




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

*Determinación del papel de los microRNAs en el desarrollo de daño hepático en
pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1*

AUTORA: Daniela Buccione

DIRIGIDA POR

Dra M^a Cristina Tural Llacher

Dr Miguel Angel Martínez de la Sierra

TUTOR

Dr Jordi Tor Aguilera

Barcelona, 2022

AGRADECIMIENTOS

Que difícil es poner orden en esta lista. Ciertamente es que este orden no marcará la importancia de las personas que voy a agradecer.

Creo que, de alguna manera, el Prof. Trevisani, médico internista de Bologna, es el culpable inicial de todo este proyecto. Me introdujo al mundo de la investigación clínica y me hizo conocer las hepatopatías.

Volviendo a la actualidad, a nivel profesional les debo muchísimo a la Doctora Franco y al Doctor Martínez. Sin ellos este proyecto de tesis doctoral no hubiera sido posible. Ambos han estado activamente implicados en todo el proyecto desde el minuto cero. Son coautores y responsables del estudio. Se ocuparon de los aspectos más técnicos de investigación de esta tesis, llevando a cabo la secuenciación masiva de los miRNAs y en definitiva realizando todo el estudio de biología molecular.

Un agradecimiento especial va a la Doctora Tural, por su paciencia y su constante energía y por creer en mí, a pesar de los retrasos y de los baches que he ido encontrando.

Al Doctor Toni Jou, que me acompañó al empezar la recogida de los primeros datos. En su momento me demostró su gran disponibilidad. Le doy las gracias también por su dedicación y por haberme transmitido el amor a la ciencia, después de años de investigación y asistencia. Gracias al Doctor Tor, por insistir en la importancia de emprender el camino del proyecto de tesis doctoral.

Les doy las gracias a todos mis compañeros de trabajo, desde residentes hasta adjuntos, que me han apoyado y a veces soportado cuando estaba cansada.

Gracias a mis compañeras Carol Tudela y Laia Llobera. Por haberme ayudado a encontrar tiempo donde no lo había y también por haberme ayudado en la gestión de algún trámite burocrático de último momento.

La verdad es que pienso que alcanzar una meta algo inesperada como esta, después de años, es un logro. Por esto hay que compartirla con todos los que, de alguna manera, en mayor o menor medida, han podido aportar algo al proyecto. No me equivoco si digo ¡gracias Hospital Germans Trias i Pujol!

Sonará algo raro decirlo, pero le doy las gracias al SARS CoV-2. Me contagié en la etapa final de la redacción de la tesis y la cuarentena inesperada me ayudó a finalizarla.

Gracias a toda mi familia, que desde la distancia siempre ha estado apoyándome.

Un grazie speciale al mio papà, che mi é stato sempre vicino con la sua dolcezza, dimostrandomi grande curiosità e interesse per quello che facevo.

Gianluca, no sé como darte las gracias. Lo hago en castellano, ya que se ha convertido en nuestro segundo idioma y también porque, hablando de tesis, es el idioma de esta aventura. Gracias por haberme apoyado psicológicamente, mentalmente y también informáticamente en la elaboración final de la tesis. Gracias por estar y por soportarme cuando se me acababan las pilas.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAD: antivirales de acción directa.

ALT: alanina aminotransferasa.

APRI: *Aspartate aminotransferase to platelet ratio index.*

AST: aspartato aminotransferasa.

AUC: *area under the curve.*

CAP: *controlled attenuation parameter.*

CHC: carcinoma hepatocelular.

DDI: didanosina.

ECV: enfermedad cardiovascular.

EHGNA: esteatosis hepática grasa no alcohólica.

EHNA: esteato-hepatitis no alcohólica.

ELF: enhanced liver fibrosis.

ET: elastografía hepática transitoria.

FDA: *Food and Drugs Administration.*

FIB-4: Fibrosis-4.

GGT: gamma glutamil transpeptidasa.

HNR: hiperplasia nodular regenerativa

HPNC: hipertensión portal no cirrótica.

HSH: hombres que tienen sexo con hombres.

IFN: interferón.

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos.

HTP: hipertensión portal.

miRNA: microRNA.

microRNA: ácido desoxirribonucleico pequeño.

NAFLD: *no alcoholic fatty liver disease*.

NASH: *no alcoholic steatohepatitis*.

(PEG)-IFN: interferón pegilado.

PIIINP: *Type III Procollagen Peptid*.

RIQ: rango intercuartílico.

RNA: ácido ribonucleico.

ROC: *receiver operating characteristic curve*.

RT-qPCR: *real time quantitative PCR*.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TAR: terapia antirretroviral de alta efectividad.

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad.

VHB: virus de la hepatitis B.

VHC: virus de la hepatitis C.

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Hepatopatía en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1</i>	3
1.1.1 <i>Afectación hepática asociada a la coinfección por virus hepatotropos</i>	3
1.1.2 <i>Virus de la hepatitis C</i>	4
1.1.2.1 Epidemiología.....	4
1.2.2 Historia natural	5
1.1.2.2 Tratamiento actual del VHC.....	7
1.1.3 <i>Coinfección VIH-1 y VHC</i>	8
1.1.3.1 Epidemiología.....	8
1.1.3.2 Historia natural	9
1.1.4 <i>Afectación hepática asociada al VIH-1</i>	11
1.1.4.1 Mecanismos directos de daño hepático	11
1.1.4.2 Agieng	14
1.1.4.3 Hepatotoxicidad del tratamiento antirretroviral	16
1.1.4.4 Hiperplasia nodular regenerativa como causa de hipertensión portal no cirrótica.....	18
1.1.4.5 Consumo de tóxicos	19
1.1.4.6 Hígado graso (esteatosis, esteatohepatitis y cirrosis)	21
1.2 <i>Diagnóstico de enfermedad hepática</i>	22
1.2.1 Biopsia hepática.....	22
1.2.2 Técnicas no invasivas	22
1.3 <i>Los marcadores de fibrosis hepática e hígado graso</i>	24
1.3.1 <i>Índices Bioquímicos</i>	24
1.3.1.1 Biomarcadores indirectos	24
1.3.1.2 Biomarcadores directos	25
1.4 <i>Biomarcadores</i>	26
1.5 <i>MicroRNAs</i>	26
1.5.1 Definición de los microRNAs	26
1.5.2 Función de los microRNAs	27
1.5.3 Técnicas para la determinación de microRNAs	29
1.5.4 Papel de los MicroRNAs como marcadores de enfermedades	32
2. HIPOTESIS	35
3. OBJETIVO	36
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	37
4.1. <i>Artículo 1</i>	37
4.2. <i>Artículo 2</i>	47

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	57
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	93
7. CONCLUSIONES	100
8. APLICACIONES Y PROYECTOS FUTUROS	101
9. BIBLIOGRAFÍA	104

RESUMEN

Existen en la actualidad múltiples marcadores no invasivos útiles en la predicción de fibrosis hepática. En la infección por VIH-1 la presencia de daño hepático se ve agravada por la coinfección por VHC, el consumo de alcohol y la propia terapia antirretroviral. Diversos estudios han demostrado que la infección por VIH-1/VHC y la replicación activa del VHC aceleran la evolución a cirrosis y aumentan la mortalidad. En los pacientes coinfectados con el VIH-1/VHC, por un lado, destaca la elevada frecuencia de esteatosis hepática no alcohólica y su consiguiente riesgo de progresión a cirrosis y, por otro lado, se asocia la incertidumbre de que la eliminación del VHC con los agentes antivirales directos (AADs) elimina el riesgo de complicaciones hepáticas. Estos antecedentes ponen de manifiesto la necesidad de disponer de mejores herramientas diagnósticas de progresión de hepatopatía. Diversos microRNAs (miRNAs) han sido asociados al desarrollo de fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma, tanto en modelos animales como en humanos. La importancia de la función y distribución de los miRNAs en distintos procesos celulares y las evidencias del papel que ejercen en la comunicación intercelular nos hace hipotetizar que los miRNAs circulantes son potenciales biomarcadores de progresión de hepatopatía. La posible implicación directa de estos miRNAs en procesos patológicos también los convierte en potenciales dianas terapéuticas.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido conocer la asociación de determinados miRNAs en pacientes infectados por el VIH-1 con o sin coinfección por el VHC, así como establecer el papel pronóstico de los mismos en la hepatopatía. Se trata de un estudio retrospectivo de cohorte de pacientes VIH-1 con o sin infección por el VHC, una población de mono infectados por el VHC y un grupo control de individuos sanos. Se han analizado variables clínicas, analíticas y anatomopatológicas y se ha determinado la presencia cualitativa y cuantitativa de miRNAs mediante técnicas de secuenciación masiva. Los resultados obtenidos se han analizado mediante técnicas estadísticas uni y multivariadas.

Nuestros resultados revelan que la mono infección por VIH-1 está asociada con una modificación del metabolismo hepático de los miRNAs circulantes, habiéndose detectado una sobre expresión de miRNAs asociados previamente a daño hepático. En particular, miR-193-5p, miR-125b-1-3p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-99a-5p y miR-122-3p, que se correlacionan significativamente con los niveles séricos de transaminasas y el estadio de fibrosis hepática. El 91% de los pacientes mono infectados por VIH-1 estaba recibiendo terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), hecho que impide discriminar los efectos hepatotóxicos producidos por el TARGA, aunque observamos diferencias entre pacientes VIH-1 positivos con niveles elevados y normales de transaminasas.

En los pacientes coinfectados por VIH-1/VHC se han detectado siete miRNAs asociados con un riesgo elevado de fibrosis hepática. En particular, los miRNAs 100-5p y 192-5p podrían ser útiles para elaborar algoritmos clínicos/biológicos pronósticos de progresión de hepatopatía en pacientes mono infectados con VIH-1 o coinfectados con VIH-1/VHC.

En conclusión, la determinación de miRNAs relacionados con daño hepático en pacientes infectados por el VIH-1 sin coinfección por virus hepatotropos sugiere un impacto directo del VIH-1 sobre el metabolismo hepático. Se ha encontrado una sobre expresión de los miRNAs 122-3p y 193b-5b en pacientes mono infectados con el VHC y en los mono infectados con el VIH-1 con ALT elevadas o con hiperplasia nodular regenerativa. Ambos miRNAs están asociados con el grado de elevación de las transaminasas y la gravedad de la fibrosis hepática. En la coinfección por VIH-1/VHC los miRNAs 122-3p y 193b-5b han mostrado una sensibilidad y especificidad superior al 85% en la predicción de progresión hepática. Nuestros resultados resaltan el potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores de daño hepático en pacientes infectados por el VIH-1 con o sin coinfección por el VHC.

ABSTRACT

Multiple non-invasive markers of liver fibrosis have shown their utility in predicting liver disease. In HIV-1 infected patients, the presence of liver damage is aggravated by HCV coinfection, alcohol abuse, and antiretroviral therapy. Several studies showed that in coinfecting HIV-1/HCV patients with active HCV replication, hepatopathy progress rapidly to cirrhosis, leading to higher mortality. In coinfecting HIV-1/HCV patients, on the one hand coexist a high frequency of non-alcoholic hepatic steatosis, and the consequent risk of progression to cirrhosis and liver damage and, on the other hand, the eradication of HCV infection, with direct antiviral agents (DAAs), not necessary results in the risk elimination of liver complications. According to these facts, we need to find better diagnostic tools for the progression of liver damage.

MicroRNAs (miRNAs) have been associated with liver fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinoma, both in animal models and in human studies. The miRNAs functions and its implication in different cellular processes, with the recent evidence of their role in cells communication, make us hypothesize that circulating miRNAs are potential biomarkers of progression liver disease. The possible direct role of these miRNAs in pathological processes also show their potential as therapeutic targets.

The main purpose of this study has been to know the prognostic role of certain miRNAs to determine liver complications in HIV-1 infected patients with or without HCV coinfection. We have performed a retrospective study in a cohort of HIV-1 patients with or without HCV infection, a population of HCV monoinfected patients, and a control group of healthy individuals. Clinical, analytical and pathological variables have been analyzed and the quantitative and qualitative presence of miRNAs has been determined, using NGS sequencing techniques. Results have been analyzed using univariate and multivariate statistical techniques.

Our data reveals a plasmatic overexpression of miRNAs previously associated with liver damage in HIV-1 monoinfected patients. Particularly, miR-193-5p, miR-125b-1-3p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-99a-5p and miR-122-3p were overexpressed. All these are significantly correlated with serum levels of transaminases and the stage of liver fibrosis. The main limitation of our study is given by the fact that 91% of the HIV-1 monoinfected patients were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART), a fact that does not allow to discriminate HAART hepatotoxic effects, although we observed differences between HIV-1 patients with elevated and normal levels of transaminase. In HIV-1/HCV coinfecting patients, a genetic signature of seven miRNAs associated with an elevated liver fibrosis risk has been found. Specifically, miRNAs 100-5p and 192-5p could be candidates for new clinical/biological algorithms to predict liver progression in relevant populations as HIV-1 monoinfected or HIV-1/HCV coinfecting patients.

In conclusion, the determination of circulating miRNAs related to liver damage in patients with HIV-1 infection and without hepatotropic virus coinfection suggests a direct impact of HIV-1 on liver metabolism. Mainly, an overexpression of miRNAs 122-3p and 193b-5b has been found in HCV monoinfected patients and in HIV-1 monoinfected patients with elevated ALT or regenerative nodular hyperplasia. Both miRNAs are associated with the degree of transaminases elevation and liver fibrosis severity. In a cohort of HIV-1/HCV co-infected patients, miRNAs 122-3p and 193b-5b have shown a sensitivity and specificity greater than 85% in predicting liver progression. Our results highlight the potential of some circulating miRNAs as biomarkers of liver damage in HIV-1 infected patients with or without HCV coinfection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hepatopatía en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Hoy en día se calcula que aproximadamente el 10-15% de las muertes en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) están relacionadas con las hepatopatías¹, ocupando la enfermedad hepática el segundo lugar como causa de muerte en pacientes infectados por el VIH-1, después de las complicaciones directas relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{2,3}. Lo más temible de la hepatopatía crónica es el desarrollo de complicaciones irreversibles, como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC). Estas complicaciones tienen una prevalencia no despreciable en los pacientes con infección por VIH-1 y representan una carga económica significativa para el sistema de sanidad público. En los pacientes infectados por el VIH-1 coinciden diversos factores etiológicos que afectan al tejido hepático. A las etiologías clásicas de hepatopatía, se añaden la propia infección por el VIH-1 y su tratamiento⁴. Cabe destacar que, desde el punto de vista analítico, unos niveles plasmáticos elevados de las enzimas hepáticas son hallazgo común en los pacientes con VIH-1, incluso en ausencia de hepatitis viral o abuso de alcohol⁵.

1.1.1 Afectación hepática asociada a la coinfección por virus hepatotropos

A nivel mundial, las infecciones crónicas por virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC) son responsables de más del 80-90% de todos los CHC, los cuales a su vez representan el 5% de todos los cánceres⁶. A pesar de la evidencia epidemiológica de que tanto el VHB como el VHC son responsables de la gran mayoría de CHC, el mecanismo de hepatocarcinogénesis viral

hoy en día se sigue entendiendo de forma incompleta¹. La infección por VHB es responsable de la mayor parte del CHC en los países no industrializados y, al contrario, el VHC es responsable de la mayor parte del CHC en los países industrializados⁷.

1.1.2 Virus de la hepatitis C

1.1.2.1 Epidemiología

El VHC es un patógeno de distribución mundial, con una seroprevalencia del 2,8%. Es un virus muy heterogéneo y hasta ahora se han detectado siete genotipos. La distribución de los genotipos difiere entre países y hay correlación entre la distribución y el nivel de desarrollo económico⁸⁻¹⁰. La distribución genotípica tiene implicaciones en el curso clínico y para el tratamiento y el desarrollo de fármacos. Los fármacos pangentotípicos son, en particular, necesarios en países no industrializados con recursos económicos mediano-bajos, donde el genotipo 1 representa menos de la mitad de todas las infecciones¹¹.

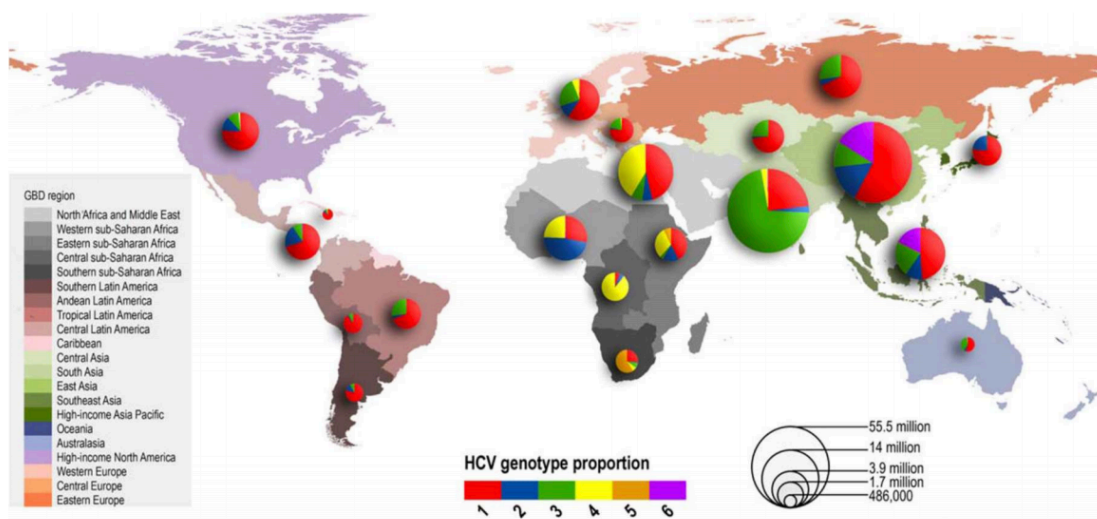


Figura 1 Prevalencia mundial de los genotipos del VHC¹².

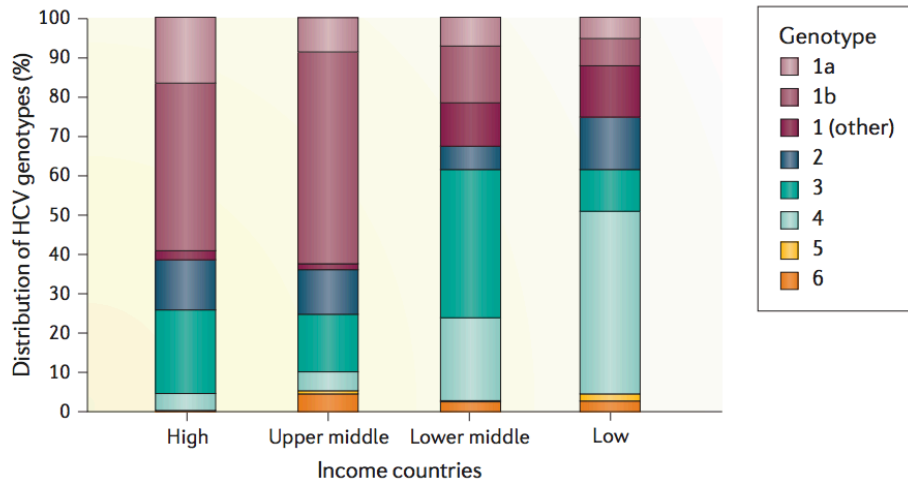


Figura 2 Distribución del genotipo del VHC en el mundo⁸.

