
19. Butorov EV. Plasma L-Carnitine and L-Lysine concentrations in HIV-infected patients. *Open Biochem J*. 2017;11:119-131.
20. Schoeman JC, Moutloatse GP, Harms AC, et al. Fetal metabolic stress disrupts immune homeostasis and induces proinflammatory responses in human immunodeficiency virus type 1- and combination antiretroviral therapy-exposed infants. *J Infect Dis*. 2017;216(4):436-446.
21. Zhou B, Lou B, Liu J, She J. Serum metabolite profiles as potential biochemical markers in young adults with community-acquired pneumonia cured by moxifloxacin therapy. *Sci Rep*. 2020;10(1):4436.
22. Rule JA, Hynan LS, Attar N, et al. Procalcitonin identifies cell injury, not bacterial infection, in acute liver failure. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138566.
23. Sidorov E, Sanghera DK, Vanamala JKP. Biomarker for ischemic stroke using metabolome: a clinician perspective. *J Stroke*. 2019;21(1):31-41.
24. Heimerl S, Fischer M, Baessler A, et al. Alterations of plasma lysophosphatidylcholine species in obesity and weight loss. *PLoS One*. 2014;9(10):e111348.
25. Diamanti K, Cavalli M, Pan G, et al. Intra- and inter-individual metabolic profiling highlights carnitine and lysophosphatidylcholine pathways as key molecular defects in type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2019;9(1):9653.
26. Pleri T, Martin D, Kronenberger B, et al. Serum autotaxin is a parameter for the severity of liver cirrhosis and overall survival in patients with liver cirrhosis—a prospective cohort study. *PLoS One*. 2014;9(7):e103532.
27. Wu JM, Xu Y, Skill NJ, et al. Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9:71.
28. Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, et al. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(6):947-957.
29. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(25):8082-8091.
30. Sharma B. Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy. *Curr HIV Res*. 2014;12(1):13-21.
31. Arun P, Rittase WB, Wilder DM, Wang Y, Gist ID, Long JB. Defective methionine metabolism in the brain after repeated blast exposures might contribute to increased oxidative stress. *Neurochem Int*. 2018;112:234-238.
32. Jansson PJ, Jung HR, Lindqvist C, Nordstrom T. Oxidative decomposition of vitamin C in drinking water. *Free Radic Res*. 2004;38(8):855-860.
33. Ipson BR, Fisher AL. Roles of the tyrosine isomers meta-tyrosine and ortho-tyrosine in oxidative stress. *Ageing Res Rev*. 2016;27:93-107.
34. Copley SD, Frank E, Kirsch WM, Koch TH. Detection and possible origins of aminomalonic acid in protein hydrolysates. *Anal Biochem*. 1992;201(1):152-157.
35. van der Pol A, Gil A, Silljé HHW, et al. Accumulation of 5-oxoproline in myocardial dysfunction and the protective effects of OPLAH. *Sci Transl Med*. 2017;9(415):eaam8574.
36. Lupberger J, Croonenborghs T, Roca Suarez AA, et al. Combined analysis of metabolomes, proteomes, and transcriptomes of hepatitis C virus-infected cells and liver to identify pathways associated with disease Development. *Gastroenterology*. 2019;157(2): 537-551.e9.
37. Usami M, Miyoshi M, Yamashita H. Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(41):11597-11608.
38. Procopet B, Fischer P, Farcau O, Stefanescu H. Metabolomics: From liver chirography to personalized precision medicine in advanced chronic liver disease. *World J Hepatol*. 2018;10(3):371-378.

39. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One*. 2010;5(5):e10883.
40. Newman JC, Verdin E. beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(2):173-181.
41. Saibara T, Maeda T, Onishi S, Yamamoto Y. The arterial blood ketone body ratio as a possible marker of multi-organ failure in patients with alcoholic hepatitis. *Liver*. 1994;14(2):85-89.
42. Bialkowska AM. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(12):200.
43. Cho EJ, Leem S, Kim SA, et al. Circulating microbiota-based metagenomic signature for detection of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2019;9(1):7536.
44. Li Y, Fu X, Ma X, et al. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. *Front Microbiol*. 2018;9:1988.
45. Wu Y, Wang M, Zhu Y, Lin S. Serum interleukin-6 in the diagnosis of bacterial infection in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(41):e5127.
46. Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, et al. Plasma amino acids imbalance in cirrhotic patients disturbs the tricarboxylic acid cycle of dendritic cell. *Sci Rep*. 2013;3:3459.
47. Kinny-Köster B, Bartels M, Becker S, et al. Plasma amino acid concentrations predict mortality in patients with end-stage liver disease. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159205.
48. Gridchik IE, Kurdyakov AV, Matveev AI. Experience in use of hepatoprotector remaxol for treating liver cirrhosis. *Eksp Klin Farmakol*. 2015;78(12):11-14.
49. Blonde-Cynober F, Aussel C, Cynober L. Abnormalities in branched-chain amino acid metabolism in cirrhosis: influence of hormonal and nutritional factors and directions for future research. *Clin Nutr*. 1999;18(1):5-13.
50. Blonde-Cynober F, Plassart F, de Bandt JP, et al. Metabolism of alpha-ketoisocaproic acid in isolated perfused liver of cirrhotic rats. *Am J Physiol*. 1995;268(2 Pt 1):E298-304.
51. Zhou Y, Jetton TL, Goshorn S, Lynch CJ, She P. Transamination is required for [alpha]-ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33718-33726.
52. Lenzen S, Formanek H, Panten U. Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem*. 1982;257(12):6631-6633.
53. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, De Vincentis A, Galati G, Picardi A. Hepatitis C virus and metabolic disorder interactions towards liver damage and atherosclerosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):2825-2838.
54. Patel S, Jinjuvadia R, Patel R, Liangpunsakul S. Insulin resistance is associated with significant liver fibrosis in chronic hepatitis C patients: a systemic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(1):80-84.
55. Krahenbuhl S, Reichen J. Carnitine metabolism in patients with chronic liver disease. *Hepatology*. 1997;25(1):148-153.
56. Amodio P, Angeli P, Merkel C, Menon F, Gatta A. Plasma carnitine levels in liver cirrhosis: relationship with nutritional status and liver damage. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1990;28(9):619-626.
57. Pozniak KN, Pearen MA, Pereira TN, et al. Taurocholate induces biliary differentiation of liver progenitor cells causing hepatic stellate cell chemotaxis in the Ductular reaction: role in pediatric cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol*. 2017;187(12):2744-2757.
58. Janssen AWF, Houben T, Katiraei S, et al. Modulation of the gut microbiota impacts nonalcoholic fatty liver disease: a potential role for bile acids. *J Lipid Res*. 2017;58(7):1399-1416.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Salgüero S, Rojo D, Berenguer J, et al; the Escorial Study Group. Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients. *Liver Int*. 2020;40:2215-2227. <https://doi.org/10.1111/liv.14580>

APPENDIX

THE ESCORIAL STUDY GROUP.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain): Cristina Díez, Luis Ibáñez-Samaniego, Leire Pérez-Latorre, Diego Rincón, Teresa Aldámiz-Echevarría, Vega Catalina, Pilar Miralles, Teresa Aldámiz-Echevarría, Francisco Tejerina, María C Gómez-Rico, Esther Alonso, José M Bellón, Rafael Bañares and Juan Berenguer.

Hospital Universitario La Paz/IdiPAZ (Madrid, Spain): José Arribas, José I Bernardino, Carmen Busca, Javier García-Samaniego, Víctor Hontañón, Luz Martín-Carbonero, Rafael Micán, María L Montes-Ramírez, Victoria Moreno, Antonio Olveira, Ignacio Pérez-Valero, Eulalia Valencia and Juan González-García.

Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid, Spain): Elba Llop and José Luis Calleja.

Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain): Javier Martínez and Agustín Albillos.

Fundación SEIMC/GeSIDA (Madrid, Spain): Marta de Miguel, María Yllescas and Herminia Esteban.

Firma de expresión génica de la cirrosis avanzada con alto riesgo de hipertensión portal clínicamente significativa en CMSPs de pacientes coinfectados por VHC/VIH: un estudio transversal

PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfectd patients: A cross-control study [112]

Introducción y objetivos. Los pacientes con cirrosis avanzada tienen un alto riesgo de desarrollar hipertensión portal clínicamente significativa (HPCS). En este trabajo, analizamos el perfil de expresión génica de las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de pacientes coinfectados con VHC/VIH para identificar una firma de expresión génica de cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS.

Métodos. Realizamos un estudio transversal en 68 pacientes. Se utilizó la medición de la rigidez hepática (LSM) para estratificar a los pacientes en $< 12,5$ kPa (sin cirrosis, $n = 19$), $12,5 - 24,9$ kPa (cirrosis, $n = 20$) y ≥ 25 kPa (cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS, $n = 29$). También evaluamos la distinción de LSM < 25 kPa ($n = 39$) frente a ≥ 25 kPa ($n = 29$). Se extrajo el ARN total de las CMSPs y se realizó la secuenciación del ARN poli(A). Se validaron mediante PCR cuantitativa dos de los transcritos expresados diferencialmente (SDE) en una cohorte independiente ($n = 46$).

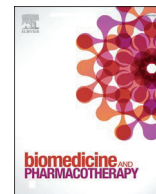
Resultados. Encontramos 60 transcritos SDE entre pacientes con LSM $< 12,5$ kPa y ≥ 25 kPa. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales mostró que esos 60 transcritos SDE discriminaron colectivamente los pacientes con LSM ≥ 25 kPa, con un área bajo la curva ROC (AUROC) de 0,84. Ocho genes tenían una AUROC $\geq 0,75$ para LSM ≥ 25 kPa: cinco se asociaron positivamente con los valores de LSM (*SCAMP1*, *ABHD17B*, *GPR146*, *GTF2A1* y *TMEM64*), mientras que tres se asociaron inversamente (*ZFHX2-AS1*, *MDK* y *STAG3L2*). Validamos los dos transcritos SDE con mayor capacidad de discriminación en una cohorte diferente, encontrando diferencias significativas entre < 25 kPa y ≥ 25 kPa (*MDK* ($p = 0,006$) y *STAG3L2* ($p = 0,021$)).

Conclusiones. Una firma de expresión génica diferencial de 60 transcritos se asoció con cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS en pacientes coinfectados por VHC/VIH.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfecting patients: A cross-control study

Sergio Salguero^{a,b,1}, Óscar Brochado-Kith^{a,c,1}, Ana Virseda Verdices^{a,c,1}, Juan Berenguer^{c,d,e}, Juan González-García^{c,f,g}, Isidoro Martínez^{a,c}, Cristina Díez^{c,d,e}, Víctor Hontañón^{c,f,g}, Leire Pérez-Latorre^{c,d,e}, Amanda Fernández-Rodríguez^{a,c,1}, María Ángeles Jiménez-Sousa^{a,c,*}, Salvador Resino^{a,c,*}

^a Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Unidad de Análisis Clínicos, Hospital El Escorial, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^d Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH; Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spain

^e Instituto de Investigación Sanitaria del Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^f Unidad de VIH; Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario "La Paz", Madrid, Spain

^g Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

HIV/HCV coinfection

Gene expression

RNA-seq

PBMCs

Liver stiffness

Advanced cirrhosis

ABSTRACT

Background: Patients with advanced cirrhosis are at high risk of developing clinically significant portal hypertension (CSPH). We analyzed the gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV/HCV coinfecting patients to identify a gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for CSPH.

Methods: We conducted a cross-sectional study on 68 patients. Liver stiffness measurement (LSM) was used to stratify patients into < 12.5 kPa (no cirrhosis, n = 19), 12.5 – 24.9 kPa (cirrhosis, n = 20), and ≥ 25 kPa (advanced cirrhosis with high risk for CSPH, n = 29). Besides, we further evaluated LSM < 25 kPa (n = 39) vs. ≥ 25 kPa (n = 29). Total RNA was extracted from PBMCs, and poly(A) RNA sequencing was performed. Two significant differentially expressed (SDE) transcripts were validated by quantitative PCR in a different cohort (n = 46).

Results: We found 60 SDE transcripts between patients with LSM < 12.5 kPa and ≥ 25 kPa. Partial least squares discriminant analysis showed that those 60 SDE transcripts collectively discriminated LSM ≥ 25 kPa, with an area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) of 0.84. Eight genes had an AUROC ≥ 0.75 for LSM ≥ 25 kPa: five were positively associated with LSM values (SCAMP1, ABHD17B, GPR146, GTF2A1, and TMEM64), while three were inversely associated (ZFX2-AS1, MDK, and STAG3L2). We validated the two SDE

Abbreviations: HIV, Human immunodeficiency virus; HCV, Hepatitis C virus; HCC, Hepatocellular carcinoma; LSM, Liver stiffness measurement; kPa, Kilopascals; CSPH, Clinically significant portal hypertension; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; cART, Combination antiretroviral therapy; RIN, RNA integrity number; TMM, Trimmed mean of the M-values; RT-qPCR, Reverse transcription-quantitative PCR; MDK, Midkine; STAG3L2, Stromal antigen 3-like 2; GLM, Generalized linear models; FC, Fold-change; FDR, False discovery rate; SDE, Significantly differentially expressed; AMR, Arithmetic mean ratio; PLS-DA, Partial least squares discriminant analysis; AUROC, Area under the ROC curve; SCAMP1, Secretory carrier membrane protein 1; ABHD17B, Abhydrolase domain containing 17B; GPR146, G protein-coupled receptor 146; GTF2A1, General transcription factor IIA subunit 1; TMEM64, Transmembrane protein 64; ZFX2-AS1, Zinc finger homeobox 2 antisense RNA 1; SERCA, Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ + ATPase; HPVG, Hepatic venous pressure gradient measurement.

* Correspondence to: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Campus Majadahonda), Carretera Majadahonda, Pozuelo, Km 2.2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

E-mail addresses: sergio.salguero@salud.madrid.org (S. Salguero), obrochado@isciii.es (Ó. Brochado-Kith), virseda.ana@gmail.com (A.V. Verdices), jbb4@me.com (J. Berenguer), juangonzalezgar@gmail.com (J. González-García), imago@isciii.es (I. Martínez), crispu82@gmail.com (C. Díez), victor.hontanon@gmail.com (V. Hontañón), legor78@hotmail.com (L. Pérez-Latorre), amandafr@isciii.es (A. Fernández-Rodríguez), jimenezsousa@isciii.es (M.Á. Jiménez-Sousa), sresino@isciii.es (S. Resino).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.114220>

Received 9 November 2022; Received in revised form 3 January 2023; Accepted 4 January 2023

Available online 9 January 2023

0753-3322/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

transcripts with the highest discrimination capacity in a different cohort, finding significant differences between < 25 kPa and ≥ 25 kPa (*MDK* ($p = 0.006$) and *STAG3L2* ($p = 0.021$)).

Conclusions: A gene expression signature of 60 transcripts was associated with advanced cirrhosis with high risk for CSPH in HIV/HCV coinfecting patients.

1. Background

Both human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) share transmission routes, cause chronic infections, and represent a significant global health burden [1]. HIV/HCV coinfection is common, and liver disease is the leading cause of morbidity and mortality among coinfecting patients [2]. HIV/HCV-coinfecting patients develop cirrhosis more rapidly than their HCV mono-infected counterparts [3], with higher rates of liver decompensation, end-stage liver disease, hepatocellular carcinoma (HCC), and liver-related death [4].

Liver fibrosis is a dynamic response to liver injury that leads to the accumulation of extracellular matrix. When the damage is maintained, the liver parenchyma is gradually replaced by scar tissue, which can lead to cirrhosis [5]. Chronic hepatitis C promotes massive destruction of hepatocytes, leading to significant pathophysiological changes during advanced fibrosis and cirrhosis [6], such as immune activation, inflammation, and coagulopathy [7], which can trigger the appearance of cirrhosis-associated immune dysfunction, characterized by systemic inflammation and immune deficiency [8]. These pathophysiological processes contribute to an increased risk of infections, organ failure [8], and carcinogenesis [9]. After HCV eradication, epigenetic and immunological alterations persist [10], and the burden of liver cirrhosis remains substantial for a long time [11]. In addition, HIV/HCV-coinfecting patients continue to have a higher mortality risk than HCV-mono-infected patients [12].

An accurate assessment of the degree of liver fibrosis is a crucial step for proper patient management. A widely used physical method to assess liver fibrosis is using transient elastography (FibroScan®), which reports liver stiffness measurement (LSM) in kilopascals (kPa) to estimate liver fibrosis [13]. In this regard, LSM ≥ 12.5 kPa is considered cirrhosis [13], and ≥ 25 kPa is advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension (CSPH) [14,15].

Liquid biopsy, such as a blood sample, can overcome the limitations of both liver biopsy and current noninvasive methods [16]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), one of the main extrahepatic reservoirs of HCV, may be an excellent source of biomarkers reflecting HCV liver infection [17,18]. There is a continuing interest in developing new biomarkers that support clinical decisions. The application of omics techniques has opened multiple possibilities to identify suitable biomarkers for liver fibrosis, which has already been applied in the context of viral hepatitis [19,20]. Furthermore, using transcriptomics can help us elucidate the molecular mechanisms behind liver fibrosis at different stages [21] and the acceleration of liver disease in HIV/HCV-coinfecting patients [22]. Identifying key molecular cues in liver fibrosis can accelerate the development of antifibrotic agents to reverse persistent hepatic pathology after HCV eradication [16,23]. These approaches should be applied to accessible tissues to identify non-invasive biomarkers.

1.1. Objective

We aimed to analyze the gene expression profile of PBMCs in HIV/HCV coinfecting patients with different degrees of fibrosis/cirrhosis, measured by LSM using transient elastography, to identify a gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for CSPH in this population group.

2. Methods

2.1. Patients

We conducted a cross-sectional study on 68 HIV/HCV-coinfecting patients (training cohort) and 46 HIV/HCV-coinfecting patients (validation cohort). For this study, inclusion criteria were: 1) detectable HCV-RNA (HCV+) and HIV-DNA (HIV+) in peripheral blood by polymerase chain reaction; 2) LSM data available; 3) PBMCs sample available; 4) combination antiretroviral therapy (cART) for at least six months or no need for cART according to guidelines used in the study period; 5) CD4⁺ T cell ≥ 200 cells/ μ L; 6) undetectable plasma HIV-RNA viral load (< 50 copies/mL). Patients with acute hepatitis C, hepatitis B virus coinfection, and previous diagnosis of HCC were excluded.

Data and samples were selected from two previously described cohorts: GESIDA 3603b cohort (November 2012 and February 2014, $n = 63$) and the ESCORIAL cohort (March 2015 and September 2015, $n = 51$) (Appendix) [24,25]. Both cohorts belong to specific research projects approved by the Research Ethics Committee of the Instituto de Salud Carlos III (References CEI PI 23_2011 and CEI PI 41_2014, respectively), which verify the ethical development of research projects. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and all participants gave their written consent before enrollment.

2.2. Clinical data and samples

Clinical data were collected using an online form, and the information was monitored. As previously described, trained operators assessed LSM using transient elastography (FibroScan®, Echosens, Paris, France) [7]. The LSM ranged from 2.5 to 75 kPa.

Clinical samples were obtained by venipuncture in ethylenediaminetetraacetic acid tubes. Peripheral venous blood samples were sent to the HIV HGM BioBank (<http://hivhgmbiobank.com/?lang=en>) on the same day of the extraction. PBMCs were isolated by Ficoll-Paque density gradient and stored in liquid nitrogen (-180 °C) until use.

2.3. Outcome variables

The outcome variable was LSM (kPa), using the following strata [13–15]: i) < 12.5 kPa (no cirrhosis); ii) 12.5 – 24.9 kPa (cirrhosis), and iii) ≥ 25 kPa (advanced cirrhosis with high risk for CSPH, Baveno VII Consensus Workshop). In addition, we assessed the presence of LSM ≥ 25 kPa.

2.4. RNA extraction, library preparation, and RNA sequencing

According to the manufacturer's instructions, total RNA was extracted from PBMCs using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was quantified using NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher). The RNA quality was evaluated by the RNA Integrity Number (RIN) using 2100 Bioanalyzer RNA Nano assay (Agilent). Only samples with RIN > 7.5 were selected for library preparation.

Libraries were synthesized following Illumina's TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit v2 protocol, using 500 nanograms of total RNA of each sample. With this procedure, polyadenylated RNAs were captured, including coding RNA and multiple forms of noncoding polyadenylated RNAs. Next, libraries were pooled for multiplexed sequencing to obtain an average of 25 million reads per sample.

Sequencing was then performed on an Illumina HiSeq2500, single read, 50nts (1 × 50). Library preparation and sequencing were performed at the Centre for Genomic Regulation in Barcelona (Spain). More details on these processes were recently described by our group [26]. The raw sequencing data were processed using FastQC (v. 0.11.8) for quality control and Trimmomatic (v. 0.38) for adapter trimming. The applied bioinformatics workflow includes sequence alignment with STAR (v. 2.6.1d), using GRCh38 as a reference genome, and the Subread's featureCounts software (v. 1.6.4) for reading count extraction [26]. The raw RNA-seq data are publicly available at the ArrayExpress repository (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/>) under the accession number E-MTAB-12251.

Before testing for differentially expressed transcripts, filtering and normalization were applied to RNA-Seq data with the *edgeR* package (v. 3.32.1). Briefly, transcripts with low counts were first filtered out using the *filterByExpr()* function. Normalization was then performed by applying the trimmed mean of the M-values (TMM) method.

2.5. Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR was used to validate the expression of differentially expressed genes by RNA sequencing. Total RNA previously extracted was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Generated cDNA was used to quantify the expression of the selected genes by RT-qPCR using Taqman Gene Expression Assays (FAM dye-labeled, Applied Biosystems) specific for each gene in a Step One system (Applied Biosystems). PCRs were run in triplicate for *midkine* (*neuregulin growth-promoting factor 2*) (*MDK*; Hs00171064_m1) and *stromal antigen 3-like 2* (*STAG3L2*; Hs00414793_m1) genes. To normalize the quantification of an mRNA target for differences in the amount of total RNA, we used *actin-β* (*ACTB*; Hs99999903_m1) as an endogenous control.

We performed a relative quantification using the comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$) method (Applied Biosystems User Bulletin no. 2) using a random mixture of samples from six HIV-infected patients as a reference sample (calibrator). Quantifying target mRNA expression was performed relative to the calibrator, expressed as n-fold for all samples.

2.6. Sample size calculation

The sample size was calculated according to the RNASeqPower package (v. 1.30.0), using 25 million reads per sample, a minimum fold change of 1.5, an alpha of 0.05, and an estimated dispersion of 0.4. For pairwise comparison of the strata of cirrhosis according to LSM (< 12.5 kPa (n = 19), 12.5–24.9 kPa (n = 20), and ≥ 25 kPa (n = 29)), we found a statistical power of 0.82 when comparing groups of at least 20 patients each. For comparison of advanced cirrhosis with high risk for CSPH (< 25 kPa (n = 39) vs. ≥ 25 kPa (n = 29)), we found a statistical power of 0.96.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), Stata/IC 17 (StataCorp, Texas, USA), and GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, Inc., California, USA). All *p*-values were two-tailed, and statistical significance was set as $p \leq 0.05$.

A descriptive analysis of the study population was performed by applying the Chi-squared or Fisher's exact test on categorical variables and the Kruskal-Wallis test on continuous variables.

For gene expression analysis, we analyzed the differences in gene expression in PBMCs (counts per million) between all possible pairwise comparisons among patient groups according to LSM strata (< 12.5kPa, 12.5 - 25 kPa, ≥ 25 kPa), using generalized linear models (GLM) with a negative binomial distribution (*stats* package v3.6.2 in R). The GLM test

provides the fold-change (FC) and its level of significance (*p*-value), which were corrected for multiple tests using the false discovery rate (FDR) with the Benjamini and Hochberg method (*q*-value). Transcripts with $FC \geq 1.5$ in both directions and a *q*-value ≤ 0.05 were considered significantly differentially expressed (SDE). Besides, the linear association between SDE genes (counts per million) and LSM (kPa) as a continuous variable was also evaluated. This test provides the arithmetic mean ratio (AMR) and the 95% confidence interval (95%CI). Marginal effects were computed, and results were plotted using the *ggpredict* function from the *ggeffects* package. Next, we evaluated the discriminatory performance of the SDE transcripts resulting from GLMs to distinguish advanced cirrhosis with high risk for CSPH (< 25 kPa vs. ≥ 25 kPa).

We also carried out a supervised multivariate analysis (multiple dependent variables) with the SDE transcripts previously identified to confirm patients' clusterization using a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) [R-packages *mixOmics* v6.3.2]. PLS-DA creates a regression model that classifies patients based on all SDE transcripts, dealing with common multicollinearity among transcripts. This test gives us the area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) of all SDE transcripts (cirrhosis signature) for discriminating advanced cirrhosis with high risk for CSPH (< 25 kPa vs. ≥ 25 kPa), considering that an AUROC between 0.90 and 1 was outstanding, 0.80–0.90 was excellent, and 0.70–0.80 was good. We also analyzed the discriminatory performance of each SDE transcript separately to discriminate advanced cirrhosis with high risk for CSPH (< 25 kPa vs. ≥ 25 kPa) via AUROC calculation.

3. Results

3.1. Significant differences between fibrosis strata

Characteristics of HIV/HCV-coinfected patients (training cohort) were similar among LSM strata (Table 1), except for nadir CD4⁺ T-cells ($p = 0.017$), LSM ($p < 0.001$), and total cholesterol levels ($p = 0.005$).

RNA-seq samples showed an average of 23.47 million reads and 99.04% mapped to the reference genome. A total of 60,623 different genes were identified, but only 15,642 met the filtering criteria for subsequent analysis (see methods).

No significant differences were observed among contiguous fibrosis strata (< 12.5kPa vs. 12.5 kPa-24.9 kPa, and 12.5 kPa-24.9 kPa vs. ≥ 25 kPa; *q*-value > 0.25). However, a total of 60 SDE transcripts were found between patients with extreme LSM values, LSM < 12.5 kPa (no cirrhosis) vs. LSM ≥ 25 kPa (advanced cirrhosis with high risk for CSPH) (Fig. 1; the full description is in Supplementary Table 1). Twenty-two out of 60 SDE genes were downregulated, and 38 were upregulated in patients with advanced cirrhosis with high risk for CSPH. Additionally, these 60 SDE transcripts followed a significant linear association with LSM values in all cases, whether positive or negative (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 1). We used these 60 SDE transcripts for further analyses.

3.2. Gene expression discriminates advanced cirrhosis with high risk for CSPH

Subsequently, we stratified all HIV/HCV patients of the training cohort into two groups by absence (< 25 kPa) or presence (≥ 25 kPa) of advanced cirrhosis with high risk for CSPH. Clinical, epidemiological, and virological characteristics are displayed in Supplementary Table 3. Patients with ≥ 25 kPa had lower values of total cholesterol ($p = 0.001$), LDL ($p = 0.037$), and HDL ($p = 0.030$).

PLS-DA showed that the previous 60 SDE transcripts collectively discriminated between patients with and without advanced cirrhosis with high risk for CSPH (AUROC = 0.835) (Fig. 2A), with an excellent discrimination ability (AUROC = 0.84; Fig. 2B). Moreover, we individually assessed this ability for each of the 60 SDE transcripts previously

Table 1
Clinical, epidemiological, and virological characteristics of HIV/HCV-coinfected patients in training set according to values of LSM.

	All	< 12.5 kPa	12.5 – 24.9 kPa	≥ 25 kPa	p-value
No.	68	19	20	29	
Gender (male)	48 (70.6%)	12 (63.2%)	15 (75%)	21 (72.4%)	0.691
Age (years)	50.5 (47; 53)	50.4 (45; 53)	48.4 (46.3; 53.1)	50.9 (48.7; 53.6)	0.513
BMI (kg/m ²) (n = 65)	23.8 (21.7; 25.5)	23.6 (20.4; 26.4)	24.1 (22.9; 25.2)	23.3 (21.7; 25.7)	0.798
BMI ≥ 25 (kg/m ²) (n = 65)	21 (32.3%)	7 (38.9%)	5 (26.3%)	9 (32.1%)	0.716
Alcohol consumed ever	36 (52.9%)	8 (42.1%)	11 (55%)	17 (58.6%)	0.521
Intravenous drug user	57 (83.8%)	16 (84.2%)	16 (80%)	25 (86.2%)	0.844
Previous HCV therapy	30 (44.1%)	7 (36.8%)	13 (65%)	10 (34.5%)	0.081
HIV antiretroviral therapy					0.349
NRTI + II-based	29 (42.6%)	8 (42.1%)	7 (35%)	14 (48.3%)	
NRTI + NNRTI-based	11 (16.2%)	4 (21.1%)	5 (25%)	2 (6.9%)	
NRTI + PI-based	6 (8.8%)	2 (10.5%)	1 (5%)	4 (13.8%)	
PI-based	7 (10.3%)	2 (10.5%)	3 (15%)	2 (6.9%)	
PI + II-based	4 (5.9%)	2 (10.5%)	2 (10%)	0 (0%)	
Others	10 (14.7%)	1 (5.3%)	2 (10%)	7 (24.1%)	
HIV markers					
Nadir CD4 ⁺ T-cells (n = 67)	122 (71; 224)	234 (70; 367)	88 (52.5; 172.5)	114.7 (93.5; 180)	0.017
CD4 ⁺ T-cells/mm ³	520.5 (279.5; 822.5)	695 (455; 814)	370.5 (245; 760.2)	434 (236.5; 901.5)	0.404
HCV markers					
HCV genotype (n = 66)					0.349
1	40 (60.6%)	11 (57.9%)	14 (70%)	15 (55.6%)	
2	1 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.7%)	
3	15 (22.7%)	7 (36.8%)	2 (10%)	6 (22.2%)	
4	10 (15.2%)	1 (5.3%)	4 (20%)	5 (18.5%)	
Log ₁₀ HCV-RNA (IU/mL)	6.4 (5.8; 6.6)	6.4 (5.9; 6.8)	6.2 (5.5; 6.5)	6.4 (5.9; 6.7)	0.187
HCV-RNA > 850.000 IU/mL	48 (70.6%)	13 (68.4%)	13 (65%)	22 (75.9%)	0.693
LSM (Kpa)	21 (11.9; 34.6)	9.8 (7.8; 11.4)	17.6 (14.8; 21.1)	36.3 (27.3; 40.6)	< 0.001
Biochemical markers					
Triglycerides (mg/dL)	114 (79; 161)	106 (65.5; 182.5)	115 (80; 160)	115 (81; 183)	0.781
Total cholesterol (mg/dL)	151 (123; 174)	167 (136; 193)	169.5 (129.5; 194.7)	130.5 (105.5; 156.5)	0.005
LDL (mg/dL)	74.5 (56; 104)	94 (57.5; 108)	93 (65; 108.2)	60 (53.5; 84)	0.113
HDL (mg/dL)	44.5 (34; 58)	48 (34; 61)	51 (40; 58)	37 (29.5; 50.5)	0.089

Statistics: The values are expressed as the absolute number (percentage) and median (interquartile range). P-values were calculated by the Fisher's exact test and the Kruskal-Wallis test.

Abbreviations: BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; HIV, human

immunodeficiency virus; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; II, HIV integrase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, HIV protease inhibitor; LSM, liver stiffness measurement; HCV-RNA, viral load of hepatitis C; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

identified (Supplementary Table 4). We found eight genes with an AUROC ≥ 0.75 (Table 2). Five out of 8 genes were positively associated with LSM values: *secretory carrier membrane protein 1 (SCAMP1)*, *abhydrolase domain containing 17B (ABHD17B)*, *general transcription factor IIA subunit 1 (GTF2A1)*, *transmembrane protein 64 (TMEM64)*, and *G protein-coupled receptor 146 (GPR146)*; while three genes were negatively associated: *zinc finger homeobox 2 antisense RNA 1 (ZFH2-AS1)*, *MDK*, and *STAG3L2*.

3.3. SDE transcripts validation

RT-qPCR was used to confirm the significance of the two SDE transcripts with higher discrimination ability for advanced cirrhosis with high risk for CSPH (*STAG3L2* and *MDK*) in a validation cohort of 46 HIV/HCV-coinfected patients (Supplementary Table 5) with similar characteristics to the training cohort. Both *MDK* ($p = 0.006$; Fig. 3A) and *STAG3L2* ($p = 0.021$; Fig. 3B) showed significant differences between < 25 kPa and ≥ 25 kPa groups.

4. Discussion

We found a PBMCs gene expression signature of 60 SDE transcripts in HIV/HCV coinfected patients between extreme phenotypes of cirrhosis (non-cirrhotic (< 12.5 kPa) vs. advanced cirrhosis with high risk for CSPH (≥ 25 kPa)). Assessing PBMCs expression is a worthy option since it may resemble some molecular mechanism related to HCV in the liver [16,18]. Besides, most gene expression changes overlap between the liver and PBMCs compartments in coinfected patients, supporting the systemic nature of inflammatory cues [27]. Lastly, the immune system is a critical element in the pathogenesis of liver fibrosis [5]. PBMCs may be arguably the best tissue to assess the chronic inflammatory state during chronic hepatitis, acting as an interplay between the liver and systemic factors. Therefore, our results may reflect the relationship between the state of the immunological system and the cirrhotic stage. In this regard, transcriptomics has already been applied to PBMCs to gain insight into immune system activity in the context of different liver diseases [28]. However, both HCV and HIV can infect PBMCs and, thus, alter their expression, making studies in HIV/HCV-coinfected patients necessary.

Our study did not find differences in contiguous fibrosis stages (<12.5 kPa vs. 12.5 – 24.9 kPa and 12.5 – 24.9 kPa vs. ≥ 25 kPa), probably because changes in gene expression are gradually established as fibrosis increases, and our statistical power is limited to detect them. However, we found a set of 60 SDE transcripts when groups with extreme LSM values (< 12.5 kPa vs. ≥ 25 kPa) were compared, as differences were maximized. Of note, an increased number of lncRNAs (e.g., *AD000090.1*) or pseudogenes (e.g., *TPT1P9*) were significantly altered, supporting the growing evidence that noncoding RNAs are critical key players during liver cirrhosis progression [29].