Un estudio epidemiológico relativamente reciente estima que hay 8 millones de personas con cirrosis por infección crónica por VHC en el mundo y, de estos individuos, 750.000 progresarán a cirrosis descompensada y aproximadamente 410.000 personas desarrollarán un CHC¹³.

1.2.2 Historia natural

La principal vía de transmisión del VHC es la endovenosa por administración de drogas. El contagio se produce al compartir agujas de venopunción, pero también mediante la contaminación de otros objetos utilizados durante el proceso^{14,15}. La transmisión materno-fetal está poco estudiada, pero se estima entre el 2 y 8%^{16,17}. La transmisión heterosexual entre parejas discordantes es extremadamente baja, de aproximadamente 0,07 por año o 1 por cada 190.000 contactos sexuales¹⁸. En el escenario del VIH-1, la transmisión del VHC a través del consumo de drogas endovenosas también es la más frecuente. La coinfección por el VIH-1 aumenta de dos a cuatro veces la probabilidad de transmisión de VHC de madre a hijo, siendo la carga viral del VHC el principal factor pronóstico¹⁷. En relación con la transmisión entre hombres que tienen

sexo con hombres (HSH) parece estar asociado a ciertas prácticas sexuales (el *fisting*, el sexo grupal y la utilización de drogas recreativas). Asimismo, se ha demostrado que la coexistencia en el momento de la relación sexual de otras infecciones que comparten el mismo mecanismo de transmisión, como la sífilis o la infección por Chlamydia, que provocan erosiones muco-cutáneas, o la utilización de juguetes, aumentan la probabilidad de transmisión del VHC¹⁴.

La infección por VHC puede causar una hepatitis C aguda más o menos sintomática y posteriormente entre un 55-85% de los pacientes desarrolla una hepatitis C crónica¹⁹⁻²¹. Tras una infección aguda asintomática, aproximadamente un 15-45% de las personas infectadas elimina el virus espontáneamente en un plazo de seis meses, aunque la respuesta inmune contra el VHC resulta frecuentemente ineficaz, incluso en personas inmunocompetentes¹⁴. En el transcurso de 20 a 30 años, una proporción de estos pacientes (entre un 5 y un 20%) progresará a la cirrosis hepática y presentará complicaciones relacionadas con la insuficiencia hepática y posiblemente desarrollará un CHC (incidencia de 1-4% al año)^{22,23}. La progresión no es necesariamente un proceso lineal y puede ser acelerada por numerosos factores. El riesgo de desarrollar cirrosis aumenta con la edad, con el sexo masculino, el consumo de alcohol mayor a 50 gramos diarios, la presencia de obesidad o esteatosis hepática y la coinfección con otros virus, como el VHB y el VIH²⁴. La replicación viral del VHC no predice su curso natural, pero ha sido un predictor de respuesta a tratamiento, en particular, para el interferón pegilado (PEG)-IFN y de la ribavirina. Actualmente tiene menos importancia para el tratamiento con antivirales de alta efectividad libres de interferón (AADs). Sin embargo, los genotipos virales difieren en el curso clínico y en la

respuesta al tratamiento. La infección por el genotipo 3 del VHC parece tener un curso más agresivo y aumentar el riesgo de desarrollar un CHC, comparado con los otros genotipos.

1.1.2.2 Tratamiento actual del VHC

La investigación básica sobre el VHC ha ido aclarando etapas críticas del ciclo replicativo del virus y ha permitido llegar al desarrollo de los AADs, punto de inflexión en el tratamiento del VHC. Los AADs hoy en día representan la curación del VHC en la mayoría de las personas²⁵. Con el tiempo, el arsenal farmacológico para combatir la infección por VHC ha ido creciendo: entre enero de 2011 y noviembre de 2016, la FDA ha aprobado diez terapias y otras dos han sido aprobadas en Japón²⁶. Los tratamientos disponibles en España se ven ilustrados en el cronograma a continuación^{27,28}.

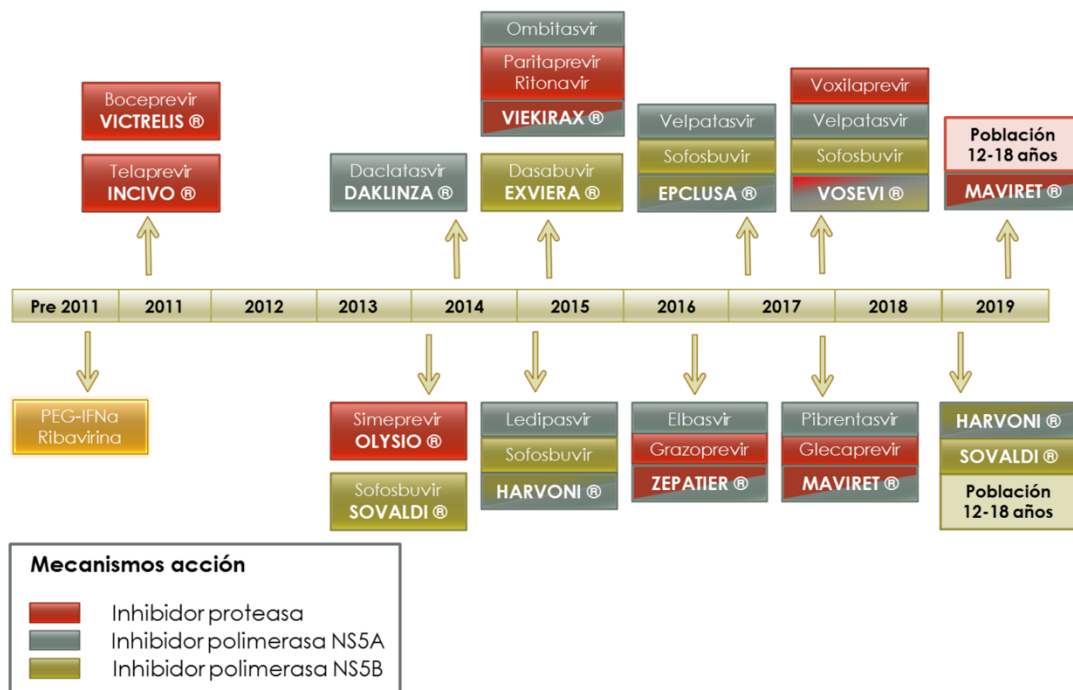


Figura 3 Cronograma introducción AADs en España²⁹.

Los regímenes de AADs orales son altamente eficaces, bien tolerados, de duración relativamente corta (8-12 semanas) y están ahora disponibles para todos los genotipos del VHC y para poblaciones de pacientes históricamente consideradas difíciles de curar. La facilidad de dosificación, el perfil de seguridad y la eficacia hacen que estos agentes representen una oportunidad de tratamiento para todo paciente con infección crónica por el VHC. En España se han tratado con estas nuevas combinaciones aproximadamente 150.000 pacientes desde el año 2014, a raíz de la implantación del Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C³⁰, consiguiendo la curación en la mayor parte de ellos (tasa de respuesta viral sostenida del 95% a las 12 semanas). Globalmente, se ha demostrado que las terapias curativas para la infección por VHC están mejorando el pronóstico de los pacientes coinfectados por el VIH-1. La introducción de los AADs ha casi erradicado la infección por el VHC en los países industrializados, incluso en los pacientes con infección por VIH-1³¹⁻³³.

1.1.3 Coinfección VIH-1 y VHC

1.1.3.1 Epidemiología

Es notorio que la infección por virus hepatotrópos y, especialmente, por el VHC es altamente prevalente en los pacientes infectados por el VIH-1, debido a que estos virus comparten las vías de transmisión. El número de personas infectadas por el VIH-1 que padecen una infección crónica por el VHC, en todo el mundo, es de aproximadamente 2,3 millones^{34,35} y sabemos que, en los países desarrollados, hasta un 25% de los pacientes con VIH-1 también padece una infección crónica por VHC³⁶. En el caso de la coinfección VIH-1/VHC, la prevalencia de la infección por el VHC ha cambiado de forma drástica en los últimos años. Tanto la hepatitis crónica como la

coinfección en los nuevos diagnósticos de VIH-1 son más prevalentes entre los usuarios de drogas por vía parenteral³⁷. En cuanto a los subtipos, al contrario de lo que sucede en la población general, el genotipo más prevalente es el genotipo 1a, seguido del 1b, 3 y 4, representado este último más el 20% en ciertas partes de Europa³⁸.

1.1.3.2 Historia natural

En contraste con la escasez de datos que indiquen que la coinfección por VHC altera la historia natural de la infección por VIH-1, está claro que la infección por VIH-1 tiene un impacto perjudicial sobre la historia natural de la infección por VHC. Antes del uso del tratamiento antiretroviral de gran actividad (TARGA), los pacientes infectados por el VIH-1 sucumbían a las complicaciones relacionadas con el SIDA. Sin embargo, en la era TARGA, el VIH-1 se ha vuelto controlable. La morbilidad y mortalidad causadas por complicaciones relacionadas con el SIDA han disminuido significativamente. El aumento de la supervivencia de los pacientes con VIH-1 ha convertido la enfermedad hepática causada por el VHC en la principal causa de muerte de estos pacientes. La coexistencia de infección crónica por VHC y VIH-1 se traduce en un daño hepático significativamente mayor^{39,40}. Sabemos que la coinfección con el VIH-1 puede aumentar el riesgo de desarrollo de CHC mediante varios mecanismos¹. El VIH-1 puede disminuir la tasa de eliminación del VHC y aumentar el riesgo de infección crónica y el riesgo de reactivación de una infección latente, debido a un defecto en la eliminación inmunomediada del VHC^{41,42}, incluida la supresión de la actividad anti-VHC de las células *natural killer* (NK)⁴³. La coinfección por el VIH-1 además parece acelerar la progresión de la enfermedad hepática por VHC, lo que aumenta el riesgo de cirrosis y posiblemente cáncer de hígado^{41,44}. En los pacientes con VIH-1 se especula

que el aumento del riesgo de CHC, así como de otros cánceres, es el resultado de una vigilancia inmunitaria defectuosa contra la oncogénesis^{43,45}. La mayor probabilidad de cronicidad de la infección por VHC asociada con la infección por VIH-1, puede explicar parte del aumento en el riesgo de CHC. El aumento de la carga de VHC asociado con la coinfección por VIH-1 podría exacerbar el daño hepático y, por lo tanto, acelerar la progresión de la enfermedad. Aunque el VHC suele considerarse no citopático, la replicación del VHC o las proteínas del VHC pueden inducir directamente daños celulares como la esteatosis⁴⁶, que también se produce con mayor frecuencia en las coinfectados⁴⁷. Finalmente, la respuesta inflamatoria y las citoquinas inducidas por la infección por VIH-1 pueden empeorar la hepatopatía asociada al VHC^{48,49}. En cambio, se ha especulado que la respuesta inmunitaria disminuida contra el VHC, como resultado de la inmunosupresión inducida por el VIH-1, podría reducir la inflamación y el daño hepático⁵⁰ y, por tanto, ralentizar la progresión a cirrosis y cáncer. Otro aspecto para tener en cuenta en las coinfecciones VIH-1/VHC es la enteropatía inducida por el VIH-1, que conduce a la translocación microbiana del tracto intestinal al hígado, acelerando la fibrosis y desempeñando un papel en la potenciación de la hepatocarcinogénesis del VHC⁵¹.

Una preocupación adicional en los pacientes coinfectados por el VIH-1/VHC es la toxicidad hepática inducida por la terapia antirretroviral. Uno de cada ocho pacientes tratados con fármacos antirretrovirales muestra hepatotoxicidad, una situación que es más probable que ocurra en pacientes coinfectados por VHC^{41,52}. En realidad, varios estudios indican que la función hepática en los pacientes coinfectados que reciben TARGA está mejor preservada respecto a los pacientes coinfectados que no reciben el tratamiento⁵³. En un estudio prospectivo español sobre 153

pacientes coinfectados por VHC/VIH-1, la probabilidad acumulada de supervivencia en pacientes que recibieron TARGA fue del 60% al año y del 40% a los 3 años, en comparación con el 38% al año y el 18% a los 3 años en los pacientes que no recibían la TARGA³⁹. Benhamou et al.⁵⁴ analizaron 182 biopsias hepáticas en pacientes con coinfección por VHC/VIH-1, y encontraron que el estadio de fibrosis fue menor en los pacientes que recibieron inhibidores de la proteasa (IPs) respecto a los pacientes que nunca habían recibido IPs. Se valoró la prevalencia acumulada de cirrosis a los 5, 15 y 25 años demostrando que el tratamiento antirretroviral con los IPs reducía la tasa de cirrosis de forma significativa, comparado con los pacientes nunca tratados con un IP. Otro estudio sobre pacientes coinfectados, el TARGA se asoció con ausencia significativa de fibrosis y la inflamación hepática fue mínima en aquellos pacientes en quienes el TARGA había suprimido el RNA del VIH-1 a niveles indetectables⁵⁵.

1.1.4 Afectación hepática asociada al VIH-1

1.1.4.1 Mecanismos directos de daño hepático

El VIH-1 puede producir un daño hepático a través de varios mecanismos:

1. Infección directa de las células estrelladas hepáticas y de las células de Kupffer. Las células de Kupffer activadas estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas, como TNF- α y TGF- β , que actúan sobre las células estrelladas, las cuales son precursoras probadas de la fibrosis hepática⁵⁶. Los resultados obtenidos por Balagopal, et al.⁵⁷ sugieren que las células de Kupffer frecuentemente se activan en pacientes con recuentos más bajos de linfocitos CD4+. Estudios previos demostraron que el VIH-1 a nivel hepático tiene tendencia a infectar primero las células de Kupffer. La pérdida de las células del Kupffer es consecuencia directa de la actividad

citotóxica del virus dentro de las células o es mediada por acción del virus soluble, que estimula la producción por parte del huésped de factores capaces de inducir la apoptosis de las células de Kupffer^{58,59}.

2. Translocación bacteriana. Este fenómeno se ha relacionado recientemente con el déficit de linfocitos CD4+ intestinales inducido por el VIH-1. Las células de Kupffer también parecen estar implicadas, por ser responsables de limpiar los productos de translocación microbiana. La infección por el VIH-1 altera la capacidad de las células para eliminar los productos de translocación bacteriana, potencialmente fibrogénicos^{58,59}. En un estudio de cohorte de personas coinfectadas por el VHC/VIH-1⁶⁰, que se encontraban en diferentes etapas de la enfermedad hepática, se ha demostrado que la translocación bacteriana estaba estrictamente relacionada con la progresión de la enfermedad hepática y que la seroconversión al VIH-1 en las personas infectadas por el VHC estaba asociada con un aumento de la translocación bacteriana. En modelos animales de otras formas de enfermedad hepática se ha demostrado que la translocación bacteriana intestinal tiene un papel fundamental en la promoción de la fibrosis⁵⁷. Ante los datos disponible hasta la fecha, se especula que la translocación bacteriana representa un mecanismo que contribuye a la progresión tanto del VIH-1 como del VHC. Balagopal, et al.⁵⁷ llevaron a cabo un interesante estudio sobre la relación entre la densidad de las células de Kupffer y los niveles plasmáticos de linfocitos CD4+ en pacientes coinfectados por VIH-1/VHC. En los pacientes en tratamiento con TARGA, que presentaron reconstitución inmune, se objetivó un incremento de la densidad de las células de Kupffer y un aumento del recuento de linfocitos CD4+. Estos resultados apoyarían la relación entre la pérdida de las células de Kupffer y la progresión de la fibrosis

hepática, teniendo en cuenta también estudios observacionales previos que relacionan el TARGA con una progresión más lenta de la hepatopatía^{61,62}.

3. La inflamación crónica por la activación del sistema inmunológico⁵⁷.

4. La coagulopatía diseminada de bajo grado⁶³.

Los mecanismos de los puntos 3 y 4 se resumen en la figura a continuación.

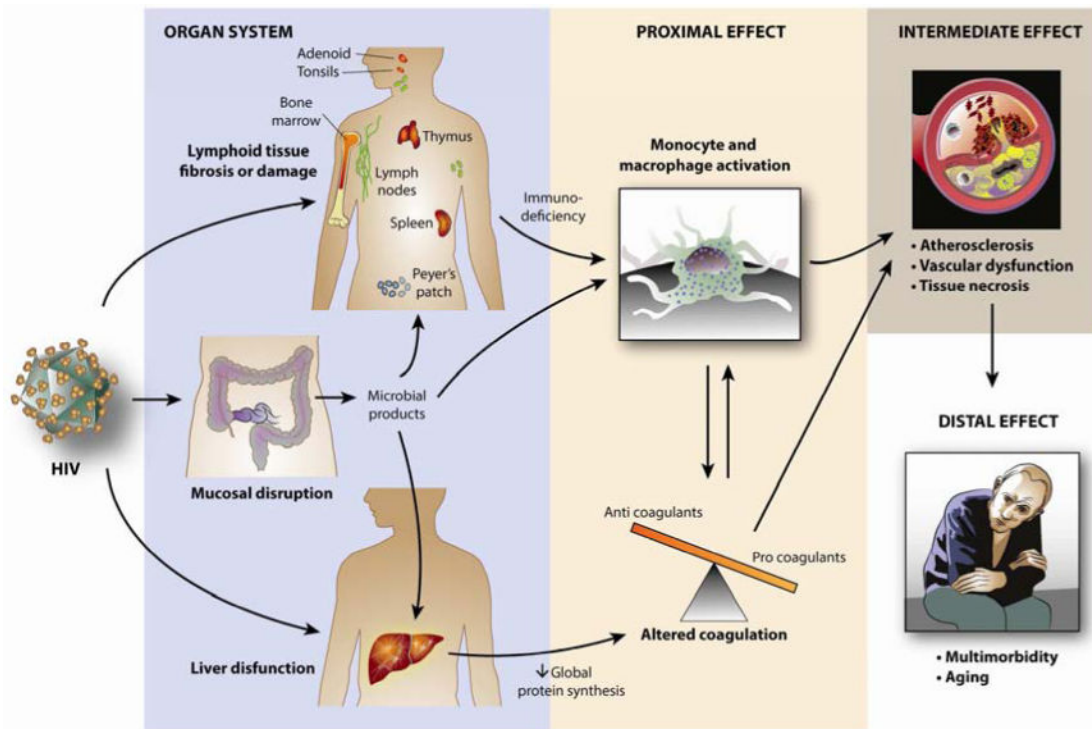


Figura 4 Patogénesis de la inflamación asociada con la infección por VIH-1 ⁶³.

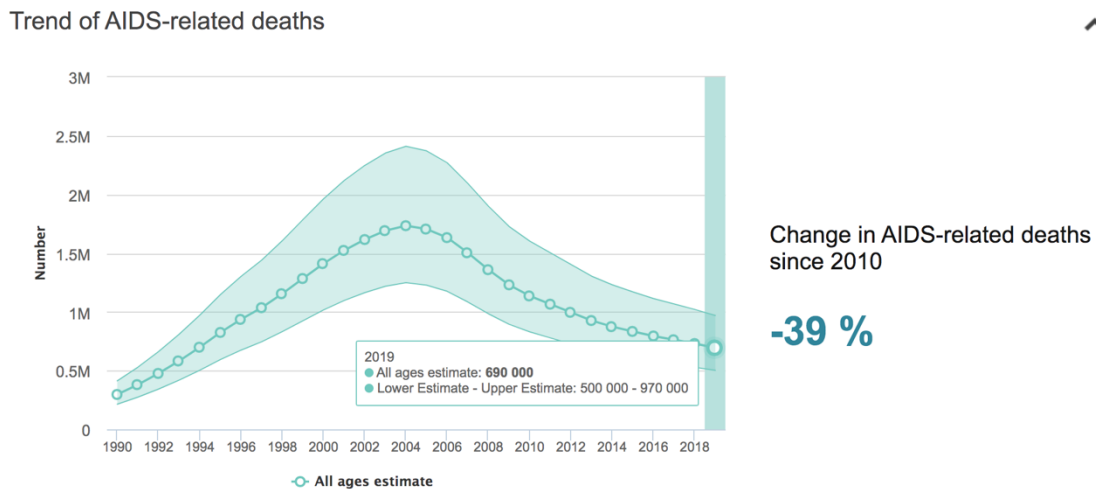
La figura 4 muestra un conjunto de las *noxas* (translocación bacteriana, inflamación, replicación del VIH-1 y disfunción hepática) que llevan a la activación crónica de los monocitos y de los macrófagos (inmunidad innata) y al estado de hipercoagulabilidad. Tanto el estado procoagulante subclínico como la inflamación producen un daño vascular y tisular de los órganos, que llevará a la aparición de enfermedades de origen vascular, así como de otras enfermedades secundarias a la

inflamación sistémica crónica, que son comorbilidades que teóricamente suelen manifestarse en edades más avanzadas de la vida (fenómeno conocido como *agieng*, que se explicará más adelante).

1.1.4.2 Agieng

El TARGA ha dado lugar a un aumento espectacular de la esperanza de vida de los pacientes infectados con el VIH-1. Cada vez más personas están viviendo con el VIH-1 a edades avanzadas. Se estima que en los países industrializados más de la mitad de las personas infectadas por el VIH-1 supera los 50 años de edad⁶⁴.

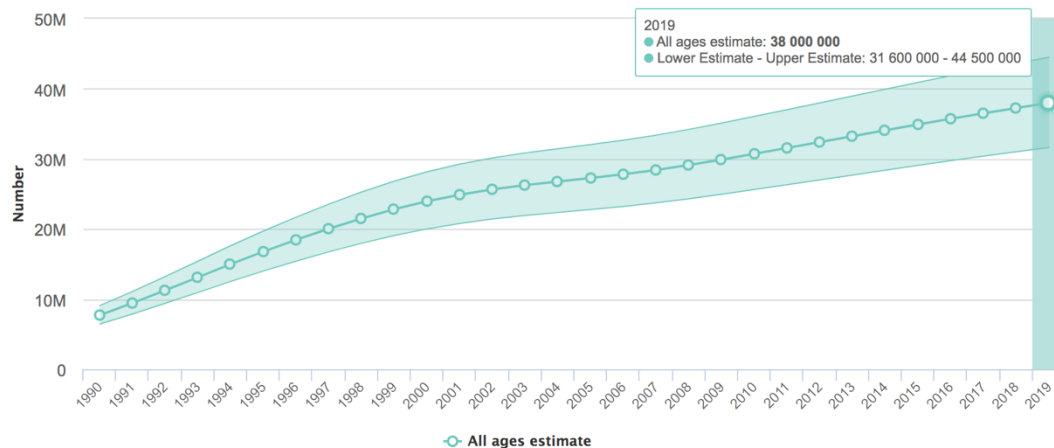
A continuación, se presentan los datos epidemiológicos de UNAIDS que ilustran gráficamente la mortalidad, la edad media de pacientes con TARGA y la supervivencia de los pacientes con VIH-1 en los últimos 10 años.



Source: UNAIDS epidemiological estimates, 2020

Figura 5 Representación gráfica de la variación de mortalidad relacionada con el SIDA en la última década. Adaptación de *UNAIDS epidemiological estimates, 2020*, <https://www.unaids.org/>.

People living with HIV (all ages)



Source: UNAIDS epidemiological estimates, 2020

Figura 6 Representación gráfica de la variación de supervivencia de la población con infección por VIH-1 desde 1990 a 2019. Adaptación de *UNAIDS epidemiological estimates, 2020* <https://www.unaids.org/>.

La población está envejeciendo mientras recibe el tratamiento y a la vez corre el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas asociadas con la edad. Las similitudes entre el envejecimiento y la evolución de la infección por el VIH-1 y el SIDA sugieren que la infección por VIH-1 comprime el proceso de envejecimiento, quizás acelerando las comorbilidades y la fragilidad⁶⁵. Por un lado, la probabilidad de seroconversión al VIH-1 disminuye con la edad⁶⁶ pero, por el otro, la edad hace que disminuya el recuento de células T CD4⁺⁶⁷. Esto implica que el tiempo desde la infección por el VIH-1 hasta el desarrollo del SIDA será más corto⁶⁸⁻⁷³, incluso en la era TARGA⁷⁴.

En los pacientes infectados por el VIH-1 la aceleración en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad incluye la cirrosis. Se ha demostrado una relación entre la edad y la disminución progresiva del volumen hepático, del número de hepatocitos, del flujo sanguíneo, del

metabolismo de los fármacos y de la capacidad hepato-regenerativa, factores que contribuyen al aumento de la susceptibilidad a la enfermedad hepática. Se ha observado un aumento de hasta 4 veces en la morbilidad y mortalidad hepática entre los pacientes mayores, en comparación con los adultos jóvenes⁷⁵.

1.1.4.3 Hepatotoxicidad del tratamiento antirretroviral

Es notorio que la infección por el VIH-1 y los fármacos antirretrovirales empleados para su tratamiento, producen cambios metabólicos y de la grasa corporal⁶⁵.

Con respecto al metabolismo glucémico, la infección por VIH-1 se asocia con una menor resistencia a la insulina⁷⁶, pero los fármacos antirretrovirales específicos tienen un efecto adverso directo sobre el metabolismo de la glucosa^{77,78}. Brown, et al. han detectado una incidencia de diabetes o hiperglucemia 4 veces mayor en hombres infectados por el VIH-1 que en hombres no infectados⁷⁹. La exposición acumulada a los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITIANs) se asocia con una elevada resistencia a la insulina y a una aumentada incidencia de diabetes⁸⁰.

Más complicada es la relación entre infección por VIH-1, TARGA y metabolismo lipídico. Sabemos que, tanto el envejecimiento como la infección por el VIH-1, se asocian con la pérdida de masa muscular, pero el tipo de pérdida de grasa difiere entre las personas de edad avanzada y las infectadas por el VIH-1⁸¹⁻⁸³. Los ITIAN y en particular la estavudina, se asocian con la pérdida de grasa periférica⁸⁴. En cambio, hay datos contradictorios sobre la relación entre la edad y la

lipoatrofía en personas infectadas por el VIH-1⁸⁵⁻⁸⁷. Durante la era anterior al TARGA, la infección por el VIH-1 se asociaba con una disminución del colesterol total, del colesterol unido a lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), seguido de un aumento en los niveles de triglicéridos (TG), a medida que la infección progresaba hasta convertirse en SIDA⁸⁸. Sin embargo, el TARGA aumenta los niveles de colesterol LDL⁸⁹, y los regímenes basados en ritonavir se asocian con niveles altos de TG^{77,90,91}.

Mehta et al. evaluó la relación entre la elevación de las transaminasas, el TARGA y el grado de fibrosis hepática. Objetivaron que el 12% de las personas con elevación previa de las enzimas hepáticas en curso de TARGA presentó su normalización, siendo el grado de fibrosis hepática de estos pacientes similar a los que tenían las enzimas hepáticas normales⁵⁵. En la Tabla 2 se resumen los principales TARGA disponibles.

Antagonistas del CCR5	Inhibidores de la fusión	Nucleósidos Inhibidores de la Transcriptasa Inversa (NITI)	No Nucleósidos Inhibidores de la Transcriptasa Inversa (NNITI)	Inhibidores de la Integrasa	Inhibidores de las Proteasas (IP)
Maraviroc (Celsentri®)	Enfuvirtide (Fuzeon®)	Zidovudina (Retrovir®)	Nevirapina (Viramune®)	Raltegravir (Isentress®)	Saquinavir (Invirase®)
		Didanosina (Videx®)	Efavirenz (Sustiva®)	Elvitegravir (Stribild®)	Indinavir (Crixivan®)
		Zalcitabina (Hivid®)	Etravirina (Intelence®)	Dolutegravir (Tivicay®)	Ritonavir (Norvir®)
		Estavudina (Zerit®)	Rilpivirina (Edurant®)		Nelfinavir (Viracept®)
		Lamivudina (Epivir®)			Amprenavir (Agenerase®)
		Abacavir (Ziagen®)			Atazanavir (Reyataz®)
		Tenofovir (Viread®)			Tipranavir (Aptivus®)
		Emtricitabina (Emtriva®)			Darunavir (Prezista®)

Tabla 1 Agentes antirretrovirales comercializados en España y sus nombres comerciales. En verde, los agentes actualmente utilizados⁹².

1.1.4.4 Hiperplasia nodular regenerativa como causa de hipertensión portal no cirrótica

La cirrosis es la causa más frecuente de hipertensión portal (HTP). La HTP cirrótica se asocia con un elevado gradiente de presión venosa hepática (GPVH), debido a una mayor resistencia sinusoidal, mientras que en los casos de HTP no cirrótica (HPNC), el GPVH es normal o solo levemente elevado y es significativamente más bajo que la presión venosa portal. Las enfermedades que provocan HPNC son principalmente de naturaleza vascular y pueden ser prehepáticas, hepáticas y poshepáticas. Las causas hepáticas se subdividen en presinusoidales, sinusoidales y post-sinusoidales^{93,94}. Dentro de las formas de HPNC, la HPNC idiopática (HPINC) o hiperplasia nodular regenerativa (HNR), es una causa rara de HTP intrahepática de etiología incierta⁹⁵⁻¹⁰¹. Para el diagnóstico de la HPINC se requiere la presencia de signos inequívocos de HTP, con permeabilidad de las venas suprahepáticas y del eje espleno-portal y ausencia de cirrosis o de otras causas de HTP¹⁰²⁻¹⁰⁴. Las alteraciones arquitecturales hepáticas abarcan un amplio espectro de lesiones, que van desde cambios mínimos hasta alteraciones histológicas más relevantes, como la HNR. Los pacientes con HPINC tienen un curso más benigno que los que presentan HTP cirrótica y la función hepática suele estar conservada. La patogenia de la HNR parece relacionarse con anomalías del flujo sanguíneo hepático portal local. Un daño endotelial provocaría una obliteración de las pequeñas vénulas portales en el parénquima hepático⁹⁴. Al daño endotelial se asociarían fenómenos de microtrombosis recurrente. La hipoperfusión venosa portal es responsable de la apoptosis de los hepatocitos y a la vez estimula la producción de factores de crecimiento celular, que promueven la regeneración tisular hepática^{99,105-107}. La teoría es que los

micronódulos se forman en áreas de flujo sanguíneo conservado, representando una respuesta hipertrófica compensatoria a los ácinos hepáticos vecinos con alteración del flujo sanguíneo^{93,108}.

Una causa reconocida de HNR es el uso de medicamentos inmunosupresores o quimioterápicos, así como la coexistencia de enfermedades autoinmunes, hematológicas, neoplásicas o infecciosas, incluida la infección por el VIH-1⁹³. La HRN comprende el 27% de todos los casos de hipertensión portal no cirrótica en Europa^{99,105,106}. La prevalencia en los pacientes VIH-1 positivos es de alrededor de 0,45-1% y está aumentando por el aumento de supervivencia de esta población. Predomina en hombres (50-100%) homosexuales (50-75%) con una infección prolongada (mediana 11,5 años, rango de 7 a 15 años) y se relaciona con la reconstitución inmune¹⁰⁹.

1.1.4.5 Consumo de tóxicos

Múltiples factores de riesgo, incluyendo alcohol y drogas, pueden inducir un estrés oxidativo en el hígado, resultando en el desarrollo de enfermedades hepáticas graves, como la enfermedad hepática alcohólica (EHA) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Figura 7).

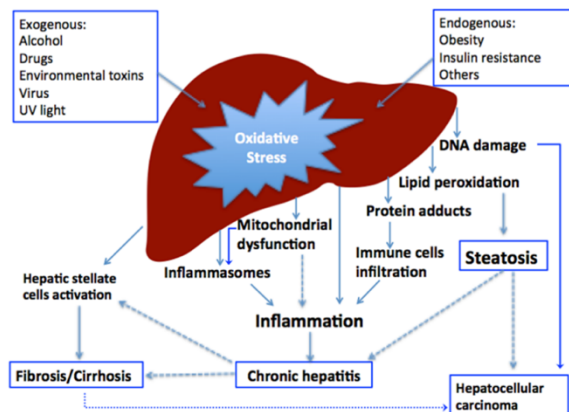


Figura 7 Representación del mecanismo a la base del estrés oxidativo hepático inducido por agentes tóxicos¹¹⁰.

La EHA puede progresar de la esteatosis a formas más graves de hepatitis, fibrosis y cirrosis¹¹¹. Más del 90% de los consumidores de riesgo de alcohol desarrolla un hígado graso y alrededor del 30% desarrollará formas más avanzadas de EHA. Aproximadamente un tercio de los 1,2 millones de personas VIH-1 positivas en Estados Unidos consumen cantidades de riesgo de alcohol o consumen drogas ilícitas¹¹². En nuestro entorno, el abuso de alcohol y otras sustancias es un diagnóstico frecuente en pacientes con infección por VIH-1^{113,114}. Aunque las estimaciones varían entre el 8% y el 42%¹¹⁵, la prevalencia de consumo intensivo de alcohol (*heavy drinking*)¹¹⁶ en estos pacientes casi se duplica con respecto a la población general^{117,118}.

Las drogas de abuso pueden causar daño hepático mediante tres modalidades principales, que son:

- toxicidad intrínseca (dosis-dependiente).
- toxicidad metabólica o idiosincrásica (dosis independiente).
- toxicidad idiosincrásica inmunológica (reacción alérgica).

Los mecanismos de toxicidad hepática suelen ser reversibles¹¹⁹. Si se retira la *noxa* responsable, el hígado, gracias a su capacidad de regeneración, puede renovarse hasta lograr una recuperación completa, incluso tras daños extensos¹²⁰. La patogenia de la EHA no se ha elaborado por completo. La consecuencia directa del metabolismo del etanol parece estar relacionada con la producción de radicales libres, conocidos como ROS (*reactive oxygen species*). Los ROS tienen la capacidad de producir daños oxidativos, lesiones mitocondriales y esteatosis, características comunes de la exposición aguda y crónica al alcohol¹²¹⁻¹²³.

Es interesante resaltar como el consumo de alcohol exacerba la patogenia de la infección por el VHC y agrava las consecuencias de la hepatopatía crónica relacionada. Aunque la razón exacta por lo que el consumo de alcohol afecta varias vías celulares del hígado no está clara, podría atribuirse parcialmente a la capacidad del alcohol para suprimir la inmunidad innata y a la modulación de la autofagia, mecanismos que pueden aumentar la replicación del VHC¹²⁴.

1.1.4.6 Hígado graso (esteatosis, esteatohepatitis y cirrosis)

La esteatosis hepática grasa no alcohólica (EHGNA), conocida como NAFLD (*no alcoholic fatty liver disease*), es presente en un 25-30% de la población mundial¹²⁵. La EHGNA es una enfermedad de amplio espectro, que incluye esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), con potencial de progresión a fibrosis, cirrosis y CHC¹²⁶. La frecuencia creciente en todo el mundo industrializado de la EHGNA está directamente relacionada con la obesidad, principal factor de riesgo para su desarrollo^{127,128}.

Si por un lado, en la infección por el VIH-1 el TARGA ha mejorado la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes VIH-1 positivos, por el otro, probablemente ha aumentado la prevalencia de obesidad y del síndrome metabólico¹²⁹. Varios estudios confirman un aumento de las tasas de EHNA en sujetos infectados por el VIH-1 con niveles elevados de las enzimas hepáticas y en curso de TARGA^{5,130-134}. Se ha visto una relación entre la aparición de esteatosis y el uso de algunos inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) como didanosina (ddI), estavudina (d4T), y zalcitabina (ddC). Estos fármacos pueden promover la

toxicidad mitocondrial de los hepatocitos, la acidosis láctica y la esteatosis hepática, aunque los resultados son controvertidos¹³⁵⁻¹³⁷.

1.2 Diagnóstico de enfermedad hepática

1.2.1 Biopsia hepática

Clásicamente se hacía referencia a la biopsia hepática (BH) como al *gold* estándar de cuantificación y estadiaje de la enfermedad hepática. Sin embargo, la biopsia es un método invasivo, no exenta de complicaciones, incluyendo una morbilidad y una mortalidad asociadas¹³⁸. Los altos costos, la variabilidad muestral y la interpretación subjetiva de los sistemas de puntuación histológica, hacen que el resultado sea cuestionable¹³⁹.