We analyzed these 60 SDE transcripts to discriminate the CSPH (< 25 kPa vs. ≥ 25 kPa). Collectively, this set of transcripts was able to correctly classify patients with advanced cirrhosis with high risk for CSPH. Eight of them showed good independent discriminatory performance (AUROC ≥ 0.75). The expression values of five of these transcripts were positively associated with LSM (*SCAMP1*, *ABHD17B*, *GPR146*, *GTF2A1*, and *TMEM64*). Some of these overexpressed genes have already been involved in HCC (*GTF2A1*, *SCAMP1*, and *TMEM64*). *GTF2A1* has previously been found to play a role in HCC [30]. *GTF2A1* encodes the general transcription factor IIA subunit 1, which, together with *GTF2A2*, forms the general transcriptional regulator TFIIA, which is regulated through multiple complex regulatory mechanisms,

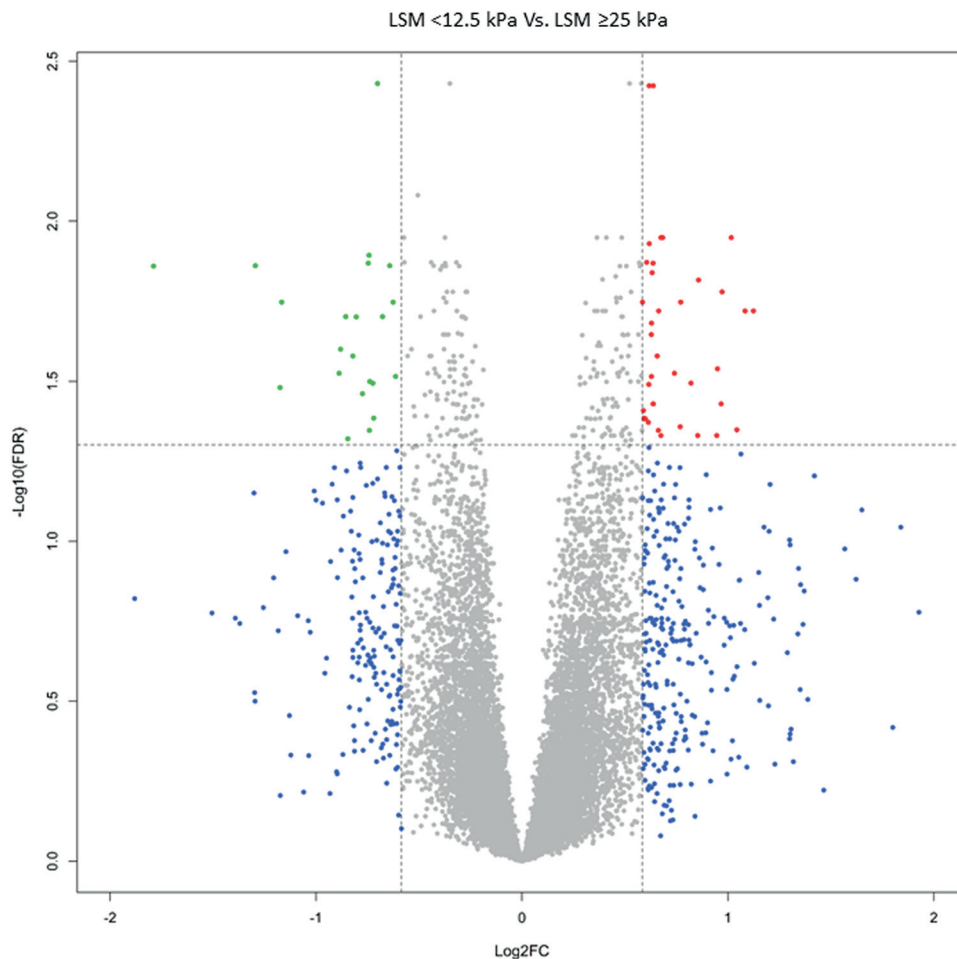


Fig. 1. Volcano plot of the differences in gene expression in PBMCs from HIV/HCV coinfecting patients clustered according to LSM < 12.5 kPa (no cirrhosis) versus LSM \geq 25 kPa (high risk for clinically significant portal hypertension, CSPH). Significant upregulated and down-regulated transcripts are illustrated as red and green circles, respectively. Statistics: The volcano plot is depicted with the fold change (FC) of each transcript calculated by the GLM test. The significance level was corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) with the Benjamini and Hochberg method. Abbreviations: FC, Fold-change; FDR, False discovery rate.

including site-specific proteolysis by the highly conserved protease Taspase 1 [31]. Taspase 1 overexpression has already been associated with HCC [32]. SCAMP1 is a protein involved in the endomembrane system and vesicle trafficking [33], and its dysregulation may contribute to several diseases, such as cancer [34]. Extracellular vesicles, especially exosomes, are the main form of communication in the liver [35], and HCV and HIV are known to hijack the host exosomal machinery. While each SCAMP member may have a distinctive role in trafficking pathways [33], it is worth mentioning that another member of the same family, SCAMP3, has already been related to the pathogenesis of HCC [36]. *TMEM64*, which has already been associated with HCC [37], codes for a transmembrane protein capable of modulating Wnt signaling, which in turn may be involved in promoting liver fibrosis [38] and the development of HCC [39]. In addition, *TMEM64* positively mediates sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) activity [40], a critical regulator of calcium homeostasis and signaling, which regulates Th17 cell differentiation [41]. This would agree with previous findings in which HIV/HCV-coinfecting patients with higher degrees of cirrhosis (LSM \geq 25 kPa) had the lowest plasma cytokine values related to Th17 response [42].

The remaining overexpressed genes in patients with advanced cirrhosis with high risk for CSPH, *GPR146*, and *ABHD17B*, together with the previously commented *TMEM64*, could also be related to metabolic function. HIV and HCV infections cause alterations in metabolism, which triggers a pathological process that leads to liver steatosis and cirrhosis [43]. *GPR146* has been given a role in the selective inhibition of RNA virus infection [44], exerts a detrimental effect on the regulation of systemic cholesterol metabolism [45], and, therefore, its overexpression could contribute to the alteration of lipid metabolism. This

would agree with the lower cholesterol values detected in our patients with LSM \geq 25 kPa. *TMEM64* overexpression has been associated with increased adipogenesis [46], and *ARL15*, another SDE overexpressed in patients with LSM \geq 25 kPa, may predispose them to lipodystrophy [47]. *ABHD17B* codes for an enzyme with depalmitoylating activity. Palmitoylation alterations have been associated with different neurological disorders [48], which could explain the neurological manifestations often described in HCV-infected patients with LSM \geq 25 kPa [49]. Besides, *ABHD17B* appears to be involved in progressing from cirrhosis to HCC [50]. The *ABHD17B* overexpression detected in our study is consistent with previous findings, where higher free fatty acids and glycerol levels in patients with higher Child-Turcotte-Pugh scores were found [51].

On the other hand, three additional transcripts showed good discriminatory performance (*STAG3L2*, *MDK*, and *ZFH2-AS1*), whose expression decreased with LSM values. *ZFH2-AS1* is a lncRNA without known function besides the putative negative regulator of the transcription factor *ZFH2*, promoting upregulation of somatostatin [52], which is elevated in cirrhotic patients [53]. These results support our current findings, where the down-regulation of *ZFH2-AS1* contributes to advanced cirrhosis with high risk for CSPH. *STAG3L2* is a pseudogene of unknown function, predicted to be involved in chromatin dynamics, according to the Alliance of Genome Resources (Apr 2022). *STAG3L2* shows low expression values in the average adult liver [54]; conversely, it is highly expressed in the liver of HCC patients [55]. *MDK* encodes for midkine, a heparin-binding growth factor that has pro-inflammatory, angiogenic, and anti-apoptotic functions implicated in several inflammatory pathophysiological processes, such as autoimmune disease and cancer [56]. The presence of high levels of MDK in serum is a promising

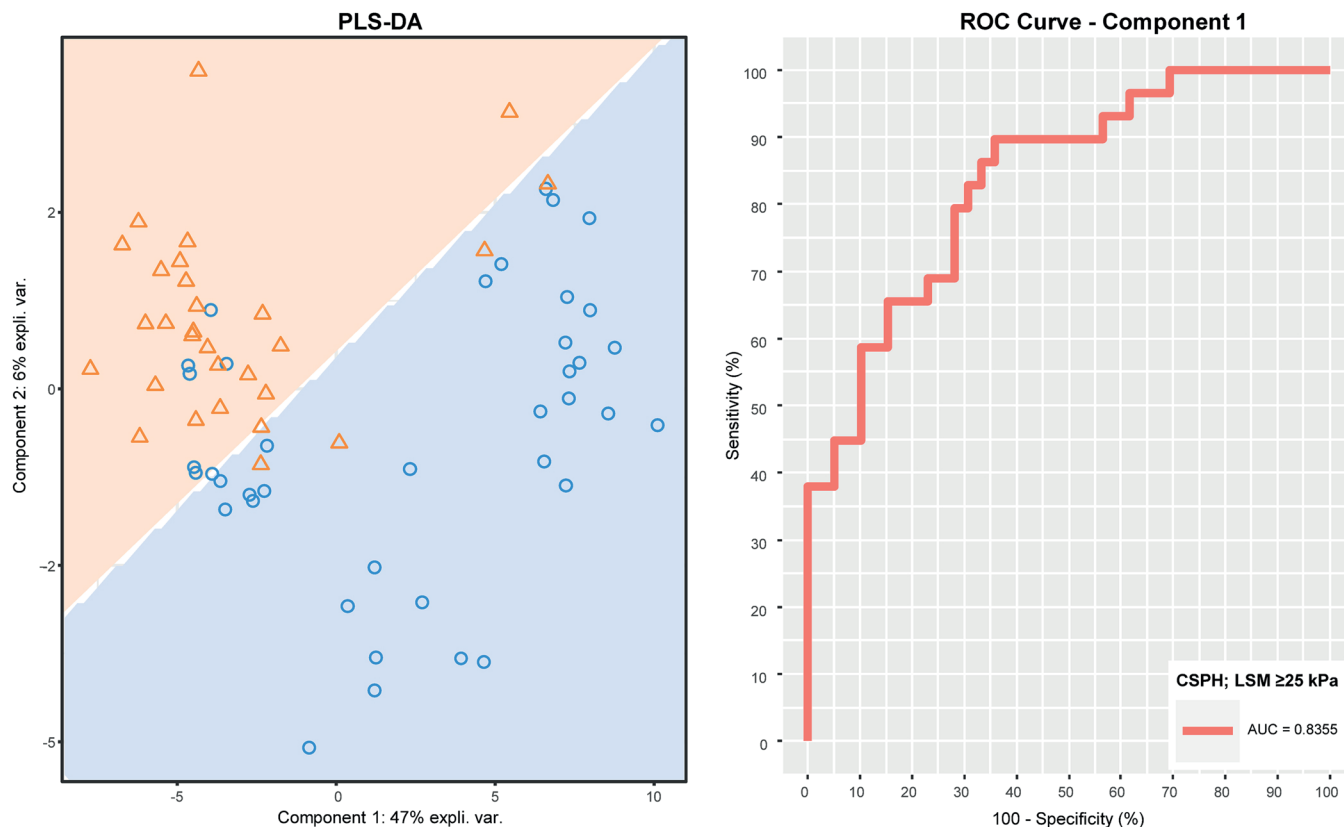


Fig. 2. Multivariate analysis of 60 SDE transcripts from PBMCs to discriminate advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension (CSPH) in HIV/HCV coinfecting patients. A) The partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) plot can differentiate patients with ≥ 25 kPa (orange triangles) from patients with < 25 kPa (blue circles). B) The area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) estimates an excellent PLS-DA classification performance. Statistics: Multivariate analysis was performed by PLS-DA, a ROC curve was plotted, and AUROC was calculated. Abbreviations: PLS-DA, Partial least squares discriminant analysis; ROC, Receiver operating characteristic; AUROC, Area under the ROC.

Table 2

Summary of predictive performance and odds of peripheral blood gene expression (counts) for advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension (< 25 kPa (n = 39) vs. ≥ 25 kPa (n = 29)) in HIV/HCV-coinfecting individuals.

	AUROC	95%CI	OR	95%CI	p-value
<i>TMEM64</i>	0.752	0.636 – 0.867	1.25	1.09 – 1.43	0.001
<i>SCAMP1</i>	0.753	0.631 – 0.874	1.15	1.06 – 1.26	0.001
<i>GPR146</i>	0.756	0.640 – 0.873	1.93	1.28 – 2.91	0.002
<i>GTF2A1</i>	0.772	0.652 – 0.891	1.11	1.05 – 1.19	0.001
<i>ABHD17B</i>	0.776	0.658 – 0.893	1.13	1.06 – 1.21	0.001
<i>ZFHX2-AS1</i>	0.791	0.684 – 0.898	0.50	0.34 – 0.74	< 0.001
<i>MDK</i>	0.793	0.682 – 0.905	0.21	0.08 – 0.52	0.001
<i>STAG3L2</i>	0.794	0.684 – 0.904	0.30	0.16 – 0.57	< 0.001

Statistic: Values are expressed as the area under the curve ROC (AUROC), odds ratio (OR), and 95% confidence interval (95%CI). Abbreviations. HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus.

marker of HCC in patients with HCV-related cirrhosis, but the role of *MDK* before the HCC apparition is much less studied. *MDK* may be induced at earlier fibrosis stages to protect liver cells from ongoing aggression [57]. Fibrosis progression could alter *MDK* function and expression, which may be related to the cirrhosis-associated immune dysfunction characteristic of cirrhotic patients [8]. During the early HCC stage, *MDK* expression would be induced by hypoxia in the tumor microenvironment, and its anti-apoptotic functions would contribute to carcinogenesis instead [58]. Our study found that *MDK* expression decreases as liver cirrhosis increases, supporting the dual function of *MDK* as a liver protector and carcinogenesis promoter. Interestingly, *MDK* expression in a model of lung fibrosis was shown to be biphasic, with

increased expression in both the early and late stages of fibrosis [59].

This set of SDE transcripts showed excellent discriminative ability for advanced cirrhosis with a high risk for CSPH (≥ 25 kPa). However, SDE transcripts to identify patients with advanced cirrhosis with increased risk for CSPH may be of little practical use since the physical examination and abdominal ultrasound make advanced cirrhosis easy to detect in the clinical setting. Despite that, omics-based analyses are becoming more accessible, and their routine application at the clinical level is closer than ever. Moreover, our study addresses two main purposes at this point. Firstly, our findings can help to understand the pathophysiological mechanisms underlying fibrosis progression and portal hypertension development at this disease stage. Secondly, it suggests molecular targets that can be employed for diagnostic or therapeutic applications. These findings could help explain the variability and the appearance of complications in advanced chronic liver disease and allow individualized management of these patients, improving the outcome of this disease.

4.1. Limitations of the study

Our study has some limitations that should be taken into account. Firstly, our sample size may limit the statistical power to detect minor differences between groups and increase the risk of false-positive results. Secondly, the lack of liver biopsies to assess the grade of fibrosis since the practice of liver biopsies in Spain is no longer in use. However, although liver biopsy was considered the gold standard, its role as a gold standard is far from perfect because it has several drawbacks regarding constrained feasibility, complications that can arise during the procedure, and sampling errors [13]. Moreover, transient elastography is validated in HIV/HCV coinfecting patients to measure liver stiffness [60].

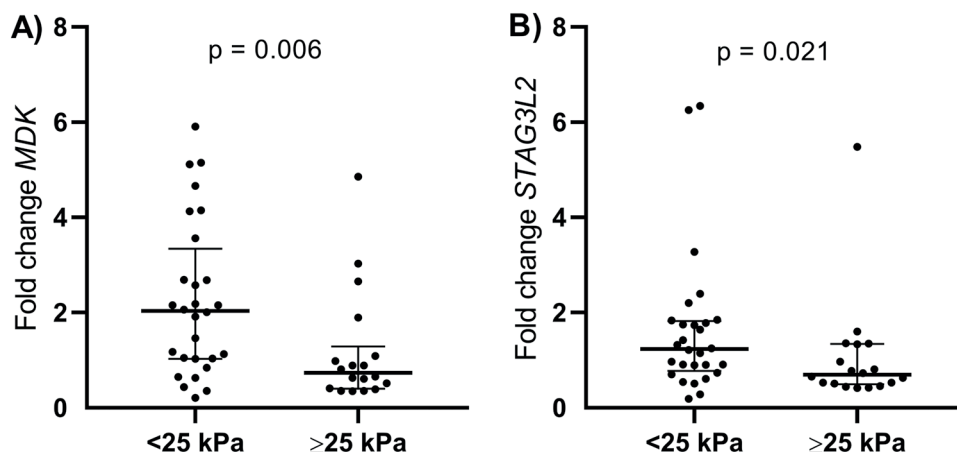


Fig. 3. Validation by RT-qPCR of differences in *MDK* (A) and *STAG3L2* (B) gene expression for advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension (CSPH) (LSM \geq 25 kPa). Relative quantification is expressed as n-fold relative to the calibrator sample. Statistics: The *p*-values were estimated using the Mann-Whitney test. Abbreviations: MDK, Midkine; STAG3L2, Stromal antigen 3-like 2; kPa, Kilopascals.

Thirdly, hepatic venous pressure gradient measurement (HPVG) remains the gold standard for the diagnosis of CSPH, as recommended in the Baveno VII Consensus [13–15]. Thus, emerging biomarkers to discriminate between CSPH and non-CSPH status should be compared with the HPVG. This comparison would have reinforced our findings, but the data scarcity in our study precluded its assessment (HPVG data available in only 15 patients of the ESCORIAL cohort, 5 of them with HPVG values \leq 10 mmHg). Nevertheless, Baveno VII also aimed for a pragmatic definition of aCLD based on transient elastography [13–15], considering that non-invasive tests are sufficiently accurate to identify CSPH in clinical practice. In this regard, our study delves into the underlying molecular differences between patients with and without advanced cirrhosis with high risk for CSPH, finding several transcripts with high discrimination ability in the two independent cohorts studied.

5. Conclusions

A gene expression signature of 60 SDE transcripts was related to advanced cirrhosis with high risk for CSPH in HIV/HCV coinfecting patients. Of these, *MDK* and *STAG3L2* were validated and showed good discriminative value. Our data may help clarify the pathophysiological mechanisms involved in advanced cirrhosis in this population group. Further studies and longitudinal data are required to delve into the biological meaning of these findings.

Ethics approval and consent to participate

This study was carried out according to the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of the Instituto de Salud Carlos III (CEI PI 23_2011 and CEI PI 41_2014). Written informed consent was obtained from all participants in the study.

Funding

This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; grant numbers CP17CIII/00007 and PI18CIII/00028 to MAJS, PI17/00657 and PI20/00474 to JB, PI17/00903 and PI20/00507 to JGG, PI18CIII/00020 to AFR, and PI17CIII/00003 and PI20CIII/00004 to SR) and Ministerio de Ciencia e Innovación (AEI, PID2021-126781OB-I00 to AFR). The study was also funded by the CIBER -Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red- (CB 2021), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea - NextGenerationEU (CB21/13/00044).

Consent for publication

Not applicable.

Author contributions

Conceptualization: SR and MAJS. Data curation: JB, JGG, CD, VH, and LPLT. Formal analysis: SS, OBK, SR, MAJS, and AFR. Funding acquisition: JB, JGG, MAJS, and SR. Investigation and methodology: SS, OBK, AFR, and AVB. Project Administration: JB. Supervision and visualization: SR. Writing – original draft preparation: AFR, MAJS, and SR. Writing – review & editing: IM. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We particularly want to acknowledge the patients in this study for their participation, the Spanish HIV HGM BioBank, and the collaborating Centers for the generous gifts of clinical samples used in this work. We also thank the Bioinformatics Unit at the Institute of Health Carlos III for their valuable support for the bioinformatics analysis.

Authors' information

Not applicable.

Appendix

The GESIDA 3603b Cohort Study Group

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid: A Carrero, P Miralles, JC López, F Parras, B Padilla, T Aldamiz-Echevarría, F Tejerina, C Díez, L Pérez-Latorre, C Fanciulli, I Gutiérrez, M Ramírez, S Carretero, JM Bellón, J Bermejo, and J Berenguer.

Hospital Universitario La Paz, Madrid: V Hontañón, JR Arribas, mL Montes, I Bernardino, JF Pascual, F Zamora, JM Peña, F Arnalich, M Díaz, J González-García.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona: P Domingo, JM Guardiola.

Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona: E Van den Eynde,

M Pérez, E Ribera, M Crespo.

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid: JL Casado, F Dronda, A Moreno, MJ Pérez-Eliás, MA Sanfrutos, S Moreno, C Quereda.

Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares: A Arranz, E Casas, J de Miguel, S Schroeder, J Sanz.

Hospital Universitario de La Princesa, Madrid: J Sanz, I Santos.

Hospital Donostia, San Sebastián: MJ Bustinduy, JA Iribarren, F Rodríguez-Arondo, MA Von-Wichmann.

Hospital Clínico San Carlos, Madrid: J Vergas, MJ Téllez.

Hospital Universitario San Cecilio, Granada: D. Vinuesa, L. Muñoz, and J. Hernández-Quero.

Hospital Clínico Universitario, Valencia: A Ferrer, MJ Galindo.

Hospital General Universitario, Valencia: L Ortiz, E Ortega.

Hospital Universitari La Fe, Valencia: M Montero, M Blanes, S Cuellar, J Lacruz, M Salavert, J López-Aldeguer.

Hospital Universitario de Getafe, Getafe: G Pérez, G Gaspar.

Fundación SEIMC-GESEDA, Madrid: M Yllescas, P Crespo, E Aznar, H Esteban.

The ESCORIAL study group

Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain): Cristina Díez, Luis Ibáñez, Leire Pérez-Latorre, Diego Rincón, Teresa Aldámiz-Echevarría, Vega Catalina, Pilar Miralles, Teresa Aldámiz-Echevarría, Francisco Tejerina, María C Gómez-Rico, Esther Alonso, José M Bellón, Rafael Bañares, and Juan Berenguer.

Hospital Universitario La Paz/IdiPAZ (Madrid, Spain): José Arribas, José I Bernardino, Ana Delgado, Carmen Busca, Javier García-Samaniego, Víctor Hontañón, Luz Martín-Carbonero, Rafael Micán, María L Montes-Ramírez, Victoria Moreno, Antonio Olveira, Ignacio Pérez-Valero, Eulalia Valencia, and Juan González-García.

Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid, Spain): Elba Llop and José Luis Calleja.

Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain): Javier Martínez and Agustín Albillos.

Fundación SEIMC/GeSEDA (Madrid, Spain): Marta de Miguel, María Yllescas, and Herminia Esteban.

References

- [1] The Polaris Observatory HCV Collaborators, Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study, *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2 (3) (2017) 161–176.
- [2] B. Hajarizadeh, J. Grebely, G.J. Dore, Epidemiology and natural history of HCV infection, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (9) (2013) 553–562.
- [3] A. Vallet-Pichard, S. Pol, Natural history and predictors of severity of chronic hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection, *J. Hepatol.* 44 (1 Suppl) (2006) S28–S34.
- [4] P. Ingiliz, J.K. Rockstroh, Natural history of liver disease and effect of hepatitis C virus on HIV disease progression, *Curr. Opin. HIV AIDS* 10 (5) (2015) 303–308.
- [5] V. Hernandez-Gea, S.L. Friedman, Pathogenesis of liver fibrosis, *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* 6 (1) (2011) 425–456.
- [6] S.K. Asrani, P.S. Kamath, Natural history of cirrhosis, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 15 (2) (2013) 308.
- [7] L.M. Medrano, P. Garcia-Broncano, J. Berenguer, J. Gonzalez-Garcia, M. A. Jimenez-Sousa, J.M. Guardiola, M. Crespo, C. Quereda, J. Sanz, I. Canorea, A. Carrero, V. Hontanon, M.A. Munoz-Fernandez, S. Resino, G.B.S. Group, Elevated liver stiffness is linked to increased biomarkers of inflammation and immune activation in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients, *Aids* 32 (9) (2018) 1095–1105.
- [8] A. Albillos, R. Martin-Mateos, S. Van der Merwe, R. Wiest, R. Jalan, M. Álvarez-Mon, Cirrhosis-associated immune dysfunction, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 19 (2) (2022) 112–134.
- [9] M.G. Refolo, C. Messa, V. Guerra, B.I. Carr, R. D'Alessandro, Inflammatory mechanisms of HCC development, *Cancers* 12 (3) (2020).
- [10] S.J. Polyak, I.N. Crispe, T.F. Baumert, Liver abnormalities after elimination of HCV infection: persistent epigenetic and immunological perturbations post-cure, *Pathogens* 10 (1) (2021) 44.
- [11] J. Berenguer, I. Jarrín, L. Pérez-Latorre, V. Hontañón, M.J. Vivancos, J. Navarro, M.J. Téllez, J.M. Guardiola, J.A. Iribarren, A. Rivero-Juárez, M. Márquez, A. Artero, L. Morano, I. Santos, J. Moreno, M.C. Fariñas, M.J. Galindo, M. A. Hernando, M. Montero, C. Cifuentes, P. Domingo, J. Sanz, L. Domínguez, O. L. Ferrero, B. De la Fuente, C. Rodríguez, S. Reus, J. Hernández-Quero, G. Gaspar, L. Pérez-Martínez, C. García, L. Force, S. Veloso, J.E. Losa, J. Vilaró, E. Bernal, S. Arponen, A.J. Ortí, Á. Chocarro, R. Teira, G. Alonso, R. Silvariño, A. Vegas, P. Geijo, J. Bisbe, H. Esteban, J. González-García, S.S.G. Ge, Human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfection in Spain: elimination is feasible, but the burden of residual cirrhosis will be significant, *Open Forum Infect. Dis.* 5 (1) (2018) ofx258.
- [12] A.J. Jeyarajan, R.T. Chung, Insights into the pathophysiology of liver disease in HCV/HIV: does it end with HCV cure? *J. Infect. Dis.* 222 (Suppl 9) (2020) S802–s813.
- [13] L. Castera, X. Forns, A. Alberti, Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography, *J. Hepatol.* 48 (5) (2008) 835–847.
- [14] G. Garcia-Tsao, J.G. Abraldes, A. Berzigotti, J. Bosch, Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases, *Hepatology* 65 (1) (2017) 310–335.
- [15] R. de Franchis, J. Bosch, G. Garcia-Tsao, T. Reiberger, C. Ripoll, Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension, *J. Hepatol.* 76 (4) (2022) 959–974.
- [16] J. Lambrecht, S. Verhulst, I. Mannaerts, H. Reynaert, L.A. van Grunsven, Prospects in non-invasive assessment of liver fibrosis: Liquid biopsy as the future gold standard? *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Basis Dis.* 1864 (4, Part A) (2018) 1024–1036.
- [17] A. Minutolo, B. Conti, S. Grelli, C. Viscomi, G. Labbadia, C. Balsano, Lymphocytes as liver damage mirror of HCV related adipogenesis deregulation, *PLoS One* 9 (3) (2014), e92343.
- [18] J. Mann, H.L. Reeves, A.E. Feldstein, Liquid biopsy for liver diseases, *Gut* 67 (12) (2018) 2204–2212.
- [19] Y. Hoshida, A. Villanueva, A. Sangiovanni, M. Sole, C. Hur, K.L. Andersson, R. T. Chung, J. Gould, K. Kojima, S. Gupta, B. Taylor, A. Crenshaw, S. Gabriel, B. Minguez, M. Iavarone, S.L. Friedman, M. Colombo, J.M. Llovet, T.R. Golub, Prognostic gene expression signature for patients with hepatitis C-related early-stage cirrhosis, *Gastroenterology* 144 (5) (2013) 1024–1030.
- [20] H. Takeda, A. Takai, E. Iguchi, M. Mishima, S. Arasawa, K. Kumagai, Y. Eso, T. Shimizu, K. Takahashi, Y. Ueda, K. Taura, E. Hatano, H. Iijima, H. Aoyagi, H. Aizaki, H. Marusawa, T. Wakita, H. Seno, Oncogenic transcriptomic profile is sustained in the liver after the eradication of the hepatitis C virus, *Carcinogenesis* 42 (5) (2021) 672–684.
- [21] B. Ijaz, W. Ahmad, T. Das, K. Shabbiri, T. Husnain, S. Hassan, HCV infection causes cirrhosis in human by step-wise regulation of host genes involved in cellular functioning and defense during fibrosis: Identification of bio-markers, *Genes Dis.* 6 (3) (2019) 304–317.
- [22] A. Whitmill, S. Kim, V. Rojas, F. Gulraiz, K. Afreen, M. Jain, M. Singh, I.-W. Park, Signature molecules expressed differentially in a liver disease stage-specific manner by HIV-1 and HCV co-infection, *PLoS One* 13 (8) (2018), e020524.
- [23] A. Jangra, A. Kothari, P. Sarma, B. Medhi, B.J. Omar, K. Kaushal, Recent advancements in antifibrotic therapies for regression of liver fibrosis, *Cells* 11 (9) (2022) 1500.
- [24] P. Garcia-Broncano, L.M. Medrano, J. Berenguer, O. Brochado-Kith, J. González-García, M.A. Jiménez-Sousa, C. Quereda, J. Sanz, M.J. Téllez, L. Díaz, J.L. Jiménez, S. Resino, GESIDA 3603b Study Group, Mild profile improvement of immune biomarkers in HIV/HCV-coinfected patients who removed hepatitis C after HCV treatment: A prospective study, *J. Infect.* 80 (1) (2020) 99–110, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.09.020>. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31585189.
- [25] S. Salguero, L.M. Medrano, J. Gonzalez-Garcia, J. Berenguer, M.L. Montes, C. Diez, P. Garcia-Broncano, E. Llop-Herrera, L. Perez-Latorre, J.M. Bellono, M.A. Jimenez-Sousa, S. Resino, Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 10384.
- [26] O. Brochado, I. Martinez, J. Berenguer, L. Medrano, J. Gonzalez-Garcia, M. A. Jimenez-Sousa, A. Carrero, V. Hontanon, J. Navarro, J.M. Guardiola, A. Fernandez-Rodriguez, S. Resino, G.S. Group, HCV eradication with IFN-based therapy does not completely restore gene expression in PBMCs from HIV/HCV-coinfected patients, *J. Biomed. Sci.* 28 (1) (2021) 23.
- [27] A.L. Rasmussen, I.M. Wang, M.C. Shuhart, S.C. Proll, Y. He, R. Cristescu, C. Roberts, V.S. Carter, C.M. Williams, D.L. Diamond, J.T. Bryan, R. Ulrich, M. J. Korth, L.V. Thomassen, M.G. Katze, Chronic immune activation is a distinguishing feature of liver and PBMC gene signatures from HCV/HIV coinfected patients and may contribute to hepatic fibrogenesis, *Virology* 430 (1) (2012) 43–52.
- [28] S. Listopad, C. Magnan, A. Asghar, A. Stolz, J.A. Tayek, Z.X. Liu, T.R. Morgan, T. M. Norden-Krichmar, Differentiating between liver diseases by applying multiclass machine learning approaches to transcriptomics of liver tissue or blood-based samples, *JHEP Rep.* 4 (10) (2022), 100560.
- [29] Z. He, D. Yang, X. Fan, M. Zhang, Y. Li, X. Gu, M. Yang, The roles and mechanisms of lncRNAs in liver fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (4) (2020) 1482.
- [30] T. Meier, M. Timm, M. Montani, L. Wilkens, Gene networks and transcriptional regulators associated with liver cancer development and progression, *BMC Med. Genom.* 14 (1) (2021) 41.
- [31] C. Schrenk, V. Fetz, C. Vallet, C. Heiselmayer, E. Schröder, A. Hensel, A. Hahlbrock, D. Wünsch, D. Goesswein, C. Bier, N. Habtemichael, G. Schneider, R.H. Stauber, S. K. Knauer, TFIIA transcriptional activity is controlled by a 'cleave-and-run' Exportin-1/Taspase 1-switch, *J. Mol. Cell Biol.* 10 (1) (2017) 33–47.
- [32] J. Jiang, B. Liu, R. Liu, W. Yang, Overexpression of taspase 1 predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma, *Cancer Manag. Res.* 13 (2021) 2517–2537.
- [33] A. Castle, D. Castle, Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1–4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface, *J. Cell Sci.* 118 (Pt 16) (2005) 3769–3780.

- [34] D. Spano, A. Colanzi, Golgi complex: a signaling hub in cancer, *Cells* 11 (13) (2022).
- [35] S. Sung, J. Kim, Y. Jung, Liver-derived exosomes and their implications in liver pathobiology, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (12) (2018).
- [36] X. Zhang, J. Sheng, Y. Zhang, Y. Tian, J. Zhu, N. Luo, C. Xiao, R. Li, Overexpression of SCAMP3 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* 8 (65) (2017) 109247–109257.
- [37] A.R. Owens, C.E. McInerney, K.M. Prise, D.G. McArt, A. Jurek-Loughrey, Novel deep learning-based solution for identification of prognostic subgroups in liver cancer (Hepatocellular carcinoma), *BMC Bioinforma.* 22 (1) (2021) 563.
- [38] C.G. Miao, Y.Y. Yang, X. He, C. Huang, Y. Huang, L. Zhang, X.W. Lv, Y. Jin, J. Li, Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions, *Biochimie* 95 (12) (2013) 2326–2335.
- [39] A.M. Khalaf, D. Fuentes, A.I. Morshid, M.R. Burke, A.O. Kaseb, M. Hassan, J. D. Hazle, K.M. Elsayes, Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance, *J. Hepatocell. Carcinoma* 5 (2018) 61–73.
- [40] H. Kim, T. Kim, B.-C. Jeong, I.-T. Cho, D. Han, N. Takegahara, T. Negishi-Koga, H. Takayanagi, J.H. Lee, J.-Y. Sul, V. Prasad, S.H. Lee, Y. Choi, Tmem64 modulates calcium signaling during RANKL-mediated osteoclast differentiation, *Cell Metab.* 17 (2) (2013) 249–260.
- [41] V. Brucklacher-Waldert, C. Ferreira, M. Stebegg, O. Fesneau, S. Innocenti, J. C. Marie, M. Veldhoen, Cellular stress in the context of an inflammatory environment supports TGF- β -independent T helper-17 differentiation, *Cell Rep.* 19 (11) (2017) 2357–2370.
- [42] P. García-Broncano, L.M. Medrano, J. Berenguer, J. González-García, M.Á. Jiménez-Sousa, A. Carrero, V. Hontañón, J.M. Guardiola, M. Crespo, C. Quereda, J. Sanz, A.B. García-Gómez, J.L. Jiménez, S. Resino, G.b.S. group, dysregulation of the immune system in HIV/HCV-coinfected patients according to liver stiffness status, *Cells* 7 (11) (2018) 196.
- [43] C.E. Coronel-Castillo, X. Qi, J. Contreras-Carmona, O.L. Ramirez-Perez, N. Mendez-Sanchez, Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in HIV infection: a metabolic approach of an infectious disease, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (6) (2019) 531–540.
- [44] H. Huang, N. Zhang, Q. Xiong, R. Chen, C. Zhang, N. Wang, L. Wang, H. Ren, M. Liu, M. Qian, B. Du, Elimination of GPR146-mediated antiviral function through IRF3/HES1-signalling pathway, *Immunology* 152 (1) (2017) 102–114.
- [45] H. Yu, A. Rimbart, A.E. Palmer, T. Toyohara, Y. Xia, F. Xia, L.M.R. Ferreira, Z. Chen, T. Chen, N. Loazia, N.B. Horwitz, M.C. Kacergis, L. Zhao, B. Consortium, A.A. Soukas, J.A. Kuivenhoven, S. Kathiresan, C.A. Cowan, GPR146 deficiency protects against hypercholesterolemia and atherosclerosis, *Cell* 179 (6) (2019) 1276–1288, e14.
- [46] B.C. Jeong, T.S. Kim, H.S. Kim, S.H. Lee, Y. Choi, Transmembrane protein 64 reciprocally regulates osteoblast and adipocyte differentiation by modulating Wnt/ β -catenin signaling, *Bone* 78 (2015) 165–173.
- [47] N. Rocha, F. Payne, I. Huang-Doran, A. Sleight, K. Fawcett, C. Adams, A. Stears, V. Saudek, S. O'Rahilly, I. Barroso, R.K. Semple, The metabolic syndrome-associated small G protein ARL15 plays a role in adipocyte differentiation and adiponectin secretion, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 17593.
- [48] V.S. Naumenko, E. Ponimaskin, Palmitoylation as a functional regulator of neurotransmitter receptors, *Neural Plast.* 2018 (2018) 5701348.
- [49] S. Mathew, M. Faheem, S.M. Ibrahim, W. Iqbal, B. Rauff, K. Fatima, I. Qadri, Hepatitis C virus and neurological damage, *World J. Hepatol.* 8 (12) (2016) 545–556.
- [50] Q.-t Chen, Z.-y Zhang, Q.-l Huang, H. Chen, W.-b Hong, T. Lin, C.-y Ju, L.-z Wu, Y.-y Huang, P. Hou, W.-j Wang, X.-m Deng, Q. Wu, Intercellular communication in the progression from fibrosis to HCC by ectosomal HK1-induced TGF- β secretion, *SSRN Electron. J.* (2021).
- [51] S. Salguero, D. Rojo, J. Berenguer, J. Gonzalez-García, A. Fernandez-Rodriguez, O. Brochado-Kith, C. Diez, V. Hontanón, A. Virseda-Berdices, J. Martinez, L. Ibanez-Samaniego, E. Llop-Herrera, C. Barbas, S. Resino, M.A. Jimenez-Sousa, G. Escorial, Study, Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients, *Liver Int.* 40 (9) (2020) 2215–2227.
- [52] A.M. Habib, A. Matsuyama, A.L. Okorokov, S. Santana-Varela, J.T. Bras, A. M. Aloisi, E.C. Emery, Y.D. Bogdanov, M. Follenfant, S.J. Gossage, M. Gras, J. Humphrey, A. Kolesnikov, K. Le Cann, S. Li, M.S. Minett, V. Pereira, C. Ponsolles, S. Sikandar, J.M. Torres, K. Yamaoka, J. Zhao, Y. Komine, T. Yamamori, N. Maniatis, K.I. Panov, H. Houlden, J.D. Ramirez, D.L.H. Bennett, L. Marsili, V. Bachiocco, J.N. Wood, J.J. Cox, A novel human pain insensitivity disorder caused by a point mutation in ZFH2, *Brain* 141 (2) (2018) 365–376.
- [53] S. Munkgaard, H. Kelbaek, B. Tronier, Elevated plasma somatostatin in cirrhosis of the liver, *New Engl. J. Med.* 304 (23) (1981) 1429–1430.
- [54] G.C. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, *Nat. Genet* 45 (6) (2013) 580–585.
- [55] J.N. Weinstein, E.A. Collisson, G.B. Mills, K.R. Shaw, B.A. Ozenberger, K. Ellrott, I. Shmulevich, C. Sander, J.M. Stuart, The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project, *Nat. Genet* 45 (10) (2013) 1113–1120.
- [56] Y.Q. Cai, Y. Lv, Z.C. Mo, J. Lei, J.L. Zhu, Q.Q. Zhong, Multiple pathophysiological roles of midkine in human disease, *Cytokine* 135 (2020), 155242.
- [57] N. Yazihan, H. Ataoglu, E. Akcil, B. Yener, B. Salman, C. Aydin, Midkine secretion protects Hep3B cells from cadmium induced cellular damage, *World J. Gastroenterol.* 14 (1) (2008) 76–80.
- [58] A. Gowhari Shabgah, F. Ezzatifar, S. Aravindhan, A. Olegovna Zekiy, M. Ahmadi, S. M. Gheibihayat, J. Gholizadeh Navashenaq, Shedding more light on the role of Midkine in hepatocellular carcinoma: new perspectives on diagnosis and therapy, *IUBMB Life* 73 (4) (2021) 659–669.
- [59] K. Misa, Y. Tanino, X. Wang, T. Nikaido, M. Kikuchi, Y. Sato, R. Togawa, M. Tanino, S. Tanaka, K. Kadomatsu, M. Munakata, Involvement of midkine in the development of pulmonary fibrosis, *Physiol. Rep.* 5 (16) (2017).
- [60] S. Resino, M. Sanchez-Conde, J. Berenguer, Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25 (5) (2012) 564–569.