1.2.2 Técnicas no invasivas

A lo largo de los años, se han ido desarrollando estrategias no invasivas para evaluar la presencia y extensión de la enfermedad hepática, tanto técnicas de imagen no invasivas como biomarcadores séricos. Hoy en día, las pruebas no invasivas para evaluar el grado de fibrosis hepática han prácticamente reemplazado la biopsia hepática tradicional. Las principales guías de práctica clínica, como las de la *European Association for the study of Liver* (EASL) desde el año 2016¹⁴⁰, indican que los test diagnósticos no invasivos, concretamente la elastografía transitoria (ET) y determinados índices bioquímicos, pueden ser utilizados para la predicción de la severidad de la fibrosis hepática en la práctica clínica. Por otro lado, su elevada exactitud diagnóstica ha permitido que sean utilizados en la mayoría de ensayos clínicos que evalúan la seguridad y eficacia de los nuevos AADs para el tratamiento del VHC¹⁴¹⁻¹⁴⁵.

1.2.2.1 Elastometría hepática transitoria

En las últimas décadas, la atención clínica se ha centrado en la ET, un método que utiliza los ultrasonidos para evaluar la rigidez del hígado¹⁴⁶. Desde el 2001, la ET se aplica en la práctica clínica bajo el nombre FibroScan® (FS) y evalúa la rigidez hepática como marcador sustituto de la fibrosis. Mediante la ET podemos medir un segmento de hígado cilíndrico de 1 cm de ancho y 4 cm de largo en una profundidad media de 4,5 cm, siendo una región de parénquima hepático aproximadamente 100 veces mayor que el volumen del cilindro de hígado obtenido por biopsia. Durante el examen se realiza una mediana de 10 mediciones. El inconveniente es que la información no se puede obtener mediante una sola medición^{146,147}. La ET posee una alta precisión para detectar fibrosis moderada y una excelente capacidad para evaluar la cirrosis. Una limitación, en cambio, es el solapamiento entre estadios adyacentes de fibrosis, especialmente en los grados más bajos¹⁴⁸. Las otras principales limitaciones de la FS son que no se puede realizar en pacientes con espacios intercostales estrechos, ascitis u obesidad y que es una técnica que no aporta información sobre la actividad necro-inflamatoria de la hepatitis.¹⁴⁹

1.2.2.2 Controlled attenuation parameter

El parámetro de atenuación controlada, conocido como CAP (*controlled attenuation parameter*), es una aplicación de la ET, disponible en los aparatos de última generación. Mediante el CAP es posible medir el grado de atenuación de la onda de ultrasonidos transmitida a través del hígado, que es proporcional a la cantidad de grasa hepática. Es un parámetro que estima de forma inmediata y no invasiva la esteatosis. La medición se realiza de forma contemporánea a la ET y

sufre de las mismas limitaciones técnicas que la. Los datos publicados indican que el CAP es capaz de diagnosticar esteatosis incluso leve y discriminar entre esteatosis leve y grave¹⁵⁰.

1.3 Los marcadores de fibrosis hepática e hígado graso

Los marcadores de daño hepático pueden ser indirectos (una combinación de la bioquímica hepática de rutina y características generales) o directos (un reflejo del recambio y acumulación de la matriz extracelular del hígado).

1.3.1 Índices Bioquímicos

Varios marcadores bioquímicos se han propuestos hasta la fecha: Actitest¹⁵¹, APRI¹⁵², FIB-4¹⁵³, FibroIndex¹⁵⁴, FibroTest¹⁵⁵, HALT- C¹⁵⁶, Fibrosis Probability Index - Sydney¹⁵⁷ y Forns¹⁵⁸. Se ha propuesto utilizarlos de forma combinada con la ET, con el objetivo de aumentar la eficacia diagnóstica y evitar la realización de la biopsia hepática en el mayor número de casos posibles.

1.3.1.1 Biomarcadores indirectos

Los marcadores indirectos comprenden parámetros como las plaquetas, las transaminasas, el albúmina y sus combinaciones. Los principales índices bioquímicos indirectos se presentan en la Tabla a continuación.

Índice	Parámetros incluidos en el índice	AUC
Fibrotest	GGT, bilirrubina total, haptoglobina, α_2 -macroglobulina, Apolipoproteína A1, edad, sexo	0,73-0,87
Forns	Edad, GGT, colesterol, plaquetas	0,81-0,86
APRI	AST, plaquetas	0,78-0,88
FIB-4	Edad, recuento de plaquetas y la concentración de AST y ALT	0,74
FPI - Sydney	Resistencia a la insulina, edad, consumo de alcohol, AST, colesterol	0,71-0,84

Tabla 2 Combinaciones de marcadores bioquímicos indirectos con los parámetros demográficos y bioquímicos y el AUC para la predicción de fibrosis. Leyenda: GGT - gammaglutamil transpeptidasa, AST- aspartato aminotransferasa, ALT- alanin aminotransferasa. APRI - AST to Platelet ratio index. AUC - area under curve).

1.3.1.2 Biomarcadores directos

Los biomarcadores directos representan los cambios cuali-cuantitativos que sufre la matriz extracelular (ME) durante la fibrogénesis. Pueden dividirse en:

- a) Componentes de la ME (ácido hialurónico, laminina, elastina, fibronectina, péptido aminoterminal del procolágeno III, procolágeno I y colágeno IV);
- b) Enzimas reguladoras de la ME involucradas en la síntesis (lisil oxidasa, lisil hidroxilasa, prolil hidroxilasa) y en la degradación de la matriz (metaloproteinasas, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas).

Las principales limitaciones de la utilización de estos marcadores en la práctica clínica son la necesidad de laboratorios especializados para su determinación, así como el elevado coste de las técnicas empleadas. En la Tabla a continuación se resumen los principales índices que utilizan biomarcadores directos.

Índice	Parámetros incluidos en el índice	
Hyaluronan ¹⁵⁹	Ácido hialurónico	AUC: 0,73-0,86; VPN: 99%.
ELF ¹⁶⁰	Edad, TIMP-1, ácido hialurónico, procolágeno III	AUC: 0,8; Se:90%; VPN: 92%.
Fibrometer ¹⁶¹	Recuento de plaquetas, índice de protrombina, AST, α 2-macroglobulina, ácido hialurónico, urea, edad, elasticidad hepática	AUC: 0,85-0,89
FIBROspect ¹⁶²	TIMP-1, ácido hialurónico, α 2-macroglobulina	AUC: Se: 72%, Esp 74%, VPP 61%, VPN 82%.
Hepascore ¹⁶³	Edad, sexo, bilirrubina total, GGT, ácido hialurónico, α 2-macroglobulina	AUC: 0.82-0.9; Se 63-88%; Esp: 89-74%.

Tabla 3 Principales índices con combinaciones de biomarcadores directos y el AUC, VPN y Sensibilidad para la predicción de fibrosis. Leyenda: Se: sensibilidad, Esp: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, GGT: gamma glutamil transpeptidasa, AST: aspartato aminotransferasa, TIMP-1: tissue inhibitors of metalloproteinases-1; AUC: area under curve.

1.4 Biomarcadores

Hoy en día, disponemos de biomarcadores capaces de estratificar el grado de inflamación y de fibrosis hepática. Estos son fundamentales para optimizar el manejo actual de los pacientes. Mirando al futuro y a la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas como la fibrosis hepática, cada vez más en la práctica clínica se entiende la importancia de disponer de biomarcadores pronósticos, capaces de predecir la progresión de la hepatopatía para identificar a aquellos pacientes que deben inscribirse en los programas de detección precoz del CHC.

1.5 MicroRNAs

1.5.1 Definición de los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) representan una clase de pequeños RNAs no codificantes monocatenarios que comprenden de 17 a 25 nucleótidos¹⁶⁴, cuya función principal es regular el RNA mensajero (mRNA), conduciendo a su degradación, y también a ajustar los niveles de las proteínas. La biogénesis de los miRNAs se resume en la Figura a continuación.

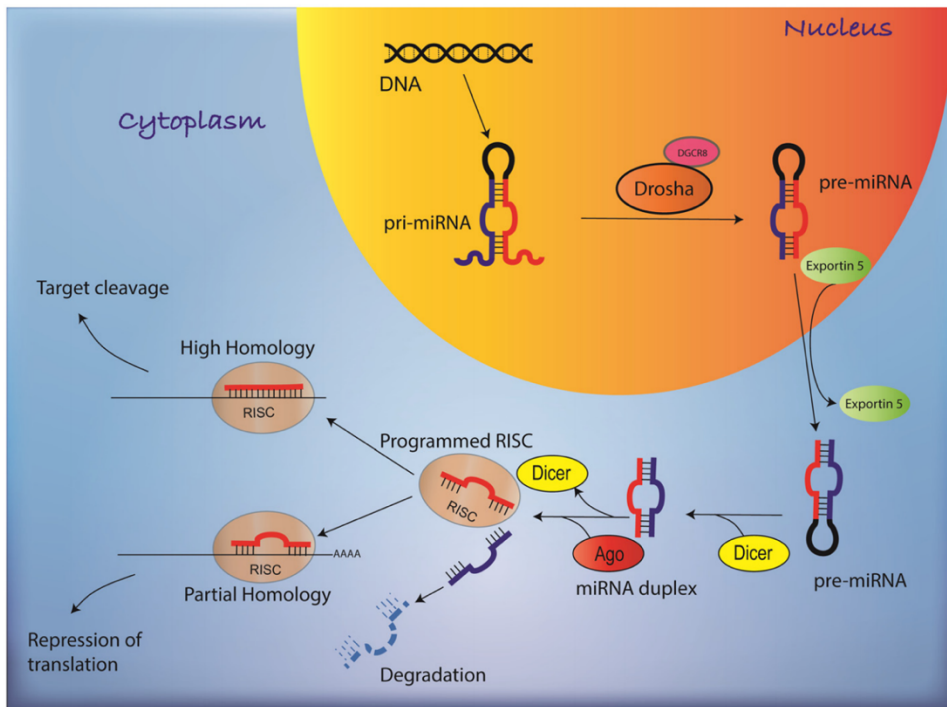


Figura 8 Biogénesis del miRNA¹⁶⁵.

1.5.2 Función de los microRNAs

El papel principal de los miRNAs es la regulación de la expresión génica¹⁶⁶, al mediar la degradación del RNA mensajero (mRNA) y también su transcripción y traducción a través de canales canónicos y no canónicos¹⁶⁷. Por mecanismo canónico se hace referencia al proceso mediante el cual el complejo miRISC (ver figura 8), que contiene la hebra guía del miRNA, ejerce su acción a través de la unión al mRNA diana a través de su región 3'-no traducida (3'-UTR)¹⁶⁸. Este proceso ocurre gracias a la presencia de una secuencia complementaria de miRNA (*seed sequence*), representada por los primeros 2-7 nucleótidos del extremo 5'. Le sigue la desadenilación del mRNA, la supresión de la traducción y finalmente, su degradación¹⁶⁹. Sin embargo, en las células humanas, aproximadamente el 60% de las interacciones entre el complejo miRISC y el mRNA no son canónicas¹⁷⁰, lo que significa que sus cadenas no siempre son

totalmente complementarias¹⁷¹. De aquí la idea de que un solo miRNA podría actuar sobre numerosos mRNA y al mismo tiempo, un mRNA podría contener múltiples sitios de unión para un miRNA, convirtiendo esto en la posibilidad de que un gran número de procesos biológicos podrían ser regulados por interacciones múltiples de mRNAs y miRNAs¹⁶⁸.

Otro papel importante que juegan los miRNAs es la señalización intercelular. A pesar de que la mayoría de los miRNAs se encuentra dentro de la célula, hay una proporción que migra fuera de ella y se puede encontrar como miRNAs circulantes en fluidos corporales¹⁷² y otros líquidos, a través de daño tisular, apoptosis y necrosis¹⁶⁷, o a través del paso activo, en forma de microvesículas, llamadas exosomas, o mediante la unión con proteínas^{173,174}. Se ha demostrado que alrededor del 10% de los miRNAs circulantes se secretan en exosomas, mientras que el restante 90% se excreta junto a proteínas, como Ago2, nucleofosmina 1 y lipoproteínas de alta densidad¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Los exosomas son microvesículas con un diámetro de 50 a 100 nm, derivadas del endosoma. Estas microvesículas se fusionan con la membrana. Son secretadas por numerosas células y se pueden encontrar en la mayoría de los fluidos corporales^{177,178}. Varios estudios han demostrado in vitro la asimilación de exosomas por células vecinas, hecho que apoya la teoría de una comunicación intercelular de tipo mensaje en una botella¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Otra hipótesis más reciente es que los miRNAs podrían asignarse selectivamente a ciertos exosomas, debido al hecho de que la variedad de miRNAs que se encuentra en estas vesículas tiende a ser diferente de la de su célula de origen¹⁸²⁻¹⁸⁴.

1.5.3 Técnicas para la determinación de microRNAs

La secuenciación masiva, denominada *next-generation sequencing* (NGS) hace referencia a un conjunto de técnicas de alto rendimiento con las cuales se obtienen grandes cantidades de información genómica secuenciando el DNA o el RNA de una manera rápida y rentable¹⁸⁵. Mediante la secuenciación masiva se pueden estudiar el genoma completo, un exoma o paneles de genes. Si bien intuitivamente la secuenciación del genoma completo parece ser la estrategia más rentable, es menos coste-efectiva, porque se obtiene una inmensa cantidad de información dificultosa de analizar y almacenar y el coste que será más elevado que los abordajes dirigidos¹⁸⁶. Si comparamos la tecnología de secuenciación por *microarrays* (primera generación) con la secuenciación masiva (llamada RNA-Seq), la principal diferencia es que en el primer caso se perfilan solo transcripciones/genes predefinidos a través de hibridación con secuencias conocidas, mientras que en el segundo se lleva a cabo la secuenciación completa de todo el transcriptoma. En una matriz de *microarrays* (tecnología Affymetrix[®]), cada punto del chip es una sonda de oligonucleótidos definida y la intensidad de la fluorescencia traduce la abundancia de una secuencia específica. En la secuenciación RNA-Seq, cada *spot* coloreado representa un nucleótido, y cada color en la ronda indica el siguiente nucleótido de la secuencia (tecnología Illumina[®] Hiseq). Esto se traduce en una mayor especificidad, siendo mejor técnica que los

microarrays para detectar transcripciones e isoformas. También es más sensible para detectar la expresión diferencial y ofrece un mayor rango dinámico.

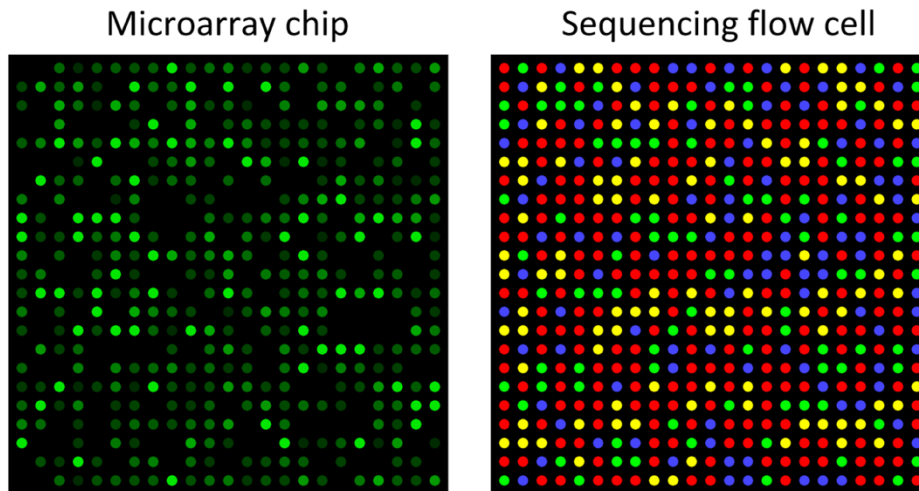


Figura 9 Representación gráfica de la tecnología microarrays a la izquierda y de la secuenciación masiva mediante el uso de matriz (*flow cell*) a la derecha. Adaptación de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microarray_and_sequencing_flow_cell.svg

En general, los pasos fundamentales en la preparación de RNA para el análisis de NGS son:

1. Proceso de fragmentación y/o adaptación de las secuencias diana para alcanzar la longitud deseada.
2. Conversión de la secuencia diana en DNA bicatenario.
3. Unión de los adaptadores de oligonucleótidos a los extremos de los fragmentos diana.
4. Cuantificación del producto final de la biblioteca para la secuenciación.

Fundamental para la de construcción de una librería NGS es la preparación del ácido nucleico diana (RNA o DNA) en una forma que sea compatible con el sistema de secuenciación que se utilizará. La fragmentación del RNA típicamente se lleva a cabo mediante la utilización de métodos físicos (por ejemplo, mediante el uso de ultrasonidos o técnicas de sonicación), químicos

o enzimáticos (por ejemplo, a través de endonucleasas no específicas y enzimas de restricción). Las metodías son igual de efectivas a la hora de crear una librería NGS¹⁸⁷, aunque dentro de las técnicas enzimáticas hay diferencias. Para extraer los fragmentos de miRNAs del RNA total, se realiza una selección por tamaño: el RNA total se procesa en un gel de agarosa y se corta la banda correspondiente al tamaño de los miRNAs. En el siguiente paso, los adaptadores de secuenciación (dímeros) se ligan a las moléculas de RNA del tamaño seleccionado, seguido de la transcripción inversa al DNA complementario (cDNA). La biblioteca de cDNA así obtenida se vuelve a ejecutar en gel de agarosa y la banda que contiene las moléculas correspondientes a los fragmentos de miRNAs con adaptadores ligados se corta para su posterior secuenciación.

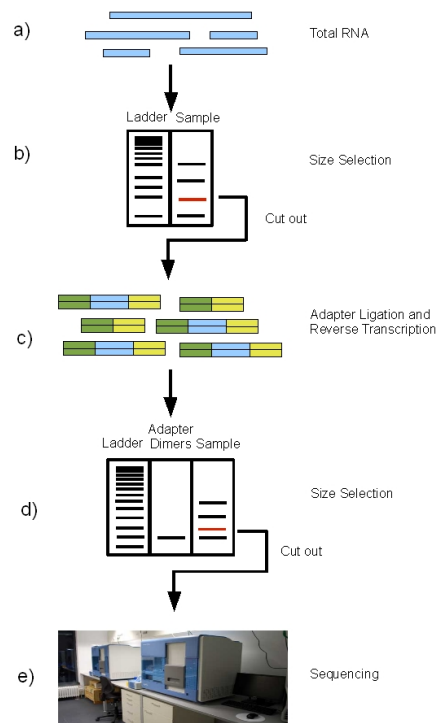


Figura 10 Esquema del procedimiento de secuenciación masiva de miRNAs con Illumina Genome Analyzer. a) extracción del RNA total; b) selección de tamaño; c) Ligación de los adaptadores y de la transcriptasa inversa; d) selección tamaño; e) secuenciación¹⁸⁸.