Discusión

La lucha contra la cirrosis por el VHC se enfrenta a varios obstáculos. Por un lado, la existencia de un conocimiento incompleto sobre los mecanismos fisiopatológicos subyacentes dificulta el desarrollo de marcadores y terapias efectivos. A este respecto, la identificación de las vías celulares implicadas puede ayudar al desarrollo de fármacos antifibróticos que ayuden a paliar esta situación [121]. Por otro lado, dada la importancia del hígado en la homeostasis del organismo, las alteraciones que sufren estos pacientes son complejas y afectan a diversos sistemas. Las alteraciones a nivel transcriptómico, metabolómico y de respuesta inmunitaria, entre otros, contribuyen en diferente medida al efecto observado en estos pacientes. El estudio de las mismas en los pacientes con enfermedad hepática avanzada y, particularmente, en aquellos coinfectados por VHC/VIH, puede contribuir a la identificación de marcadores pronósticos objetivos que permitan identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar complicaciones potencialmente mortales, lo cual es una necesidad clínica no cubierta. El material empleado en los distintos trabajos comprende tanto muestras de plasma como CMSPs, ambos fácilmente accesibles.

Biomarcadores plasmáticos vinculados a la inflamación se relacionan con la gravedad de la cirrosis hepática

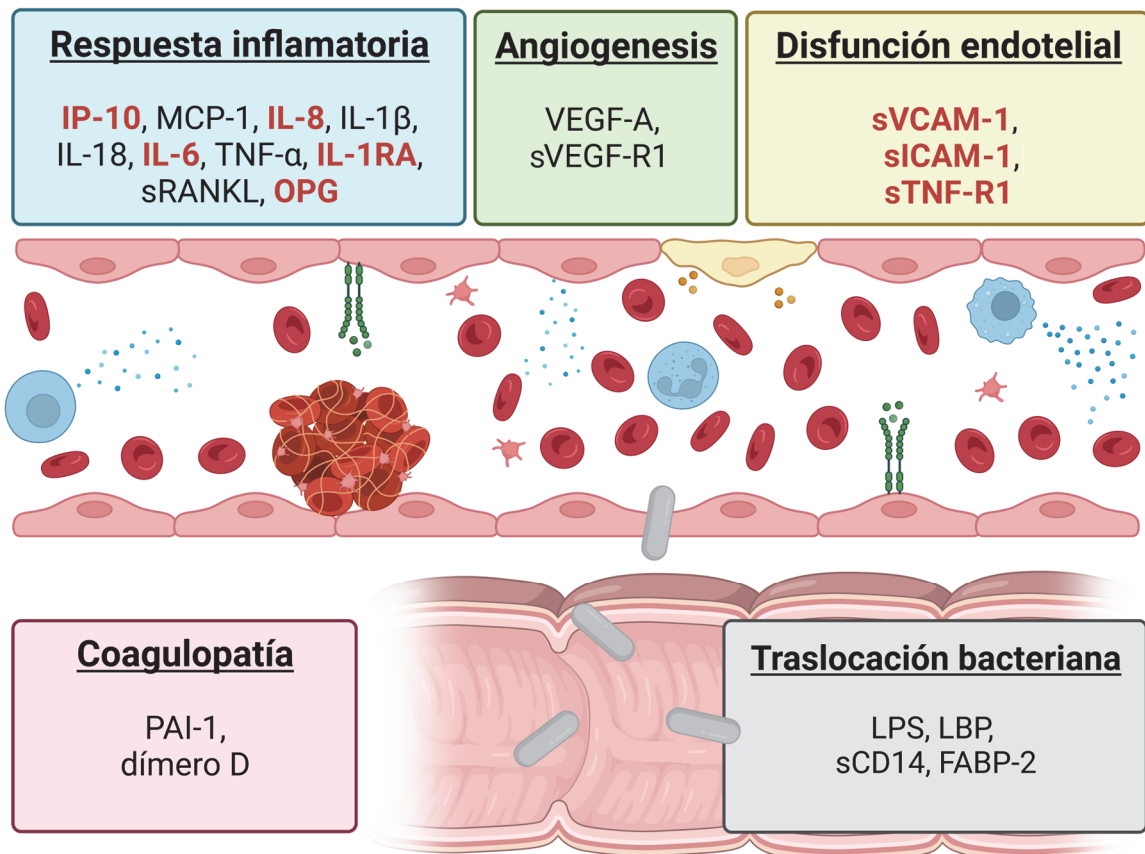
En el primer trabajo se evaluaron los biomarcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, la disfunción endotelial, coagulopatía, angiogénesis y translocación bacteriana (**Figura 7**).

Los pacientes coinfectados por VHC/VIH tuvieron valores más bajos de sCD14, IL-1RA y sRANKL que los pacientes mono infectados con el VHC en los análisis ajustados de regresión. Sin embargo, estas diferencias significativas desaparecieron después de ajustar por comparaciones múltiples. Por lo tanto, las personas coinfectadas por VHC/VIH con tratamiento antirretroviral presentaron valores de biomarcadores plasmáticos muy similares a los de los pacientes mono infectados con el VHC.

Los marcadores relacionados con la respuesta inflamatoria IP-10, IL-8, IL-6, IL-1RA y OPG, y de disfunción endotelial sVCAM-1, sICAM-1 y sTNFR-I, se asociaron de forma positiva con cirrosis de mayor gravedad, en base al valor de CTP. Al estratificar a los pacientes por la coinfección con el VIH, el valor de CTP se asoció significativamente, en los pacientes mono infectados con el VHC, con los niveles de IL-8, IL-6, OPG, sVCAM-1, sICAM-1 y sTNFR-I; mientras que en los coinfectados por VHC/VIH solo con los niveles de IL-6 y

sICAM-1. Además, los pacientes con CTP grado B (CTP 7 - 9) presentaron mayores niveles de IP-10, IL-6, OPG, sVCAM-1, sICAM-1, y dímero D, que los pacientes con CTP grado A (CTP <7).

Figura 7. Biomarcadores plasmáticos evaluados de acuerdo a su función fisiopatológica.



En rojo se indican aquellos biomarcadores con una asociación significativa con la escala Child-Turcotte-Pugh (CTP) en pacientes con cirrosis avanzada relacionada con el VHC. Abreviaturas: IP-10, proteína de 10 kilodalton inducida por IFN- γ ; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1; IL, interleuquina; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-1 RA, antagonista del receptor de la IL-1; sRANKL, ligando soluble del receptor asociado al factor nuclear kappa B; OPG, osteoprotegerina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; sVEGF-R1, receptor 1 para el VEGF soluble; sVCAM-1, molécula soluble de adhesión celular vascular 1; sICAM-1, molécula soluble de adhesión intercelular 1; sTNF-R1, receptor 1 del TNF soluble; PAI-1, inhibidor 1 del activador del plasminógeno; LPS, lipopolisacárido; LBP, proteína de unión al LPS; sCD14 soluble; FABP-2, proteína de unión a ácidos grasos 2. Imagen creada en Biorender.com.

Estos hallazgos están en concordancia con los datos publicados anteriormente, donde un nivel alto de marcadores inflamatorios es característico de CAID y se asocia a un peor pronóstico y una mayor gravedad de la cirrosis [50, 53]. En este sentido, se ha reportado la asociación entre la IL-6 y una cirrosis más severa, con mayor riesgo de encefalopatía hepática, así como una mayor concentración en CTP grado C comparado con la clase A [122, 123].

Asimismo, el nivel sérico de IP-10 se ha propuesto como un marcador pronóstico útil de la progresión de la enfermedad hepática [124], y que correlaciona con su gravedad evaluada mediante biopsia hepática [125]. Se ha planteado, también, su uso como marcador de respuesta ante la terapia tanto con IFN y ribavirina [126], como con AADs [124]. IP-10 puede ser medido en orina [127], lo que puede facilitar su aplicación como marcador no invasivo. Además, IP-10 se considera un factor proinflamatorio relevante en la infección por el VIH [128].

La inflamación, la disfunción endotelial y la coagulopatía están fuertemente relacionadas. La inflamación juega un papel central en la formación de las lesiones vasculares provocando cambios en la pared del vaso, y con el tiempo, la disfunción endotelial [129]. En particular, se ha visto que la disfunción endotelial de los sinusoides hepáticos durante la cirrosis favorece el desarrollo de hipertensión portal [130]. La pérdida de la capacidad protectora del endotelio disfuncional provoca un incremento del riesgo de aterosclerosis, la cual se ha relacionado directamente con el efecto provocado por el VHC, independientemente de los factores clásicos de riesgo cardiovascular [131].

En nuestro estudio encontramos también una asociación significativa entre los niveles del dímero D, que es el producto final de la degradación de fibrina y que sirve como marcador de la activación de la coagulación, y estadios más avanzados de cirrosis. Esta asociación sufre al tener en cuenta la FDR y desaparece al estratificar por la coinfección por VIH, pero probablemente debido al escaso poder estadístico resultante de reducir el número de muestras.

En el hígado se sintetiza el fibrinógeno y casi la totalidad de los factores de la coagulación. Sus niveles se ven afectados en los pacientes cirróticos, lo que puede conllevar un mayor riesgo trombótico [132]. La coagulopatía se relaciona con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad y de mortalidad en personas infectadas, tanto por el VIH [133], como por el VHC [134].

Los niveles del dímero D se correlacionan con la activación de citoquinas proinflamatorias y la inflamación sistémica, siendo un marcador pronóstico en varias entidades clínicas [135]. Como resultado de la respuesta inflamatoria crónica al virus, los pacientes infectados por el VHC

pueden tener un mayor riesgo de sufrir un tromboembolismo venoso [136]. Por otro lado, la trombosis de la vena porta es una complicación bien descrita en los pacientes cirróticos [137], y este riesgo permanece incluso tras la cura viral [138], aunque se ha publicado recientemente que este riesgo no se asocia a los niveles del dímero D ni otros marcadores inflamatorios [139]. Además, se ha demostrado que el sistema de coagulación también se activa en los pacientes cirróticos descompensados con ascitis y donde los niveles plasmáticos de dímero D se relacionan directamente con la severidad de la ascitis [140].

La disfunción endotelial y coagulopatía también se relacionan profundamente. En este sentido, se han asociado directamente los niveles de dímero D y la disfunción endotelial en pacientes con VIH y con supresión virológica [141]. La disfunción endotelial y el riesgo de trombosis inmunomediado ya ha demostrado ser un factor patogénico clave en el contexto de otras enfermedades, como durante la COVID-19 [142].

El perfil metabólico plasmático de los pacientes coinfectados por VHC/VIH y mono infectados por el VHC se altera durante los estadios avanzados de la cirrosis

En el segundo trabajo, exploramos los cambios producidos en el metabolismo con la progresión de la cirrosis causada por el VHC, mediante estudios de asociación específicos entre metabolitos plasmáticos y factores epidemiológicos y clínicos, la puntuación CTP y el grado de descompensación.

Los pacientes coinfectados por VHC/VIH presentaron un nivel más bajo de colesterol, ácido esteárico, fosfatidilcolina (16:0/9:0(CHO)) y acetilcarnitina; y uno más alto de lisofosfatidilcolina (LPC) (18:0), que los pacientes mono infectados por VHC. Se conoce con anterioridad que ambos virus pueden alterar el metabolismo de los lípidos. De hecho, se habían observado niveles bajos de colesterol tanto en pacientes mono infectados por el VHC como coinfectados VHC/VIH, siendo en estos últimos donde la reducción fue más acusada [143]. También, en concordancia con nuestros hallazgos, se ha visto un nivel más bajo de carnitina en los pacientes infectados por el VIH [144], y cuya suplementación podría ser beneficiosa para estos pacientes [145]. Además, en pacientes infectados por el VIH se ha reportado también un nivel más alto de LPC (18:0), así como de otros isómeros, como LPC (18:1) y LPC (20:4) [146].

Cuando exploramos la asociación con el tratamiento previo frente al VHC o con estatinas, no pudimos identificar ningún metabolito significativamente asociado. Sin embargo, pudimos

mostrar por primera vez la asociación entre los niveles de ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico (también conocido como ácido 2-hidroxiisovalérico) y el grado de ingesta de alcohol, siendo significativamente superiores en aquellos pacientes con mayor consumo. La producción de este ácido está unida a la síntesis hepática del glutatión, que se eleva en respuesta al estrés oxidativo [147]. Además, el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico es un producto del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, los cuales también se han relacionado con el consumo de alcohol [148]. En línea con nuestros hallazgos, este analito se ha asociado recientemente con el grado de consumo de alcohol autorreportado y el riesgo de CHC [149].

Los lisofosfolípidos, como la LPC y la lisofosfatidiletanolamina (LPE), presentan un papel clave en la señalización celular y como partícipes en la regulación de la respuesta inflamatoria, muy alejada de la concepción desfasada original de ser constituyentes inertes de la membrana plasmática. En nuestro estudio, LPC (16:0), LPC (16:1), LPC (18:0), LPC (20:3), LPC (20:4), LPC (22:6) y LPE (22:6), mostraron niveles cada vez más reducidos a medida que aumentaba la puntuación CTP. La desregulación de distintos isómeros LPC se ha observado en el contexto de múltiples enfermedades crónicas con un importante componente inflamatorio, como, entre otras, durante la hepatitis crónica [150]. Esta desregulación también se ha visto en pacientes infectados con el VIH y asociada a desórdenes metabólicos [151]. En relación a esto, se han detectado niveles aumentados de la enzima lisofosfolipasa, que emplea LPC como sustrato, en pacientes con cirrosis avanzada y CHC [152, 153], lo que podría representar el mecanismo molecular causal de los bajos niveles de LPC en pacientes cirróticos por VHC.

El estrés oxidativo está involucrado en la progresión de la enfermedad hepática y la desregulación del sistema inmune en el seno de la hepatitis C crónica [154, 155]. El estrés oxidativo se genera como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de hacerlas frente mediante antioxidantes. Tanto el VIH como el VHC contribuyen al mismo [156, 157]. En nuestro estudio, se encontró una asociación significativa con varios metabolitos implicados en ese equilibrio. En este sentido, los fosfolípidos oxidados como la fosfatidilcolina (16:0/9:0(CHO)) [158], los isómeros de tirosina [159], la 5-oxoprolina [160], y el ácido aminomalónico [161] son marcadores bien reconocidos de estrés oxidativo biológico.

El ciclo celular del VHC está estrechamente relacionado con el metabolismo celular lipídico en el sistema endomembranoso del huésped. En nuestro estudio, aquellos pacientes con una mayor puntuación de CTP presentaron mayores niveles, tanto de ácidos grasos libres (ácido palmítico,

ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmitoleico y ácido láurico) como de glicerol, lo que parece estar conforme a la bibliografía publicada hasta el momento. El virus reajusta el metabolismo para favorecer la replicación vírica y la formación de viriones, provocando un notable aumento de la utilización de ácidos grasos desaturados, principalmente ácido oleico [162, 163]. En este contexto, la acción del complejo génico de desaturasas de ácidos grasos puede estar involucrada, ya que se ha visto su actividad alterada, tanto en el contexto de la infección por el VHC [164], como en otras enfermedades hepáticas como la MAFLD [165]. Además, se ha descrito que la enfermedad hepática crónica puede alterar el metabolismo de los ácidos grasos a través de cambios en la microbiota intestinal [166], así como que durante los estadios avanzados y/o con CHC se alcanza un mayor nivel de glicerol plasmático [167].

La carnitina, sintetizada a partir de la lisina y metionina, es la responsable transferir los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol al interior de las mitocondrias, para la producción de energía a través de la β -oxidación. Las distintas especies de carnitina se han relacionado con alteraciones metabólicas en los pacientes infectados con el VIH [151], lo que puede explicarse por una existente disfunción mitocondrial [168]. En pacientes cirróticos, se han encontrado niveles aumentados de carnitina y acetilcarnitina, especialmente asociados con la clase CTP C [169]. Aunque se han descrito altos niveles de estos metabolitos en pacientes con MAFLD y con CHC [170], la asociación de carnitina y acetilcarnitina con estadios avanzados de cirrosis, en pacientes monoinfectados con el VHC y coinfectados por VHC/VIH, no había sido referida con anterioridad.

Los niveles de ácidos biliares circulantes disminuyen en la cirrosis hepática, de acuerdo al grado de descompensación hepática, a la vez que aumenta la proporción relativa de los conjugados de taurina [171]. En nuestro estudio, el ácido taurocólico es el metabolito con mayor grado de asociación con la puntuación CTP. Este ácido se ha descrito como el ácido biliar cuyos niveles se alteran más en pacientes cirróticos. No sólo es un marcador de progresión de la cirrosis hepática, sino que la promueve activamente mediando la activación de las células hepáticas estrelladas [172, 173].

Varios metabolitos derivados del butirato se asociaron en nuestro estudio con mayor puntuación de CTP, sugiriendo un papel en la progresión de la cirrosis. El 2-hidroxi-butarato es un marcador temprano de resistencia a la insulina [174]. El 3-hidroxi-butarato se ha asociado al riesgo cardiovascular y, dado que es uno de los cuerpos cetónicos predominantes durante la cetoacidosis diabética, se puede considerar como un marcador de diabetes. Otros autores han

visto que sus niveles aumentaron durante la infección por el VHC y se restauraron tras la RVS [175]. En conjunto, estos resultados podrían explicar la relación con las manifestaciones extrahepáticas más frecuentes, como la diabetes mellitus o el riesgo cardiovascular. Por el contrario, se ha publicado recientemente un análisis metabólico en orina de pacientes con hepatitis C crónica donde los niveles de 2-hidroxiacetato y 3-hidroxiacetato eran menores que en controles sanos y, además, los valores de 3-hidroxiacetato incrementaban transitoriamente durante el tratamiento con AADs [176]. Nuevos estudios metabólicos longitudinales son necesarios para dar una visión conjunta de los hallazgos en plasma y orina en estos pacientes.

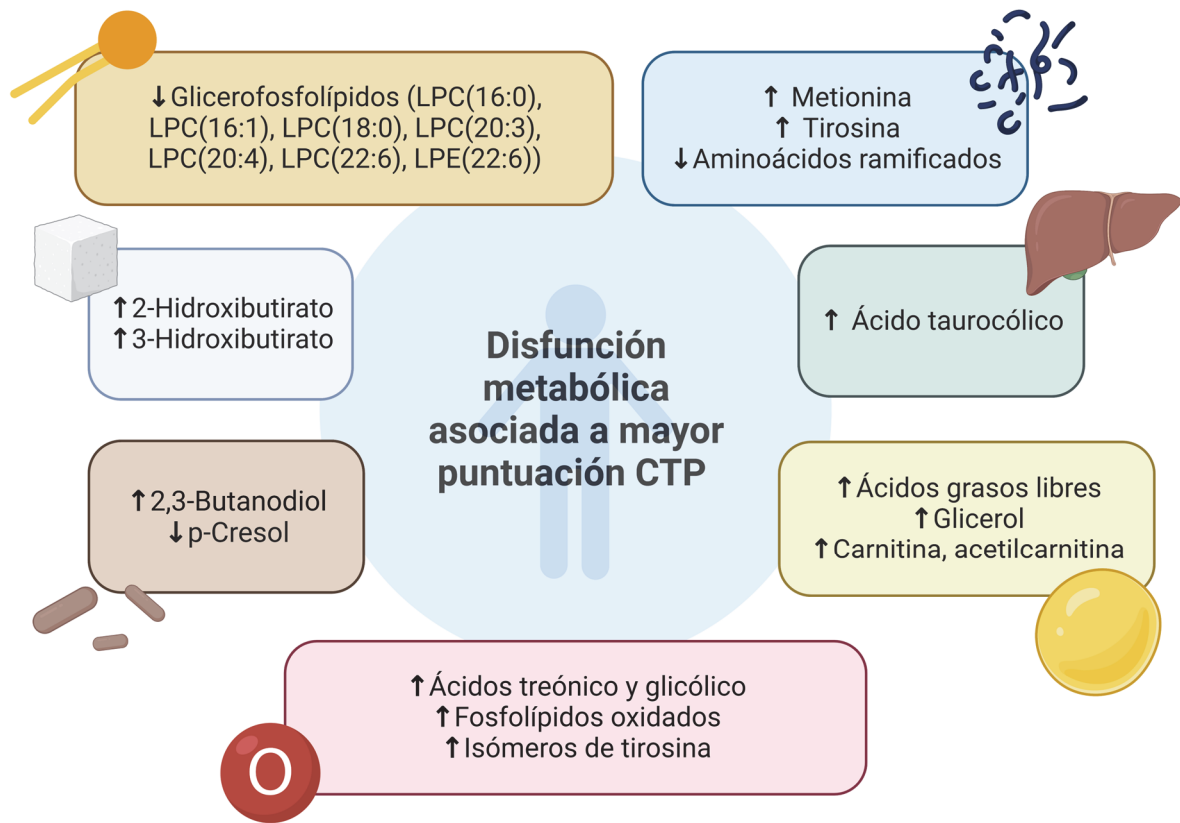
Además, el 2,3-butanodiol también se encontró aumentado en los pacientes con mayor CTP. Este metabolito es un producto derivado de la fermentación de varios géneros bacterianos, como *Klebsiella*, cuya presencia aumentada en sangre se ha relacionado con el CHC [177]. Recientemente, otro artículo ha reportado niveles aumentados de 2,3-butanodiol en pacientes con cirrosis descompensada y en la ACLF [178]. El 2,3-butanodiol, junto con el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, se han correlacionado con los niveles de IL-6, que se ha descrito como un buen marcador capaz de discriminar la presencia de infección bacteriana en pacientes cirróticos [179]. Igualmente, otros metabolitos significativos en este estudio, como el ácido N-(2-hidroxiethyl) iminodiacético y el ácido 3-hidroxiacetato se correlacionaron con el LPS y la LBP, respectivamente. Estos metabolitos pueden reflejar cambios en la diversidad de la microbiota y un aumento de la traslocación bacteriana, de la cual, tanto el LPS como la LBP, son marcadores. Sin embargo, hay que mencionar que el ácido N-(2-hidroxiethyl) iminodiacético se puede originar a partir de la descomposición del EDTA [180], el anticoagulante empleado para la obtención de las muestras, por lo que estos resultados deben interpretarse con precaución.

En relación con los aminoácidos, las enfermedades hepáticas crónicas presentan habitualmente un patrón alterado, como se ha comentado en el texto con anterioridad, con un aumento de las concentraciones de aminoácidos aromáticos y una disminución de las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada, como valina, leucina o isoleucina. Por un lado, encontramos niveles aumentados de metionina y tirosina en pacientes con estadios más avanzados de la cirrosis, en consonancia con trabajos previos [181]. También, un reciente estudio de metabolómica ha mostrado como los pacientes coinfectados por VHC/VIH, con progresión de su enfermedad hepática, presentaron niveles aumentados de tirosina [182]. La proporción sérica de aminoácidos de cadena ramificada/tirosina tiene valor pronóstico, disminuyendo con el aumento de la gravedad del daño hepático [183, 184]; y los valores de tirosina se han asociado

con la aparición de CHC [185]. Los mismos niveles aumentados se han encontrado en la orina de estos pacientes [176]. Además, el p-cresol, un metabolito del que encontramos en nuestro estudio niveles disminuidos en pacientes con puntuaciones CTP más elevadas, se produce a partir de la tirosina por varias bacterias intestinales. Asimismo, la metionina y otros aminoácidos de cadena ramificada, se pueden transformar en succinil-CoA que puede ser convertido a su vez en ácido succínico, siendo ambos intermediarios del ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarboxílicos). En nuestro trabajo, los niveles de ácido succínico se encontraron disminuidos en los pacientes con mayor puntuación CTP, lo que puede estar relacionado con el secuestro del metabolismo celular por parte del VHC. Éste reorienta el metabolismo celular hacia la glucólisis, reduciendo la actividad del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, y favoreciendo, a su vez, la generación de metabolitos anabólicos [186, 187]. Por otro lado, en nuestro estudio también encontramos niveles más bajos de otros metabolitos relacionados con aminoácidos de cadena ramificada, a medida que aumentaba el CTP. El ácido α -cetoisocaproico es un metabolito derivado de la leucina con capacidad de estimular la liberación de insulina, promoviendo el anabolismo, y que podría relacionarse con una mayor resistencia a la insulina presente en los pacientes con mayor puntuación CTP. Además, como se ha mencionado previamente, el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico se origina principalmente en la cetogénesis y en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada [188].

En conjunto, los estadios avanzados de cirrosis, tanto en pacientes mono infectados con el VHC como coinfectados por VHC/VIH, se asocian a un perfil metabólico plasmático alterado (**Figura 8**). La metabolómica puede contribuir a entender mejor la fisiopatología de la enfermedad y conducir al desarrollo de métodos útiles para fines diagnósticos y pronósticos. Notablemente, ya existen herramientas metabolómicas que se emplean en la clínica, como el OWL Liver Test[®], desarrollada en nuestro país y que permite distinguir la esteatosis de la esteatohepatitis en el contexto de la MAFLD.

Figura 8. Principales alteraciones metabólicas encontradas, asociadas a una mayor puntuación en la escala CTP.

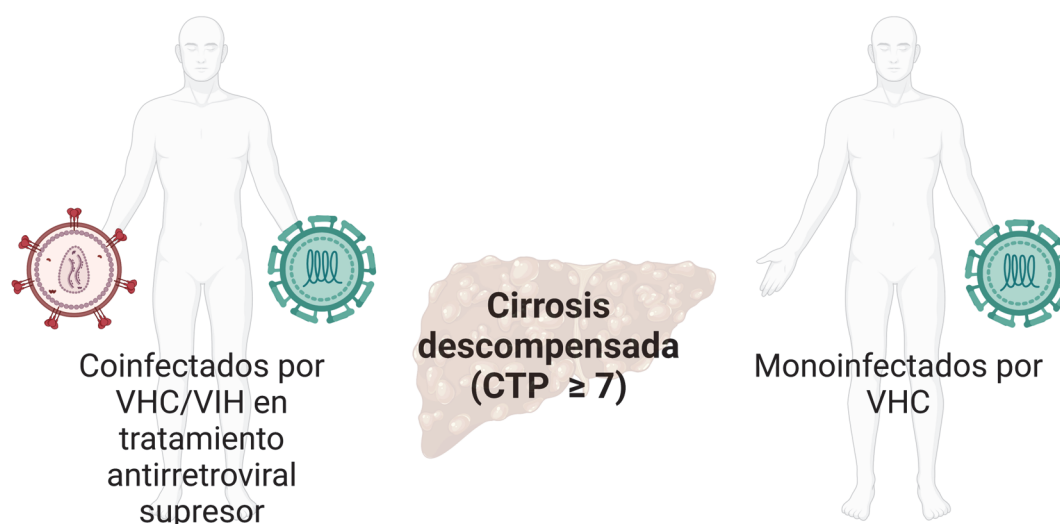


Abreviaturas: LPC, lisofosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina. Imagen creada en Biorender.com.

Los pacientes mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada descompensada presentan alteraciones similares

Otro punto a considerar es la evaluación de los resultados al compararlos entre pacientes mono infectados con el VHC y los coinfectados VHC/VIH. Como previamente se ha mencionado, está bien establecido que la infección por VIH promueve la inflamación y se relaciona con un aumento de los desórdenes metabólicos, pero, en nuestros trabajos, ambos grupos de pacientes presentan un nivel similar, tanto de los biomarcadores estudiados como en la tendencia de los metabolitos analizados (**Figura 9**).

Figura 9. Los pacientes mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH con daño hepático avanzado presentan alteraciones similares.



- Presentan en plasma:
 - Valores similares de biomarcadores de respuesta inflamatoria, disfunción endotelial y coagulopatía.
 - Fundamentalmente las mismas alteraciones metabólicas.
- El daño hepático avanzado enmascara, si es que las hay, las diferencias entre estos dos tipos de pacientes.

Abreviaturas: VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHC, virus de la hepatitis C; CTP, clasificación Child-Turcotte-Pugh. Imagen creada en Biorender.com.

Sin embargo, aunque con la misma tendencia, la fuerza de la asociación entre los metabolitos fue mayor en los pacientes coinfectados por VHC/VIH. Además, los pacientes infectados con el VIH estaban en tratamiento estable con tratamiento antirretroviral supresor y con una recuperación importante del sistema inmunológico, reflejado en la diferencia entre los valores del nadir de linfocitos T CD4⁺ y el recuento actual. Una posible explicación es que la presencia de una enfermedad hepática avanzada en estos pacientes no permitió desenmascarar el efecto, si existente, del VIH bien controlado sobre los biomarcadores y metabolitos estudiados. Aun así, no debemos olvidar que, a la luz de una terapia antirretroviral cada vez más segura y efectiva, la consideración de los coinfectados por VHC/VIH como una población especial a considerar dentro de los infectados por el VHC está siendo cada vez más objeto de debate [103].

Los pacientes coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada con alto riesgo para HPCS presentan un perfil de expresión génica diferencial

En nuestro tercer trabajo, evaluamos la expresión génica en CMSPs de pacientes coinfectados por VIH y VHC de acuerdo con su estadio de fibrosis, designado por el valor de LSM, para identificar una firma de expresión génica de cirrosis avanzada con alto riesgo de desarrollar HPCS.

La utilización de CMSPs es una buena opción no invasiva, ya que se obtienen fácilmente y han demostrado una expresión comparable a la detectada en distintos tejidos [189]. Particularmente, se ha visto que los cambios en las CMSPs reflejan aquellos ocurrientes en el hígado [190, 191]. Sin embargo, tanto el VHC como el VIH son capaces de infectarlas y, por tanto, alterar su expresión. Aun así, la mayoría de los cambios en la expresión génica se superponen entre los compartimentos hepático y CMSPs en los pacientes coinfectados por VHC/VIH, lo que respalda la naturaleza sistémica de las señales inflamatorias [190]. Además, como se ha explicado exhaustivamente con anterioridad, el sistema inmunitario es un elemento clave en la patogenia de la fibrosis hepática. Podría decirse que las CMSPs son el mejor tejido para evaluar el estado crónico inflamatorio que ocurre durante la fibrosis hepática, actuando como mediadores entre el hígado y los factores sistémicos. En este sentido, la transcriptómica ya se ha aplicado a las CMSPs para comprender mejor la acción del sistema inmunitario en el contexto de distintas enfermedades hepáticas [192, 193]. Además, su uso ha dado lugar a la agrupación de genes coexpresados en los denominados módulos transcripcionales sanguíneos (BTM), que facilitan la exploración de subconjuntos sanguíneos claves en distintos contextos [194]. Por lo tanto, creemos que esta estrategia es complementaria a aquellas que exploran la arquitectura y el microambiente del hígado a nivel unicelular [195].

En nuestro análisis descriptivo, encontramos una diferencia significativa en el recuento del nadir $CD4^+$ entre los distintos grados de fibrosis. A pesar de que un estudio no encontró evidencia significativa [196], muchos otros están en concordancia con nuestro estudio asociándolo con un mayor riesgo de fibrosis hepática [197-199]. Si bien no se encontró una asociación del recuento actual de células T $CD4^+$ en el momento del estudio con la fibrosis hepática, se podría argumentar que puede haber estado enmascarada por un tratamiento antirretroviral supresor efectivo (como lo muestra la diferencia entre el nadir $CD4^+$ y el valor actual de $CD4^+$). Esto respaldaría la asociación de los recuentos más bajos de $CD4^+$ con la

característica inmunosupresión de la progresión de la fibrosis hepática, y no como marcador independiente de disfunción hepática avanzada, por ejemplo a través del secuestro esplénico de estas células, como también se ha sugerido [200]. Además, los niveles de colesterol total estaban significativamente disminuidos en aquellos pacientes con mayor grado de fibrosis. Esto concuerda con los datos publicados con anterioridad [201, 202], pudiendo ser debido a la pérdida de hepatocitos asociada con la cirrosis, lo que reduciría la función hepática implicada en el metabolismo de las lipoproteínas [201]. Además, la infección por el VHC en sí misma puede interferir con la vía del mevalonato, limitando la síntesis de colesterol [202].