Dentro de los datos obtenidos de una secuenciación de miRNAs, típicamente se observarán muchas secuencias que son casi idénticas, menos por unos pocos nucleótidos. Estas secuencias representan diferentes isoformas de un miRNA. El origen y la función de tales isoformas se conocen poco. Las isoformas pueden complicar el proceso de análisis, así como la interpretación de los resultados. En el análisis de expresión, por ejemplo, no está claro de inmediato cuál de las diferentes isoformas debe usarse en la comparación de expresiones, especialmente si los cambios de expresión de diferentes isoformas muestran un comportamiento contrario. Actualmente, es una práctica común considerar solo la isoforma con el recuento de lectura más alto, lo que parece ser una estrategia razonable, pero en el futuro el manejo de isoformas merecerá mayor atención¹⁸⁸.

1.5.4 Papel de los MicroRNAs como marcadores de enfermedades

Estudios recientes sugieren que los miRNAs pueden servir como *hub* en las redes reguladoras de genes que gobiernan numerosas dianas¹⁸⁹. Estas evidencias indican que los miRNAs pueden ser excelentes biomarcadores. Su expresión podría reflejar la información dispersa en cientos y hasta miles de genes diana, además de ser altamente estables y fáciles de detectar.

Los niveles desregulados de miRNAs específicos se han asociado con una variedad de enfermedades que incluyen cáncer¹⁹⁰, diabetes¹⁹¹, obesidad¹⁹², enfermedades cardiovasculares¹⁹³ y neurológicas¹⁹⁴. En el caso del cáncer, se ha demostrado que la detección de los niveles de miRNAs en plasma y suero tiene su potencial para un diagnóstico precoz de diferentes tumores, así como para predecir la respuesta a la terapia¹⁸⁹.

Hoy en día es notorio que los miRNAs regulan diversas funciones biológicas del hígado (como la inflamación, la fibrosis y el metabolismo de la glucosa y de los lípidos)¹⁹⁵ y los estudios disponibles han demostrado la relevancia de los miRNAs en enfermedades hepáticas de diversas etiologías^{196,197,206–215,198–205}. Las alteraciones de los miRNAs intracelulares se correlacionan con las hepatitis virales, las EHNA y EHA, la lesión hepática inducida por fármacos, la enfermedad hepática autoinmune y lesión por isquemia-reperfusión. Recientes evidencias sugieren que los perfiles de expresión de los miRNAs son distintos entre las diferentes enfermedades hepáticas. En la tabla 4 se resumen los miRNAs implicados en la replicación del VHC descubiertos hasta la

Table 1 Selected miRNA and their cognate gene targets relevant to HCV infection

	miRNA	Target	Function
miRNAs that promote HCV replication	miR-122	HCV 5'-UTR	Promote HCV replication [34,40,41] and IRES mediated HCV translation [52]
		SOCS3	Enhance methylation at SOCS3 gene promoter, inhibits IFN-induced ISRE activity [51]
		Cyclin G1	Promote viral replication induced by alcohol [54]
		Xrn1	Inhibit 5'decay of HCV RNA [55]
	miR-141	DLC	Up-regulated in HCV infection [35]
	miR-130a	IFITM	Inhibits type I IFN signaling and promote HCV replication [36]
miRNAs that inhibit HCV replication	miR-21	MyD88 and IRAK1	Negatively regulate IFN signaling [62]
	miR-196	N5SA region in HCV genome	Inhibition of HCV replication [37]
		BACH1	Inhibits HCV RNA and N5SA protein expression [63]
	miR-448	Core region of HCV genome	Inhibition of HCV replication [37]
	let-7b	N5SB and 5'UTR regions in HCV genome	Reduces HCV infectivity [38]
		BACH1	Repression of HCV expression [64]
	miR-199a	HCV 5'-UTR	Inhibits viral replication [39]
miR-130a	IFN α /IFN β ?	Inhibits HCV RNA replication by increased expression of IFN- α /IFN- β and the ISGs [61]	

Abbreviations: UTR Un-translated region, *SOCS3* suppressor of cytokine signaling 3, *ISRE* interferon stimulated responsive element, *Xrn1* exoribonuclease enzyme, *DLC-1* deleted in liver cancer 1, *IFITM* interferon inducible transmembrane protein, *IRAK1* interleukin-1 receptor-associated kinase 1, *MyD88* myeloid differentiation factor 88, *BACH1* transcription regulator protein, *ISGs* interferon stimulated genes.

fecha.

Tabla 4 miRNAs implicados en la replicación del VHC¹⁶⁵.

Numerosos estudios han demostrado la superioridad de los miRNAs para el diagnóstico precoz, el pronóstico y la evaluación de las hepatopatías en comparación con los biomarcadores tradicionales. Muchos de ellos están registrados en la base de datos Clinicaltrials.gov²¹⁶.

Gracias al estudio de los miRNAs implicados en el desarrollo de la EHNA, se han descubierto diversos miRNAs implicados en la fibrogénesis hepática. En las figuras 11 A y B se resumen los principales miRNAs descritos y sus funciones²¹⁶.

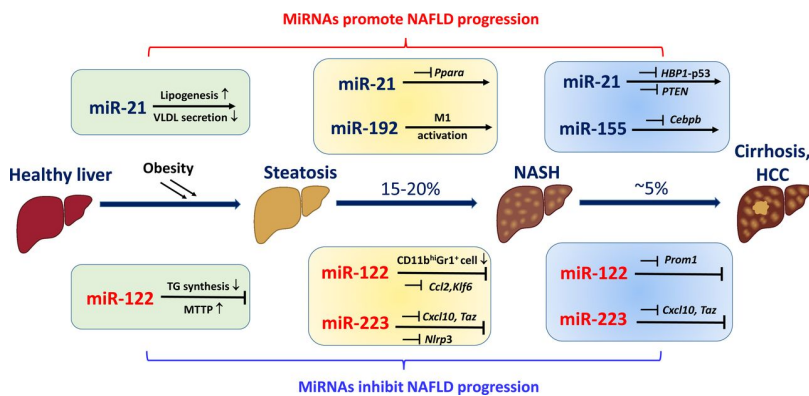


Fig. 11A. Papel de los miRNAs en la progresión de la EHNA²¹⁶

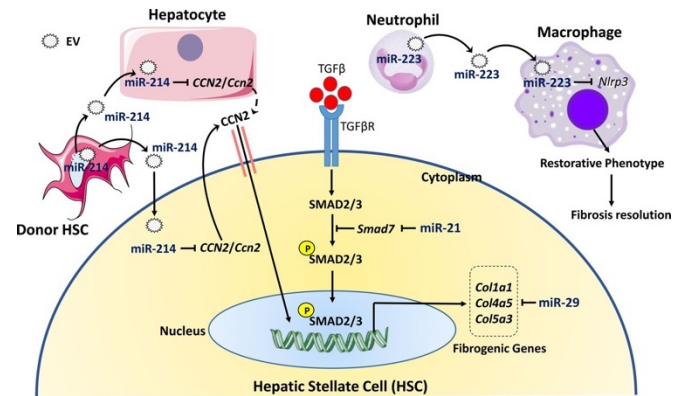


Fig 17B. Papel de los miRNAs en la progresión de EHNA a fibrosis²¹⁶.

Con respecto a la infección por el VIH-1, se ha demostrado que la presencia del virus puede modificar el perfil de los miRNAs en plasma²¹⁷, en las células mononucleares²¹⁸ y en la mucosa gastrointestinal²¹⁹. Existen evidencias de que el VIH-1 inhibe las proteínas implicadas en la biogénesis y maduración celular de los miRNAs y, como consecuencia, los perfiles de expresión de miRNAs²²⁰. El perfil de miRNAs circulantes asociado con daño hepático inducido por el VIH-1 se ha explorado recientemente en pacientes coinfectados con el VIH-1 y VHC¹⁹⁶.

2. HIPOTESIS

La presencia de daño hepático en los pacientes infectados por el VIH-1, agravada por la coinfección por VHC, el consumo de alcohol y la propia terapia antirretroviral, representa un problema de salud relevante por su riesgo de progresión a cirrosis y CHC, complicaciones que conllevan una alta morbilidad y mortalidad. Por otro lado, se asocia la incertidumbre de que la eliminación del VHC con los AADs, incluso en aquellos pacientes cirróticos, resulte en la eliminación también del riesgo que tienen estos pacientes de presentar progresión de su hepatopatía. Estos antecedentes ponen de manifiesto la necesidad de disponer de mejores herramientas para el diagnóstico y pronóstico de la progresión del daño hepático para nuestros pacientes.

Diversos miRNAs han sido asociados al desarrollo de fibrosis hepática, cirrosis y CHC, tanto en modelos animales como en estudios en humanos. La importancia de la función y distribución de los miRNAs en diversos procesos celulares y las recientes evidencias del papel que ejercen en la comunicación entre células nos hace hipotetizar que los miRNAs circulantes diagnostican y/o son potenciales marcadores de progresión de la enfermedad hepática.

3. OBJETIVO

En esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto identificar miRNAs circulantes en sangre periférica como biomarcadores de diagnóstico y/o progresión del daño hepático en pacientes infectados con el VIH-1.

Objetivos secundarios:

1. Determinar la asociación de los niveles de miRNAs circulantes con la infección por el VIH-1 y la coinfección por el VHC.
2. Identificar los miRNA asociados a progresión de la fibrosis hepática en pacientes coinfectados VIH-1/VHC con replicación del VHC activa y en estadios iniciales de fibrosis (F0-F1).

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1. Artículo 1

Franco S, Buccione D, et al. Large scale screening of circulating microRNAs in individuals with HIV-1 mono-infections reveals specific liver damage signatures. Antiviral Research 155 (2018), 106-114, DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.05.008.



Large-scale screening of circulating microRNAs in individuals with HIV-1 mono-infections reveals specific liver damage signatures

Sandra Franco^{a,1}, Daniela Buccione^{b,1}, Raquel Pluvinet^c, Beatriz Mothe^a, Lidia Ruiz^a, Maria Nevot^a, Ana Jordan-Paiz^a, Laia Ramos^c, Susanna Aussó^c, Rosa M. Morillas^d, Lauro Sumoy^c, Miguel Angel Martinez^{a,*}, Cristina Tural^b

^a IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Spain

^b Internal Medicine Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Spain

^c High Content Genomics and Bioinformatics Unit, Institut Germans Trias i Pujol (IGTP), Can Ruti Campus, Badalona, Spain

^d Liver Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), CIBERehd, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

HIV-1 infection
Circulating microRNAs
Liver disease

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced inflammation and/or long-term antiretroviral drug toxicity may contribute to the evolution of liver disease. We investigated circulating plasma microRNAs (miRNAs) as potential biomarkers of liver injury in patients mono-infected with HIV-1. We performed large-scale deep sequencing analyses of small RNA level on plasma samples from patients with HIV-1 mono-infection that had elevated or normal levels of alanine aminotransferase (ALT) or focal nodular hyperplasia (FNH). Hepatitis C virus (HCV) mono-infected patients were also studied. Compared to healthy donors, patients with HIV-1 or HCV mono-infections showed significantly altered (fold change > 2, adjusted $p < 0.05$) level of 25 and 70 miRNAs, respectively. Of the 25 altered miRNAs found in patients with HIV-1, 19 were also found in patients mono-infected with HCV. Moreover, 13 of the 14 most up-regulated miRNAs (range: 9.3–3.4-fold increase) in patients with HCV mono-infections were also up-regulated in patients with HIV-1 mono-infections. Importantly, most of these miRNAs significantly and positively correlated with ALT and aspartate aminotransferase (AST) levels, and liver fibrosis stage ($p < 0.05$). MiR-122-3p and miR-193b-5p were highly up-regulated HIV-1 mono-infected patients with elevated ALT or FNH, but not in HIV-1 patients with normal levels of ALT. These results reveal that HIV-1 infections impacted liver-related miRNA levels in the absence of an HCV co-infection, which highlights the potential of miRNAs as biomarkers for the progression of liver injury in HIV-1 infected patients.

1. Introduction

After the advent of highly active antiretroviral therapy (ART), liver disease became a leading cause of morbidity and mortality in patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections (Ford et al., 2015). HIV-1 infections may cause liver disease through several mechanisms; HIV-1 can directly infect stellate and Kupffer cells, or it can cause chronic inflammation, microbial product translocation, and low-grade disseminated coagulopathy (Deeks et al., 2013). Consequent to these complex interactions, end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) are often complications in patients with HIV-1 infections. This effect is exacerbated in patients with chronic hepatitis C

virus (HCV) infections and/or drug-induced hepatotoxicity. Remarkably, abnormal liver enzymes are common in patients with HIV-1, even in the absence of viral hepatitis or alcohol abuse (Rockstroh, 2017). End-stage liver disease and cirrhosis were also associated with bacterial translocations (Wiest and Garcia-Tsao, 2005), immune system activation and inflammation (Montes-de-Oca et al., 2011), and heart failure (So-Armah et al., 2017). Consequently, we need biomarkers of liver disease progression to assess for advanced fibrosis and to identify patients that should be enrolled in HCC screening programs.

MicroRNAs (miRNAs) are 19–22-nucleotide-long, non-coding RNAs that operate as negative regulators of translation; they are involved in many cellular processes (Ameres and Zamore, 2013). Numerous

Abbreviations: HIV-1, Human immunodeficiency virus type 1; miRNA, microRNA; ALT, alanine aminotransferase; FNH, focal nodular hyperplasia; HCV, Hepatitis C virus; AST, aspartate aminotransferase; HCC, hepatocellular carcinoma; QC, quality control; LNA, Locked Nucleic Acid; RT, Reverse Transcription; qPCR, quantitative PCR; PCA, principal component analysis; IQR, interquartile range; FC, fold change

* Corresponding author. Fundació IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916, Badalona, Spain.

E-mail address: mmartinez@irsicaixa.es (M.A. Martinez).

¹ SF and DB contributed equally to this manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.008>

Received 11 April 2018; Received in revised form 22 May 2018; Accepted 24 May 2018
Available online 25 May 2018

0166-3542/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

miRNAs are in the circulation and in tissues. Importantly, many circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues (Thomou et al., 2017). Dysregulated levels of specific miRNAs have been associated with a variety of diseases, including cancer (Mitchell et al., 2008), diabetes (Guay et al., 2011), obesity (Capobianco et al., 2012), and cardiovascular disease (Caroli et al., 2013). The relationship between liver injury and miRNA biology has been studied profusely (Anadol et al., 2015; Bandiera et al., 2015; Hatzia Apostolou et al., 2013; Hung et al., 2016; Huo et al., 2017; Jopling et al., 2005; Kitano and Bloomston, 2016; Koenig et al., 2016; Li et al., 2014, 2015; Liang et al., 2010; Liu et al., 2017; Mazzu et al., 2017; Petrelli et al., 2012; Roy et al., 2017; Shaker and Senousy, 2017; van der Ree et al., 2017; Wang et al., 2012, 2015, 2017). Those studies have demonstrated the relevance of miRNAs in liver function and diseases of diverse etiologies.

Some reports have shown that HIV-1 can modify the miRNA profile in plasma (Yahyaie et al., 2016), peripheral blood mononuclear cells (Egana-Gorrono et al., 2014), and gastrointestinal mucosa (Fulcher et al., 2017). The circulating miRNA profile associated with liver damage in HIV-1 has been recently explored in patients with HIV-1/HCV co-infections (Anadol et al., 2015). However, knowledge is lacking about the association between liver injury and peripheral miRNA profiles in patients with HIV-1 mono-infections. In the present study, we conducted a large-scale genome-wide screen to construct a profile of circulating plasma miRNAs related to liver injury in patients with HIV-1 that were not co-infected with hepatotropic viruses. Our results showed that the HIV-1 infection could dysregulate circulating liver-associated miRNAs.

2. Materials and methods

2.1. Study patients

Stored human plasma samples from patients and healthy donors were obtained with written informed consent under Institutional Review Board-approved protocols. For this study, we cross-sectionally analyzed 21 healthy volunteers (control group), 54 patients with HIV-1 mono-infections and 22 patients with HCV mono-infections. Table 1 shows the characteristics of these 3 groups. Patients with HIV-1 infections were recruited from patients that attended the outpatient HIV Clinical Unit at Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Out of 53

patients with HIV-1 mono-infections, 22 had normal ALT levels, 20 had ALT levels above the upper limit of normal, and 11 had biopsy-proven nodular regenerative hyperplasia (Table 2). Patients with HCV mono-infections were recruited from the Liver Unit at Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. In this group, liver fibrosis was evaluated with transient elastometry.

2.2. RNA extraction and RT-qPCR-based miRNA assays

Plasma samples from 97 individuals were processed to isolate RNA with the miRCURY RNA Isolation kit-Biofluids (Exiqon), according to the manufacturer's protocol, with slight modifications. We included a pre-clearing step by centrifuging 300 μ l of plasma for 5 min at 3000 \times g to pellet cellular debris. Prior to extraction, we added 3 μ g glycogen carrier (Ambion) and 2 fmol synthetic RNA from a spike-in mix (spike-in kit, Exiqon) to 200 μ l of cleared plasma supernatant. RNA was eluted in 50 μ l of RNase-free water. Total RNA extracted from each plasma sample was subjected to quality control (QC) to analyze the robustness of the plasma RNA isolation procedure and the quality of biological samples for assaying miRNA expression. We amplified all samples with the miRNA QC PCR panel (Exiqon) and the miRCURY Locked Nucleic Acid (LNA™) Universal Reverse Transcription (RT) microRNA PCR system. Expression levels of the red blood cell-specific miR-451 and the stable miR-23a were used to monitor hemolysis in all plasma samples. A Δ Ct (miR-23a-miR-451) value < 5 indicated no hemolysis; a value \geq 7 implied an increased risk of hemolysis. We chose samples with the lowest miR-451/miR-23a-3p ratios in each clinical group for subsequent sequencing-based miRNA profiling (Δ Ct values ranged from -0.72 to 6.3; average 3.15). We performed RT, followed by quantitative PCR (RT-qPCR), according to the manufacturer's protocol. Plasma RNA was reverse transcribed, followed by real-time PCR amplification with LNA enhanced primers in the ExiLent SYBR Green master mix (Exiqon) on a Lightcycler 480 real-time PCR system (LC480, Roche). RT-qPCR Cp values were determined with the second derivative method provided in LC480 software.

2.3. Small RNA library generation and sequencing

Small RNA sequencing libraries were prepared according to the TruSeq® Small RNA Sample Preparation Guide (Illumina). Briefly, we

Table 1
Clinical and biochemical characteristics of the whole study population according to infection status.