Se realizó un análisis transcriptómico en las CMSPs de estos pacientes coinfectados por VHC/VIH mediante la secuenciación de los ARN poliadenilados. Tras el análisis y filtrado de las lecturas, quedaron 15642 genes para los estudios sucesivos. En nuestro estudio, un conjunto de 60 transcritos se asociaron con el incremento de la rigidez y enfermedad hepáticas. Se evaluó también la asociación al estratificar los pacientes de acuerdo con sus valores de LSM: < 12,5 kPa (sin cirrosis), 12,5 - 25 kPa (cirrosis compensada) y \geq 25 kPa (cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS) [62]. Se detectó una expresión diferencial al comparar estadios distantes (LSM < 12,5 kPa y \geq 25 kPa). Estos 60 transcritos (22 con su expresión disminuida y 38 aumentada, en pacientes con alto riesgo de HPCS) fueron, colectivamente, capaces de discriminar entre ambos grupos (AUROC = 0,84). Sin embargo, estas diferencias desaparecieron entre estadios fibróticos adyacentes, probablemente debido a que los cambios en la expresión génica se establecen gradualmente a medida que aumenta la fibrosis y el poder estadístico real no era capaz de detectarlos a menos que las diferencias se maximizaran en fenotipos extremos.

Se puede hacer aquí alguna apreciación sobre algunos de estos transcritos. Siete de ellos (*EEF1A1P6*, *NACA3P*, *EEF1A1P12*, *PABPC3*, *RPL10AP2*, *EEF1A1P4*, *EEF1A1P1*) también se regularon a la baja en el conjunto de datos GSE101413 derivado de un modelo de hepatoblastoma [203]. *PABPC3* puede participar en el control de la expresión génica actuando a través del metabolismo del ARNm [204]. Los otros seis son pseudogenes que podrían actuar modificando la expresión génica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *EEF1A1* se ha asociado con el desarrollo de CHC [205]. Los pseudogenes descubiertos para *EEF1A1* son muy numerosos y pueden reflejar una regulación genómica compleja poco conocida [206]. Si bien la regulación a la baja de estos pseudogenes (en nuestro conjunto *EEF1A1P6*, *EEF1A1P12*, *EEF1A1P4*, *EEF1A1P1*) puede estar involucrada en el aumento del riesgo de CHC a medida que avanza la cirrosis, éste es un aspecto desconocido que tiene que ser investigado. Otros ARNs de cadena larga no codificante (lncARNs) (por ejemplo, *AD000090.1*) o pseudogenes

(por ejemplo, *TPTIP9*) también se alteraron significativamente. Juntos, estos hallazgos respaldan la creciente evidencia de que los ARNs no codificantes son actores clave importantes durante la progresión de la fibrosis hepática [43, 207]. Es de destacar que la embigina (*EMB*) y su pseudogén *EMBP1* estaban regulados al alza a medida que aumentaba la fibrosis. Ya se ha demostrado esta sobreexpresión de *EMB* con la fibrosis en un modelo de rata [208]. Además, ya se ha asociado con el cáncer [209] y se ha demostrado que promueve la transición epitelial-mesenquimatosa, que es un mecanismo molecular clave que subyace a la fibrosis [210].

A continuación, se evaluó el rendimiento diagnóstico individual de cada uno de estos 60 transcritos para discriminar aquellos pacientes con cirrosis severa con alto riesgo de HPCS (≥ 25 kPa) frente al grupo sin cirrosis (< 25 kPa), siendo ocho los transcritos con mayor poder de discriminación. De estos ocho transcritos, se validaron los dos con mayor poder de discriminación (*MDK* y *STAG3L2*) para cirrosis con alto riesgo de HPCS, en una cohorte independiente de pacientes.

Por un lado, los niveles transcripcionales de la proteína de membrana transportadora secretora 1 (*SCAMP1*), hidrolasa que contiene dominio alfa/beta 17B (*ABHD17B*), subunidad 1 del factor de transcripción general IIA o TFIIA (*GTF2A1*), proteína transmembrana 64 (*TMEM64*), y receptor acoplado a proteína G 146 (*GPRI46*), se asociaron positivamente con los valores de LSM y se consideran, por tanto, factores de riesgo.

De los genes anteriores, *GTF2A1*, *SCAMP1* y *TMEM64* ya se han involucrado en la aparición de cáncer. *GTF2A1*, que ya se ha asociado a CHC [211], codifica para la subunidad 1 del TFIIA, que, junto con *GTF2A2*, forma el TFIIA [212]. Este factor de transcripción está regulado a través de múltiples mecanismos reguladores, incluida la proteólisis específica del sitio por la proteasa altamente conservada Taspasa 1 [213]. La sobreexpresión de Taspasa 1 también se ha asociado ya con CHC [214].

SCAMP1 es una proteína involucrada en el sistema de endomembranas y el tráfico de vesículas [215], cuya desregulación puede estar involucrada en los procesos cancerígenos [216]. Las vesículas extracelulares, especialmente los exosomas, son la principal forma de comunicación en el hígado [217], y se sabe que, tanto el VHC como el VIH, son capaces de aprovechar la maquinaria exosomal del huésped en beneficio propio. Aunque cada miembro de SCAMP puede tener un papel regulatorio distinto [215], otro miembro de la misma familia, SCAMP3, ya se ha relacionado con la patogenia del CHC [218].

TMEM64, que ya se ha asociado con el CHC [219], codifica una proteína transmembrana capaz de modular la señalización de Wnt [220]. Esta vía está involucrada en la promoción de la fibrosis hepática [221] y en el desarrollo de CHC [222]. Además, *TMEM64* media positivamente la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplasmático (SERCA) [223], un regulador crítico de la homeostasis y señalización del calcio. Se ha demostrado que la inhibición de SERCA facilita la diferenciación de células Th17 [224]. Esto estaría de acuerdo con hallazgos previos en los que los pacientes coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada ($\text{LSM} \geq 25$ kPa) tenían los valores plasmáticos más bajos de citoquinas relacionadas con la respuesta Th17 [51].

Muchos cambios de expresión detectados pueden estar relacionados con la alteración del metabolismo. Tanto la infección por el VIH como por el VHC muestran alteraciones del metabolismo lipídico, como se ha discutido en relación a los resultados del segundo artículo. GPR146, al que también se le ha otorgado una función en la inhibición selectiva de la infección por virus ARN [225], dificulta la regulación del colesterol sistémico [226] y, por tanto, su detectada sobreexpresión podría estar contribuyendo a esta alteración metabólica. Esto concuerda con la reducción en los niveles de colesterol total detectada en el análisis descriptivo. Además, la sobreexpresión de *TMEM64* se ha relacionado con un incremento en la adipogénesis [220] y mutaciones de pérdida de función en *ARL15*, otro de los transcritos que se encontraron sobreexpresados en pacientes con cirrosis severa, pueden encontrarse en algunos pacientes con lipodistrofia [227, 228], por lo que el aumento detectado puede estar relacionado como mecanismo compensatorio de la lipodistrofia característica observada en pacientes infectados por el VIH y coinfectados por VHC/VIH.

ABHD17B codifica una enzima con actividad despalmítóilante [229]. La sobreexpresión detectada en este estudio está en consonancia con los resultados del segundo artículo en los que encontramos niveles más altos de ácidos grasos libres y glicerol a medida que aumentaba la puntuación CTP [111]. Además, las alteraciones en la palmitoilación se han asociado con diferentes trastornos neurológicos [230], lo que podría explicar las manifestaciones neurológicas frecuentemente descritas en pacientes infectados por el VHC [231]. Además, *ABHD17B* se ha asociado recientemente a la progresión hacia CHC [232], lo que está en concordancia con nuestros hallazgos.

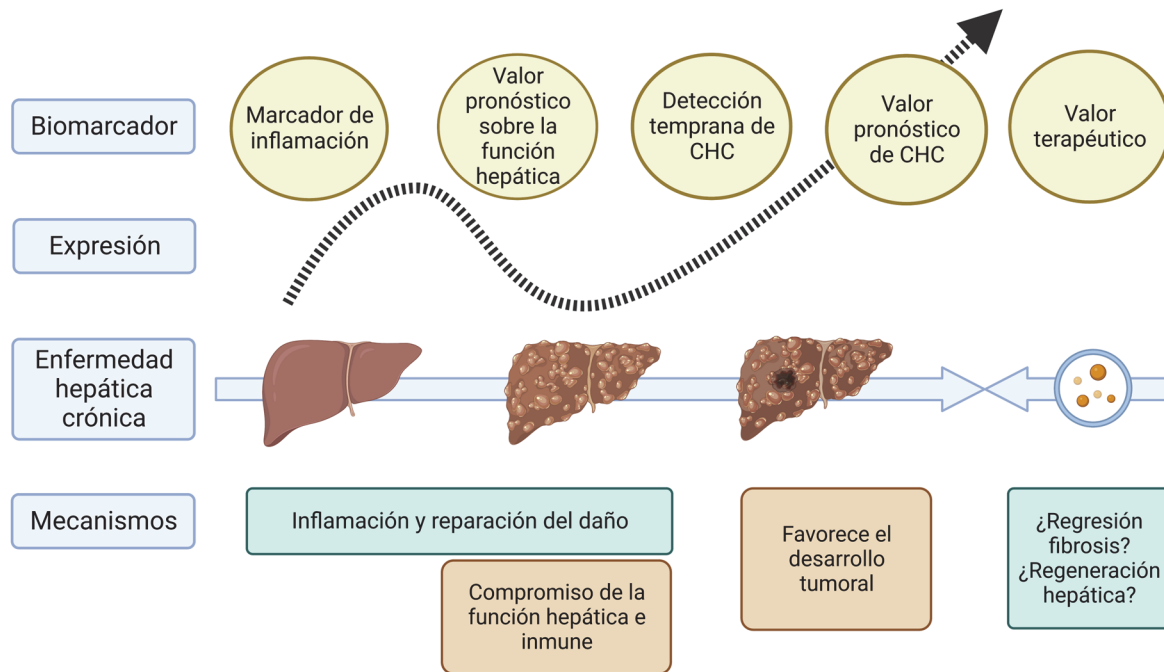
Por el otro lado, el ARN antisentido 1 del homeobox dedo de zinc 2 (*ZFH2-AS1*), *MDK* y *STAG3L2* se asociaron a un descenso de LSM.

ZFH2-AS1 es un lncARN sin función conocida, más allá de regular negativamente al factor de transcripción *ZFH2* [233]. Curiosamente, *ZFH2* puede regular al alza la somatostatina [234], que se encuentra elevada en pacientes cirróticos [235]. Esto respalda nuestros hallazgos en los que una disminución de los niveles de *ZFH2-AS1* y, por tanto, un posible aumento resultante de *ZFH2*, se asociaron a cirrosis avanzada con alto riesgo de HPCS.

MDK codifica para midquina, un factor de crecimiento de unión a heparina que se eleva en diversas afecciones, como la inflamación y en muchos tipos de cáncer [236-238]. Es secretado y, por tanto, medible en la sangre y otros fluidos corporales, como la orina y el líquido cefalorraquídeo, lo que facilita su uso como marcador no invasivo. *MDK* ya ha demostrado su implicación en varias enfermedades inflamatorias [239, 240] y, más recientemente, durante la COVID-19 [241]; y está emergiendo como un objetivo para tratar estas condiciones. En el hígado, la investigación sobre *MDK* se ha centrado en su uso como biomarcador para el CHC [242]. Su nivel sérico es bajo en pacientes sanos o cirróticos, pero aumenta en pacientes con CHC [243, 244]. Se ha demostrado que es más sensible que la alfafetoproteína, el marcador tumoral clásico por excelencia, lo que sugiere un papel esperanzador para el diagnóstico temprano de CHC. Sin embargo, en este estudio, encontramos que la expresión de *MDK* fue un factor protector, reduciendo su expresión a medida que aumentaba la fibrosis hepática. Consideramos que estas dos afirmaciones anteriores no son contradictorias, sino complementarias (**Figura 10**). El papel de *MDK* en etapas más tempranas de la enfermedad hepática crónica, antes de la aparición de CHC, ha sido mucho menos estudiado y es importante destacar que los pacientes con CHC diagnosticado fueron excluidos de este estudio.

La fibrosis hepática avanzada da como resultado cirrosis e insuficiencia hepática, pero hay que considerar que la fibrosis es un arma de doble filo [245]. La fibrosis constituye un proceso fisiológico, mediado por la inflamación e implicado en la reparación tisular. El aspecto beneficioso de *MDK* se ha estudiado mayoritariamente en modelos animales [246, 247], habiéndose demostrado que promueve la regeneración hepática tras hepatectomía parcial en ratón [248].

Figura 10. Hipotéticas funciones y aplicaciones de MDK durante el desarrollo de la enfermedad hepática crónica.



Abreviatura: CHC, carcinoma hepatocelular. Imagen creada en Biorender.com.

MDK es una citoquina con funciones proinflamatorias, angiogénicas y antiapoptóticas. Su expresión se induce en el tejido dañado y promueve la inflamación y la supervivencia celular [249]. Durante la enfermedad hepática crónica y las primeras etapas de la fibrosis, se podría inducir la expresión de *MDK* para proteger las células del hígado de la agresión en curso. Ya se ha demostrado que *MDK* protege a los hepatocitos en el tejido hepático dañado [250]. A medida que avanza la fibrosis, el daño celular en el hígado se vuelve tan prominente que las funciones de *MDK* también se alteran. En este sentido, este cambio detectado en la expresión de esta citoquina inflamatoria puede estar relacionado con la CAID característica de los pacientes cirróticos [53]. Finalmente, durante los estadios iniciales en la aparición de CHC, la hipoxia en el microambiente tumoral induciría la expresión de *MDK* y sus funciones antiapoptóticas contribuirían a la carcinogénesis [251, 252]. Es interesante plantear el posible papel que podría tener la *MDK*, que es capaz de unirse a la heparina, en la regresión de la fibrosis y la regeneración del hígado. Desde esta perspectiva, ya se ha demostrado que los exosomas

derivados de hepatocitos pueden promover cambios terapéuticos en el hígado a través de moléculas similares a la heparina [253].

Nuestro estudio apoya la doble función de MDK como protector hepático y promotor de la carcinogénesis. Al respecto, se ha demostrado una expresión bifásica de *MDK* en un modelo de fibrosis pulmonar, con una mayor expresión tanto en la etapa inflamatoria temprana como en la etapa fibrosante tardía [240].

STAG3L2, es un pseudogen de función desconocida, que parece participar en la regulación de la cromatina, según la *Alliance of Genome Resources* (abril de 2022). *STAG3L2* sigue el mismo patrón de expresión de *MDK*, expresándose poco en el hígado adulto normal y, por el contrario, aumentando sustancialmente su expresión en muestras de CHC [254]. Se encuentra en 7q11.23, justo al lado de la región cromosómica involucrada en el síndrome de Williams-Beuren [255]. Aunque las características clínicas más comunes de este síndrome no incluyen la enfermedad hepática, una minoría de pacientes desarrollan ictericia colestásica similar a la observada en pacientes con síndrome de Alagille [256, 257]. Al ser un síndrome de genes contiguos, es interesante plantear la hipótesis de que los cambios en *STAG3L2* pueden contribuir a las alteraciones hepáticas observadas en este pequeño grupo de pacientes con síndrome de Williams-Beuren.

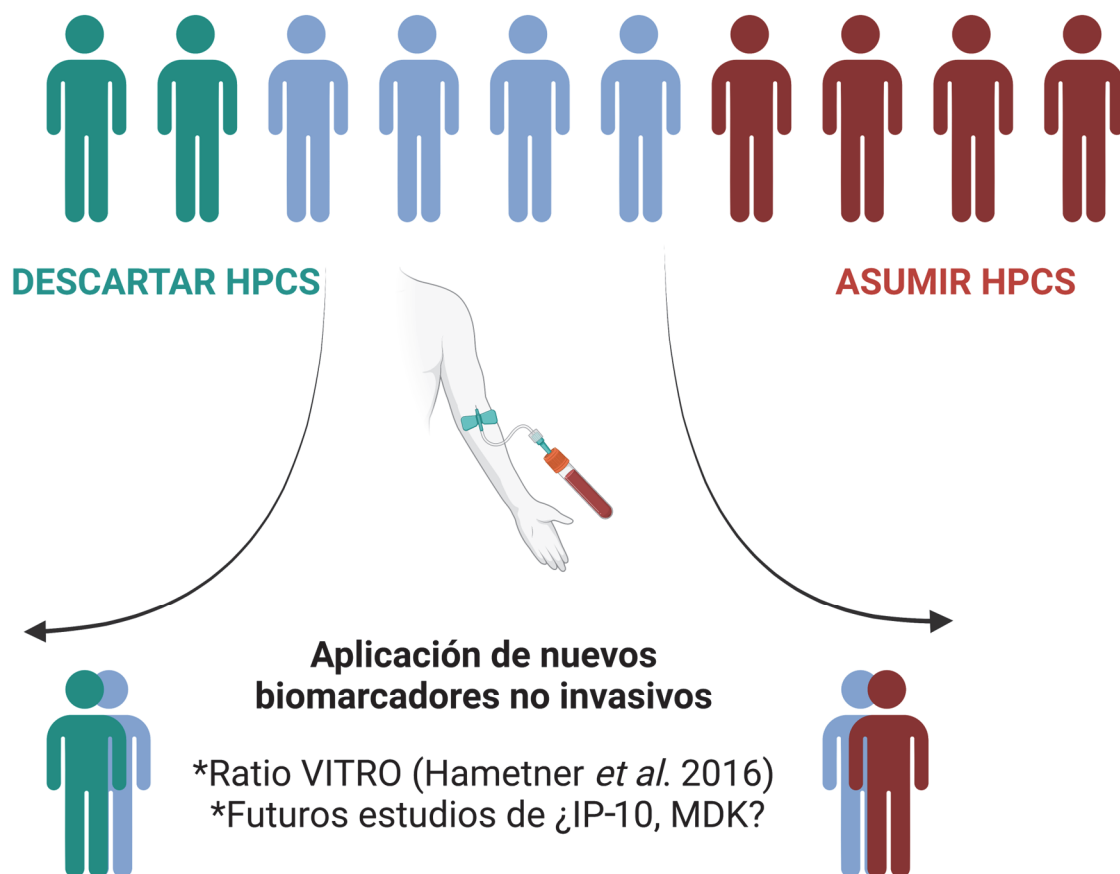
Biomarcadores accesibles distinguen a los pacientes con mayor disfunción hepática

La cirrosis se puede subdividir en una fase inicial compensada seguida de una fase descompensada. La transición entre ambas está definida por el desarrollo de complicaciones como ascitis, ictericia o varices esofágicas. Por ello, existe una necesidad clínica de información pronóstica precisa para guiar el manejo de los pacientes con enfermedad hepática avanzada.

A medida que el grado de rigidez hepática aumenta, también lo hace el grado de disfunción hepática. Como se ha indicado con anterioridad, un valor de LSM ≥ 25 kPa se ha asociado con la aparición de HPCS [61] que, a su vez, promueve el desarrollo de complicaciones como varices esofágicas de alto riesgo, descompensación hepática, CHC y/o muerte [61, 62]. Baveno VII enfatiza el diagnóstico no invasivo de la HPCS proponiendo valores extremos para descartarla (LSM ≤ 15 kPa más $\geq 150 \times 10^9/L$ plaquetas) o asumirla (LSM ≥ 25 kPa) (**Figura 4**) [62]. Además, la recomendación del consenso de iniciar tratamiento en el momento del diagnóstico de la HPCS para prevenir las complicaciones que definen la descompensación

hepática, ha supuesto un cambio de mentalidad en el campo de la hepatología clínica. Sin embargo, estos criterios diagnósticos dejan alrededor del 40% de los pacientes sin clasificar [258] (**Figura 11**). En este sentido, ya hay estudios que intentan complementar estos criterios con marcadores plasmáticos (por ejemplo, el índice VITRO como la relación entre el antígeno del factor de von Willebrand y las plaquetas) que permitan reducir este número y, por tanto, un tratamiento temprano de estos pacientes [259, 260]. Nuestros hallazgos pueden ayudar al desarrollo de biomarcadores que apoyen esta estrategia.

Figura 11. Aplicación de nuevos biomarcadores no invasivos para reducir el vacío diagnóstico con las recomendaciones actuales.

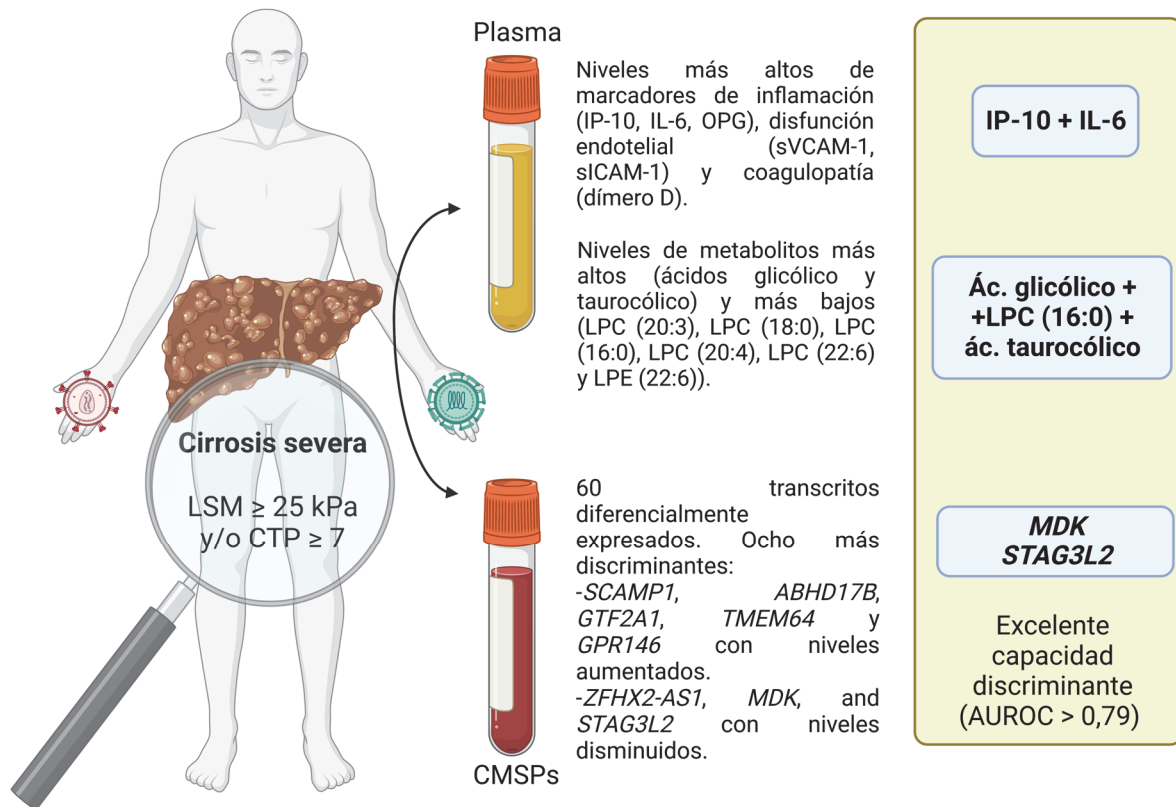


Abreviaturas: HPCS, hipertensión portal clínicamente significativa; VITRO, índice entre el antígeno del factor de von Willebrand y las plaquetas; IP-10, proteína de 10 kilodalton inducida por IFN- γ ; MDK, midquina. Imagen creada en Biorender.com.

Para ayudar en la estratificación pronóstica de los pacientes cirróticos contamos también con la ayuda de la clasificación CTP. La casi totalidad de los pacientes con CTP clase B o C tienen una LSM ≥ 25 kPa, como se ha visto en nuestros trabajos y los de otros grupos [261]. Los pacientes con cirrosis compensada se asocian fundamentalmente a una clasificación CTP A, mientras que aquellos con descompensación moderada o severa presentan una clasificación CTP B o C, respectivamente [16, 27]. En esta memoria se muestra que, por un lado, la combinación de los marcadores inflamatorios IL-6 e IP-10 y, por otro, la de los metabolitos ácido glicólico, LPC (16: 0) y ácido taurocólico permiten distinguir a los pacientes con cirrosis descompensada (CTP ≥ 7) con un AUROC de 0,964 y de 0,879, respectivamente. Sin embargo, la clasificación CTP presenta sus limitaciones, siendo la principal la subjetividad de dos de sus variables clínicas, como son la ascitis y la encefalopatía. Además, hay veces que la línea divisoria que establece la clasificación al distinguir los pacientes con cirrosis compensada y descompensada se desdibuja en la práctica clínica [262]. Aun así, parece que el hecho de que esta clasificación esté abierta a integrar el juicio clínico que evalúa el paciente en su totalidad puede llegar a ser beneficioso para una adecuada clasificación pronóstica [263]. Esto se explica por la existencia de múltiples factores fisiopatológicos, de los que cada vez se conocen más, como el papel de los factores inflamatorios o las alteraciones metabólicas, que no están integrados en estas clasificaciones. Por tanto, la evaluación de nuevos marcadores biológicos objetivos que reflejen el proceso patológico subyacente, como los presentados en estos artículos, pueden ayudar en la clasificación y manejo de estos pacientes.

Por tanto, podemos concluir que los tres artículos incluidos en esta memoria describen nuevos posibles biomarcadores accesibles (plasma o CMSPs), mediante metodologías distintas, que permiten distinguir aquellos pacientes con mayor disfunción hepática (CTP ≥ 7 o LSM ≥ 25 kPa) para poder optimizar su seguimiento y tratamiento (**Figura 12**).

Figura 12. Los pacientes con cirrosis severa ($LSM \geq 25$ kPa y/o $CTP \geq 7$) presentan alteraciones a niveles plasmático y de CMSPs.



Abreviaturas: LSM, medida de la rigidez del tejido hepático; CTP, clasificación Child-Turcotte-Pugh; IP-10, proteína de 10 kilodalton inducida por IFN- γ ; IL-6, interleuquina 6; OPG, osteoprotegerina; sVCAM-1, molécula soluble de adhesión celular vascular; sICAM-1, molécula soluble de adhesión celular intercelular 1; LPC, lisofosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina; SCAMP1, proteína de membrana transportadora secretora 1; ABHD17B, hidrolasa que contiene dominio alfa/beta 17B; GTF2A1, subunidad 1 del factor de transcripción general IIA; TMEM64, proteína transmembrana 64; GPR146, receptor acoplado a proteína G 146; ZFH2-AS1, ARN antisentido 1 del homeobox dedo de zinc 2; MDK, midquina; STAG3L2, antígeno estromal 3 similar a 2; CMSPs, células mononucleares de sangre periférica; AUROC, área bajo la curva ROC. Imagen creada en Biorender.com.

Perspectivas futuras

En conjunto, estos artículos ilustran la importancia de la desregulación inmuno-metabólica en el desarrollo y progresión de la cirrosis. La desregulación de la respuesta inmunitaria conduce a la aparición de inflamación y diversos trastornos metabólicos. La inflamación es un mecanismo patológico central que media en la transición de la cirrosis compensada a la descompensada. La erradicación del VHC tras el tratamiento con AADs, en pacientes coinfectados por el VHC/VIH con cirrosis avanzada, ha mostrado aliviar la gravedad de la cirrosis avanzada y provocar un descenso de los biomarcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, coagulopatía y angiogénesis [107, 108], así como una regulación a la baja de la expresión relacionada con la respuesta inflamatoria y antiviral [108]. Sin embargo, puede que existan alteraciones del sistema inmunitario que persistan tras la curación virológica [264, 265], por lo que es posible que se requieran, además de mecanismos reparadores de la fibrosis, el desarrollo de herramientas que permitan aliviar esa “cicatriz” inmunológica. Además, existen claras evidencias de alteraciones metabólicas en las enfermedades hepáticas, relacionándose con un aumento de la mortalidad y la insuficiencia orgánica extrahepática. Por lo tanto, la evaluación del perfil metabólico y sus alteraciones es un paso esencial que podría facilitar el diagnóstico temprano y la terapia ajustada a nuevos biomarcadores desarrollados. Aunque los cambios metabólicos detectados tras la terapia con AADs parecen relacionarse con la mejoría de la cirrosis y la inflamación [175, 266], existen evidencias que sugieren que la alteración del metabolismo lipídico y la esteatosis persiste después de la erradicación viral [267]. Por tanto, todavía se desconoce si permanece una “cicatriz” metabólica tras la curación virológica, si existe una predisposición genética a su aparición, la posible extensión y duración de la misma, así como sus implicaciones clínicas. Por último, la posible “cicatriz” epigenética está siendo objeto de numerosos estudios en la actualidad, dada la desregulación observada tras la cura [268].

Limitaciones

Los trabajos aquí incluidos tienen algunas limitaciones que es necesario reseñar.

En primer lugar, debido a la naturaleza del diseño transversal, es imposible establecer una verdadera relación de causa y efecto. Se requieren más estudios y datos longitudinales que describan el curso de la enfermedad a lo largo del tiempo para profundizar en el significado biológico de estos hallazgos. Como se ha comentado con anterioridad, parece que, tras el

tratamiento con AADs, se produce una mejoría a nivel tanto de los marcadores de inflamación como metabólicos, pero se necesita explorar con más profundidad estos aspectos, así como sus posibles implicaciones clínicas.

En segundo lugar, partimos de un tamaño de muestra limitado, lo que puede afectar el poder estadístico para detectar diferencias menores entre los grupos y, por tanto, nuestra capacidad para encontrar diferencias significativas. A su vez, este tamaño limitado puede aumentar la tasa de falsos positivos, pese a que los resultados fueron corregidos para comparaciones múltiples. Además, la generalización de los hallazgos en distintos pacientes puede estar limitada, porque los pacientes incluidos en cada estudio cumplen una serie de criterios, que pueden haber introducido un sesgo de selección.

En tercer lugar, no dispusimos de datos de biopsia hepática, considerada el estándar de oro, para evaluar el grado de fibrosis. Sin embargo, la biopsia presenta varios inconvenientes al ser un procedimiento invasivo, con complicaciones derivadas y posibles errores de muestreo [269, 270]. Por otro lado, la elastografía de transición está bien validada en pacientes coinfectados por VHC/VIH para la medición de la rigidez hepática y puede considerarse el estándar no invasivo [271], incluso para controlar la regresión de la fibrosis después de la curación [272].

En cuarto lugar, el estándar de oro para el diagnóstico de HPCS es la medición del GPVH, como se refleja en el Consenso de Baveno VII. Por tanto, los estudios dirigidos a discriminar entre la aparición de HPCS o no deberían compararse con el GPVH. La escasez de datos en nuestro estudio impidió su evaluación (datos disponibles en solo 15 pacientes de la cohorte ESCORIAL, 5 de ellos con valores de GPVH ≤ 10 mmHg). Sin embargo, Baveno VII también apunta a una definición pragmática de cACLD basada en la elastografía de transición, considerando que las pruebas no invasivas son suficientemente precisas para identificar la HPCS en la práctica clínica [62]. Si bien la comparación con datos de GPVH habría reforzado nuestros hallazgos, la comparación con los datos de LSM puede ser más robusta cuando se aplica directamente a los entornos clínicos, particularmente en aquellos contextos donde una medición invasiva como la del GPVH no se puede realizar de forma rutinaria.

Por último, el enriquecimiento para especies poliadeniladas en nuestra preparación de las muestras para el estudio transcriptómico impidió la evaluación de ARNs no codificantes, ARNs largos no codificantes con extremo 3' no canónico, pre-ARNm y ARNs pequeños, que se han visto asociados con la fibrosis hepática [273]. En este contexto, se ha sugerido la desregulación de la poliadenilación del ARN en el contexto de la enfermedad hepática grasa asociada a la

disfunción metabólica [274]. Actualmente no se sabe si esto puede afectar al análisis de las muestras de pacientes coinfectados por VHC/VIH. Un enfoque diferente y complementario puede ayudar a llenar los vacíos en nuestra comprensión de la transcriptómica de la fibrosis hepática. Finalmente, como se ha comentado previamente, nuestros hallazgos en CMSPs pueden reflejar solo parcialmente lo que está sucediendo en el hígado.

Conclusiones

- 1) Los pacientes con cirrosis avanzada mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH no presentan grandes diferencias a nivel de biomarcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, disfunción endotelial, coagulopatía y angiogénesis.
- 2) Los marcadores inflamatorios (IP-10, IL-8, IL-6 y OPG), de disfunción endotelial (sVCAM-1, sICAM-1), y de riesgo trombotico como el dímero D, se encuentran más elevados en aquellos pacientes con una cirrosis más severa.
- 3) La combinación de dos biomarcadores inflamatorios (IL-6 e IP-10) puede distinguir aquellos pacientes con cirrosis descompensada (CTP B o C) de aquellos en estadio de cirrosis compensada (CTP A), pudiendo contribuir a una clasificación adecuada de estos pacientes.
- 4) Los pacientes mono infectados por el VHC y los coinfectados por VHC/VIH presentan la misma tendencia en las alteraciones metabólicas, con ligeras diferencias en la intensidad de éstas.
- 5) La cirrosis avanzada en pacientes mono infectados por el VHC y coinfectados por VHC/VIH se asocia con una alteración del perfil metabólico plasmático. Por un lado, los ácidos grasos, los ácidos biliares, los aminoácidos aromáticos y azufrados, los derivados del butirato, los fosfolípidos oxidados, y aquellos metabolitos relacionados con la energía y los relacionados con la fermentación bacteriana aumentan a medida que progresa la cirrosis. Por el contrario, las LPC y LPE, los aminoácidos de cadena ramificada y los metabolitos del ciclo del ácido tricarbóxico, entre otros, disminuyen en cirrosis más avanzadas.
- 6) La combinación de los metabolitos ácido glicólico, LPC (16: 0) y ácido taurocólico permite discriminar, también, a los pacientes con cirrosis descompensada (CTP ≥ 7), con un buen rendimiento.
- 7) La firma de expresión génica de pacientes coinfectados por VHC/VIH con cirrosis avanzada y con alto riesgo para el desarrollo de HPCS (≥ 25 kPa) comprende 60 transcritos diferencialmente expresados (38 sobreexpresados y 22 infraexpresados) que, además, tienen una excelente capacidad discriminatoria.
- 8) Dos de los transcritos (*STAG3L2* y *MDK*) presentan buena capacidad discriminatoria para distinguir individualmente pacientes con alto riesgo para el desarrollo de HPCS (≥ 25 kPa), habiendo sido validados en una cohorte independiente.

Referencias bibliográficas

1. Polaris Observatory HCV Collaborators: **Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study.** *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2022, **7**(5):396-415.
2. WHO: **Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis.** In. Geneva: World Health Organization; 2016.
3. MSCBS: **Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud.** In. Madrid: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2020.
4. Buti M, Domínguez-Hernández R, Casado MA: **Impact of the COVID-19 pandemic on HCV elimination in Spain.** *Journal of Hepatology* 2021, **74**(5):1246-1248.
5. MSCBS: **Resultados del 2º Estudio de Seroprevalencia en España (2017-2018).** In. Madrid: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2019.
6. MSCBS: **Guía de cribado de la infección por el VHC Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.** In. Madrid: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2020.
7. Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M: **Hepatitis C.** *The Lancet* 2019, **394**(10207):1451-1466.
8. Aguilera A, Navarro D, Rodríguez-Frias F, Viciano I, Martínez-Sapiña AM, Rodríguez MJ, Martró E, Lozano MC, Coletta E, Cardeñoso L *et al*: **Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study).** *Journal of Viral Hepatitis* 2017, **24**(9):725-732.
9. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J-M, Razavi H, Terrault N, Younossi Z: **Hepatitis C virus infection.** *Nature Reviews Disease Primers* 2017, **3**(1):17006.
10. Cuadrado A, Llerena S, Cobo C, Pallás JR, Mateo M, Cabezas J, Fortea JI, Alvarez S, Pellón R, Crespo J *et al*: **Microenvironment Eradication of Hepatitis C: A Novel Treatment Paradigm.** *American Journal of Gastroenterology* 2018, **113**(11):1639-1648.
11. Corma-Gómez A, Pineda JA: **Hepatitis C virus infection in Spain: Challenges in the track to elimination.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2019, **37**(4):219-221.
12. Montoya-Ferrer A, Fierer DS, Alvarez-Alvarez B, de Gorgolas M, Fernandez-Guerrero ML: **Acute hepatitis C outbreak among HIV-infected men, Madrid, Spain.** *Emerging Infectious Diseases* 2011, **17**(8):1560-1562.
13. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, Gish RG, Busch MP, Reingold AL, Alter MJ: **Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study.** *Hepatology* 2013, **57**(3):881-889.
14. Hoornenborg E, Achterbergh RCA, Schim van der Loeff MF, Davidovich U, Hogewoning A, de Vries HJC, Schinkel J, Prins M, van de Laar TJW: **MSM starting**

- preexposure prophylaxis are at risk of hepatitis C virus infection.** *AIDS* 2017, **31**(11):1603-1610.
15. Terrault NA, Levy MT, Cheung KW, Jourdain G: **Viral hepatitis and pregnancy.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021, **18**(2):117-130.
 16. Ghany MG, Morgan TR, Panel A-IHCG: **Hepatitis C Guidance 2019 Update: American Association for the Study of Liver Diseases-Infectious Diseases Society of America Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection.** *Hepatology* 2020, **71**(2):686-721.
 17. Dubuisson J, Cosset F-L: **Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update.** *Journal of Hepatology* 2014, **61**(1, Supplement):S3-S13.
 18. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M: **Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes.** *International Journal of Molecular Sciences* 2017, **19**(1):23.
 19. Jiang X, Chang L, Yan Y, Ji H, Sun H, Guo F, Wang L: **A study based on four immunoassays: Hepatitis C virus antibody against different antigens may have unequal contributions to detection.** *Virology Journal* 2021, **18**(1):137.
 20. Crespo J, Lázaro P, Blasco AJ, Aguilera A, García-Samaniego J, Eiros JM, Calleja JL, García F: **Diagnóstico en un solo paso de la hepatitis C en 2019: una realidad en España.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2021, **39**(3):119-126.
 21. Lazarus JV, Picchio CA, Guy D, Aleman S, James C, Nava FA, Øvrehus A, Turnes J, Ward JW, Ustianowski A: **Hepatitis C standards of care: A review of good practices since the advent of direct-acting antiviral therapy.** *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2021, **45**(2):101564.
 22. Grebely J, Applegate TL, Cunningham P, Feld JJ: **Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis.** *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2017, **17**(12):1109-1115.
 23. García Deltoro M, Ricart Olmos C: **Infección por el virus de la hepatitis C y nuevas estrategias de tratamiento.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2019, **37**:15-19.
 24. Lingala S, Ghany MG: **Natural History of Hepatitis C.** *Gastroenterology Clinics of North America* 2015, **44**(4):717-734.
 25. Parlati L, Hollande C, Pol S: **Treatment of hepatitis C virus infection.** *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2021, **45**(4):101578.
 26. Cacoub P, Saadoun D: **Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection.** *New England Journal of Medicine* 2021, **384**(11):1038-1052.
 27. Muir AJ: **Understanding the Complexities of Cirrhosis.** *Clinical Therapeutics* 2015, **37**(8):1822-1836.
 28. Shin EC, Sung PS, Park SH: **Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis.** *Nature Reviews Immunology* 2016, **16**(8):509-523.

29. Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P: **Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence.** *Cells* 2019, **8**(4).
30. Chang M-L, Yang S-S: **Metabolic Signature of Hepatic Fibrosis: From Individual Pathways to Systems Biology.** *Cells* 2019, **8**(11):1423.
31. Chaudhari R, Fouda S, Sainu A, Pappachan JM: **Metabolic complications of hepatitis C virus infection.** *World Journal of Gastroenterology* 2021, **27**(13):1267-1282.
32. Virzi A, Roca Suarez AA, Baumert TF, Lupberger J: **Rewiring Host Signaling: Hepatitis C Virus in Liver Pathogenesis.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2020, **10**(1).
33. Dejong CHC, van de Poll MCG, Soeters PB, Jalan R, Olde Damink SWM: **Aromatic Amino Acid Metabolism during Liver Failure.** *The Journal of Nutrition* 2007, **137**(6):1579S-1585S.
34. Rivera Irigoien R, Abilés J: **SopORTE nutricional en el paciente con cirrosis hepática.** *Gastroenterología y Hepatología* 2012, **35**(8):594-601.
35. Krishna M: **Anatomía microscópica del hígado.** *Clinical Liver Disease* 2013, **2**(S5):109-112.
36. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA: **Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ.** *Nature Reviews Immunology* 2014, **14**(3):181-194.
37. Roeb E: **Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects).** *Matrix Biology* 2018, **68-69**:463-473.
38. Han H, Desert R, Das S, Song Z, Athavale D, Ge X, Nieto N: **Danger signals in liver injury and restoration of homeostasis.** *Journal of Hepatology* 2020, **73**(4):933-951.
39. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF: **Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives.** *Cells* 2020, **9**(4):875.
40. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F: **Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors.** *Cell Death & Disease* 2019, **10**(2):128.
41. Li H, Huang M-H, Jiang J-D, Peng Z-G: **Hepatitis C: From inflammatory pathogenesis to anti-inflammatory/hepatoprotective therapy.** *World Journal of Gastroenterology* 2018, **24**(47):5297-5311.
42. Khatun M, Ray RB: **Mechanisms Underlying Hepatitis C Virus-Associated Hepatic Fibrosis.** *Cells* 2019, **8**(10).
43. Martínez-González E, Brochado-Kith Ó, Gómez-Sanz A, Martín-Carbonero L, Jimenez-Sousa M, Martínez-Román P, Resino S, Briz V, Fernández-Rodríguez A: **Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients.** *Scientific Reports* 2020, **10**(1):11140.

44. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M: **Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis.** *Hepatology* 2010, **51**(4):1445-1449.
45. D'Amico G, Morabito A, D'Amico M, Pasta L, Malizia G, Rebora P, Valsecchi MG: **Clinical states of cirrhosis and competing risks.** *Journal of Hepatology* 2018, **68**(3):563-576.
46. EASL: **EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update.** *Journal of Hepatology* 2021, **75**(3):659-689.
47. Bosch J, Abraldes JG, Albillos A, Aracil C, Bañares R, Berzigotti A, Calleja JL, de la Peña J, Escorsell A, García-Pagán JC *et al*: **Hipertensión portal: recomendaciones para su evaluación y tratamiento.** *Gastroenterología y Hepatología* 2012, **35**(6):421-450.
48. Pons M, Augustin S, Scheiner B, Guillaume M, Rosselli M, Rodrigues SG, Stefanescu H, Ma MM, Mandorfer M, Mergeay-Fabre M *et al*: **Noninvasive Diagnosis of Portal Hypertension in Patients With Compensated Advanced Chronic Liver Disease.** *Official Journal of the American College of Gastroenterology* 2021, **116**(4):723-732.
49. Noor MT, Manoria P: **Immune Dysfunction in Cirrhosis.** *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2017, **5**(1):50-58.
50. Irvine KM, Ratnasekera I, Powell EE, Hume DA: **Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis.** *Frontiers in Immunology* 2019, **10**:293.
51. Garcia-Broncano P, Medrano LM, Berenguer J, González-García J, Jiménez-Sousa MÁ, Carrero A, Hontañón V, Guardiola JM, Crespo M, Quereda C *et al*: **Dysregulation of the Immune System in HIV/HCV-Coinfected Patients According to Liver Stiffness Status.** *Cells* 2018, **7**(11):196.
52. Lebossé F, Gudd C, Tunc E, Singanayagam A, Nathwani R, Triantafyllou E, Pop O, Kumar N, Mukherjee S, Hou TZ *et al*: **CD8+ T cells from patients with cirrhosis display a phenotype that may contribute to cirrhosis-associated immune dysfunction.** *EBioMedicine* 2019, **49**:258-268.
53. Albillos A, Martin-Mateos R, Van der Merwe S, Wiest R, Jalan R, Álvarez-Mon M: **Cirrhosis-associated immune dysfunction.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2022, **19**(2):112-134.
54. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ: **Epidemiology and natural history of HCV infection.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2013, **10**(9):553-562.
55. Boyd A, Cain O, Chauhan A, Webb GJ: **Medical liver biopsy: background, indications, procedure and histopathology.** *Frontline Gastroenterology* 2020, **11**(1):40-47.
56. Almpanis Z, Demonakou M, Tiniakos D: **Evaluation of liver fibrosis: "Something old, something new..."**. *Annals of Gastroenterology* 2016, **29**(4):445-453.

57. Fiel MI: **Histologic scoring systems for chronic liver disease (last updated: Aug 16, 2021)**. In: *UpToDate*. Edited by Robson KM. Waltham, MA: UpToDate; 2021.
58. Chin JL, Pavlides M, Moolla A, Ryan JD: **Non-invasive Markers of Liver Fibrosis: Adjuncts or Alternatives to Liver Biopsy?** *Frontiers in Pharmacology* 2016, 7:159.
59. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph J-M, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F *et al*: **Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis**. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2003, 29(12):1705-1713.
60. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de Ledinghen V: **Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C**. *Gastroenterology* 2005, 128(2):343-350.
61. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J: **Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases**. *Hepatology* 2017, 65(1):310-335.
62. de Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C: **Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension**. *Journal of Hepatology* 2022, 76(4):959-974.
63. Podrug K, Trkulja V, Zelenika M, Bokun T, Madir A, Kanizaj TF, O'Beirne J, Grgurevic I: **Validation of the New Diagnostic Criteria for Clinically Significant Portal Hypertension by Platelets and Elastography**. *Digestive Diseases and Sciences* 2022, 67(7):3327-3332.
64. Augustin S, Pons M, Maurice JB, Bureau C, Stefanescu H, Ney M, Blasco H, Procopet B, Tsochatzis E, Westbrook RH *et al*: **Expanding the Baveno VI criteria for the screening of varices in patients with compensated advanced chronic liver disease**. *Hepatology* 2017, 66(6):1980-1988.
65. Asensio del Barrio C: **Efectividad diagnóstica y seguridad de la elastografía en el estudio de fibrosis hepática en la enfermedad hepática crónica**. Madrid: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.; 2018.
66. Zhang YN, Fowler KJ, Ozturk A, Potu CK, Louie AL, Montes V, Henderson WC, Wang K, Andre MP, Samir AE *et al*: **Liver fibrosis imaging: A clinical review of ultrasound and magnetic resonance elastography**. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2020, 51(1):25-42.
67. Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M: **Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression**. *Future Science OA* 2018, 4(1):Fso250.
68. Lai M, Afdhal NH: **Liver Fibrosis Determination**. *Gastroenterology Clinics of North America* 2019, 48(2):281-289.
69. Qin S, Wang J, Zhou C, Xu Y, Zhang Y, Wang X, Wang S: **The influence of interleukin 28B polymorphisms on the risk of hepatocellular carcinoma among**

- patients with HBV or HCV infection: An updated meta-analysis.** *Medicine* 2019, **98**(38):e17275.
70. Domovitz T, Gal-Tanamy M: **Tracking Down the Epigenetic Footprint of HCV-Induced Hepatocarcinogenesis.** *Journal of Clinical Medicine* 2021, **10**(3).
 71. Li Q, Lowey B, Sodroski C, Krishnamurthy S, Alao H, Cha H, Chiu S, El-Diwany R, Ghany MG, Liang TJ: **Cellular microRNA networks regulate host dependency of hepatitis C virus infection.** *Nature Communications* 2017, **8**(1):1789.
 72. Brochado-Kith Ó, Gómez Sanz A, Real LM, Crespo García J, Ryan Murúa P, Macías J, Cabezas González J, Troya J, Pineda JA, Arias Loste MT *et al*: **MicroRNA Profile of HCV Spontaneous Clarified Individuals, Denotes Previous HCV Infection.** *Journal of Clinical Medicine* 2019, **8**(6):849.
 73. Valle-Millares D, Brochado-Kith Ó, Gómez-Sanz A, Martín-Carbonero L, Ryan P, De los Santos I, Castro JM, Troya J, Mayoral-Muñoz M, Cuevas G *et al*: **HCV eradication with DAAs differently affects HIV males and females: A whole miRNA sequencing characterization.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022, **145**:112405.
 74. Campos-Varela I, Castells L: **Puntuaciones de pronóstico de la cirrosis.** *Gastroenterología y Hepatología* 2008, **31**(7):439-446.
 75. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR: **A model to predict survival in patients with end-stage liver disease.** *Hepatology* 2001, **33**(2):464-470.
 76. Prieto M, Aguilera V, Berenguer M, Pina R, Benlloch S: **Selección de candidatos para trasplante hepático.** *Gastroenterología y Hepatología* 2007, **30**(1):42-53.
 77. Peng Y, Qi X, Guo X: **Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies.** *Medicine* 2016, **95**(8):e2877-e2877.
 78. Solé C, Solà E: **Actualización en la insuficiencia hepática aguda sobre crónica.** *Gastroenterología y Hepatología* 2018, **41**(1):43-53.
 79. Fernández J, Aracil C, Solà E, Soriano G, Cinta Cardona M, Coll S, Genescà J, Hombrados M, Morillas R, Martín-Llahí M *et al*: **Evaluación y tratamiento del paciente cirrótico crítico.** *Gastroenterología y Hepatología* 2016, **39**(9):607-626.
 80. Ramzan M, Iqbal A, Murtaza HG, Javed N, Rasheed G, Bano K: **Comparison of CLIF-C ACLF Score and MELD Score in Predicting ICU Mortality in Patients with Acute-On-Chronic Liver Failure.** *Cureus* 2020, **12**(2):e7087.
 81. Polyak A, Kuo A, Sundaram V: **Evolution of liver transplant organ allocation policy: Current limitations and future directions.** *World Journal of Hepatology* 2021, **13**(8):830-839.
 82. Götte M, Feld JJ: **Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2016, **13**(6):338-351.

83. Hézode C: **Treatment of hepatitis C: Results in real life.** *Liver International* 2018, **38 Suppl 1**:21-27.
84. EASL: **EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series(★).** *Journal of Hepatology* 2020, **73(5)**:1170-1218.
85. Celsa C, Stornello C, Giuffrida P, Giacchetto CM, Grova M, Rancatore G, Pitrone C, Di Marco V, Cammà C, Cabibbo G: **Direct-acting antiviral agents and risk of Hepatocellular carcinoma: Critical appraisal of the evidence.** *Annals of Hepatology* 2021:100568.
86. Calleja JL, Macias J, Forns X, Garcia F, Berenguer M, Garcia Deltoro M, Buti M, Granados R, Carrion JA, Morano L *et al*: **Guía de tratamiento de la infección por virus de la hepatitis C. Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).** *Gastroenterología y Hepatología* 2018, **41(9)**:597-608.
87. Berenguer J, Gil-Martin Á, Jarrin I, Moreno A, Dominguez L, Montes M, Aldámiz-Echevarría T, Téllez MJ, Santos I, Benitez L *et al*: **All-oral direct-acting antiviral therapy against hepatitis C virus (HCV) in human immunodeficiency virus/HCV-coinfected subjects in real-world practice: Madrid coinfection registry findings.** *Hepatology* 2018, **68(1)**:32-47.
88. Sarrazin C: **Treatment failure with DAA therapy: Importance of resistance.** *Journal of Hepatology* 2021, **74(6)**:1472-1482.
89. Calvaruso V, Craxì A: **Hepatic benefits of HCV cure.** *Journal of Hepatology* 2020, **73(6)**:1548-1556.
90. Rockey DC: **Fibrosis reversal after hepatitis C virus elimination.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2019, **35(3)**:137-144.
91. van der Meer AJ, Berenguer M: **Reversion of disease manifestations after HCV eradication.** *Journal of Hepatology* 2016, **65(1 Suppl)**:S95-s108.
92. Ahumada A, Rayón L, Usón C, Bañares R, Alonso Lopez S: **Hepatocellular carcinoma risk after viral response in hepatitis C virus-advanced fibrosis: Who to screen and for how long?** *World Journal of Gastroenterology* 2021, **27(40)**:6737-6749.
93. Crouchet E, Bandiera S, Fujiwara N, Li S, El Saghire H, Fernández-Vaquero M, Riedl T, Sun X, Hirschfield H, Jühling F *et al*: **A human liver cell-based system modeling a clinical prognostic liver signature for therapeutic discovery.** *Nature Communications* 2021, **12(1)**:5525.
94. Pinzani M: **Liver Fibrosis in the Post-HCV Era.** *Seminars in Liver Disease* 2015, **35(2)**:157-165.
95. Shengir M, Elgara M, Sebastiani G: **Metabolic and cardiovascular complications after virological cure in hepatitis C: What awaits beyond.** *World Journal of Gastroenterology* 2021, **27(17)**:1959-1972.

96. Roguljic H, Nincevic V, Bojanic K, Kuna L, Smolic R, Vcev A, Primorac D, Vceva A, Wu GY, Smolic M: **Impact of DAA Treatment on Cardiovascular Disease Risk in Chronic HCV Infection: An Update.** *Frontiers in Pharmacology* 2021, **12**:678546-678546.
97. Fanciulli C, Berenguer J, Busca C, Vivancos MJ, Téllez MJ, Domínguez L, Domingo P, Navarro J, Santos J, Iribarren JA *et al*: **Epidemiological trends of HIV/HCV coinfection in Spain, 2015-2019.** *HIV Medicine* 2022, **23**(7):705-716.
98. Liberto MC, Zicca E, Pavia G, Quirino A, Marascio N, Torti C, Focà A: **Virological Mechanisms in the Coinfection between HIV and HCV.** *Mediators of Inflammation* 2015, **2015**:320532.
99. Chew KW, Bhattacharya D: **Virologic and immunologic aspects of HIV-hepatitis C virus coinfection.** *AIDS* 2016, **30**(16):2395-2404.
100. Mastroianni CM, Lichtner M, Mascia C, Zuccalà P, Vullo V: **Molecular mechanisms of liver fibrosis in HIV/HCV coinfection.** *International Journal of Molecular Sciences* 2014, **15**(6):9184-9208.
101. Merchante N, Aldámiz-Echevarría T, García-Álvarez M, Rivero-Juárez A, Macías J, Miralles P, Jiménez-Sousa MA, Mancebo M, Pérez-Latorre L, Pineda-Tenor D *et al*: **Bacterial translocation and clinical progression of HCV-related cirrhosis in HIV-infected patients.** *Journal of Viral Hepatitis* 2018, **25**(2):180-186.
102. Salmon-Ceron D, Nahon P, Layese R, Bourcier V, Sogni P, Bani-Sadr F, Audureau E, Merchadou L, Dabis F, Wittkop L *et al*: **Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus (HCV) Co-infected Patients With Cirrhosis Are No Longer at Higher Risk for Hepatocellular Carcinoma or End-Stage Liver Disease as Compared to HCV Mono-infected Patients.** *Hepatology* 2019, **70**(3):939-954.
103. Karageorgopoulos DE, Allen J, Bhagani S: **Hepatitis C in human immunodeficiency virus co-infected individuals: Is this still a "special population"?** *World Journal of Hepatology* 2015, **7**(15):1936-1952.
104. Jeyarajan AJ, Chung RT: **Insights Into the Pathophysiology of Liver Disease in HCV/HIV: Does it End With HCV Cure?** *The Journal of Infectious Diseases* 2020, **222**(Suppl 9):S802-s813.
105. Macías J, Granados R, Téllez F, Merino D, Pérez M, Morano LE, Palacios R, Paniagua M, Frías M, Merchante N *et al*: **Similar recovery of liver function after response to all-oral HCV therapy in patients with cirrhosis with and without HIV coinfection.** *Journal of Viral Hepatitis* 2019, **26**(1):16-24.
106. AASLD-IDSAs: **What's New, Updates and Changes to the Guidance (Last update: October 24, 2022).** In: *HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C.* 2022.
107. Medrano LM, Berenguer J, Salguero S, González-García J, Díez C, Hontañón V, Garcia-Broncano P, Ibañez-Samaniego L, Bellón JM, Jiménez-Sousa MA *et al*: **Successful HCV Therapy Reduces Liver Disease Severity and Inflammation**

- Biomarkers in HIV/HCV-Coinfected Patients With Advanced Cirrhosis: A Cohort Study.** *Frontiers in Medicine* 2021, **8**:615342.
108. Brochado-Kith Ó, Martínez I, Berenguer J, González-García J, Salgüero S, Sepúlveda-Crespo D, Díez C, Hontañón V, Ibañez-Samaniego L, Pérez-Latorre L *et al*: **HCV Cure With Direct-Acting Antivirals Improves Liver and Immunological Markers in HIV/HCV-Coinfected Patients.** *Frontiers in Immunology* 2021, **12**:723196.
 109. Gobran ST, Ancuta P, Shoukry NH: **A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection.** *Frontiers in Immunology* 2021, **12**(3192).
 110. Salgüero S, Medrano L, González-García J, Berenguer J, Montes M, Díez C, Garcia-Broncano P, Llop-Herrera E, Pérez-Latorre L, Bellóno J *et al*: **Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study.** *Scientific Reports* 2020, **10**(1):10384.
 111. Salgüero S, Rojo D, Berenguer J, González-García J, Fernández-Rodríguez A, Brochado-Kith O, Díez C, Hontañón V, Virseda-Berdices A, Martínez J *et al*: **Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients.** *Liver International* 2020, **40**(9):2215-2227.
 112. Salgüero S, Brochado-Kith Ó, Virseda A, Berenguer J, González-García J, Martínez I, Díez C, Hontañón V, Pérez-Latorre L, Fernández-Rodríguez A *et al*: **PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfecting patients: A cross-control study.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023, **159**:114220.
 113. Breen EJ, Tan W, Khan A: **The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays.** *Scientific Reports* 2016, **6**:26996.
 114. Binek A, Rojo D, Godzien J, Rupérez FJ, Nuñez V, Jorge I, Ricote M, Vázquez J, Barbas C: **Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome.** *Journal of Proteome Research* 2019, **18**(1):169-181.
 115. Eriksson L, Antti H, Gottfries J, Holmes E, Johansson E, Lindgren F, Long I, Lundstedt T, Trygg J, Wold S: **Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm).** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **380**(3):419-429.
 116. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM, van Dorsten FA: **Assessment of PLS-DA cross validation.** *Metabolomics* 2008, **4**(1):81-89.
 117. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK: **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** *Bioinformatics* 2010, **26**(1):139-140.
 118. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1995, **57**(1):289-300.

119. Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR, Gerds T, Gonen M, Obuchowski N, Pencina MJ, Kattan MW: **Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures.** *Epidemiology* 2010, **21**(1):128-138.
120. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL: **Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach.** *Biometrics* 1988, **44**(3):837-845.
121. Soriano V, Benitez L, Arias A, Barreiro P, de Mendoza C: **Need to Face Liver Cirrhosis after HCV Cure with Antivirals.** *EBioMedicine* 2017, **24**:24-25.
122. Rey I, Effendi-Ys R: **Association Between Serum IL-6, IL-10, IL-12, and IL-23 Levels and Severity of Liver Cirrhosis.** *Medical Archives* 2021, **75**(3):199-203.
123. Chen X, Liu X, Duan S, Tang R, Zhou S, Ye R, Yang Y, Wang J, Yao S, He N: **Plasma Inflammatory Biomarkers Associated with Advanced Liver Fibrosis in HIV–HCV-Coinfected Individuals.** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, **17**(24):9474.
124. Ghazy AA, Haydara T, Farooq UD, Nadwa EH, Ghazy HA, Amer I: **Relation between HLA-DP/DQ Polymorphisms, Serum IP-10 and Response to Direct Acting Antiviral Therapy among HCV Infected Patients.** *The Egyptian Journal of Immunology* 2020, **27**(1):177-185.
125. You CR, Park SH, Jeong SW, Woo HY, Bae SH, Choi JY, Sung YC, Yoon SK: **Serum IP-10 Levels Correlate with the Severity of Liver Histopathology in Patients Infected with Genotype-1 HCV.** *Gut Liver* 2011, **5**(4):506-512.
126. Willemse SB, Reesink HW, Ladee K, Karlas J, Gelderblom HC, Molenkamp R, Schinkel J: **IP-10 in chronic hepatitis C patients treated with high-dose interferon.** *The Netherlands Journal of Medicine* 2014, **72**(8):407-415.
127. Petrone L, Chiacchio T, Vanini V, Petruccioli E, Cuzzi G, Di Giacomo C, Pucci L, Montalbano M, Lionetti R, Testa A *et al*: **High urine IP-10 levels associate with chronic HCV infection.** *The Journal of Infection* 2014, **68**(6):591-600.
128. Lei J, Yin X, Shang H, Jiang Y: **IP-10 is highly involved in HIV infection.** *Cytokine* 2019, **115**:97-103.
129. Castellon X, Bogdanova V: **Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction.** *Aging and Disease* 2016, **7**(1):81-89.
130. Iwakiri Y: **Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension.** *Liver International* 2012, **32**(2):199-213.
131. Barone M, Viggiani MT, Amoruso A, Schiraldi S, Zito A, Devito F, Cortese F, Gesualdo M, Brunetti N, Di Leo A *et al*: **Endothelial dysfunction correlates with liver fibrosis in chronic HCV infection.** *Gastroenterology Research and Practice* 2015, **2015**:682174.
132. 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 Journal of Gastroenterology* 2016, **22**(18):4427-4437.
133. Leeansyah E, Malone DFG, Anthony DD, Sandberg JK: **Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities.** *Current Opinion in HIV and AIDS* 2013, **8**(2):117-124.
134. Sherman KE: **Advanced liver disease: what every hepatitis C virus treater should know.** *Topics in Antiviral Medicine* 2011, **19**(3):121-125.
135. Shorr AF, Thomas SJ, Alkins SA, Fitzpatrick TM, Ling GS: **D-dimer correlates with proinflammatory cytokine levels and outcomes in critically ill patients.** *Chest* 2002, **121**(4):1262-1268.
136. Wijarnpreecha K, Thongprayoon C, Panjawatanan P, Ungprasert P: **Hepatitis C Virus Infection and Risk of Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Annals of Hepatology* 2017, **16**(4):514-520.
137. Abu El-Makarem MA, El-Akad AF, Elian MM, Sherif TM, El-Shaheed RA, Abd El Fatah AS, Sayed DM, Bakry RM, Mahmoud AM: **Non-neoplastic Portal Vein Thrombosis in HCV Cirrhosis Patients: Is it an Immuno-Inflammatory Disorder?** *Annals of Hepatology* 2017, **16**(4):574-583.
138. Mandorfer M, Turon F, Lens S, Baiges A, García-Criado Á, Darnell A, Belmonte E, Ferrusquía-Acosta J, Magaz M, Perez-Campuzano V *et al*: **Risk of non-tumoural portal vein thrombosis in patients with HCV-induced cirrhosis after sustained virological response.** *Liver International* 2021.
139. Turon F, Driever EG, Baiges A, Cerda E, García-Criado Á, Gilabert R, Bru C, Berzigotti A, Nuñez I, Orts L *et al*: **Predicting portal thrombosis in cirrhosis: A prospective study of clinical, ultrasonographic and hemostatic factors.** *Journal of Hepatology* 2021, **75**(6):1367-1376.
140. Thaler J, Lisman T, Quehenberger P, Hell L, Schwabl P, Scheiner B, Bucsics T, Nieuwland R, Ay C, Trauner M *et al*: **Intraperitoneal Activation of Coagulation and Fibrinolysis in Patients with Cirrhosis and Ascites.** *Thrombosis and Haemostasis* 2021.
141. Hileman CO, Longenecker CT, Carman TL, Milne GL, Labbato DE, Storer NJ, White CA, McComsey GA: **Elevated D-dimer is independently associated with endothelial dysfunction: a cross-sectional study in HIV-infected adults on antiretroviral therapy.** *Antiviral Therapy* 2012, **17**(7):1345-1349.
142. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, Dentali F, Montecucco F, Massberg S, Levi M *et al*: **Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19.** *Nature Reviews Immunology* 2021, **21**(5):319-329.
143. Langohr K, Sanvisens A, Fuster D, Tor J, Serra I, Rey-Joly C, Rivas I, Muga R: **Liver enzyme alterations in HCV-monoinfected and HCV/HIV-coinfected patients.** *The Open AIDS Journal* 2008, **2**:82-88.

144. Butorov EV: **Plasma L-Carnitine and L-Lysine Concentrations in HIV-Infected Patients.** *The Open Biochemistry Journal* 2017, **11**:119-131.
145. Cruciani RA, Revuelta M, Dvorkin E, Homel P, Lesage P, Esteban-Cruciani N: **L-carnitine supplementation in patients with HIV/AIDS and fatigue: a double-blind, placebo-controlled pilot study.** *HIV/AIDS* 2015, **7**:65-73.
146. Cassol E, Misra V, Holman A, Kamat A, Morgello S, Gabuzda D: **Plasma metabolomics identifies lipid abnormalities linked to markers of inflammation, microbial translocation, and hepatic function in HIV patients receiving protease inhibitors.** *BMC Infectious Diseases* 2013, **13**(1):203.
147. Lord RS, Bralley JA: **Clinical applications of urinary organic acids. Part I: Detoxification markers.** *Alternative Medicine Review* 2008, **13**(3):205-215.
148. Harada S, Takebayashi T, Kurihara A, Akiyama M, Suzuki A, Hatakeyama Y, Sugiyama D, Kuwabara K, Takeuchi A, Okamura T *et al*: **Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men.** *Environmental Health and Preventive Medicine* 2016, **21**(1):18-26.
149. Loftfield E, Stepien M, Viallon V, Trijsburg L, Rothwell JA, Robinot N, Biessy C, Bergdahl IA, Bodén S, Schulze MB *et al*: **Novel Biomarkers of Habitual Alcohol Intake and Associations With Risk of Pancreatic and Liver Cancers and Liver Disease Mortality.** *Journal of the National Cancer Institute* 2021, **113**(11):1542-1550.
150. Sevastou I, Kaffe E, Mouratis M-A, Aidinis V: **Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, **1831**(1):42-60.
151. Zhang J, Jin HL, Jian FB, Feng SL, Zhu WT, Li LH, Yuan ZW: **Evaluation of lipid metabolism imbalance in HIV-infected patients with metabolic disorders using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Clinica Chimica Acta* 2022, **526**:30-42.
152. Pleli T, Martin D, Kronenberger B, Brunner F, Köberle V, Grammatikos G, Farnik H, Martinez Y, Finkelmeier F, Labocha S *et al*: **Serum autotaxin is a parameter for the severity of liver cirrhosis and overall survival in patients with liver cirrhosis--a prospective cohort study.** *PloS One* 2014, **9**(7):e103532.
153. Wu JM, Xu Y, Skill NJ, Sheng H, Zhao Z, Yu M, Saxena R, Maluccio MA: **Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma.** *Molecular Cancer* 2010, **9**:71.
154. Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood AB, Ramachandran A, Balasubramanian KA: **Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006, **21**(6):947-957.
155. Ivanov AV, Bartosch B, Smirnova OA, Isaguliants MG, Kochetkov SN: **HCV and oxidative stress in the liver.** *Viruses* 2013, **5**(2):439-469.

156. Cichoż-Lach H, Michalak A: **Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases.** *World Journal of Gastroenterology* 2014, **20**(25):8082-8091.
157. Sharma B: **Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy.** *Current HIV Research* 2014, **12**(1):13-21.
158. Spickett CM, Pitt AR: **Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2015, **22**(18):1646-1666.
159. Ipson BR, Fisher AL: **Roles of the tyrosine isomers meta-tyrosine and ortho-tyrosine in oxidative stress.** *Ageing Research Reviews* 2016, **27**:93-107.
160. Pederzolli CD, Mescka CP, Zandoná BR, de Moura Coelho D, Sgaravatti AM, Sgarbi MB, de Souza Wyse AT, Duval Wannmacher CM, Wajner M, Vargas CR *et al*: **Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats.** *Metabolic Brain Disease* 2010, **25**(2):145-154.
161. Jing L, Chengji W: **GC/MS-based metabolomics strategy to analyze the effect of exercise intervention in diabetic rats.** *Endocrine Connections* 2019, **8**(6):654-660.
162. Hofmann S, Krajewski M, Scherer C, Scholz V, Mordhorst V, Truschow P, Schöbel A, Reimer R, Schwudke D, Herker E: **Complex lipid metabolic remodeling is required for efficient hepatitis C virus replication.** *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids* 2018, **1863**(9):1041-1056.
163. Lupberger J, Croonenborghs T, Roca Suarez AA, Van Renne N, Jühling F, Oudot MA, Virzi A, Bandiera S, Jamey C, Meszaros G *et al*: **Combined Analysis of Metabolomes, Proteomes, and Transcriptomes of Hepatitis C Virus-Infected Cells and Liver to Identify Pathways Associated With Disease Development.** *Gastroenterology* 2019, **157**(2):537-551.e539.
164. Yamane D, Hayashi Y, Matsumoto M, Nakanishi H, Imagawa H, Kohara M, Lemon SM, Ichi I: **FADS2-dependent fatty acid desaturation dictates cellular sensitivity to ferroptosis and permissiveness for hepatitis C virus replication.** *Cell Chemical Biology* 2021.
165. Chiappini F, Coilly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterke C, Samuel D, Duclos-Vallée J-C, Touboul D, Bertrand-Michel J *et al*: **Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients.** *Scientific Reports* 2017, **7**(1):46658.
166. Usami M, Miyoshi M, Yamashita H: **Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis.** *World Journal of Gastroenterology* 2015, **21**(41):11597-11608.
167. Procopet B, Fischer P, Farcau O, Stefanescu H: **Metabolomics: From liver chiromancy to personalized precision medicine in advanced chronic liver disease.** *World Journal of Hepatology* 2018, **10**(3):371-378.
168. Schank M, Zhao J, Moorman JP, Yao ZQ: **The Impact of HIV- and ART-Induced Mitochondrial Dysfunction in Cellular Senescence and Aging.** *Cells* 2021, **10**(1).