	Healthy	HCV monoinfected	p-value ^a	HIV-1 monoinfected	p-value
N	21	17	–	53	–
Age, median [IQR], yr	37 (35–44.5) ^b	54 (44.5–70.5)	0.0011	55 (50–60)	< 0.0001
Gender, Male (%)	6 (28)	7 (41)	–	38 (71)	–
Fibroscan (kPa)	–	7.9 (5.3–10.65)	–	–	–
Alkaline Phosphatase (U/L), median (IQR)	54 (46–65)	75 (60–115.5)	0.001	85 (66–111)	< 0.0001
ALT, (U/L) median (IQR)	15 (12–19.5)	36 (29.5–51)	< 0.0001	31 (19–70)	< 0.0001
AST, (U/L) median (IQR)	15 (15–20.5)	35.5 (25.5–46)	< 0.0001	31 (21–50)	< 0.0001
GGT, (U/L) median (IQR)	–	39 (21–128)	–	47 (27–105)	–
Serum Albumin, (g/L) median (IQR)	–	42 (38.5–43)	–	46.1 (42.1–47.65)	–
Total protein, (g/L) median (IQR)	73.4 (71.1–76.6)	71.7 (68.2–74.6)	0.1727	71.9 (68.6–74.4)	0.0765
Total bilirubin, (umol/L) median (IQR)	8 (6.4–12.65)	10 (8–17)	0.1421	8 (5.3–13.5)	0.7852
HDL, (mmol/L) median (IQR)	1.45 (1.3–1.8)	–	–	1.2 (1–1.5)	–
LDL, (mmol/L) median (IQR)	2.55 (1.95–3.35)	–	–	3.35 (2.6–4.05)	–
Cholesterol, (mmol/L) median (IQR)	4.5 (3.6–5.45)	4.1 (3.55–4.85)	0.2645	5.2 (4.5–6)	0.0374
Triglycerides, (mmol/L) median (IQR)	0.9 (0.5–1.05)	0.9 (0.75–1.1)	0.4359	1.5 (1.2–2)	< 0.0001
Creatinin, (umol/L) median (IQR)	69 (60–79.5)	69 (61.4–84.5)	0.5971	73.5 (65–86.5)	0.1139
Glucosa (mmol/L), median (IQR)	–	5.5 (4.85–6.55)	–	4.8 (4.5–5.5)	–
Platelet counts (\times 10 ⁹), median (IQR)	253.5 (189.5–348.5)	190 (144.5–223)	0.0039	198 (149–232)	0.0042
CD4 cell counts (cell/mm ³), median (IQR)	–	–	–	454 (285–750)	–
HCV RNA Viral load log ₁₀ (IU/ml), median (IQR)	–	6.05 (5.75–6.71)	–	–	–
Undetectable HIV viral load, N (%)	–	–	–	42 (79.2)	–
Patients on ART, N (%)	–	–	–	48 (90.6)	–

^a Mann Whitney test.

^b Median, IQR.

Table 2
Clinical and biochemical characteristics of the HIV-1 mono-infected patients.

	HIV-1 mono-infected patients				
	HIV-1 normal ALT	HIV-1 elevated ALT	p-value ^a	HIV-1 FNH ^c	p-value
N	22	20	–	11	–
Age, yr	58 (54–61.5) ^b	20 (43.5–53)	0.0003	60 (54–69)	0.566
Gender, Male, N (%)	12 (54)	19 (95)	–	7 (63)	–
Alkaline Phosphatase (U/L)	83 (64–93)	84.5 (62–108.5)	0.6233	116 (103.5–138.5)	0.0007
ALT, (U/L)	19 (14–22.5)	75.5 (52.5–112)	< 0.0001	35 (27.5–54)	0.0006
AST, (U/L)	21 (17–24.5)	51.5 (43–71)	< 0.0001	35 (28–49.5)	0.0007
GGT, (U/L)	24.5 (14.5–38.5)	83 (43.5–214)	0.0001	68 (47–102.5)	0.0019
Serum Albumin, (g/L)	46 (42.05–47.2)	46.8 (41.9–48.3)	0.34	–	–
Total protein, (g/L)	70 (67.7–73)	73.7 (71.7–76.1)	0.0179	–	–
Total bilirubin, (umol/L)	6.05 (5–9.5)	8 (5.5–17.05)	0.0697	13.5 (7.65–20.2)	0.0096
HDL, (mmol/L)	1.35 (1–1.55)	1.05 (0.76–1.42)	0.0487	–	–
LDL, (mmol/L)	3.3 (2.6–3.7)	3.4 (2.6–4.15)	0.5472	–	–
Cholesterol, (mmol/L)	5.35 (4.45–6.1)	5.65 (4.6–6.15)	0.571	4.6 (4–5.2)	0.2765
Triglycerides, (mmol/L)	1.7 (1.2–2.1)	1.55 (1.1–2.15)	0.7433	1.2 (1–1.45)	0.0708
Creatinin, (umol/L)	69 (62–86.5)	82.5 (70.5–91)	0.0394	70 (58.5–82)	0.7343
Glucosa (mmol/L)	4.8 (4.4–5.2)	4.9 (4.5–5.5)	0.2622	5.5 (4.75–5.75)	0.0613
Platelet counts (x10 ⁹)	198.5 (167–233)	207.5 (167.5–260)	0.7818	125 (99–221.5)	0.0431
CD4 cell counts (cell/mm3)	533 (353.5–970.5)	462.5 (378–684)	0.4203	249 (179.5–283.5)	0.0009
Undetectable HIV-1 viral load, N (%)	17 (77.3)	16 (80)	–	9 (81.8)	–
Patients on ART	19 (86.4)	18 (90)	–	11 (100)	–

^a Mann Whitney test.

^b Median, IQR.

^c Focal nodular hyperplasia.

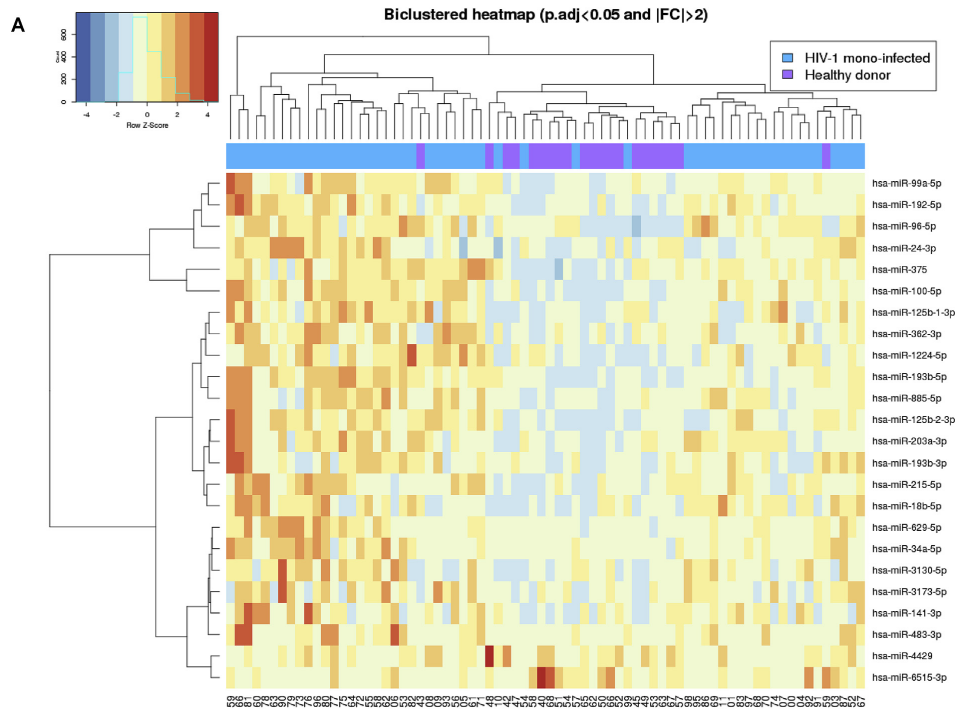


Fig. 1. Expression profile of dysregulated circulating miRNAs. A heatmap shows the miRNAs with significant (fold change > 2 and adjusted $p < 0.05$) differential level. Red: up-regulated miRNAs; blue: down-regulated miRNAs; yellow: no change. **A)** Patients with HIV-1 mono-infections (n = 53, blue) compared to healthy control donors (n = 21, magenta). Twenty-four miRNAs were up-regulated and 1 was down-regulated. **B)** Patients with HCV mono-infections (n = 17, magenta) compared to healthy control donors (n = 21, purple). Fifty-two miRNAs were up-regulated and 18 were down-regulated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

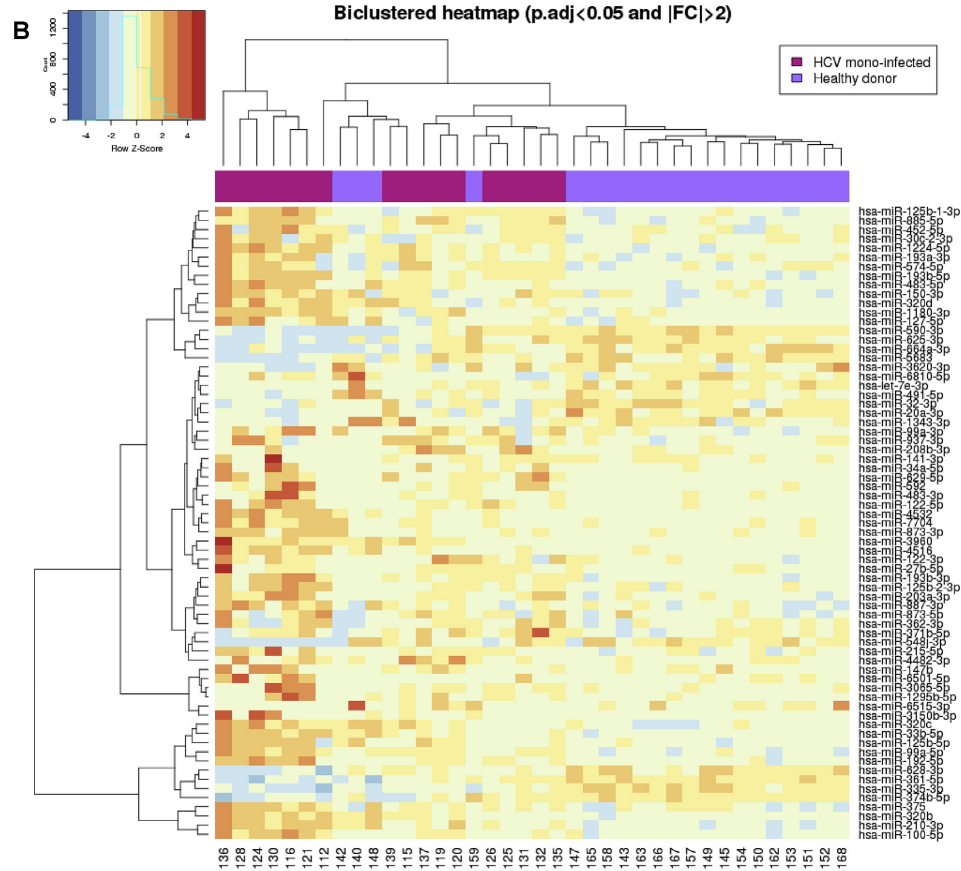


Fig. 1. (continued)

used less than 1 μ g of total RNA as starting material (the remaining 48 μ l of RNA were concentrated to 5 μ l); we used 15 instead of 12 PCR amplification cycles after ligation of the 3' and 5' adapters; and we performed an automated pooled library size selection. Libraries were constructed in batches, each with 24 samples; we took special care to obtain a randomized, balanced representation of all study groups in every batch to prevent confounding possible technical biases phenotypes. Prior to pooling and size selection, individual library yields and molarities were assessed with the DNA 1000 Kit on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), based on an integration of the 135 to 160 bp size range. Most libraries exhibited visible size patterns and yields according to specifications (with major peaks expected around 142 bp for miRNAs and 152 for piwiRNAs). All libraries were indexed based on barcoded adapter ligation. Libraries were combined to form independent pools. Each individual pool was size-selected for products between 115 and 165 bp with the Pippin Prep automated gel system and 3% agarose dye-free gel cassettes, with internal standards (Sage Science). Library pools were cleaned and concentrated by column centrifugation prior to and after size selection, with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Size-selected library pool quality was assessed with the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). The final concentration was derived by qPCR, performed with the KAPA library quantification Kit for Illumina (Kapa Biosystems)

on a 7900-HT PCR system (Applied Biosystems, Thermofisher). Finally, for each of the 3 pools, sequencing was performed on 3 independent HiSeq-2500 lanes (Illumina).

Sequencing was performed on cBot and HiSeq-2500 instruments (Illumina) with the HiSeq single read cluster generation, version 4, designed for the cBOT-HiSeq, and the HiSeq sequencing-by-synthesis 50-cycle kit, according to the supplier protocols. Per-sample raw data files were generated in fastq format with bcl2fastq conversion software (Illumina). Platelet as well as red blood cell derived miRNAs have been found to be present in plasma samples that can dampen cell free RNA pool and bias results (Blondal et al., 2013; Mitchell et al., 2016). We took special precautions during RNA extraction to prevent carryover from cellular debris. This was relevant since platelet counts were found altered in the disease groups (Table 1). In addition, we performed a quality control step to select samples with minimal signs of hemolysis. None of the differentially expressed miRNAs between cases and controls overlapped with miRNAs described to be of platelet or erythrocytic origin, in accordance with proper care being taken during plasma separation and clearing prior to RNA extraction. Therefore, the resulting differentially expressed miRNAs were not directly associated to platelet counts.

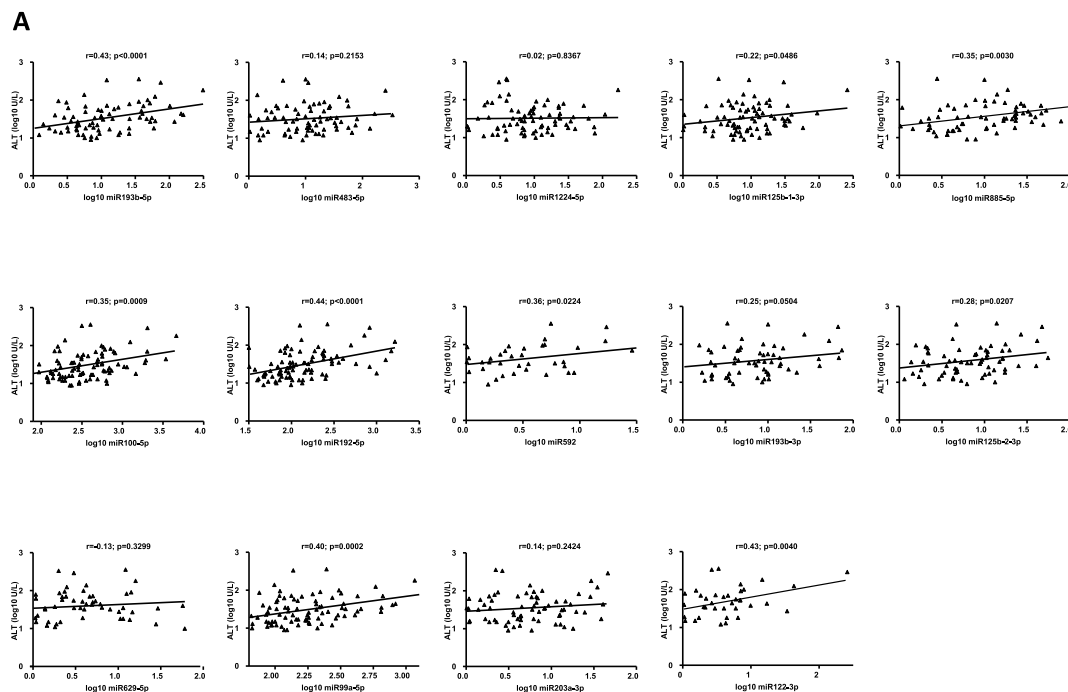


Fig. 2. Correlation of plasma miRNA levels with plasma liver enzyme levels. **A)** Alanine aminotransferase (ALT); **B)** Aspartate aminotransferase (AST). The 14 identified miRNAs were: miR-193b-5p, miR-483-5p, miR-1224-5p, miR-125b-1-3p, miR-885-5p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-592, miR-193b-3p, miR-125b-2-3p, miR-629-5p, miR-99a-5p, miR-203a-3p and miR-122-3p). The entire patient cohort and healthy donors were included in this analysis ($n = 91$). Statistical analysis was performed with a Pearson correlation.

2.4. miRNA sequence analysis

Small RNA sequence analysis was focused on miRNA expression and performed with mirPro software (Shi et al., 2015). Starting with demultiplexed raw sequence data, mirPro performed quality trimming and removed the adaptor for each read. For efficient read-to-reference mapping, the final, clean reads in each library/sample were collapsed into unique sequences with read numbers counted. Novoalign (Li and Homer, 2010) was used to map the collapsed reads to the pre-miRNAs (hairpins) downloaded from miRBase (<http://www.mirbase.org>). Relying on both the canonical mature miRNAs and their pre-miRNA (hairpin) sequences (downloaded from miRBase), mirPro quantified the known miRNAs. A principal component analysis (PCA) executed on sequence length data showed a cluster of 5 samples that happened to have a low count yield and exhibited a proportionately very low number of sequences assignable to miRNAs. Therefore, these 5 samples were removed from subsequent analyses. MiRNA differential expression analysis was performed with DESeq2 (Love et al., 2014), with the default normalization parameters applying a negative binomial model to test for differential expression in count data, based on estimates of variance-mean dependence. After normalization, a PCA identified another outlier, which was removed from subsequent analyses. After removing this sample and the 5 samples previously mentioned from the original 97 patients included in the study, the differential expression analysis was performed with a dataset containing 91 samples and 1355 miRNAs. This differential analysis was adjusted for the following covariates: sex, age, and hemolysis. Statistical significance was determined by computing the adjusted *p* value by the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995), which controls for the false

discovery rate, to account for multiple testing.