169. Amodio P, Angeli P, Merkel C, Menon F, Gatta A: **Plasma carnitine levels in liver cirrhosis: relationship with nutritional status and liver damage.** *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1990, **28**(9):619-626.
170. Safaei A, Arefi Oskouie A, Mohebbi SR, Rezaei-Tavirani M, Mahboubi M, Peyvandi M, Okhovatian F, Zamanian-Azodi M: **Metabolomic analysis of human cirrhosis, hepatocellular carcinoma, non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis diseases.** *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 2016, **9**(3):158-173.
171. Sauerbruch T, Hennenberg M, Trebicka J, Beuers U: **Bile Acids, Liver Cirrhosis, and Extrahepatic Vascular Dysfunction.** *Frontiers in Physiology* 2021, **12**(1131).
172. Pozniak KN, Pearen MA, Pereira TN, Kramer CSM, Kalita-De Croft P, Nawaratna SK, Fernandez-Rojo MA, Gobert GN, Tirnitz-Parker JEE, Olynyk JK *et al*: **Taurocholate Induces Biliary Differentiation of Liver Progenitor Cells Causing Hepatic Stellate Cell Chemotaxis in the Ductular Reaction: Role in Pediatric Cystic Fibrosis Liver Disease.** *The American Journal of Pathology* 2017, **187**(12):2744-2757.
173. Liu Z, Zhang Z, Huang M, Sun X, Liu B, Guo Q, Chang Q, Duan Z: **Taurocholic acid is an active promoting factor, not just a biomarker of progression of liver cirrhosis: evidence from a human metabolomic study and in vitro experiments.** *BMC Gastroenterology* 2018, **18**(1):112.
174. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam KP, Mitchell MW, Nakhle PJ, Ryals JA, Milburn MV, Nannipieri M, Camastra S *et al*: **alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population.** *PloS One* 2010, **5**(5):e10883.
175. Meoni G, Lorini S, Monti M, Madia F, Corti G, Luchinat C, Zignego AL, Tenori L, Gragnani L: **The metabolic fingerprints of HCV and HBV infections studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.** *Scientific Reports* 2019, **9**(1):4128.
176. Biliotti E, Giampaoli O, Sciubba F, Marini F, Tomassini A, Palazzo D, Capuani G, Esvan R, Spaziante M, Taliani G *et al*: **Urinary metabolomics of HCV patients with severe liver fibrosis before and during the sustained virologic response achieved by direct acting antiviral treatment.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021, **143**:112217.
177. Cho EJ, Leem S, Kim SA, Yang J, Lee YB, Kim SS, Cheong JY, Cho SW, Kim JW, Kim SM *et al*: **Circulating Microbiota-Based Metagenomic Signature for Detection of Hepatocellular Carcinoma.** *Scientific Reports* 2019, **9**(1):7536.
178. Zhang IW, Curto A, López-Vicario C, Casulleras M, Duran-Güell M, Flores-Costa R, Colsch B, Aguilar F, Aransay AM, Lozano JJ *et al*: **Mitochondrial dysfunction governs immunometabolism in leukocytes of patients with acute-on-chronic liver failure.** *Journal of Hepatology* 2021.
179. Wu Y, Wang M, Zhu Y, Lin S: **Serum interleukin-6 in the diagnosis of bacterial infection in cirrhotic patients: A meta-analysis.** *Medicine* 2016, **95**(41):e5127.

180. Martell AE, Motekaitis RJ, Fried AR, Wilson JS, MacMillan DT: **Thermal Decomposition of EDTA, NTA, and Nitrilotrimethylenephosphonic Acid in Aqueous Solution.** *Canadian Journal of Chemistry* 1975, **53**(22):3471-3476.
181. Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Kimura O, Ueno Y, Shimosegawa T: **Plasma amino acids imbalance in cirrhotic patients disturbs the tricarboxylic acid cycle of dendritic cell.** *Scientific Reports* 2013, **3**(1):3459.
182. He J, Liu X, Duan S, Ye R, Yang Y, Wang J, He N: **Untargeted Plasma Metabolomics Reveals Extensive Metabolic Alterations Among Treatment-Naive Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus Co-Infected Patients with Liver Disease Progression.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 2022, **38**(5):378-393.
183. Kinny-Köster B, Bartels M, Becker S, Scholz M, Thiery J, Ceglarek U, Kaiser T: **Plasma Amino Acid Concentrations Predict Mortality in Patients with End-Stage Liver Disease.** *PLoS One* 2016, **11**(7):e0159205.
184. Ishikawa T, Imai M, Ko M, Sato H, Nozawa Y, Sano T, Iwanaga A, Seki K, Honma T, Yoshida T: **Evaluation of the branched-chain amino acid-to-tyrosine ratio prior to treatment as a prognostic predictor in patients with liver cirrhosis.** *Oncotarget* 2017, **8**(45).
185. Stepien M, Duarte-Salles T, Fedirko V, Floegel A, Barupal DK, Rinaldi S, Achaintre D, Assi N, Tjønneland A, Overvad K *et al*: **Alteration of amino acid and biogenic amine metabolism in hepatobiliary cancers: Findings from a prospective cohort study.** *International Journal of Cancer* 2016, **138**(2):348-360.
186. Gerresheim GK, Roeb E, Michel AM, Niepmann M: **Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells.** *Cells* 2019, **8**(11):1410.
187. Sánchez-García FJ, Pérez-Hernández CA, Rodríguez-Murillo M, Moreno-Altamirano MMB: **The Role of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Viral Infections.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2021, **11**(830).
188. Liebich HM, Först C: **Hydroxycarboxylic and oxocarboxylic acids in urine: products from branched-chain amino acid degradation and from ketogenesis.** *Journal of Chromatography* 1984, **309**(2):225-242.
189. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA: **The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool.** *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2006, **147**(3):126-132.
190. Rasmussen AL, Wang IM, Shuhart MC, Proll SC, He Y, Cristescu R, Roberts C, Carter VS, Williams CM, Diamond DL *et al*: **Chronic immune activation is a distinguishing feature of liver and PBMC gene signatures from HCV/HIV coinfecting patients and may contribute to hepatic fibrogenesis.** *Virology* 2012, **430**(1):43-52.
191. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S: **Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients.** *Cancer Research* 2008, **68**(24):10267-10279.

192. Gadd VL, Patel PJ, Jose S, Horsfall L, Powell EE, Irvine KM: **Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation.** *PloS One* 2016, **11(6):e0157771.**
193. Idrees S, Ashfaq UA, Masoud MS, Qasim M, Javed T, Ali A: **Gene expression profiling of immune responsive and fibrosis genes in hepatitis C virus infected patients.** *Viral Immunology* 2014, **27(5):250-254.**
194. Sharma S, Baweja S, Maras JS, Shasthry SM, Moreau R, Sarin SK: **Differential blood transcriptome modules predict response to corticosteroid therapy in alcoholic hepatitis.** *JHEP Reports* 2021, **3(3).**
195. MacParland SA, Liu JC, Ma X-Z, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, Manuel J, Khuu N, Echeverri J, Linares I *et al*: **Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations.** *Nature Communications* 2018, **9(1):4383.**
196. Collazos J, Cartón JA, Asensi V: **Immunological status does not influence hepatitis c virus or liver fibrosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 2011, **27(4):383-389.**
197. Baranoski AS, Cotton D, Heeren T, Nunes D, Kubiak RW, Horsburgh CR, Jr.: **Clinical Liver Disease Progression Among Hepatitis C-Infected Drug Users With CD4 Cell Count Less Than 200 Cells/mm(3) Is More Pronounced Among Women Than Men.** *Open Forum Infectious Diseases* 2016, **3(1):ofv214.**
198. Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C, Arizcorreta A, Gonzalez A, Rockstroh J, Asensi V *et al*: **Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: a European collaborative study.** *Clinical Infectious Diseases* 2004, **38(1):128-133.**
199. Polo ML, Ghigliione YA, Salido JP, Urioste A, Poblete G, Sisto AE, Martinez A, Rolón MJ, Ojeda DS, Cahn PE *et al*: **Liver cirrhosis in HIV/HCV-coinfected individuals is related to NK cell dysfunction and exhaustion, but not to an impaired NK cell modulation by CD4(+) T-cells.** *Journal of the International AIDS Society* 2019, **22(9):e25375.**
200. Sullivan T: **The Implications of Low Absolute CD4 Counts in Patients With Cirrhosis and Human Immunodeficiency Virus.** *Open Forum Infectious Diseases* 2016, **3(2):ofw060-ofw060.**
201. Chi-Cervera LA, Montalvo GI, Icaza-Chávez ME, Torres-Romero J, Arana-Argáez V, Ramírez-Camacho M, Lara-Riegos J: **Clinical relevance of lipid panel and aminotransferases in the context of hepatic steatosis and fibrosis as measured by transient elastography (FibroScan®).** *Journal of Medical Biochemistry* 2021, **40(1):60-66.**
202. Butt AA, Yan P, Simon TG, Chung RT, Abou-Samra A-B, for the Est: **Changes in circulating lipids level over time after acquiring HCV infection: results from ERCHIVES.** *BMC Infectious Diseases* 2015, **15(1):510.**

203. Indersie E, Hooks KB, Capdevielle C, Fabre M, Dugot-Senant N, Desplat A, Lepreux S, Merched A, Grosset CF, Hagedorn M: **Tracking cellular and molecular changes in a species-specific manner during experimental tumor progression in vivo.** *Oncotarget* 2018, **9**(22):16149-16162.
204. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A: **Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression.** *Genome Biology* 2003, **4**(7):223.
205. Chen SL, Lu SX, Liu LL, Wang CH, Yang X, Zhang ZY, Zhang HZ, Yun JP: **eEF1A1 Overexpression Enhances Tumor Progression and Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma.** *Translational Oncology* 2018, **11**(1):125-131.
206. Cristiano L: **The pseudogenes of eukaryotic translation elongation factors (EEFs): Role in cancer and other human diseases.** *Genes & diseases* 2022, **9**(4):941-958.
207. Wang Z, Yang X, Gui S, Yang F, Cao Z, Cheng R, Xia X, Li C: **The Roles and Mechanisms of lncRNAs in Liver Fibrosis.** *Frontiers in Pharmacology* 2021, **12**:779606.
208. Su LJ, Hsu SL, Yang JS, Tseng HH, Huang SF, Huang CY: **Global gene expression profiling of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis: from pathological and biochemical data to microarray analysis.** *Gene Expression* 2006, **13**(2):107-132.
209. Jung DE, Kim JM, Kim C, Song SY: **Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- β pathway.** *Molecular Carcinogenesis* 2016, **55**(5):633-645.
210. Di Gregorio J, Robuffo I, Spalletta S, Giambuzzi G, De Iuliis V, Toniato E, Martinotti S, Conti P, Flati V: **The Epithelial-to-Mesenchymal Transition as a Possible Therapeutic Target in Fibrotic Disorders.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020, **8**:607483.
211. Meier T, Timm M, Montani M, Wilkens L: **Gene networks and transcriptional regulators associated with liver cancer development and progression.** *BMC Medical Genomics* 2021, **14**(1):41.
212. DeJong J, Bernstein R, Roeder RG: **Human general transcription factor TFIIA: characterization of a cDNA encoding the small subunit and requirement for basal and activated transcription.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(8):3313-3317.
213. Schrenk C, Fetz V, Vallet C, Heiselmayer C, Schröder E, Hensel A, Hahlbrock A, Wünsch D, Goesswein D, Bier C *et al*: **TFIIA transcriptional activity is controlled by a ‘cleave-and-run’ Exportin-1/Taspase 1-switch.** *Journal of Molecular Cell Biology* 2017, **10**(1):33-47.
214. Jiang J, Liu B, Liu R, Yang W: **Overexpression of Taspase 1 Predicts Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma.** *Cancer Management and Research* 2021, **13**:2517-2537.

215. Castle A, Castle D: **Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface.** *Journal of Cell Science* 2005, **118**(Pt 16):3769-3780.
216. Spano D, Colanzi A: **Golgi Complex: A Signaling Hub in Cancer.** *Cells* 2022, **11**(13).
217. Sung S, Kim J, Jung Y: **Liver-Derived Exosomes and Their Implications in Liver Pathobiology.** *International Journal of Molecular Sciences* 2018, **19**(12).
218. Zhang X, Sheng J, Zhang Y, Tian Y, Zhu J, Luo N, Xiao C, Li R: **Overexpression of SCAMP3 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma.** *Oncotarget* 2017, **8**(65):109247-109257.
219. Owens AR, McInerney CE, Prise KM, McArt DG, Jurek-Loughrey A: **Novel deep learning-based solution for identification of prognostic subgroups in liver cancer (Hepatocellular carcinoma).** *BMC Bioinformatics* 2021, **22**(1):563.
220. Jeong BC, Kim TS, Kim HS, Lee SH, Choi Y: **Transmembrane protein 64 reciprocally regulates osteoblast and adipocyte differentiation by modulating Wnt/ β -catenin signaling.** *Bone* 2015, **78**:165-173.
221. Miao CG, Yang YY, He X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J: **Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions.** *Biochimie* 2013, **95**(12):2326-2335.
222. Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, Hazle JD, Elsayes KM: **Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance.** *Journal of Hepatocellular Carcinoma* 2018, **5**:61-73.
223. Kim H, Kim T, Jeong B-C, Cho I-T, Han D, Takegahara N, Negishi-Koga T, Takayanagi H, Lee JH, Sul J-Y *et al*: **Tmem64 modulates calcium signaling during RANKL-mediated osteoclast differentiation.** *Cell Metabolism* 2013, **17**(2):249-260.
224. Brucklacher-Waldert V, Ferreira C, Stebegg M, Fesneau O, Innocentin S, Marie JC, Veldhoen M: **Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation.** *Cell Reports* 2017, **19**(11):2357-2370.
225. Huang H, Zhang N, Xiong Q, Chen R, Zhang C, Wang N, Wang L, Ren H, Liu M, Qian M *et al*: **Elimination of GPR146-mediated antiviral function through IRF3/HES1-signalling pathway.** *Immunology* 2017, **152**(1):102-114.
226. Yu H, Rimbert A, Palmer AE, Toyohara T, Xia Y, Xia F, Ferreira LMR, Chen Z, Chen T, Loaiza N *et al*: **GPR146 Deficiency Protects against Hypercholesterolemia and Atherosclerosis.** *Cell* 2019, **179**(6):1276-1288.e1214.
227. Wu Y, Bai Y, McEwan DG, Bentley L, Aravani D, Cox RD: **Palmitoylated small GTPase ARL15 is translocated within Golgi network during adipogenesis.** *Biology Open* 2021, **10**(12).

228. Rocha N, Payne F, Huang-Doran I, Sleigh A, Fawcett K, Adams C, Stears A, Saudek V, O'Rahilly S, Barroso I *et al*: **The metabolic syndrome- associated small G protein ARL15 plays a role in adipocyte differentiation and adiponectin secretion.** *Scientific Reports* 2017, **7**(1):17593.
229. Xu J, Gu W, Ji K, Xu Z, Zhu H, Zheng W: **Sequence analysis and structure prediction of ABHD16A and the roles of the ABHD family members in human disease.** *Open Biology* 2018, **8**(5).
230. Naumenko VS, Ponimaskin E: **Palmitoylation as a Functional Regulator of Neurotransmitter Receptors.** *Neural Plasticity* 2018, **2018**:5701348-5701348.
231. Mathew S, Faheem M, Ibrahim SM, Iqbal W, Rauff B, Fatima K, Qadri I: **Hepatitis C virus and neurological damage.** *World Journal of Hepatology* 2016, **8**(12):545-556.
232. Chen Q-t, Zhang Z-y, Huang Q-l, Chen H, Hong W-b, Lin T, Ju C-y, Wu L-z, Huang Y-y, Hou P *et al*: **Intercellular Communication in the Progression from Fibrosis to HCC by Ectosomal HK1-Induced TGF- β Secretion.** *SSRN Electronic Journal* 2021.
233. Komine Y, Takao K, Miyakawa T, Yamamori T: **Behavioral abnormalities observed in Zfhx2-deficient mice.** *PloS One* 2012, **7**(12):e53114.
234. Habib AM, Matsuyama A, Okorokov AL, Santana-Varela S, Bras JT, Aloisi AM, Emery EC, Bogdanov YD, Follenfant M, Gossage SJ *et al*: **A novel human pain insensitivity disorder caused by a point mutation in ZFHX2.** *Brain* 2018, **141**(2):365-376.
235. Munkgaard S, Kelbaek H, Tronier B: **Elevated plasma somatostatin in cirrhosis of the liver.** *New England Journal of Medicine* 1981, **304**(23):1429-1430.
236. Filippou PS, Karagiannis GS, Constantinidou A: **Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target.** *Oncogene* 2020, **39**(10):2040-2054.
237. Jones DR: **Measuring midkine: the utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases.** *British Journal of Pharmacology* 2014, **171**(12):2925-2939.
238. Weckbach LT, Muramatsu T, Walzog B: **Midkine in inflammation.** *Scientific World Journal* 2011, **11**:2491-2505.
239. Takada S, Sakakima H, Matsuyama T, Otsuka S, Nakanishi K, Norimatsu K, Itashiki Y, Tani A, Kikuchi K: **Disruption of Midkine gene reduces traumatic brain injury through the modulation of neuroinflammation.** *Journal of Neuroinflammation* 2020, **17**(1):40.
240. Misa K, Tanino Y, Wang X, Nikaido T, Kikuchi M, Sato Y, Togawa R, Tanino M, Tanaka S, Kadomatsu K *et al*: **Involvement of midkine in the development of pulmonary fibrosis.** *Physiological Reports* 2017, **5**(16).
241. Ketenci S, Uygur Kalaycı M, Dündar B, Duranay R, Şükrü Aynacıoğlu A: **Elevated serum midkine levels in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infected patients.** *International Immunopharmacology* 2022, **110**:108939.

242. Zhang BH, Li B, Kong LX, Yan LN, Yang JY: **Diagnostic accuracy of midkine on hepatocellular carcinoma: A meta-analysis.** *PloS One* 2019, **14**(10):e0223514.
243. Zheng L, Li H, Huang J, Shin J, Luo S, Guo C, Zhao Y, Li F: **Serum midkine levels for the diagnosis and assessment of response to interventional therapy in patients with hepatocellular carcinoma.** *Journal of Interventional Medicine* 2021, **4**(1):39-45.
244. Vongsuvan R, van der Poorten D, Iseli T, Strasser SI, McCaughan GW, George J: **Midkine Increases Diagnostic Yield in AFP Negative and NASH-Related Hepatocellular Carcinoma.** *PloS One* 2016, **11**(5):e0155800.
245. Chandler C, Liu T, Buckanovich R, Coffman LG: **The double edge sword of fibrosis in cancer.** *Translational Research: the Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2019, **209**:55-67.
246. Grivas D, González-Rajal Á, de la Pompa JL: **Midkine-a Regulates the Formation of a Fibrotic Scar During Zebrafish Heart Regeneration.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, **9**:669439.
247. Tsai SL, Baselga-Garriga C, Melton DA: **Midkine is a dual regulator of wound epidermis development and inflammation during the initiation of limb regeneration.** *eLife* 2020, **9**.
248. Ochiai K, Muramatsu H, Yamamoto S, Ando H, Muramatsu T: **The role of midkine and pleiotrophin in liver regeneration.** *Liver International* 2004, **24**(5):484-491.
249. Muramatsu T: **Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases.** *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences* 2010, **86**(4):410-425.
250. Yazihan N, Ataoglu H, Akcil E, Yener B, Salman B, Aydin C: **Midkine secretion protects Hep3B cells from cadmium induced cellular damage.** *World Journal of Gastroenterology* 2008, **14**(1):76-80.
251. Gowhari Shabgah A, Ezzatifar F, Aravindhan S, Olegovna Zekiy A, Ahmadi M, Gheibihayat SM, Gholizadeh Navashenaq J: **Shedding more light on the role of Midkine in hepatocellular carcinoma: New perspectives on diagnosis and therapy.** *IUBMB Life* 2021, **73**(4):659-669.
252. Reynolds PR, Mucenski ML, Le Cras TD, Nichols WC, Whitsett JA: **Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(35):37124-37132.
253. Chen L, Brenner DA, Kisseleva T: **Combatting Fibrosis: Exosome-Based Therapies in the Regression of Liver Fibrosis.** *Hepatology Communications* 2019, **3**(2):180-192.
254. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM: **The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project.** *Nature Genetics* 2013, **45**(10):1113-1120.
255. Pober BR: **Williams–Beuren Syndrome.** *New England Journal of Medicine* 2010, **362**(3):239-252.

256. Honeywell C, Gardin L, Jimenez-Rivera C, Allanson J: **Array CGH ends diagnostic odyssey for infant with features of Williams and Alagille syndrome.** *American Journal of Medical Genetics Part A* 2009, **149A(5)**:1102-1103.
257. Sakhuja P, Whyte H, Kamath B, Martin N, Chitayat D: **Williams syndrome presenting with findings consistent with Alagille syndrome.** *Clinical Case Reports* 2015, **3(1)**:24-28.
258. Semmler G, Jachs M, Mandorfer M: **Non-invasive tests-based risk stratification: Baveno VII and beyond.** *Clinical and Molecular Hepatology* 2023, **29(1)**:105-109.
259. Jachs M, Hartl L, Simbrunner B, Bauer D, Paternostro R, Scheiner B, Balcar L, Semmler G, Stättermayer AF, Pinter M *et al*: **The Sequential Application of Baveno VII Criteria and VITRO Score Improves Diagnosis of Clinically Significant Portal Hypertension.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2022.
260. Hametner S, Ferlitsch A, Ferlitsch M, Etschmaier A, Schöfl R, Ziachehabi A, Maieron A: **The VITRO Score (Von Willebrand Factor Antigen/Thrombocyte Ratio) as a New Marker for Clinically Significant Portal Hypertension in Comparison to Other Non-Invasive Parameters of Fibrosis Including ELF Test.** *PloS One* 2016, **11(2)**:e0149230.
261. Wang J, Wang Q, Yu G, She Q, Zhang W, Zhang J: **Correlation Between Liver Stiffness Measured by Shear Wave Elastography and Child-Pugh Classification.** *Journal of Ultrasound in Medicine* 2018, **37(9)**:2191-2199.
262. Qi X, Han G, Wu K, Fan D: **A confusing relationship between Child-Turcotte-Pugh class A and compensated cirrhosis.** *The American Journal of Gastroenterology* 2010, **105(2)**:470-472; author reply 472.
263. Garcia-Tsao G: **The Child-Turcotte Classification: From Gestalt to Sophisticated Statistics and Back.** *Digestive Diseases and Sciences* 2016, **61(11)**:3102-3104.
264. Strunz B, Hengst J, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, Ljunggren H-G, Wedemeyer H, Björkström NK: **Chronic hepatitis C virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity.** *Nature Communications* 2018, **9(1)**:2275.
265. Wu X, Roberto JB, Knupp A, Greninger AL, Truong CD, Hollingshead N, Kenerson HL, Tuefferd M, Chen A, Koelle DM *et al*: **Response of Human Liver Tissue to Innate Immune Stimuli.** *Frontiers in Immunology* 2022, **13**:811551.
266. Virseda-Berdices A, Rojo D, Martínez I, Berenguer J, González-García J, Brochado-Kith O, Fernández-Rodríguez A, Díez C, Hontañón V, Pérez-Latorre L *et al*: **Metabolomic changes after DAAs therapy are related to the improvement of cirrhosis and inflammation in HIV/HCV-coinfected patients.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022, **147**:112623.
267. Chuaypen N, Siripongsakun S, Hiranrat P, Tanpowpong N, Avihingsanon A, Tangkijvanich P: **Improvement of liver fibrosis, but not steatosis, after HCV eradication as assessment by MR-based imaging: Role of metabolic derangement and host genetic variants.** *PloS One* 2022, **17(6)**:e0269641.

268. Perez S, Kaspi A, Domovitz T, Davidovich A, Lavi-Itzkovitz A, Meirson T, Alison Holmes J, Dai CY, Huang CF, Chung RT *et al*: **Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals.** *PLoS Genetics* 2019, **15**(6):e1008181.
269. Poynard T, de Ledinghen V, Zarski JP, Stanciu C, Munteanu M, Vergniol J, France J, Trifan A, Le Naour G, Vaillant JC *et al*: **Relative performances of FibroTest, Fibroscan, and biopsy for the assessment of the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a step toward the truth in the absence of a gold standard.** *Journal of Hepatology* 2012, **56**(3):541-548.
270. Castera L, Bedossa P: **How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: serum markers or transient elastography vs. liver biopsy?** *Liver International* 2011, **31** Suppl 1:13-17.
271. EASL, ALEH: **EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis.** *Journal of Hepatology* 2015, **63**(1):237-264.
272. Kronfli N, Young J, Wang S, Cox J, Walmsley S, Hull M, Cooper C, Martel-Laferrriere V, Wong A, Pick N *et al*: **Liver Fibrosis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Hepatitis C Virus (HCV) Coinfection Before and After Sustained Virologic Response: What Is the Best Noninvasive Marker for Monitoring Regression?** *Clinical Infectious Diseases* 2021, **73**(3):468-477.
273. Cabral BCA, Hoffmann L, Bottaro T, Costa PF, Ramos ALA, Coelho HSM, Villela-Nogueira CA, Ürményi TP, Faffe DS, Silva R: **Circulating microRNAs associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients.** *Biochemistry and Biophysics Reports* 2020, **24**:100814-100814.
274. Jobbins AM, Haberman N, Artigas N, Amourda C, Paterson HAB, Yu S, Blackford SJI, Montoya A, Dore M, Wang Y-F *et al*: **Dysregulated RNA polyadenylation contributes to metabolic impairment in non-alcoholic fatty liver disease.** *Nucleic Acids Research* 2022, **50**(6):3379-3393.
275. Kind T, Wohlgemuth G, Lee dY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, Fiehn O: **FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry.** *Analytical Chemistry* 2009, **81**(24):10038-10048.
276. Kuligowski J, Sanchez-Illana A, Sanjuan-Herraez D, Vento M, Quintas G: **Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC).** *Analyst* 2015, **140**(22):7810-7817.
277. Godzien J, Ciborowski M, Armitage EG, Jorge I, Camafeita E, Burillo E, Martin-Ventura JL, Ruperez FJ, Vazquez J, Barbas C: **A Single In-Vial Dual Extraction Strategy for the Simultaneous Lipidomics and Proteomics Analysis of HDL and LDL Fractions.** *Journal of Proteome Research* 2016, **15**(6):1762-1775.

278. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, vab der Werf M, Nikolau B, Morrison N, Sumner L, Goodacre R, Hardy N, Taylor C *et al*: **The metabolomics standards initiative (MSI)**. *Metabolomics* 2007, **3**(3):175-178.
279. Salek RM, Steinbeck C, Viant MR, Goodacre R, Dunn WB: **The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies**. *Gigascience* 2013, **2**(1):13.

Apéndices

Apéndice A: Información suplementaria - Plasma IP-10 and IL-6 are linked to Child-Pugh B cirrhosis in patients with advanced HCV-related cirrhosis: a cross-sectional study [110]

Supplementary Table 1. Summary of plasma biomarkers (fluorescence intensity, arbitrary units) in the HCV-monoinfected patients and HIV/HCV coinfecting patients with severe advanced cirrhosis.

	Patients		Unadjusted regression		Adjusted regression	
	HCV	HIV/HCV	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)	p-value
Bacterial translocation						
LPS (EU/ml)	0.94 (0.8; 1.25)	1.05 (0.82; 1.55)	1.33 (0.25; 7.02)	0.736	0.11 (0.01; 2.74)	0.176
LBP (µg/ml)	0.82 (0.61; 1.1)	1.04 (0.75; 1.37)	5.85 (0.74; 46.52)	0.095	14.55 (0.15; 1396.36)	0.250
sCD14 (µg/ml)	2.89 (2.39; 3.96)	2.06 (1.62; 2.81)	0.05 (0.01; 0.43)	0.006	0.01 (0.01; 0.71)	0.046
FABP-2 (ng/ml)	1 (0.47; 1.77)	0.4 (0.11; 0.75)	0.13 (0.04; 0.44)	0.001	0.22 (0.04; 1.12)	0.068
Inflammatory response						
IP-10 (a.u.)	1396.25 (879.5; 1920)	1082 (768; 1591)	0.56 (0.16; 2.02)	0.376	1.08 (0.11; 10.16)	0.950
MCP-1 (a.u.)	369 (204.25; 635.75)	470 (266; 692)	1.37 (0.47; 4.01)	0.568	0.37 (0.02; 6.43)	0.495
IL-8 (a.u.)	80 (61.25; 128.5)	115 (76; 169)	2.14 (0.46; 9.98)	0.332	1.42 (0.06; 36.55)	0.834
IL-1β (a.u.)	17.75 (14.25; 40.75)	15 (14; 18.5)	0.19 (0.04; 0.87)	0.033	0.06 (0.01; 1.88)	0.110
IL-18 (a.u.)	801 (426.5; 1297.25)	1045.5 (581; 1536)	1.35 (0.5; 3.63)	0.554	1.32 (0.12; 14.95)	0.823
IL-6 (a.u.)	125 (55; 208.25)	68.5 (36; 129)	0.31 (0.1; 0.95)	0.040	0.36 (0.03; 4.02)	0.404
TNF-α (a.u.)	10.25 (9; 17.25)	9 (7; 12)	0.21 (0.05; 0.98)	0.047	0.22 (0.01; 6.85)	0.389
IL-1RA (a.u.)	45.25 (34.75; 62.75)	37 (31; 55)	1.28 (0.32; 5.08)	0.731	97.33 (1.03; 9202.83)	0.049
sRANKL (a.u.)	31.25 (24.75; 50)	24 (19; 36)	0.09 (0.01; 0.56)	0.010	0.01 (0.01; 0.17)	0.019
OPG (a.u.)	242.5 (133.25; 327.5)	193.5 (144; 289.5)	0.83 (0.2; 3.52)	0.805	3.36 (0.14; 79.09)	0.453
Endothelial dysfunction						
sVCAM-1 (a.u.)	10321 (8738.25; 11628.25)	10629 (9205; 11996.5)	0.68 (0.01; 48.1)	0.857	0.74 (0.01; 2861.09)	0.943
sICAM-1 (a.u.)	84.25 (44.75; 139.75)	106.5 (68; 136)	3.12 (0.72; 13.55)	0.129	2.68 (0.16; 46.29)	0.497
sTNF-RI (a.u.)	27.75 (18.5; 38)	31 (20.5; 45.5)	2.88 (0.63; 13.25)	0.174	29.65 (0.81; 1080.65)	0.065
Coagulopathy						
PAI-1 (a.u.)	951.5 (798.25; 1152.5)	1042.5 (812; 1315)	0.84 (0.17; 4.25)	0.833	1.24 (0.09; 17.21)	0.872
D-dimer (a.u.)	4184 (1256.25; 9015.5)	1707 (559; 3524)	0.33 (0.14; 0.77)	0.010	0.68 (0.15; 3.16)	0.623
Angiogenesis/Fibrosis						

VEGF-A (a.u.)	75 (57; 114.5)	78 (59.5; 96)	1.27 (0.25; 6.39)	0.773	0.857	1.27 (0.04; 42.25)	0.893	0.950
VEGF-R1 (a.u.)	52 (40.5; 88.25)	42 (33; 74)	0.18 (0.04; 0.74)	0.017	0.072	0.06 (0.01; 1.35)	0.076	0.267

Statistics: Values expressed as median (P25th; P75th), odds ratio (OR), and 95% of confidence interval (95%CI). *P-values* were calculated by GLM models adjusted by the main clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). *P-values*, raw *p-values*; *q-values*, *p-values* corrected for multiple testing using the false discovery rate (*FDR*) with Benjamini and Hochberg procedure. The statistically significant differences are shown in bold.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; a.u., arbitrary units of fluorescence; sCD14, soluble CD14; LPS, lipopolysaccharide; FABP2, fatty acid-binding protein 2; LBP, lipopolysaccharide binding protein; IL, interleukin; IL-1RA, interleukin-1 receptor antagonist; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IP-10, IFN- γ -inducible protein 10; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; OPG, osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular cell adhesion molecule 1; sTNF-R1, soluble tumor necrosis factor receptor 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; VEGF-A; vascular endothelial growth factor A; sVEGF-R1, soluble receptors for vascular endothelial growth factor.

Coagulopathy						
PAI-1 (a.u.)	0.88 (0.58; 1.32)	0.519	0.629	0.83 (0.57; 1.19)	0.305	0.427
D-dimer (a.u.)	1.11 (0.98; 1.26)	0.105	0.235	1.09 (0.97; 1.22)	0.131	0.291
Angiogenesis/Fibrosis						
VEGF-A (a.u.)	1.28 (0.96; 1.7)	0.096	0.235	1.19 (0.92; 1.56)	0.190	0.363
VEGF-R1 (a.u.)	1.14 (0.95; 1.36)	0.167	0.320	1.05 (0.88; 1.24)	0.586	0.650

	HIV/HCV-coinfected patients					
	Unadjusted GLM			Adjusted GLM		
	AMR (95%CI)	<i>p</i> -value	<i>q</i> -value	AMR (95%CI)	<i>p</i> -value	<i>q</i> -value
Bacterial translocation						
LPS (EU/ml)	0.91 (0.82; 1.02)	0.102	0.407	0.91 (0.82; 1.01)	0.085	0.340
LBP (µg/ml)	1.12 (0.97; 1.28)	0.114	0.407	1.12 (0.98; 1.28)	0.097	0.340
sCD14 (µg/ml)	0.96 (0.82; 1.12)	0.610	0.739	0.98 (0.84; 1.14)	0.806	0.846
FABP-2 (ng/ml)	1 (0.95; 1.05)	0.884	0.924	1 (0.95; 1.05)	0.969	0.969
Inflammatory response						
IP-10 (a.u.)	1.06 (0.98; 1.15)	0.124	0.407	1.06 (0.98; 1.14)	0.157	0.375
MCP-1 (a.u.)	1.02 (0.93; 1.11)	0.698	0.803	1.02 (0.93; 1.11)	0.708	0.802
IL-8 (a.u.)	1.06 (0.94; 1.19)	0.340	0.653	1.12 (0.99; 1.26)	0.075	0.340
IL-1β (a.u.)	1.06 (0.91; 1.24)	0.451	0.692	1.07 (0.92; 1.23)	0.400	0.581
IL-18 (a.u.)	1.02 (0.95; 1.1)	0.572	0.730	1.02 (0.95; 1.1)	0.547	0.718
IL-6 (a.u.)	1.16 (1.08; 1.24)	<0.001	0.002	1.15 (1.07; 1.24)	<0.001	0.007
TNF-α (a.u.)	1.05 (0.92; 1.19)	0.500	0.718	1.08 (0.95; 1.22)	0.233	0.464
IL-1RA (a.u.)	1.1 (1.01; 1.21)	0.046	0.353	1.11 (1.01; 1.22)	0.026	0.179
sRANKL (a.u.)	1.07 (0.91; 1.26)	0.420	0.692	1.13 (0.96; 1.33)	0.141	0.375
OPG (a.u.)	1.07 (0.95; 1.19)	0.257	0.565	1.06 (0.95; 1.18)	0.311	0.545
Endothelial dysfunction						
sVCAM-1 (a.u.)	1.2 (0.88; 1.63)	0.240	0.565	1.19 (0.89; 1.61)	0.243	0.464
sICAM-1 (a.u.)	1.16 (1.05; 1.28)	0.004	0.047	1.18 (1.07; 1.3)	0.001	0.007
TNFR-I (a.u.)	1.06 (0.96; 1.17)	0.270	0.565	1.05 (0.95; 1.16)	0.339	0.547
Coagulopathy						
PAI-1 (a.u.)	1.03 (0.93; 1.14)	0.564	0.730	1.02 (0.93; 1.13)	0.669	0.802
D-dimer (a.u.)	1.05 (0.99; 1.1)	0.078	0.407	1.04 (0.99; 1.09)	0.161	0.375
Angiogenesis/Fibrosis						
VEGF-A (a.u.)	0.99 (0.88; 1.11)	0.846	0.924	0.98 (0.87; 1.1)	0.726	0.802
VEGF-R1 (a.u.)	0.95 (0.84; 1.08)	0.450	0.692	0.95 (0.84; 1.07)	0.415	0.581

Statistics: Values expressed as arithmetic mean ratio (aAMR) and 95% of confidence interval (95%CI). *P*-values were calculated by GLM models unadjusted and adjusted by the main clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). *P*-values, raw *p*-values; *q*-values, *p*-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (*FDR*) with Benjamini and Hochberg procedure. The statistically significant differences are shown in bold.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; -1, human immunodeficiency virus type 1; a.u., arbitrary units of fluorescence; sCD14, soluble CD14; LPS, lipopolysaccharide; FABP2, fatty acid-binding protein 2; LBP, lipopolysaccharide binding protein; IL, interleukin; IL-1RA, interleukin-1 receptor antagonist; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IP-10, IFN-γ-inducible protein 10; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; OPG, osteoprotegerin; sRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor-κB ligand; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular cell adhesion molecule 1; sTNF-R1, soluble tumor necrosis factor receptor 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; VEGF-A; vascular endothelial growth factor A; sVEGF-R1, soluble receptors for vascular endothelial growth factor.

Apéndice B: Información suplementaria - Plasma metabolomic fingerprint of advanced cirrhosis stages among HIV/HCV-coinfected and HCV-monoinfected patients [111]

Additional File 1: Additional description of methods section.

Reagents and standards for metabolomics

They have been used: acetonitrile (LC-MS grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), formic acid (FA) (MS grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), MilliQ® water (Millipore, Billerica, MA, USA), heptane (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), methylterbutyleter (MTBE) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), pyridine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), O-methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) plus 1 % trimethylchlorosilane (TMCS) (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA). Stearic acid methyl ester (C18:0 methyl ester) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as internal standard for GC-MS. For reference masses purine, hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine (HP) and ammonium trifluoroacetate (TFA(NH₄)) from Agilent (API-TOF reference mass solution kit) were used in LC-MS. In GC-MS, a FAME mix (fatty acid methyl esters, e.g. caprylic acid, capric acid, lauric acid, tridecanoic acid, myristic acid, myristoleic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, heptadecanoic acid, stearic acid, elaidic acid, oleic acid, linoleic acid, arachidic acid, cis-11-eicosenoic acid, linolenic acid, behenic acid and erucic acid) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Sample preparation for metabolomics analysis

In the day of the analysis, for GC-MS 100 µL of the corresponding methanolic aliquots were evaporated to dryness using a Speedvac Concentrator, followed by the addition of 10 µL of O-methoxyamine hydrochloride (15 mg/mL) in pyridine for methoximation. After gently vortexing, the vials were incubated in darkness at room temperature for 16 hours. Then, 10 µL of BSTFA with 1 % TMCS (v/v) were added and samples were vortexed for 5 min, silylation was carried out for 1 h at 70°C and finally 100 µL of C18:0 methyl ester (10 mg/L in heptane) were added as an internal standard and samples were mixed again by gently vortex. Six blank samples were prepared by the same procedure of extraction and derivatization. For LC-MS, 500 µL of MTBE were added to the samples to enhance the extraction of the lipophilic compounds.

After gently vortexing (TissueLyser LT, 50 Hz, 10 min) and centrifugation (16000 g, 20 min, 4°C), the resulting supernatants were filtered through 0.22 µm nylon syringe filters and transferred into an analytical vial for their analysis.

Quality controls (QCs) samples are required at the beginning of the sequence to stabilize the system and throughout the analytical runs at periodic intervals of time to monitor variations in signal across the time. For these reasons, individual QC samples were prepared independently for each analytical platform by pooling and mixing equal volumes of each corresponding sample. After gently vortex, the mixes were transferred to analytical vials.

GC-EI-Q-MS fingerprinting (for using FiehnLib [275] and NIST 14 libraries)

GC system (Agilent Technologies 7890A) consisted in an autosampler (Agilent Technologies 7693) and an inert mass selective detector (MSD) with Quadrupole (Agilent Technologies 5975). Two µL of the derivatized sample were injected through a GC-Column DB5-MS (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film 95% dimethylpolysiloxane/5% diphenylpolysiloxane) with a pre-column (10 m J&W integrated with Agilent 122-5532G). The flow rate of the helium carrier gas was set at 1 mL/min and the injector temperature 250°C. The split ratio was 1:10 flow into a Restek 20782 deactivated glass-wool split liner. The temperature gradient was programmed at 60°C (held for 1 min), with a ramping increase rate of 10 °C/min up to 325°C. Finally, it was cooled down for 10 min before the next injection. The total analysis time was 37.5 min. The detector transfer line, filament source and quadrupole temperature were respectively set at 290°C, 230°C and 150°C. The electron ionization (EI) source was placed at 70 eV. The mass spectrometer operated in scan mode over a mass range of m/z 50–600 at a rate of 2 spectra per second. The method was retention time locked at 19.663 minutes (elution time of the internal standard). The analytical run was set up starting with the injection of C18:0 methyl ester (10 mg/L in heptane) and FAME mix (0.1 mg/mL in CH₂Cl₂) followed by four blanks, five QCs and then samples were analysed in a randomised order, where other QCs were injected between blocks of ten samples until the end of the run that terminated with the injection of the four blanks.

LC-ESI-QTOF-MS fingerprinting

The metabolic profile was achieved using a liquid chromatography system consisting of a degasser, a binary pump, and an autosampler (1290 infinity II, Agilent). Samples (0.5 µL) were

applied to a reversed-phase column (Zorbax Extend C18 50 x 2.1 mm, 1.8 μm ; Agilent), which was maintained at 60°C during the analysis. The system was operated at a flow rate of 0.6 mL/min with solvent A (H₂O containing 0.1% FA) and solvent B (acetonitrile containing 0.1% FA). The gradient was 5% B (0–1 min), 5 to 80% B (1–7 min), 80 to 100% B (7–11.5 min), and 100 to 5% B (11.5–12 min). The system was finally held at 5% B for 3 min to re-equilibrate the system (15 min of total analysis time). Data were collected in positive and negative electrospray ionization (ESI) modes in separate runs using QTOF (Agilent 6550 iFunnel). The analyses were performed in both positive and negative ion modes in full-scan from m/z 50 to 1000. The capillary voltage was 3000 V and the nozzle voltage was 1000 V with a scan rate of 1.0 spectrum per second. The gas temperature was 250°C, the drying gas flow was 12 L/min, the nebulizer was 52 psi, the sheath gas temperature 370°C and the sheath gas flow 11 L/min. For positive mode, the MS-TOF parameters were as follows: fragmentor 175 V and octopole radio frequency voltage 750 V. For negative mode, the MS-TOF parameters included the following: fragmentor 250 V and octopole radio frequency voltage 750 V. During the analyses, two reference masses were used: 121.0509 (purine, detected m/z [C₅H₄N₄+H]⁺) and 922.0098 (HP, detected m/z [C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄+H]⁺) in positive mode and 112.9855 (TFA(NH₄), detected m/z [C₂O₂F₃(NH₄)-H]⁻) and 966.0007 (HP+FA, detected m/z [C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄+FA-H]⁻) in negative mode. The references were continuously infused into the system, enabling constant mass correction. Samples were analyzed in randomized runs, during which they were incubated in an autosampler at 4°C. The analytical runs for both polarities were set up starting with the analysis of ten QCs followed by the samples; a QC sample was injected between blocks of ten samples until the end of the run.

Quality assurance

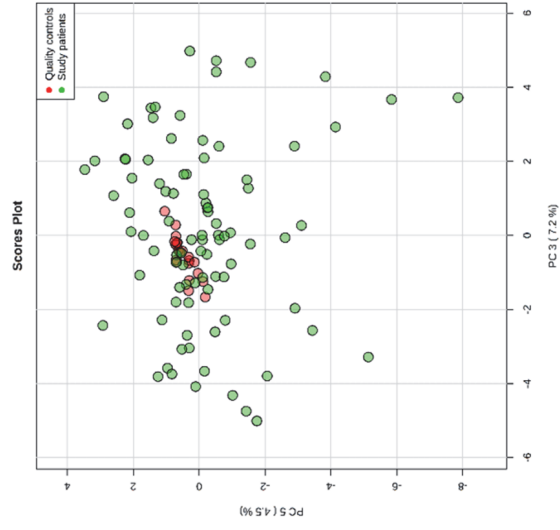
After data reprocessing, the metabolic features were subsequently filtered. For GC-MS, 82 metabolites were detected. After filtering for a relative standard deviation (RSD) <40 and presence in at least 60% of the samples in each experimental group, 68 metabolites were selected for statistical analysis. For LC-MS, a normalization over the analysis time (injection order) was carried [276]. The detected features were 347 and 335 for ESI+ and ESI-, respectively. Out of them, 261 and 210 features fulfilled a value of RSD <40, of which 13 and 2 features had not presence in more than 60% of samples in each group, and were discarded. Finally, 248 and 208 features were statistically analyzed for ESI+ and ESI-, respectively.

Metabolite identification

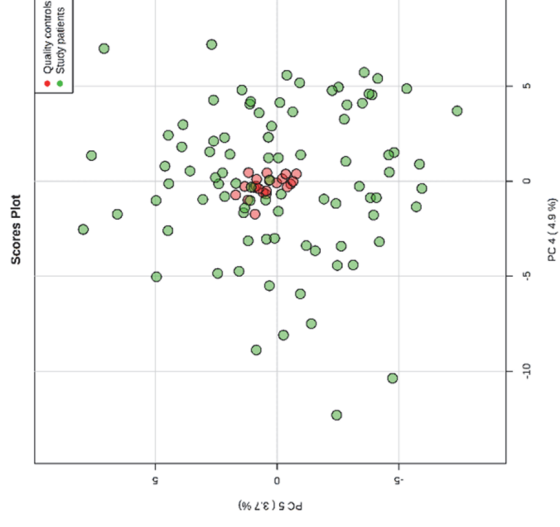
The significant metabolites were identified. In GC-MS the identification was done based on FiehnLib [275] and NIST 14 libraries. In LC-MS the list of accurate masses was searched using the CEU Mass Mediator search tool (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>; error ± 5 ppm) to obtain tentative identifications. Each of them was manually curated based on their MS adducts [277]. In the cases that it was applicable, the elution order was also considered to discard spurious identifications. Eventually the biological role of each compound was evaluated and unrelated identifications such as pesticides, drugs or not possible chemical structures were excluded. The metabolites are reported in agreement with the criteria of the Metabolomics Standards Initiative [278, 279] with a confidence level grade 2 (putatively annotated compounds), which certitude is increased after manual curation of the final list.

Additional File 2: Principal component analysis (PCA) plot showing clustering of study samples and quality controls. **Abbreviations:** GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS, and liquid chromatography–mass spectrometry; ESI, electrospray ionization; PC, principal component.

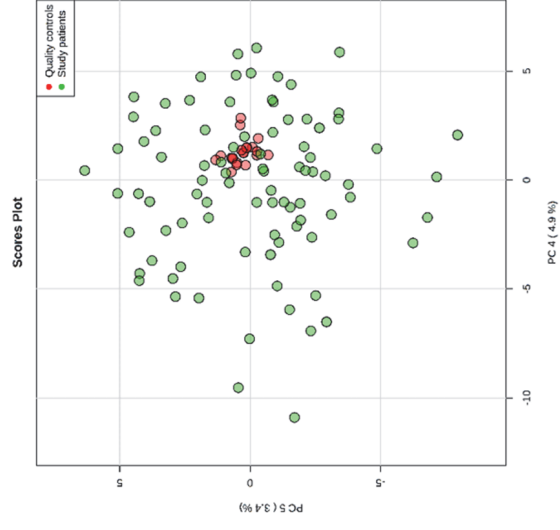
GC-MS



LC-MS ESI+



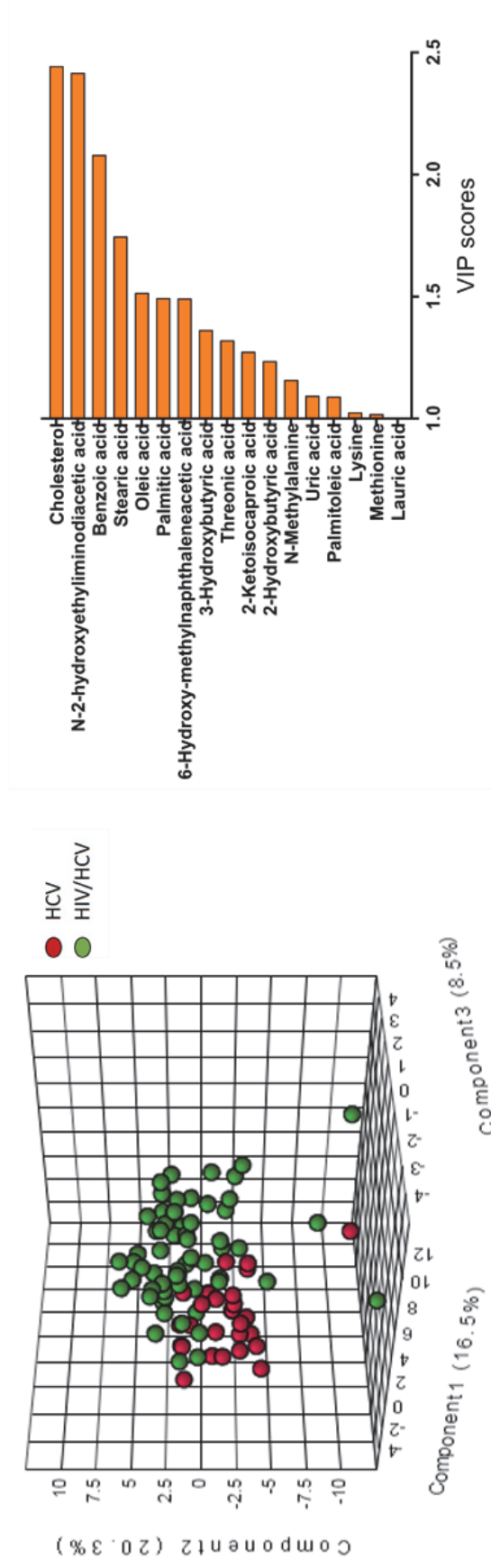
LC-MS ESI-



Additional File 3. Multivariate analysis of plasma metabolites regarding HIV coinfection. PLS-DA plot resulting from GC-MS data and metabolites with the highest VIP score (≥ 1).

Statistics: Multivariate analysis was performed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The VIP score measures the variable's importance and allows metabolites to be ranked according to their importance.

Abbreviations: PLS-DA, partial least squares discriminant analysis, VIP, variable importance in projection, GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry.



Additional File 4. Summary of associations between metabolites and HIV coinfection (HCV/HIV coinfecting vs. HCV mono-infected patients).

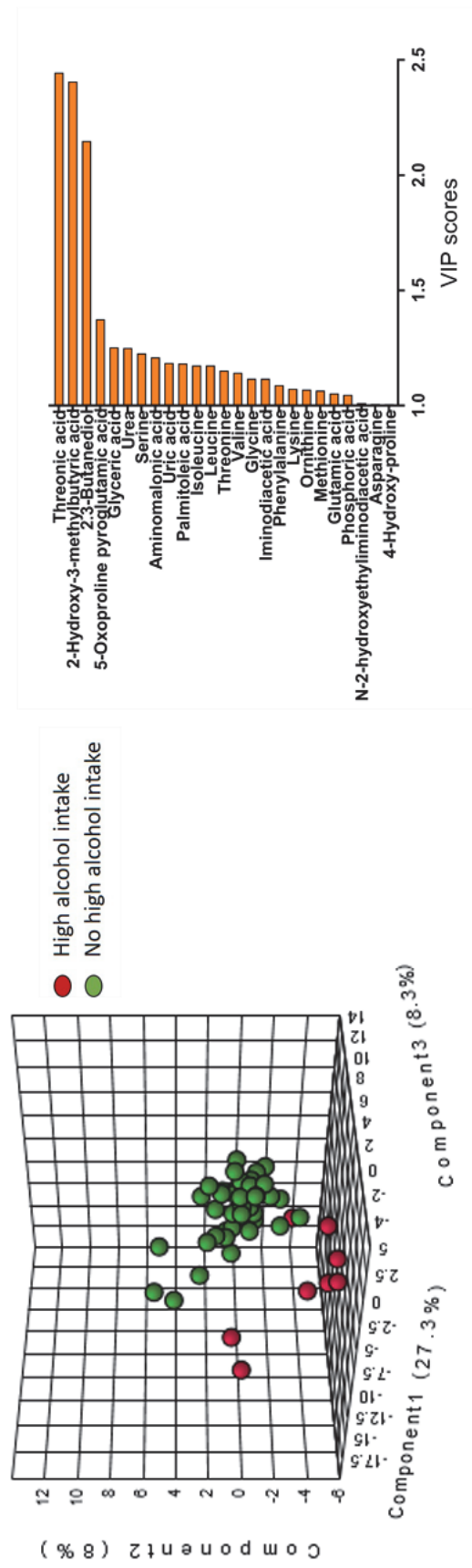
Metabolite	Technology	Unadjusted model			Adjusted model		
		OR (95%CI)	p-value	q-value	aOR (95%CI)	p-value	q-value
Benzoic acid	GC-MS	0.30 (0.15-0.58)	3.22*10 ⁻⁴	0.007	0.38 (0.14-1.00)	0.051	0.073
Cholesterol	GC-MS	0.14 (0.05-0.37)	7.79*10 ⁻⁵	2.65*10⁻³	0.06 (0.01-0.34)	0.010	0.023
N-2-hydroxyethyl- Iminodiacetic acid	GC-MS	2.92 (1.73-4.94)	6.57*10 ⁻⁵	2.65*10⁻³	2.05 (1.06-3.98)	0.151	0.171
Stearic acid	GC-MS	0.36 (0.20-0.67)	0.001	0.022	0.08 (0.01-0.51)	0.009	0.023
LPC(16:0)	LC-MS ESI+	2.35(1.36-4.05)	0.002	0.064	2.22 (0.86-5.71)	0.044	0.073
LPC (18:0)	LC-MS ESI+	2.61 (1.50-4.56)	7.62*10 ⁻⁴	0.032	2.78 (1.10-6.99)	0.010	0.023
LPC(20:4)	LC-MS ESI+	2.39 (1.34-4.28)	0.003	0.073	2.09 (0.80-5.48)	0.316	0.316
PC (16:0/9:0(CHO))	LC-MS ESI+	0.19 (0.09-0.41)	2.89*10 ⁻⁵	7.17*10⁻³	0.15 (0.05-0.48)	0.008	0.023
Acetylcarmitine	LC-MS ESI+	0.35 (0.19-0.63)	5.62*10 ⁻⁵	0.032	0.22(0.07-0.65)	0.011	0.023

Statistics: Values are expressed as odds ratio and 95% confidence interval. P-values were calculated by Generalized Linear Models (GLM) with binomial distribution (logit-link); q-values represent p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Adjusted models were adjusted by the most significant clinical and epidemiological characteristics (see Statistical analysis section). Statistically significant differences are shown in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; q-value, corrected level of significance; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

Additional File 5. Multivariate analysis of plasma metabolites regarding high alcohol intake (>50 g/day). PLS-DA plot resulting from GC-MS data and metabolites with the highest VIP score (≥ 1).

Statistics: Multivariate analysis was performed by PLS-DA. The VIP score measures the variable's importance and allows metabolites to be ranked according to their importance.

Abbreviations: PLS-DA, partial least squares discriminant analysis, VIP, variable importance in projection, GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry.



Additional File 6. Summary of associations between plasma metabolites and high alcohol intake (>50 g/day).

Metabolite	Technology	Unadjusted model			Adjusted model		
		OR (95%CI)	p-value	q-value	aOR (95%CI)	p-value	q-value
2,3-Butanediol	GC-MS	6.68 (2.04-21.93)	0.002	0.058	60.73 (0.58-6401.83)	0.084	0.084
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	GC-MS	16.63 (2.48-111.42)	0.004	0.085	15.50 (1.96-122.79)	0.009	0.028
Threonic acid	GC-MS	0.17 (0.06-0.49)	0.001	0.058	0.11 (0.01-0.82)	0.064	0.084

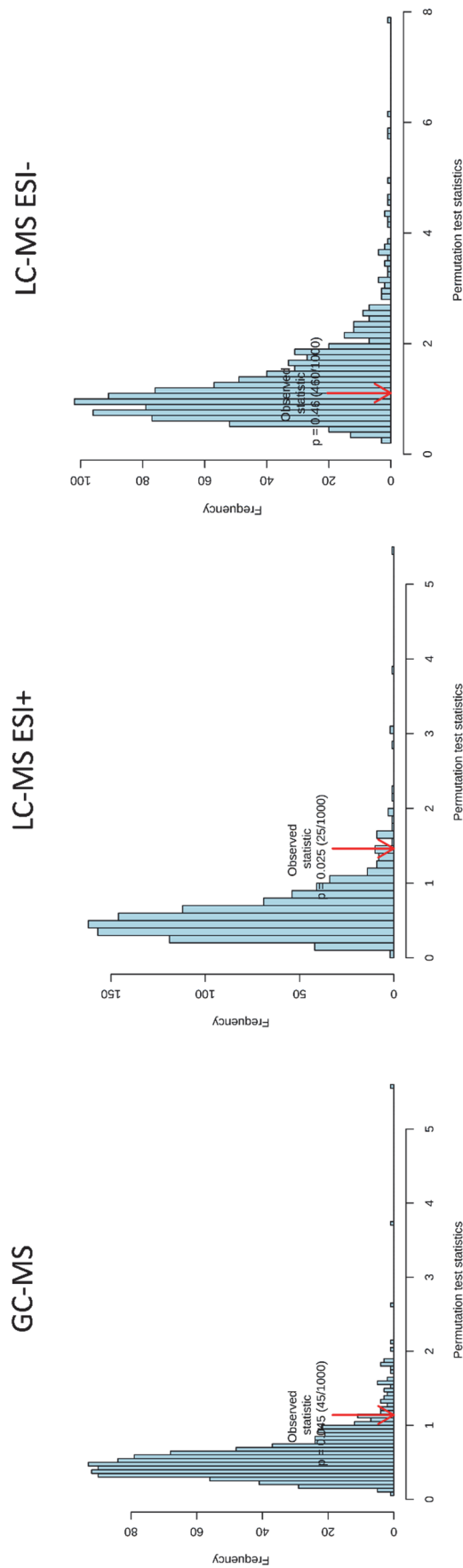
Statistics: Values are expressed as odds ratio and 95% confidence interval. P-values were calculated by Generalized Linear Models (GLM) with binomial distribution (logit-link); q-values represent p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Adjusted models were adjusted by the most significant clinical and epidemiological characteristics (see Statistical analysis section). Statistically significant differences are shown in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; q-value, corrected level of significance.

Additional File 7. Summary of associations between metabolites and previous HCV therapy failure.

Feature	Technology	Mass	RT (min)	OR	Unadjusted model				Adjusted model				Identification	
					IC2.5	IC97.5	p	q	aOR	IC2.5	IC97.5	p		q
210.1607.0.25500023	LC-MS-	210.1607	0.25500023	0.39	0.22	0.67	6.6 x 10 ⁻⁴	0.072	0.39	0.22	0.68	8.6 x 10 ⁻⁴	0.074	Unknown
191.1076.0.25500023	LC-MS-	191.1076	0.25500023	0.39	0.23	0.67	6.9 x 10 ⁻⁴	0.072	0.37	0.21	0.66	7.5 x 10 ⁻⁴	0.074	Unknown

Statistics: Values are expressed as odds *ratio* and 95% confidence interval. P-values were calculated by Generalized Linear Models (GLM) with binomial distribution; q-values represent p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Adjusted models were adjusted by the most significant clinical and epidemiological characteristics (see Statistical analysis section). Statistically significant differences are shown in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; q-value, corrected level of significance.

Additional File 8. Permutation by separation distance (B/W) to confirm the validity of the PLS-DA models, with a permutation number of 1000.
Abbreviations: GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS, and liquid chromatography–mass spectrometry; ESI, electrospray ionization.



Additional File 9. Summary of the highest variable importance in projection (VIP) scores for the multivariate analysis of metabolites according to the CTP score. **Statistics:** Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to calculate the VIP score for each of the metabolites. The VIP score measures the variable's importance and allows ranking of the metabolites according to their importance. **Abbreviations:** GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS, and liquid chromatography–mass spectrometry; ESI, electrospray ionization; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; VIP, variable importance in projection.

GC-MS

Metabolites	VIP score
Glycolic acid	2.2855
2-Ketoisocaproic acid	1.6336
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	1.5122
Palmitoleic acid	1.4778
Oleic acid	1.4708
Methionine	1.4646
Palmitic acid	1.4551
2.3-Butanediol	1.4459
2-Hydroxybutyric acid	1.3753
Tyrosine	1.3550
Threonic acid	1.2964
Stearic acid	1.2279
Glycerol	1.1796
3-Hydroxybutyric acid	1.1705
N-2-hydroxyethyliminodiacetic acid	1.1661
Aminomalonic acid	1.1417
Lauric acid	1.1333
Succinic acid	1.1205
p-Cresol	1.0294
5-Oxoproline (pyroglutamic acid)	1.0063

LC-MS ESI+

Metabolites	VIP score
Carnitine	2.3015
LPC(16:0)	2.2998
LPC(20:4)	1.9704
LPC(18:0)	1.9362
LPE(22:6)	1.8365
LPC(20:3)	1.7856
LPC(22:6)	1.6811
PC(16:0/9:0(CHO))	1.6452
Acetylcarnitine	1.6136
2-amino-3-methylbutanol/Neurine	1.1557
LPC(16:1)	1.0196

Additional File 10. Association between individual metabolites and CTP score. **Statistics:** Ordinal regression models (dependent variable: CTP score; independent variable: metabolites), adjusted by the most relevant covariates (see Statistical analysis in Patients and methods section). P-values were adjusted by FDR correction for multiple comparisons (Benjamini and Hochberg). **Abbreviations:** RT, retention time; OR, odd ratio; CI, confidence interval; p-value, level of significance; q-value, adjusted p-value by FDR correction; LPC, lysophosphatidylcholine.

Feature	Technology	Mass	RT (min)	Unadjusted model				Adjusted model				Identification		
				OR	IC2.5	IC97.5	p	q	aOR	IC2.5	IC97.5		p	q
X2.3.Butanediol	GC-MS	NA	NA	1.65	1.06	2.59	0.027	0.326						
X2.Hydroxy.3.methylbutyric.acid	GC-MS	NA	NA	1.72	1.12	2.68	0.014	0.323						
X2.Hydroxybutyric.acid	GC-MS	NA	NA	1.60	1.03	2.57	0.040	0.326						
X2.Ketoisocaproic.acid	GC-MS	NA	NA	0.63	0.40	0.96	0.037	0.326						
Glycolic.acid	GC-MS	NA	NA	2.35	1.44	3.98	0.001	0.058	2.66	1.56	4.87	0.000	0.001	Glycolic acid
Oleic.acid	GC-MS	NA	NA	1.71	1.06	2.89	0.036	0.326						
Palmitoleic.acid	GC-MS	NA	NA	2.02	1.19	3.68	0.014	0.323						
Threonic.acid	GC-MS	NA	NA	1.79	1.07	3.25	0.037	0.326						
Unknown_11.04	GC-MS	NA	NA	0.65	0.43	0.99	0.043	0.326						
X495.3332.5.817994	LC-MS ESI+	495.3332	5.817994	0.38	0.21	0.64	0.001	0.027	0.32	0.16	0.59	0.000	0.001	LPC(16:0) d
X545.3479.5.8089995	LC-MS ESI+	545.3479	5.8089995	0.45	0.25	0.75	0.004	0.082	0.36	0.18	0.65	0.001	0.0023	LysoPC(20:3)
X103.0998.5.8220115	LC-MS ESI+	103.0998	5.8220115	0.41	0.24	0.65	0.000	0.027	0.34	0.19	0.59	0.000	0.001	Unknown
X543.3325.5.4619956	LC-MS ESI+	543.3325	5.4619956	0.41	0.22	0.70	0.002	0.064	0.49	0.25	0.91	0.032	0.035	LysoPC(20:4) d
X523.3638.6.3559937	LC-MS ESI+	523.3638	6.3559937	0.47	0.28	0.76	0.003	0.072	0.42	0.24	0.70	0.001	0.002	PC(18:0/0:0)
X495.3325.5.666006	LC-MS ESI+	495.3325	5.666006	0.37	0.21	0.63	0.000	0.027	0.32	0.16	0.59	0.000	0.001	PC(16:0/0:0)
X543.3322.5.5649934	LC-MS ESI+	543.3322	5.5649934	0.39	0.21	0.67	0.001	0.044	0.39	0.21	0.69	0.002	0.003	LysoPC(20:4)
X444.3049.0.28200057	LC-MS ESI+	444.3049	0.28200057	0.53	0.29	0.90	0.027	0.413						
X523.3639.6.5389843	LC-MS ESI+	523.3639	6.5389843	0.48	0.28	0.78	0.004	0.082	0.43	0.24	0.71	0.0017	0.0023	PC(18:0/0:0) d
X567.3322.5.5489993	LC-MS ESI+	567.3322	5.5489993	0.44	0.25	0.73	0.002	0.064	0.32	0.17	0.57	0.000	0.001	PC(22:6/0:0)

X1080.6339.5.817994	LC-MS ESI+	1080.633	5.817994	0.40	0.23	0.65	0.000	0.027	0.33	0.17	0.58	0.000	0.001	Unknown
X585.3021.5.818982	LC-MS ESI+	585.3021	5.818982	0.40	0.23	0.65	0.000	0.027	0.33	0.17	0.59	0.000	0.001	Unknown
X161.1048.0.31000045	LC-MS ESI+	161.1048	0.31000045	1.80	1.13	2.90	0.013	0.221						
X203.1169.0.30899903	LC-MS ESI+	203.1169	0.30899903	1.62	1.03	2.63	0.043	0.445						
X532.3545.0.2809992	LC-MS ESI+	532.3545	0.2809992	0.61	0.37	0.98	0.049	0.486						
X488.3314.0.28200057	LC-MS ESI+	488.3314	0.28200057	0.57	0.33	0.94	0.035	0.445						
X183.0871.0.29700062	LC-MS ESI+	183.0871	0.29700062	1.65	1.03	2.67	0.037	0.445						
X117.0789.0.3079994	LC-MS ESI+	117.0789	0.3079994	1.65	1.02	2.70	0.043	0.445						
X103.0999.6.541007	LC-MS ESI+	103.0999	6.541007	0.50	0.30	0.80	0.005	0.097	0.59	0.33	1.04	0.069	0.069	Unknown
X649.4327.6.779012	LC-MS ESI+	649.4327	6.779012	1.72	1.05	2.96	0.040	0.445						
X185.204.0.26200023	LC-MS ESI+	185.204	0.26200023	0.63	0.40	0.98	0.042	0.445						
X664.4305.0.2809992	LC-MS ESI+	664.4305	0.2809992	0.58	0.34	0.93	0.029	0.428						
X121.9565.0.34299982	LC-MS ESI+	121.9565	0.34299982	0.59	0.35	0.94	0.033	0.445						
X103.0997.6.3559937	LC-MS ESI+	103.0997	6.3559937	0.42	0.25	0.69	0.001	0.031	0.38	0.21	0.63	0.000	0.001	Unknown
X525.2854.5.403004	LC-MS ESI+	525.2854	5.403004	0.48	0.29	0.76	0.003	0.067	0.46	0.26	0.78	0.005	0.006	PE(22:6(0:0))
X130.063.0.25799963	LC-MS ESI-	130.063	0.25799963	0.61	0.34	0.88	0.020	0.480						
X472.062.0.26200023	LC-MS ESI-	472.062	0.26200023	0.59	0.36	0.91	0.022	0.480						
X546.0626.0.2589997	LC-MS ESI-	546.0626	0.2589997	0.63	0.39	0.99	0.048	0.577						
X196.1455.0.257	LC-MS ESI-	196.1455	0.257	0.60	0.35	0.97	0.047	0.577						
X194.1293.0.25500023	LC-MS ESI-	194.1293	0.25500023	0.56	0.33	0.90	0.021	0.480						
X515.2919.3.5839999	LC-MS ESI-	515.2919	3.5839999	2.63	1.58	4.65	0.000	0.084	3.62	1.96	7.30	0.000	0.001	Taurocholic acid
X113.9929.0.22700024	LC-MS ESI-	113.9929	0.22700024	0.60	0.38	0.93	0.023	0.480						
X482.0907.0.2560003	LC-MS ESI-	482.0907	0.2560003	0.60	0.38	0.93	0.024	0.480						
X184.1087.0.257	LC-MS ESI-	184.1087	0.257	0.59	0.37	0.93	0.026	0.480						
X108.0572.0.24200036	LC-MS ESI-	108.0572	0.24200036	0.60	0.37	0.94	0.028	0.480						
X220.8528.0.41899928	LC-MS ESI-	220.8528	0.41899928	1.65	1.03	2.77	0.045	0.577						
X183.9957.0.22900008	LC-MS ESI-	183.9957	0.22900008	0.55	0.35	0.87	0.011	0.480						
X574.0573.2.8510072	LC-MS ESI-	574.0573	2.8510072	1.81	1.11	2.98	0.018	0.480						

X173.9992.0.24000041	LC-MS ESI-	173.9992	0.24000041	0.54	0.35	0.82	0.004	0.412					
X150.0167.9.493017	LC-MS ESI-	150.0167	9.493017	0.56	0.32	0.90	0.020	0.480					
X240.0702.9.838995	LC-MS ESI-	240.0702	9.838995	0.61	0.38	0.96	0.037	0.546					
X427.9751.0.27199957	LC-MS ESI-	427.9751	0.27199957	0.60	0.37	0.95	0.033	0.531					

Additional File 11. Summary of unadjusted and adjusted associations between plasma metabolites and hepatic decompensation (CTP ≥ 7).

Metabolite	Technology	Unadjusted model			Adjusted model		
		OR (95%CI)	p-value	q-value	aOR (95%CI)	p-value	q-value
Glycolic acid	GC-MS	3.09 (1.55-6.16)	0.001	0.011	6.28 (1.74-22.62)	0.005	0.020
LPC(20:3)	LC-MS ESI+	0.64 (0.34-1.20)	0.165	0.220	0.06 (0.01-0.62)	0.018	0.032
LPC(18:0)	LC-MS ESI+	0.54 (0.29-1.02)	0.058	0.116	0.40 (0.13-1.25)	0.114	0.151
LPC(16:0)	LC-MS ESI+	0.45 (0.23-0.89)	0.021	0.055	0.11 (0.02-0.51)	0.005	0.020
LPC(20:4)	LC-MS ESI+	0.61 (0.32-1.17)	0.137	0.219	0.03 (0.01-0.59)	0.020	0.032
LPC(22:6)	LC-MS ESI+	0.79 (0.43-1.44)	0.441	0.441	0.65 (0.28-1.47)	0.295	0.295
LPE (22:6)	LC-MS ESI+	0.70 (0.40-1.26)	0.235	0.269	0.67 (0.32-1.41)	0.287	0.295
Taurocholic acid	LC-MS ESI-	2.91 (1.42-5.97)	0.004	0.014	4.52 (1.47-13.90)	0.009	0.023

Statistics: Values are expressed as odds ratio and 95% confidence interval. P-values were calculated by Generalized Linear Models (GLM) with binomial distribution; q-values represent p-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Adjusted models were adjusted by the most significant clinical and epidemiological characteristics (see Statistical analysis section). Statistically significant differences are shown in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; q-value, corrected level of significance; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine.