2.5. Statistical analysis

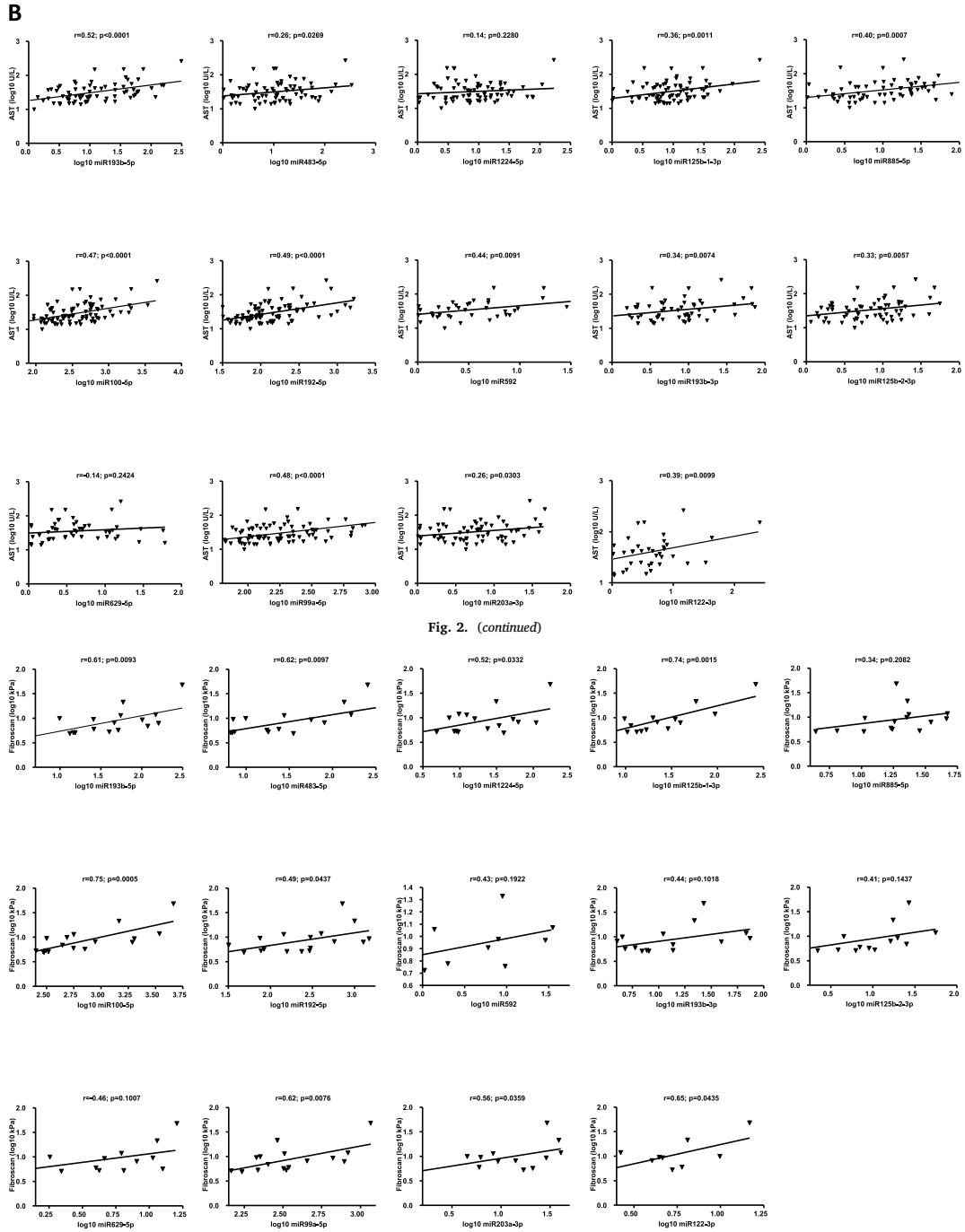
The Pearson correlation method was used to analyze associations between miRNA levels and levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), liver fibrosis, and other clinical characteristics. Mean values were compared between groups with the Mann Whitney test. Frequencies were compared between groups with the Chi-square test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 4.00 for Windows.

2.6. MiRNA sequence data

The data is publicly available in the GEO database under accession number XXXXXX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

3. Results

Differential miRNA level was determined by comparing miRNA expression profiles between each patient group (HIV-1 mono-infections or HCV mono-infections) and the healthy control group. Table 1 shows the characteristics of study patients and healthy controls. Compared to healthy donors, the two patient cohorts displayed significantly higher liver enzyme levels (alkaline phosphatase, ALT, AST, and gamma-glutamyl transferase) and platelet counts (Table 1). Patients with HIV-1 mono-infections, but not patients with HCV mono-infections, showed significantly higher triglyceride levels than controls. Within the HIV-1 mono-infected group no differences were found between ART treated



and untreated patients regarding their ALT or AST levels ($p = 0.6387$ and $p = 0.7527$, respectively).

The miRNA expression profiles determined for 20 patient samples in the HIV-1 mono-infection group that displayed elevated ALT values were compared to those of healthy donors and those of 22 samples in the HIV-1 mono-infection group with normal or significantly low ($p < 0.0001$) ALT values (Table 2). Similarly, miRNA expression profiles determined for 11 samples in the HIV-1 mono-infection group that displayed focal nodular hyperplasia (FNH) at the time of sampling were compared to those of healthy donors and those of 22 patients in the HIV-1 mono-infection group with normal ALT levels. In addition, patients with FNH exhibited higher levels of alkaline phosphatase and platelet counts than those without FNH.

We identified 1355 mature miRNAs in the study samples (median, 568 miRNAs; interquartile range [IQR]: 480–609). In the HIV-1 mono-infection group, 25 miRNAs displayed significant dysregulation compared to healthy donors; 24 were up-regulated [range: 4.27-fold–2.04-fold change (FC)], and 1 was down-regulated (-2.57 FC; Fig. 1A and Supplementary-Table 1). In the HCV mono-infection group, 70 miRNAs displayed significant dysregulation compared to healthy controls; 52 were up-regulated (range: 9.3 to 2 FC), and 18 were down-regulated (range: -3.27 to -2.04 FC; Fig. 1B and Supplementary-Table 2). These results demonstrated that chronic HCV mono-infections significantly dysregulated a greater number of circulating miRNAs than HIV-1 infections ($p < 0.0001$, Chi-square test). Moreover, the observed FCs were higher in HCV than in HIV-1 samples ($p = 0.0127$, Mann Whitney test; Supplementary-Tables 1 and 2).

Interestingly, among the 24 up-regulated miRNAs found in HIV-1 mono-infection samples, 19 (including the 11 most up-regulated miRNAs in this group) were also significantly up-regulated in the HCV mono-infection group (Supplementary-Tables 1 and 2). Furthermore, of the 14 miRNAs most up-regulated (range: 9.3–3.4 FC) in the HCV mono-infection group, 13 miRNAs (miR-193b-5p, miR-483-5p, miR-1224-5p, miR-125b-1-3p, miR-885-5p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-592, miR-193b-3p, miR-125b-2-3p, miR-629-5p, miR-99a-5p and miR-203a-3p) were also up-regulated in the HIV-1 mono-infection group. This result indicated that chronic HIV-1 infections induced consistent changes in circulating miRNAs that were associated with HCV infections and liver damage.

The above-mentioned 13 highly up-regulated miRNAs found in both the HCV and HIV-1 mono-infection groups were analyzed for correlations with different patient clinical characteristics. Remarkably, 8 and 11 of these miRNAs were positively correlated with ALT and AST levels, respectively, in the entire study cohort, including the healthy donors (average correlation coefficients, $r = 0.27$ and $r = 0.36$, respectively; Fig. 2). Thus, circulating levels of these 8 and 11 miRNAs were significantly lower in patients with normal ALT and AST levels than in patients with high levels ($p < 0.05$; Supplementary-Fig. 2). Eight of these miRNAs significantly correlated with liver fibrosis stage in our cohort of HCV mono-infected patients ($p < 0.05$) (Fig. 3). No differences in the expression levels of these 13 miRNAs were found when HIV-1 ART treated and untreated patients were compared ($p > 0.05$). Taken together, these results indicated that these 11 circulating miRNAs might be associated with liver metabolism and damage.

Among the patients with HIV-1 mono-infections, we investigated circulating biomarkers of liver damage in two specific groups: one with elevated ALT levels and the other with FNH diagnoses (Table 2). We compared plasma miRNA levels in these two groups to miRNA levels in healthy donors and in patients with HIV-1 mono-infections, but normal ALT levels.

Compared to healthy donors, HIV-1 samples with elevated ALT levels displayed 48 dysregulated miRNAs; 34 were up-regulated and 14 were down-regulated (Supplementary-Fig. 1A and Supplementary-Table 3). The 34 up-regulated miRNAs included the above-mentioned 13 miRNAs that were up-regulated in patients with HCV and HIV-1 mono-infections. Similar results were obtained with the FNH sample

group; in addition to the 13 above-mentioned miRNAs, another 16 miRNAs were up-regulated (Supplementary-Fig. 1B and Supplementary-Table 4). Significantly, when HIV-1 mono-infection samples from patients with normal ALT levels were compared to samples from healthy donors, we found that only 8 miRNAs were dysregulated in the former group; 7 were up-regulated, and 1 was down-regulated (Supplementary-Fig. 1C and Supplementary-Table 5). Furthermore, among the 7 up-regulated miRNAs found in this group of samples, 4 (miR-1224-5p, miR-885-5p, miR-100-5p, and miR-629-5p) belonged to the above-mentioned group of 13 miRNAs. Of note, among these 4 miRNAs, 2 (miR-629-5p and miR-1224-5p) were not associated with elevated levels of ALT or AST (Fig. 2). These results indicated that HIV-1 mono-infections had a lower impact on circulating miRNA levels in patients with normal ALT levels than in patients with elevated ALT levels. However, in the absence of elevated ALT, HIV-1 mono-infections were associated with the up-regulation of 4 miRNAs that were also highly up-regulated in the HCV mono-infection group.

When all HIV-1 mono-infected samples with elevated ALT were compared to all those with normal ALT levels, 25 dysregulated miRNAs were found; 9 up-regulated and 16 down-regulated (Supplementary-Fig. 1D and Supplementary-Table 6). The up-regulated miRNAs included miR-122-3p, miR-193b-5p, miR-122-5p, miR-99a-3p, and miR-885-5p. A comparison of miRNA level in samples from patients with HIV-1 and FNH to level in samples from patients with HIV-1 with normal ALT levels, showed 7 differentially expressed miRNAs, 3 up-regulated and 4 down-regulated in the FNH group compared to the HIV-1 group with normal ALT (Supplementary-Fig. 1E and Supplementary-Table 7). Analogous to the results obtained with samples from the patients with elevated ALT levels, miR-122-3p and miR-193b-5p were the two most up-regulated miRNAs.

The above-mentioned group of 13 miRNAs did not include miR-122-3p, which was up-regulated in the HCV mono-infection group (Fig. 1B). In fact, the only patient group that did not show dysregulation of this miRNA was the HIV-1 mono-infection group with normal ALT levels (Supplementary-Fig. 1C). Two miRNAs, miR-122-3p and miR-193b-5p, were significantly correlated with the levels of ALT ($r = 0.43$ and 0.44 , $p = 0.0040$ and < 0.0001 , respectively) and AST ($r = 0.39$ and 0.52 , $p = 0.0099$ and < 0.0001 , respectively) in the entire cohort (Fig. 2). Conversely, circulating levels of miR-122-3p and miR-193b-5p were significantly lower in samples with normal levels of ALT ($p = 0.0119$ and $= 0.0028$, respectively) and AST ($p = 0.0078$ and $= 0.1927$, respectively) (Supplementary-Fig. 2). Finally, miR-122-3p and miR-193b-5p levels were significantly correlated with liver fibrosis progression in our cohort of HCV mono-infected patients ($r = 0.65$ and 0.61 , $p = 0.0435$ and $= 0.0093$, respectively) (Fig. 3). Overall, these results showed that miR-122-3p and miR-193b-5p were associated with liver damage in patients with HIV-1 mono-infections.

4. Discussion

Prior studies have documented the circulating levels of miRNAs in patients with HIV-1/HCV co-infections with regard to the extent and etiology of liver injuries (Anadol et al., 2015). For example, circulating levels of miR-122 are higher in patients with HIV-1/HCV co-infections that have liver injuries, elevated transaminases, and portal hypertension (Anadol et al., 2015). However, those studies have not focused on patients with HIV-1 mono-infections without a hepatotropic virus infection. In this study, we have analyzed the plasma circulating miRNA levels in patients with HIV-1 mono-infections and HCV mono-infections. Because we aimed to identify biomarkers of liver damage in HIV-1 infections, we have also compared patients with HIV-1 mono-infections with normal transaminase levels to patients with elevated transaminase levels and patients with FNH.

We have found that HIV-1 mono-infections are associated with modified liver miRNA metabolism and up-regulated plasma levels of miRNAs that have been previously associated with liver damage. We

show that 14 miRNAs are highly up-regulated in patients with HCV mono-infections. Importantly, these miRNAs are also up-regulated in patients with HIV-1 mono-infections that exhibited elevated transaminase levels or FNH. Remarkably, fewer miRNAs are up-regulated in patients with HIV-1 mono-infections with normal transaminase levels. However, in this group of patients, 4 of the identified miRNAs are significantly up-regulated, which suggests that, even in the absence of liver damage indications, HIV-1 infections and/or ART might interfere with liver metabolism. Therefore, this study demonstrates the potential of miRNAs as biomarkers of liver injury progression in patients with HIV-1 mono-infections.

Every miRNA identified in this study has been previously related to liver injury. MiR-99a-5p and miR-100-5p have been previously associated with HCC [reviewed in (Li et al., 2015)]. Both miRNAs are members of the miR-100 family. Previous studies have shown that they are down-regulated in HCC liver tissues (Petrelli et al., 2012) and up-regulated in serum of patients with HCC (Wang et al., 2015). They are dysregulated in many human cancers, and they are considered tumor suppressors because they target tumor-related genes, such as mTOR, AKT1, or PI3K, among others (Li et al., 2015). Likewise, miR-125b inhibits HCC cell migration and invasion by targeting LIN28B (Liang et al., 2010), and it is dysregulated in HCC associated with hepatitis B virus (HBV) or HCV infections (Liu et al., 2017). Dysregulation of miR-193b, miR-483-5p, and miR-592 is correlated with HBV-associated HCC (Mao et al., 2014; Wang et al., 2012). MiR-193b suppresses tumors by targeting the CRK-like proto-oncogene and focal adhesion kinase (Mazzu et al., 2017). MiR-483-5p inhibits mouse liver fibrosis by targeting two pro-fibrosis factors, platelet-derived growth factor- β and tissue inhibitor of metalloproteinase 2, which suppress the activation of hepatic stellate cells (Li et al., 2014). MiR-592 targets insulin-like growth factor 1 receptor to suppress cellular proliferation, migration, and invasion in HCC (Wang et al., 2017). MiR-203-3p targets IL-24 to modulate HCC (Huo et al., 2017). Serum levels of miR-203a also predict liver fibrosis in patients with HCV (Shaker and Senousy, 2017). Furthermore, miR-629-3p is sufficient to induce stable transformation of hepatocytes in vitro and in vivo, and its inhibition suppresses HCC growth (Hatziapostolou et al., 2013). Members of the miR-122 family are considered key factors in liver disease [reviewed in (Bandiera et al., 2015)]. MiR-122 is the most abundant miRNA in hepatocytes (Kitano and Bloomston, 2016). It facilitates replication of HCV viral RNA (Jopling et al., 2005). In patients with HCV, up-regulated serum levels of members of the miR-122 family are correlated with elevated aminotransferases, liver fibrosis progression, and HCC (Anadol et al., 2015). Dysregulated levels of circulating miR-122 are also associated with HCC and HBV infections (Hung et al., 2016). Plasma levels of miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-192-5p, and miR-193b-3p are associated with HBV infections (van der Ree et al., 2017). MiR-1224 is associated with acute liver failure in a murine model (Roy et al., 2017). This function of miR-1224 is mediated by repressing the anti-apoptotic gene, Nf1b, in hepatocytes (Roy et al., 2017). Finally, miR-885 has been linked to elevated aminotransferases and liver injury in a dog disease model (Koenig et al., 2016). Overall, based on the fact that the miRNAs identified in the present study have been previously shown to be involved in liver metabolism and liver pathogenesis with diverse etiologies, we conclude that HIV-1 infections alone could impact liver function.

Our results provide compelling evidence that HIV-1 infections impact liver-associated miRNAs. Moreover, our findings strongly suggest that the identified miRNAs might serve as non-invasive biomarkers of liver damage progression in patients with HIV-1. In particular, miR-193-5p, miR-125b-1-3p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-99a-5p and miR-122-3p, which are significantly correlated with ALT and AST levels and liver fibrosis stage, can possibly be used as predictive markers of liver damage progression in HIV-1 mono-infected patients. This work provides initial proof-of-principle that circulating liver-related miRNAs are dysregulated during chronic HIV-1 mono-infections and ART.

However, our findings are limited by the fact that 91% of the studied patients with HIV-1 mono-infections were undergoing ART. Therefore, we cannot discriminate the effects produced by virus infection and inflammation from the potentially toxic effects of ART. Nevertheless, among the studied patients with HIV-1 mono-infections, we observe differences between those with elevated and those with normal ALT levels. These findings strongly suggest that HIV-1 infections played a role in liver disease progression. Further work should include the analysis of a large cohort of treatment-naïve patients with HIV-1 infections.

Acknowledgements

We thank Jochen Hecht and the staff of the CRG Genomics Unit for providing excellent next generation sequencing services, and Gabriel Rech for his contribution to the initial setup of miRNA bioinformatic analysis tools at the IGTP High Content Genomics and Bioinformatics Unit. This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI14/00195) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2016-75277-R). MN is supported by the Instituto de Salud Carlos III through the Spanish AIDS network (RD16/0025/0041). AJ-P is supported by a contract with the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2014-069931).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.008>.