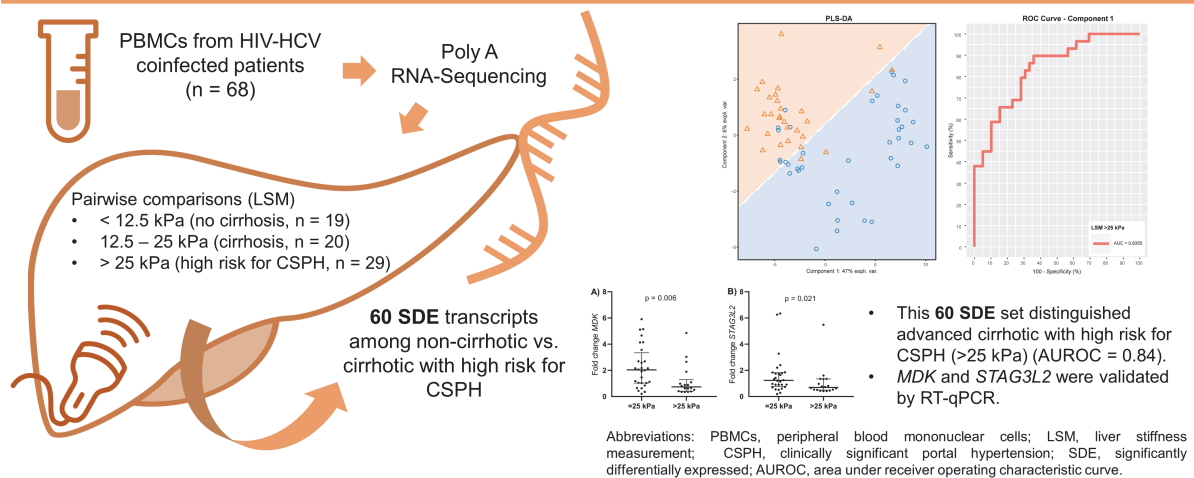
Additional File 12. Correlation between bacteria-related metabolites and bacterial translocation and infection.

Metabolite	LPS		LBP		IL6	
	r	p	r	p	r	p
2-Hydroxybutyric acid	-0.017	0.871	0.118	0.269	-0.008	0.937
3-Hydroxybutyric acid	-0.060	0.572	0.265	0.012	0.175	0.099
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	-0.091	0.392	0.065	0.540	0.278	0.008
2,3-Butanediol	-0.063	0.558	-0.011	0.918	0.362	<0.001
N-(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid	0.254	0.016	0.012	0.914	-0.011	0.921

Statistics: P-values were calculated by Spearman correlation. Statistically significant differences are shown in bold. Abbreviations: r, Spearman correlation coefficient; p, level of significance; LPS, lipopolysaccharide; LBP, lipopolysaccharide binding protein; IL6, interleukin 6.

Apéndice C: Resumen gráfico - PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfectd patients: A cross-control study [112]

PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfectd patients: a cross-control study



Conclusion: A gene expression signature of 60 SDE transcripts was related to cirrhosis with high risk for CSPH in HIV/HCV coinfectd patients. Of these, *MDK* and *STAG3L2* showed a good discriminative value.

Apéndice D: Información suplementaria - PBMCs gene expression signature of advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension in HIV/HCV coinfecting patients: A cross-control study [112]

Supplementary Table 1. Unadjusted differences between LSM strata (<12.5 kPa vs. ≥25 kPa) in transcript expressions (counts) in peripheral blood mononuclear cells from HIV/HCV-coinfecting individuals.

Gene symbol	LSM strata (<12.5 kPa vs. ≥25 kPa)			
	FC	Log ₂ (FC)	p-value *	q-value **
<i>AD000090.1</i>	0.29	-1.79	≤0.001	0.014
<i>TMSB10P1</i>	0.41	-1.29	≤0.001	0.014
<i>RPL10AP2</i>	0.44	-1.17	≤0.001	0.033
<i>AC005019.1</i>	0.45	-1.17	≤0.001	0.018
<i>TPT1P9</i>	0.54	-0.88	≤0.001	0.025
<i>RPL3P4</i>	0.54	-0.89	≤0.001	0.030
<i>MIR7111</i>	0.55	-0.86	≤0.001	0.020
<i>NACA3P</i>	0.56	-0.85	0.001	0.048
<i>EEF1A1P4</i>	0.57	-0.80	≤0.001	0.020
<i>EEF1A1P6</i>	0.57	-0.82	≤0.001	0.026
<i>EEF1A1P12</i>	0.58	-0.77	≤0.001	0.035
<i>THTPA</i>	0.60	-0.74	≤0.001	0.013
<i>EEF1A1P1</i>	0.60	-0.75	≤0.001	0.014
<i>AC016586.1</i>	0.60	-0.74	≤0.001	0.032
<i>AL391244.2</i>	0.60	-0.74	0.001	0.045
<i>ZFHX2-AS1</i>	0.61	-0.70	≤0.001	0.004
<i>RPL23AP74</i>	0.61	-0.72	≤0.001	0.032
<i>PABPC3</i>	0.61	-0.72	0.001	0.041
<i>MDK</i>	0.63	-0.68	≤0.001	0.020
<i>STAG3L2</i>	0.64	-0.64	≤0.001	0.014
<i>JMJD7-PLA2G4B</i>	0.65	-0.63	≤0.001	0.018
<i>RPL4P4</i>	0.65	-0.61	≤0.001	0.031
<i>GTF2A1</i>	1.50	0.59	≤0.001	0.018
<i>SDCBP</i>	1.51	0.59	0.001	0.039
<i>FAM174A</i>	1.51	0.59	0.001	0.041
<i>SLC16A7</i>	1.51	0.60	0.001	0.041
<i>PGRMC2</i>	1.51	0.59	0.001	0.041
<i>NXT2</i>	1.52	0.61	≤0.001	0.013
<i>SCAMP1</i>	1.53	0.62	≤0.001	0.004
<i>TENT5C</i>	1.53	0.62	≤0.001	0.032
<i>ARL15</i>	1.53	0.61	0.001	0.043
<i>EMB</i>	1.54	0.62	≤0.001	0.012
<i>MMD</i>	1.55	0.64	≤0.001	0.014
<i>IER3IP1</i>	1.55	0.63	≤0.001	0.014
<i>SLC39A8</i>	1.55	0.63	≤0.001	0.021
<i>NDUFC2</i>	1.55	0.63	≤0.001	0.023

<i>AC000123.3</i>	1.55	0.63	≤0.001	0.031
<i>EEF1E1</i>	1.55	0.64	≤0.001	0.037
<i>ABHD17B</i>	1.56	0.64	≤0.001	0.004
<i>CASD1</i>	1.56	0.64	≤0.001	0.037
<i>FBXO5</i>	1.58	0.66	≤0.001	0.019
<i>NUDT15</i>	1.58	0.66	≤0.001	0.026
<i>ZNF680</i>	1.58	0.66	0.001	0.045
<i>EIF5A2</i>	1.60	0.67	≤0.001	0.011
<i>GPR146</i>	1.60	0.67	0.001	0.047
<i>TMEM64</i>	1.61	0.68	≤0.001	0.011
<i>AC145207.5</i>	1.67	0.74	≤0.001	0.030
<i>AC244090.1</i>	1.70	0.77	0.001	0.044
<i>Z99129.4</i>	1.71	0.77	≤0.001	0.018
<i>AC090198.1</i>	1.77	0.82	≤0.001	0.032
<i>PDE4D</i>	1.81	0.86	≤0.001	0.015
<i>AREG</i>	1.81	0.85	0.001	0.047
<i>AC093827.1</i>	1.93	0.95	≤0.001	0.029
<i>EMBP1</i>	1.93	0.95	0.001	0.047
<i>AL391834.2</i>	1.95	0.97	≤0.001	0.037
<i>HDGFL3</i>	1.96	0.97	≤0.001	0.017
<i>AC126474.2</i>	2.02	1.02	≤0.001	0.011
<i>AC115223.1</i>	2.06	1.04	0.001	0.045
<i>FP565260.6</i>	2.12	1.08	≤0.001	0.019
<i>DLL1</i>	2.18	1.12	≤0.001	0.019

Statistics: Values are expressed as fold-change (FC) and its \log_2 . (*), raw p -values. (**), p -values corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) with Benjamini and Hochberg procedure (q -values).

Abbreviations. HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; LSM, liver stiffness measure.

Supplementary Table 2. Unadjusted association between transcript expressions (counts) in peripheral blood mononuclear cells and LSM values (kPa) from all HIV/HCV-coinfected individuals.

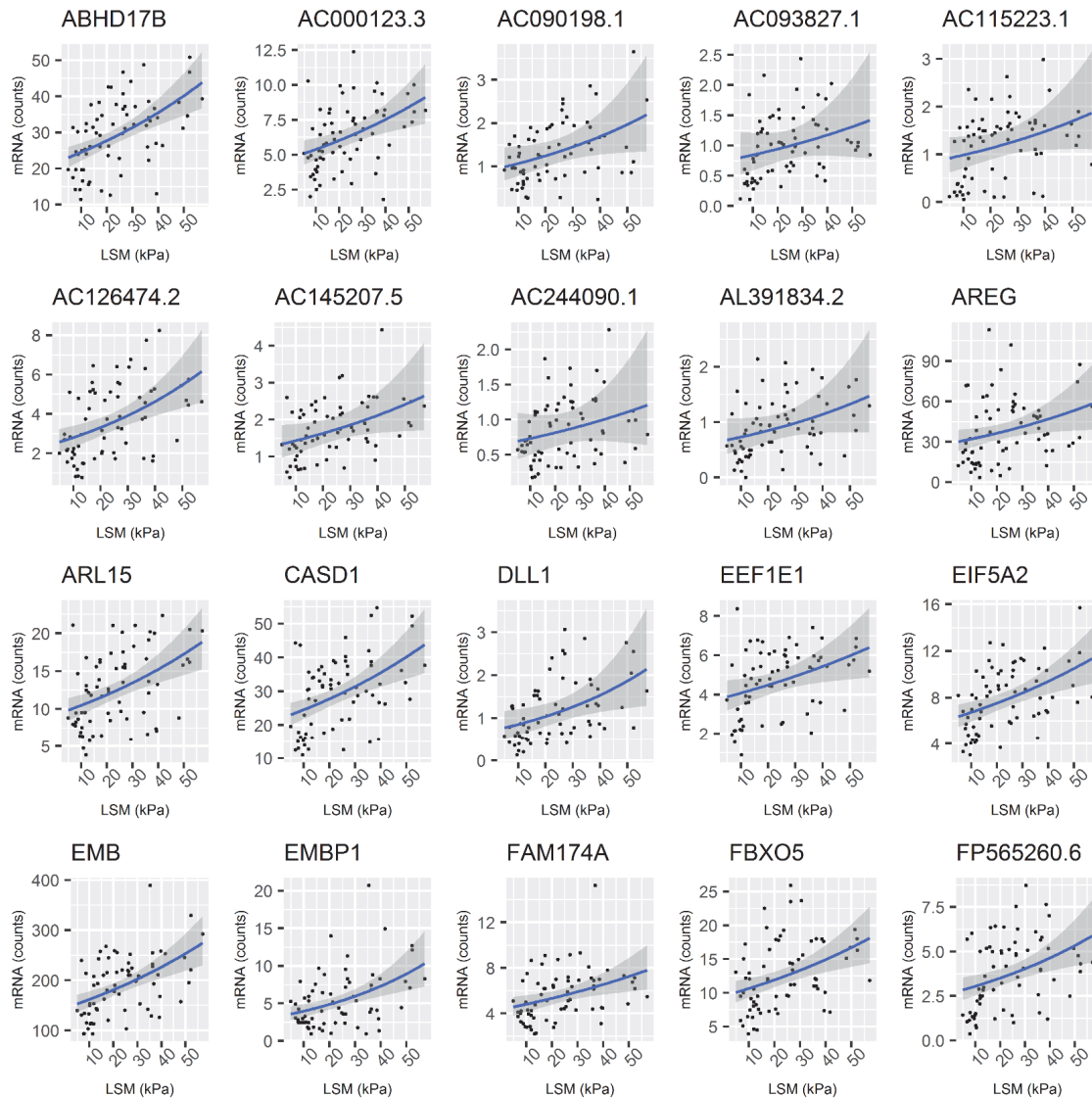
Gene symbol	AMR	95%CI	<i>p</i> -value *	<i>q</i> -value **
<i>AD000090.1</i>	0.95	0.93; 0.97	≤0.001	≤0.001
<i>TMSB10P1</i>	0.97	0.96; 0.98	≤0.001	≤0.001
<i>RPL10AP2</i>	0.97	0.96; 0.99	0.002	0.003
<i>AC005019.1</i>	0.97	0.96; 0.99	0.001	0.001
<i>TPT1P9</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	≤0.001
<i>RPL3P4</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	0.001
<i>MIR7111</i>	0.98	0.97; 0.99	0.002	0.003
<i>NACA3P</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	0.001
<i>EEF1A1P4</i>	0.98	0.97; 0.99	0.001	0.002
<i>EEF1A1P6</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	0.001
<i>EEF1A1P12</i>	0.98	0.97; 0.99	0.001	0.002
<i>THTPA</i>	0.98	0.98; 0.99	≤0.001	≤0.001
<i>EEF1A1P1</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	≤0.001
<i>AC016586.1</i>	0.98	0.97; 0.99	0.005	0.006
<i>AL391244.2</i>	0.99	0.98; 1	0.012	0.013
<i>ZFHX2-AS1</i>	0.98	0.98; 0.99	≤0.001	≤0.001
<i>RPL23AP74</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	0.001
<i>PABPC3</i>	0.98	0.97; 0.99	≤0.001	0.001
<i>MDK</i>	0.98	0.98; 0.99	≤0.001	0.001
<i>STAG3L2</i>	0.99	0.98; 0.99	≤0.001	0.001
<i>JMJD7-PLA2G4B</i>	0.99	0.98; 0.99	≤0.001	0.001
<i>RPL4P4</i>	0.99	0.98; 0.99	≤0.001	0.001
<i>GTF2A1</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>SDCBP</i>	1.01	1; 1.02	0.005	0.005
<i>FAM174A</i>	1.01	1; 1.02	0.002	0.003
<i>SLC16A7</i>	1.01	1; 1.02	0.003	0.003
<i>PGRMC2</i>	1.01	1; 1.02	0.004	0.005
<i>NXT2</i>	1.01	1; 1.01	≤0.001	0.001
<i>SCAMP1</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>TENT5C</i>	1.01	1.01; 1.02	0.001	0.002
<i>ARL15</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>EMB</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>MMD</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>IER3IP1</i>	1.01	1; 1.02	0.003	0.003
<i>SLC39A8</i>	1.01	1; 1.02	0.002	0.003
<i>NDUFC2</i>	1.01	1; 1.02	0.005	0.005
<i>AC000123.3</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>EEF1E1</i>	1.01	1; 1.02	0.002	0.003
<i>ABHD17B</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>CASD1</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>FBXO5</i>	1.01	1; 1.02	0.002	0.003
<i>NUDT15</i>	1.01	1; 1.02	0.003	0.004
<i>ZNF680</i>	1.01	1.01; 1.02	0.001	0.001
<i>EIF5A2</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001

<i>GPR146</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>TMEM64</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>AC145207.5</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>AC244090.1</i>	1.01	1; 1.02	0.018	0.018
<i>Z99129.4</i>	1.01	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>AC090198.1</i>	1.02	1.01; 1.02	≤0.001	0.001
<i>PDE4D</i>	1.01	1; 1.02	0.003	0.003
<i>AREG</i>	1.01	1; 1.03	0.034	0.034
<i>AC093827.1</i>	1.01	1; 1.02	0.015	0.015
<i>EMBP1</i>	1.02	1.01; 1.03	≤0.001	0.001
<i>AL391834.2</i>	1.01	1.01; 1.02	0.002	0.003
<i>HDGFL3</i>	1.02	1.01; 1.03	0.001	0.002
<i>AC126474.2</i>	1.02	1.01; 1.02	≤0.001	≤0.001
<i>AC115223.1</i>	1.01	1; 1.02	0.007	0.008
<i>FP565260.6</i>	1.01	1.01; 1.02	0.002	0.003
<i>DLL1</i>	1.02	1.01; 1.03	≤0.001	≤0.001

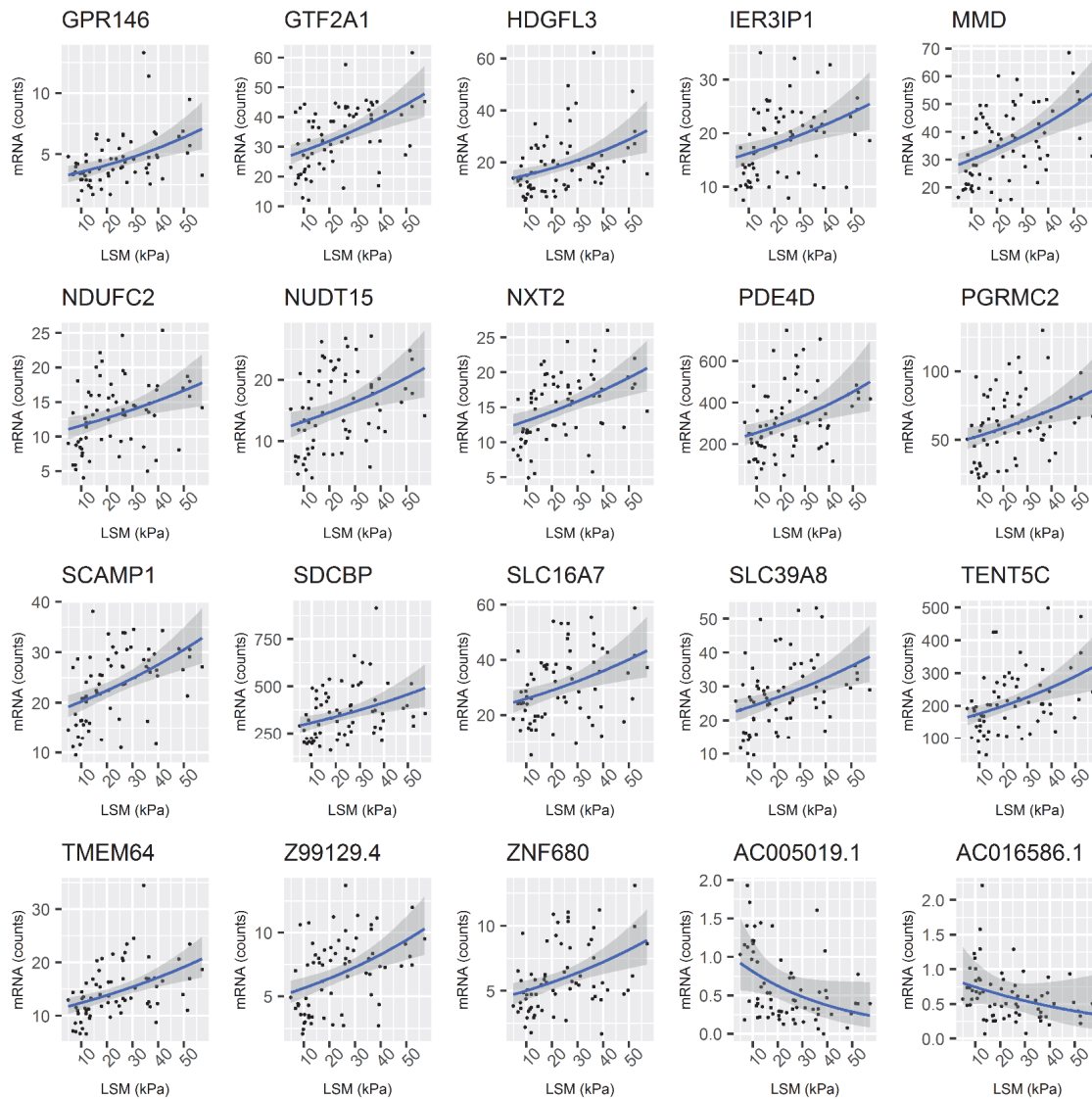
Statistics: Values are expressed as the arithmetic mean ratio (AMR) and 95% confidence interval (95%CI). (*), raw *p*-values. (**), *p*-values corrected for multiple testing using the false discovery rate (*FDR*) with Benjamini and Hochberg procedure (*q*-values).

Abbreviations. HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; LSM, liver stiffness measure.

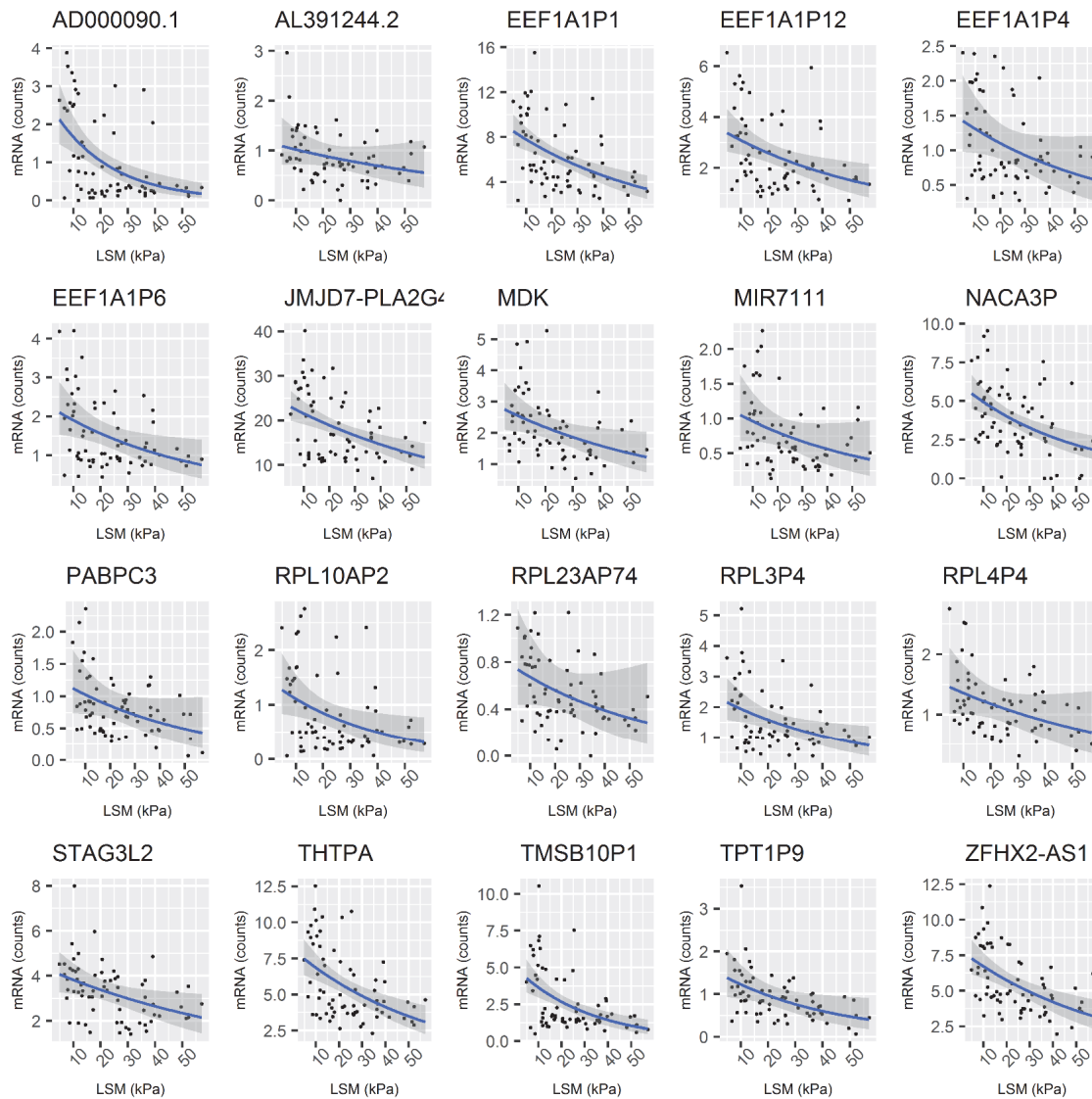
Supplementary Figure 1. Relationship between the expression values (normalized mRNA counts) of 60 significantly differentially expressed (SDE) transcripts measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver stiffness measurement (LSM) values in HIV/HCV-coinfected patients. Transcripts are alphabetically sorted, showing those positively associated with LSM values, followed by transcripts with inverse association with LSM values.



Supplementary Figure 1 (continued). Relationship between the expression values (normalized mRNA counts) of 60 significantly differentially expressed (SDE) transcripts measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver stiffness measurement (LSM) values in HIV/HCV-coinfected patients. Transcripts are alphabetically sorted, showing those positively associated with LSM values, followed by transcripts with inverse association with LSM values.



Supplementary Figure 1 (continued). Relationship between the expression values (normalized mRNA counts) of 60 significantly differentially expressed (SDE) transcripts measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver stiffness measurement (LSM) values in HIV/HCV-coinfected patients. Transcripts are alphabetically sorted, showing those positively associated with LSM values, followed by transcripts with inverse association with LSM values.



Supplementary Table 3. Clinical, epidemiological, and virological characteristics of HIV/HCV-coinfected patients in training set according to values of LSM.

	All	<25 kPa	≥25 kPa	p-value
No.	68	39	29	
Gender (male)	48 (70.6%)	27 (69.2%)	21 (72.4%)	0.776
Age (years)	50.5 (47; 53)	50 (46; 53)	51 (48.7; 53.5)	0.281
BMI (kg/m²) (n = 65)	23.8 (21.7; 25.5)	24.1 (21.3; 25.8)	23.3 (21.8; 25.6)	0.648
BMI ≥25 (kg/m²) (n = 65)	21 (32.3%)	12 (32.4%)	9 (63.1%)	0.980
Alcohol consumed ever	36 (52.9%)	19 (48.7%)	17 (58.6%)	0.418
Intravenous drug user	57 (83.8%)	32 (82.1%)	25 (86.2%)	0.645
Previous HCV therapy	30 (44.1%)	20 (51.3%)	10 (34.5%)	0.168
HIV antiretroviral therapy				0.068
NRTI + II-based	29 (42.6%)	15 (38.5%)	14 (48.3%)	
NRTI + NNRTI-based	11 (16.2%)	9 (23.1%)	2 (6.9%)	
NRTI + PI-based	7 (10.3%)	3 (7.7%)	4 (13.8%)	
PI-based	7 (10.3%)	5 (12.8%)	2 (6.9%)	
PI + II-based	4 (5.9%)	4 (10.3%)	0 (0%)	
Others	10 (14.7%)	3 (7.7%)	7 (24.1%)	
HIV markers				
Nadir CD4+ T-cells (n = 67)	122 (71; 224)	135 (60; 260)	114.7 (94.5; 176)	0.741
CD4+ T-cells/mm³	520.5 (279.5; 822.5)	530 (297; 810)	434 (246; 891)	0.607
HCV markers				
HCV genotype (n = 66)				0.576
1	40 (60.6%)	25 (64.1%)	15 (55.6%)	
2	1 (1.5%)	0 (0%)	1 (3.7%)	
3	15 (22.7%)	9 (23.1%)	6 (22.2%)	
4	10 (15.2%)	5 (12.8%)	5 (18.5%)	
Log₁₀ HCV-RNA (IU/mL)	6.4 (5.8; 6.6)	6.3 (5.7; 6.6)	6.4 (6; 6.7)	0.303
HCV-RNA > 850.000 IU/mL	48 (70.6%)	26 (66.7%)	22 (75.9%)	0.410
LSM (Kpa)	21 (11.9; 34.6)	12.8 (9.8; 17.8)	36.3 (27.7; 39.7)	<0.001
Biochemical markers				
Triglycerides (mg/dL)	114 (79; 161)	110 (75.7; 160.7)	115 (81; 183)	0.555
Total cholesterol (mg/dL)	151 (123; 174)	167 (136; 194)	130.5 (105.5; 156.5)	0.001

LDL (mg/dL)	74.5 (56; 104)	94 (65; 107)	60 (53.5; 84)	0.037
HDL (mg/dL)	44.5 (34; 58)	50 (36.5; 58.5)	37 (27; 50.5)	0.030

Statistics: The values are expressed as the absolute number (percentage) and median (interquartile range). *P-values* were calculated by the Fisher's exact test and the Kruskal-Wallis test.

Abbreviations: BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; II, HIV integrase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, HIV protease inhibitor; LSM, liver stiffness measurement; HCV-RNA, viral load of hepatitis C; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

Supplementary Table 4. Summary of the predictive performance of peripheral blood gene expression (counts) for advanced cirrhosis with high risk for clinically significant portal hypertension (<25 kPa (n=39) vs. ≥25 kPa (n=29)) in HIV/HCV-coinfected individuals.

Gene	AUROC	95%CI	
<i>STAG3L2</i>	0.794	0.684	0.904
<i>MDK</i>	0.793	0.682	0.905
<i>ZFHX2-AS1</i>	0.791	0.684	0.898
<i>ABHD17B</i>	0.776	0.659	0.894
<i>GTF2A1</i>	0.772	0.652	0.891
<i>GPR146</i>	0.757	0.640	0.874
<i>SCAMP1</i>	0.753	0.632	0.875
<i>TMEM64</i>	0.752	0.636	0.867
<i>AC126474.2</i>	0.747	0.628	0.864
<i>FAM174A</i>	0.744	0.626	0.861
<i>AC145207.5</i>	0.743	0.624	0.862
<i>DLL1</i>	0.740	0.629	0.851
<i>AC000123.3</i>	0.733	0.606	0.860
<i>AC090198.1</i>	0.729	0.604	0.855
<i>HDGFL3</i>	0.729	0.616	0.843
<i>SLC39A8</i>	0.728	0.610	0.846
<i>FBXO5</i>	0.724	0.602	0.846
<i>AREG</i>	0.724	0.605	0.844
<i>MMD</i>	0.723	0.598	0.848
<i>TPT1P9</i>	0.722	0.605	0.840
<i>THTPA</i>	0.721	0.604	0.838
<i>ARL15</i>	0.718	0.588	0.848
<i>Z99129.4</i>	0.718	0.592	0.844
<i>SDCBP</i>	0.714	0.598	0.829
<i>AL391834.2</i>	0.713	0.584	0.841
<i>MIR7111</i>	0.712	0.592	0.832
<i>EEF1A1P1</i>	0.709	0.583	0.835
<i>EMBP1</i>	0.708	0.582	0.834
<i>NACA3P</i>	0.707	0.580	0.835
<i>PDE4D</i>	0.707	0.584	0.830
<i>AC115223.1</i>	0.704	0.581	0.827
<i>EMB</i>	0.702	0.574	0.830
<i>EIF5A2</i>	0.700	0.578	0.823
<i>FP565260.6</i>	0.698	0.570	0.825
<i>JMJD7- PLA2G4B</i>	0.698	0.577	0.818
<i>EEF1E1</i>	0.696	0.568	0.824
<i>NXT2</i>	0.691	0.562	0.821
<i>ZNF680</i>	0.689	0.555	0.822
<i>AC244090.1</i>	0.686	0.559	0.813
<i>AC093827.1</i>	0.684	0.557	0.812

<i>PGRMC2</i>	0.683	0.558	0.809
<i>CASD1</i>	0.681	0.551	0.810
<i>SLC16A7</i>	0.679	0.542	0.816
<i>AL391244.2</i>	0.679	0.553	0.805
<i>TENT5C</i>	0.677	0.549	0.806
<i>AC005019.1</i>	0.671	0.542	0.800
<i>EEF1A1P4</i>	0.670	0.542	0.799
<i>AD000090.1</i>	0.668	0.537	0.798
<i>TMSB10P1</i>	0.668	0.534	0.802
<i>AC016586.1</i>	0.658	0.525	0.791
<i>NDUFC2</i>	0.651	0.516	0.785
<i>NUDT15</i>	0.651	0.520	0.781
<i>RPL4P4</i>	0.649	0.516	0.782
<i>RPL10AP2</i>	0.648	0.512	0.784
<i>IER3IP1</i>	0.646	0.509	0.784
<i>EEF1A1P12</i>	0.646	0.510	0.782
<i>RPL23AP74</i>	0.646	0.514	0.778
<i>EEF1A1P6</i>	0.638	0.506	0.771
<i>RPL3P4</i>	0.633	0.500	0.766
<i>PABPC3</i>	0.613	0.478	0.747

Statistics: Values are expressed as the area under the curve - ROC (AUROC) and 95% confidence interval (95%CI).

Abbreviations. HCV: hepatitis C virus; HIV: human immunodeficiency virus.

Supplementary Table 5. Clinical, epidemiological, and virological characteristics of HIV/HCV-coinfected patients in the validation set according to values of LSM.

	All	≤25 kPa	>25 kPa	p-value
No.	46	27	19	
Gender (male)	31 (67.4%)	17 (63.0%)	14 (73.7%)	0.532
Age (years)	49.5 (47; 52)	49.6 (47.; 51)	49.4 (46; 52)	0.308
BMI (kg/m²) (n = 44)	22.3 (20.7; 24.8)	22.1 (20.6;24.5)	24.0 (20.8; 26.0)	0.616
BMI ≥25 (kg/m²) (n = 44)	10 (22.7%)	5 (18.5%)	5 (29.4%)	0.473
Alcohol consumed ever (n = 45)	21 (46.7%)	10 (38.5%)	11 (57.9%)	0.294
Intravenous drug user	37 (80.4%)	22 (81.5%)	15 (78.9%)	0.999
Previous HCV therapy	6 (13.0%)	0 (0%)	6 (31.6%)	0.003
HIV antiretroviral therapy				0.502
NRTI + II-based	16 (34.8%)	7 (26.0%)	9 (47.4%)	
NRTI + NNRTI-based	14 (30.4%)	8 (29.6%)	6 (31.6%)	
NRTI + PI-based	11 (23.9%)	8 (29.6%)	3 (15.8%)	
PI-based	2 (4.4%)	2 (7.4%)	0 (0%)	
PI + II-based	3 (6.5%)	2 (7.4%)	1 (5.2%)	
Others	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
HIV markers				
Nadir CD4+ T-cells (n = 45)	198 (89; 272)	198 (81; 251)	237 (101; 309)	0.501
CD4+ T-cells/mm³	612 (410; 781)	616 (417; 793)	608 (397; 720)	0.724
HCV markers				
HCV genotype (n = 45)				0.347
1	28 (62.2%)	14 (53.8%)	14 (73.7%)	
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
3	7 (15.6%)	6 (23.1%)	1 (5.3%)	
4	10 (22.2%)	6 (23.1%)	4 (21.0%)	
Log₁₀ HCV-RNA (IU/mL) (n = 45)	6.2 (5.7; 6.7)	6.3 (5.7; 6.7)	6.0 (5.7; 6.6)	0.999
HCV-RNA > 850,000 IU/mL (n = 45)	30 (66.7%)	17 (65.4%)	13 (68.4%)	0.999
LSM (Kpa)	17.5 (11.5; 29.4)	12.0 (9.5; 15.6)	33.3 (27.0; 35.3)	<0.001

Biochemical markers

Triglycerides (mg/dL) (n = 43)	113 (88; 156)	110 (77; 154)	128 (92; 158)	0.456
Total cholesterol (mg/dL) (n = 41)	158 (139; 181)	172 (149; 193)	140 (114; 154)	0.005
LDL (mg/dL) (n = 37)	86 (62; 100)	88 (69; 108)	79 (62; 100)	0.337
HDL (mg/dL) (n = 37)	42 (31; 59)	49 (39; 59)	36 (30; 51)	0.041

Statistics: The values are expressed as the absolute number (percentage) and median (interquartile range). *P-values* were calculated by the Fisher's exact test and the Mann-Whitney test.

Abbreviations: BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; NRTI, nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; IL, HIV integrase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside analogue HIV reverse transcriptase inhibitor; PI, HIV protease inhibitor; LSM, liver stiffness measurement; HCV-RNA, viral load of hepatitis C; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.