References

- Ameres, S.L., Zamore, P.D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475–488.
- Anadol, E., Schierwagen, R., Elfimova, N., Tack, K., Schwarze-Zander, C., Eischeid, H., Noetel, A., Boesecke, C., Jansen, C., Dold, L., Wasmuth, J.C., Strassburg, C.P., Spengler, U., Rockstroh, J.K., Odenthal, M., Trebicka, J., 2015. Circulating microRNAs as a marker for liver injury in human immunodeficiency virus patients. *Hepatology* 61, 46–55.
- Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., Zeisel, M.B., 2015. miR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* 62, 448–457.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilmann, M., Dahlsveen, I.K., 2013. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59, S1–S6.
- Capobianco, V., Nardelli, C., Ferrigno, M., Iaffaldano, L., Pilone, V., Forestieri, P., Zambrano, N., Sacchetti, L., 2012. miRNA and protein expression profiles of visceral adipose tissue reveal miR-141/YWHAG and miR-520e/RAB11A as two potential miRNA/protein target pairs associated with severe obesity. *J. Proteome Res.* 11, 3358–3369.
- Caroli, A., Cardillo, M.T., Galea, R., Biasucci, L.M., 2013. Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *J. Cardiol.* 61, 315–320.
- Deeks, S.G., Tracy, R., Douek, D.C., 2013. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity* 39, 633–645.
- Egana-Gorrondo, L., Escriba, T., Boulanger, N., Guardo, A.C., Leon, A., Bargallo, M.E., Garcia, F., Gatell, J.M., Plana, M., Arnedo, M., Network, H.I.V.C.o.t.A.S., 2014. Differential microRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors. *PLoS One* 9, e106360.
- Ford, N., Shubber, Z., Meintjes, G., Grinsztajn, B., Eholie, S., Mills, E.J., Davies, M.A., Vitoria, M., Penazzato, M., Nsanangimana, S., Frigati, L., O'Brien, D., Ellman, T., Ajose, O., Calmy, A., Doherty, M., 2015. Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. HIV* 2, e438–444.
- Fulcher, J.A., Koukos, G., Koutsoumpa, M., Elliott, J., Drakaki, A., Iliopoulos, D., Anton, P.A., 2017. Unique microRNA expression in the colonic mucosa during chronic HIV-1 infection. *AIDS* 31, 1925–1934.
- Guay, C., Roggli, E., Nesca, V., Jacovetti, C., Regazzi, R., 2011. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl. Res. : J. Lab. Clin. Med.* 157, 253–264.
- Hatziapostolou, M., Polytrachou, C., Iliopoulos, D., 2013. miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends Endocrinol. Metabol.* 24, 361–373.
- Hung, C.H., Hu, T.H., Lu, S.N., Kuo, F.Y., Chen, C.H., Wang, J.H., Huang, C.M., Lee, C.M., Lin, C.Y., Yen, Y.H., Chiu, Y.C., 2016. Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. *Int. J. Canc.* 138, 714–720.
- Huo, W., Du, M., Pan, X., Zhu, X., Gao, Y., Li, Z., 2017. miR-203a-3p.1 targets IL-24 to modulate hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis. *FEBS open bio* 7,

- 1085–1091.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P., 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Kitano, M., Bloomston, P.M., 2016. Hepatic stellate cells and microRNAs in pathogenesis of liver fibrosis. *J. Clin. Med.* 5.
- Koenig, E.M., Fisher, C., Bernard, H., Wolenski, F.S., Gerrein, J., Carsillo, M., Gallacher, M., Tse, A., Peters, R., Smith, A., Meehan, A., Tirrell, S., Kirby, P., 2016. The beagle dog MicroRNA tissue atlas: identifying translatable biomarkers of organ toxicity. *BMC Genom.* 17, 649.
- Li, C., Gao, Y., Zhang, K., Chen, J., Han, S., Feng, B., Wang, R., Chen, L., 2015. Multiple roles of MicroRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential. *Cell. Physiol. Biochem. Inter. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 37, 2143–2159.
- Li, F., Ma, N., Zhao, R., Wu, G., Zhang, Y., Qiao, Y., Han, D., Xu, Y., Xiang, Y., Yan, B., Jin, J., Lv, G., Wang, L., Xu, C., Gao, X., Luo, S., 2014. Overexpression of miR-483-5p/3p cooperate to inhibit mouse liver fibrosis by suppressing the TGF-beta stimulated HSCs in transgenic mice. *J. Cell Mol. Med.* 18, 966–974.
- Li, H., Homer, N., 2010. A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing. *Briefings Bioinf.* 11, 473–483.
- Liang, L., Wong, C.M., Ying, Q., Fan, D.N., Huang, S., Ding, J., Yao, J., Yan, M., Li, J., Yao, M., Ng, I.O., He, X., 2010. MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology* 52, 1731–1740.
- Liu, W., Hu, J., Zhou, K., Chen, F., Wang, Z., Liao, B., Dai, Z., Cao, Y., Fan, J., Zhou, J., 2017. Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncotargets Ther.* 10, 3843–3851.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Mao, K., Zhang, J., He, C., Xu, K., Liu, J., Sun, J., Wu, G., Tan, C., Zeng, Y., Wang, J., Xiao, Z., 2014. Restoration of miR-193b sensitizes Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Canc. Lett.* 352, 245–252.
- Mazzu, Y.Z., Hu, Y., Soni, R.K., Mojica, K.M., Qin, L.X., Agius, P., Waxman, Z.M., Mihailovic, A., Socci, N.D., Hendrickson, R.C., Tuschl, T., Singer, S., 2017. miR-193b-regulated signaling networks serve as tumor suppressors in liposarcoma and promote adipogenesis in adipose-derived stem cells. *Canc. Res.* 77, 5728–5740.
- Mitchell, A.J., Gray, W.D., Hayek, S.S., Ko, Y.A., Thomas, S., Rooney, K., Awad, M., Roback, J.D., Quyyumi, A., Searles, C.D., 2016. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. *Sci. Rep.* 6, 32651.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10513–10518.
- Montes-de-Oca, M., Blanco, M.J., Marquez, M., Soto, M.J., Fernandez-Gutierrez, C., Rodriguez-Ramos, C., Giron-Gonzalez, J.A., 2011. Haemodynamic derangement in human immunodeficiency virus-infected patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: the role of bacterial translocation. *Liver Int. Offic. J. Inter. Assoc. Study Liver* 31, 850–858.
- Petrelli, A., Perra, A., Schernhuber, K., Cargnelutti, M., Salvi, A., Migliore, C., Ghiso, E., Benetti, A., Barlati, S., Ledda-Columbano, G.M., Portolani, N., De Petro, G., Columbano, A., Giordano, S., 2012. Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. *Oncogene* 31, 4517–4526.
- Rockstroh, J.K., 2017. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in HIV. *Current HIV/AIDS Rep.* 14, 47–53.
- Roy, S., Bantel, H., Wandrer, F., Schneider, A.T., Gautheron, J., Vucur, M., Tacke, F., Trautwein, C., Luedde, T., Roderburg, C., 2017. miR-1224 inhibits cell proliferation in acute liver failure by targeting the antiapoptotic gene Nfib. *J. Hepatol.*
- Shaker, O.G., Senousy, M.A., 2017. Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. *J. Viral Hepat.* 24, 636–644.
- Shi, J., Dong, M., Li, L., Liu, L., Luz-Madrugal, A., Tsonis, P.A., Del Rio-Tsonis, K., Liang, C., 2015. mirPro-a novel standalone program for differential expression and variation analysis of miRNAs. *Sci. Rep.* 5, 14617.
- So-Armah, K.A., Lim, J.K., Lo Re, V., Tate, J.P., Chang, C.H., Butt, A.A., Gibert, C.L., Rimland, D., Marconi, V.C., Goetz, M.B., Rodriguez-Barradas, M.C., Budoff, M.J., Tindle, H.A., Samet, J.H., Justice, A.C., Freiberg, M.S., Veterans Aging Cohort Study Project, T., 2017. FIB-4 stage of liver fibrosis predicts incident heart failure among HIV-infected and uninfected patients. *Hepatology* 66, 1286–1295.
- Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K., Gorden, P., Kahn, C.R., 2017. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542, 450–455.
- van der Ree, M.H., Jansen, L., Kruize, Z., van Nuenen, A.C., van Dort, K.A., Takkenberg, R.B., Reesink, H.W., Kootstra, N.A., 2017. Plasma MicroRNA Levels Are Associated With Hepatitis B e Antigen Status and Treatment Response in Chronic Hepatitis B Patients. *J. Infect. Dis.* 215, 1421–1429.
- Wang, W., Zhang, H., Tang, M., Liu, L., Zhou, Z., Zhang, S., Wang, L., 2017. MicroRNA-592 targets IGF-1R to suppress cellular proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* 13, 3522–3528.
- Wang, W., Zhao, L.J., Tan, Y.X., Ren, H., Qi, Z.T., 2012. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 18, 5442–5453.
- Wang, Y., Gao, Y., Shi, W., Zhai, D., Rao, Q., Jia, X., Liu, J., Jiao, X., Du, Z., 2015. Profiles of differential expression of circulating microRNAs in hepatitis B virus-positive small hepatocellular carcinoma. *Canc. Biomarkers Sect. A Dis. Markers* 15, 171–180.
- Wiest, R., Garcia-Tsao, G., 2005. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 41, 422–433.
- Yahyaee, S., Biasin, M., Saule, I., Gnudi, F., De Luca, M., Tasca, K.I., Trabattini, D., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Clerici, M., 2016. Identification of a specific miRNA profile in HIV-exposed seronegative individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 73, 11–19.

4.2. Artículo 2

Franco S, Buccione D, et al. Circulating microRNA signatures that predict liver fibrosis progression in patients with HIV-1/hepatitis C virus coinfections. AIDS 2021 July 15;35(9): 1355-1363. DOI: 10.197/QAD.0000000000002895.

Circulating microRNA signatures that predict liver fibrosis progression in patients with HIV-1/hepatitis C virus coinfections

Sandra Franco^a, Daniela Buccione^b, Cristina Tural^b
and Miguel Angel Martinez^a

See related paper on page 1499

Objective: The lack of available biomarkers for diagnosing and predicting different stages of liver disease with a noninvasive strategy is currently one of the main challenges that clinicians are facing. Recent evidence indicates that the plasma levels of specific microRNAs (miRNAs) may be significantly altered in patients with liver injury, including those with HIV type 1 (HIV-1) infections.

Design/methods: Large-scale deep sequencing analysis of small RNA expression was performed on plasma samples from 46 patients with HIV-1/hepatitis C virus (HCV) coinfections that did not exhibit liver fibrosis at the time of sampling.

Results: A total of 1065 different miRNAs were identified. After a mean of 10.3 years, 26 out of the 46 patients developed liver fibrosis (stage F2–4) and 20 remained without signs of liver fibrosis (stage F0–1). We identified a signature of seven miRNAs: 100–5p, 192–5p, 99a-5p, 122–5p, 125b-2–3p, 1246 and 194–5p, which were highly correlated with progression to liver fibrosis. These seven miRNAs detected liver fibrosis progression with an area under the curve (AUC) of 0.910–0.806. Two miRNAs, 100–5p and 192–5p, which displayed the best AUC values, yielded a sensitivity of 88% and a specificity of 85% for detecting liver fibrosis progression.

Conclusion: Our results demonstrated that circulating miRNA levels had potential in predicting liver fibrosis progression before the clinical detection of liver fibrosis or significant clinical signs, such as elevated liver transaminases or platelets. Thus, our results might facilitate predictions of liver injury progression in patients with HIV-1-infections.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2021, **35**:1355–1363

Keywords: circulating microRNAs, HIV-1 infection, liver disease, risk prediction

Introduction

Chronic, noninfectious comorbidities are increasingly important in the medical care of the ageing population of patients infected with HIV type 1 (HIV-1). Interests have focused on how a chronic HIV-1 infection might affect age-related diseases, such as liver disease. Liver disease is a leading cause of deaths unrelated to AIDS among individuals living with HIV-1 [1]. In the past, a hepatitis C virus (HCV) coinfection was the leading cause of liver disease in individuals with HIV-1. Currently, in

developing countries, the introduction of HCV treatment with direct-acting antivirals (DAAs) has almost eradicated HCV coinfections in patients with HIV-1. Nevertheless, HIV-1/HCV coinfections remain an important area of study, mainly for two reasons. First, HCV eradication in patients with cirrhosis or precirrhosis does not completely eliminate liver disease progression. Second, HIV-1/HCV coinfections might provide a useful model for learning about liver disease in patients with HIV-1 mono-infections or even in the general population.

^aIrsiCaixa, and ^bInternal Medicine Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Spain.

Correspondence to Miguel Angel Martinez, Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain.

Tel: +34 934656374; fax: +34 934653968; e-mail: mmartinez@irsicaixa.es

Received: 12 November 2020; revised: 12 March 2021; accepted: 16 March 2021.

DOI:10.1097/QAD.0000000000002895

One of the main challenges, in general, that clinics are currently confronting is the lack of available biomarkers for diagnosing and predicting the different stages of liver diseases, such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH), with a noninvasive strategy, particularly among individuals infected with HIV-1 [2]. Notably, the prevalence of NAFLD in HIV-1 mono-infections is about 35%, which is higher than the global average of 23–25% [3,4]. Current data strongly suggest that HIV-1 and associated drug exposure play a role in the development and progression of NAFLD and NASH in individuals living with HIV-1 [4,5].

MicroRNAs (miRNAs) are 19–22-nucleotide, noncoding RNAs that act as negative regulators of translation. MicroRNAs are involved in numerous cellular processes [6]. A growing body of evidence has established that epigenetic mechanisms, particularly those associated with the deregulation of gene expression and the activities of miRNAs, play a major role in many diseases, including cancer [7], diabetes [8], obesity [9] and cardiovascular disease [10]. Recent data have indicated that plasma levels of specific miRNAs might be significantly altered in individuals with liver injuries [11].

Currently, several noninvasive tools for diagnosing liver disease are available, including plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) or platelets; algorithms, such as fibrosis-4 (FIB-4) and enhanced liver fibrosis (ELF test); or liver transient elastography [12]. In addition, plasma miRNA levels have been explored as a noninvasive diagnostic tool for detecting the presence of liver injury in the general population [11,13], in patients with HIV-1 mono-infections [2,14,15] and in patients with HIV-1/HCV coinfections [16]. As previously described for other diseases, here, we aimed to explore the capacity of circulating miRNAs for predicting liver fibrosis progression before signs of fibrosis (i.e. stage F0–1) or other clinical parameters were evident. Our aim was to identify patients at high risk of developing liver disease. To that end, we performed a large-scale deep sequencing analysis of small RNA expression on plasma samples from 46 patients with HIV-1/HCV coinfections that showed no liver fibrosis in a liver biopsy (fibrosis stage F0–1). We identified a circulating miRNA signature in patients who progressed to liver fibrosis.

Patients and methods

Study cohort

This cross-sectional study included plasma samples from 46 patients with HIV-1/HCV coinfections with baseline histological stage F0–1 liver fibrosis. All patients were previously described in a prospective study on HIV-1/

HCV [17]. The inclusion criteria were HIV-1/HCV coinfection; no previous HCV therapy; fibrosis stage F0–1, confirmed with a liver biopsy performed between January 1997 and December 2007; and a transient elastography performed between January 2010 and December 2015. Transient elastography values below 7.6 kilopascals (kPa) were considered fibrosis stages F0–1, and above 9.5 kPa fibrosis stages F2–4. To calculate ELF scores, plasma levels of procollagen III-amino-terminal peptide (PIIINP), hyaluronic acid and tissue inhibitor of metalloprotease-1 (TIMP1) were quantified using commercial ELISAs (Cusabio and Biorbit). The algorithm to calculate ELF scores was $-7.412 + [\ln \text{hyaluronic acid (ng/ml)} \times 0.681] + [\ln \text{PIIINP (ng/ml)} \times 0.775] + [\ln \text{TIMP1 (ng/ml)} \times 0.494] + 10$. The clinical characteristics of this cohort are summarized in Table 1. Plasma samples from a previously described [2] cohort of 21 healthy, uninfected volunteers were also analysed as a control group (Supplementary Table 1, <http://links.lww.com/QAD/C84>). Patient and healthy donor samples were obtained with written informed consent, as required for Institutional Review Board approved protocols.

RNA extraction

RNA was extracted with the miRCURY Isolation kit-Biofluids (Exiqon, Vedbaek, Denmark). First, 300 μl of plasma was precleared by centrifuging for 5 min at $3000 \times g$. We collected 200 μl of cleared plasma supernatant and added 3 μg of glycogen carrier [Ambion (Thermo Fisher, Rockford, Illinois, USA)] and 2 fmol synthetic RNA from a spike-in mix (spikein kit, Exiqon). RNA was eluted in 50 μl of RNase-free water. To analyse the robustness of the plasma RNA isolation procedure and the quality of biological samples for assaying miRNA expression, we performed a quality control analysis of the total RNA extracted from each plasma sample. Samples were amplified with the miRNA QC PCR panel (Exiqon) and the miRCURY Locked Nucleic Acid (LNA) Universal Reverse Transcription (RT) microRNA PCR system. Haemolysis was detected by analysing the expression levels of red blood cell specific miR-451 and stable miR-23a. We evaluated the ΔCt (miR-23a-miR-451), and defined values less than 5 as no haemolysis and values at least 7 as an increased risk of haemolysis. Samples with the lowest miR-451/miR-23a-3p ratios were selected for subsequent sequencing-based miRNA profiling (ΔCt values ranged from -0.72 to 5.86 , mean 2.33). Plasma RNA was reverse-transcribed and real-time PCR (RT-PCR) amplified with LNA-enhanced primers in the ExiLENT SYBR Green master mix (Exiqon) on a Lightcycler 480 RT-PCR system (LC480, Roche (Mannheim, Germany)). RT-quantitative PCR (RT-qPCR) Cp values were determined with the second derivative method provided in LC480 software.

Small RNA library generation and sequencing

Small RNA sequencing libraries were prepared according to the TruSeq Small RNA Sample Preparation Guide

Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics of nonprogressing and progressing HIV-1/HCV-coinfected patients.

Parameter	Nonprogressing (F0–1) Median (Range) N (%)	Progressing (F2–4) Median (Range) N (%)	P ^a
N	20	26	–
Age (years)	39 (27–59) ^b	36 (29–59)	0.5188
Sex, male, N (%)	14 (70)	19 (73)	–
Alkaline phosphatase (U/l)	66 (43–139)	70 (43–195)	0.9929
Bilirubin (μmol/l)	8.5 (4.4–17.2)	11.6 (1.5–22)	0.0090
Serum albumin (g/l)	44 (39–51)	45 (37–51)	0.6420
Creatinine (μmol/l)	84 (71–120)	82 (62–127)	0.9982
Total protein (g/l)	75 (66–84)	72 (61–87)	0.6968
Cholesterol (mmol/l)	168 (96–232)	166 (73–266)	0.8666
Triglycerides (mmol/l)	1.9 (0.6–7.5)	1.3 (0.5–3.4)	0.2449
Glucose (mmol/l)	4.7 (4.2–6.6)	5.1 (3.7–7.8)	0.3854
ALT (U/l)	51 (13–422)	84 (21–268)	0.1895
AST (U/l)	37 (20–369)	61 (20–145)	0.4548
GGT (U/l)	63 (20–262)	81 (12–1949)	0.2345
Platelet counts (x10 ⁹)	188 (114–301)	192 (107–297)	0.6278
PIIINP (ng/ml)	4.0 (1.3–10.4)	4.0 (1.3–8.7)	0.3950
HA (ng/ml)	242 (90–428)	352 (91–1351)	0.0104
TIMP1 (ng/ml)	370 (109–1259)	448 (127–1996)	0.2762
ELF score	10.1 (8.5–12.5)	10.9 (8.5–12.9)	0.0510
FIB-4	1.1 (0.6–3.8)	1.4 (0.5–2.8)	0.2149
Steatosis	3 (15%)	6 (23%)	0.5726
On antiretroviral therapy	17 (85%)	26 (100%)	0.7060
CD4 ⁺	624 (336–1234)	481 (234–1431)	0.0300
CD8 ⁺	1237 (509–2314)	1024 (476–3222)	0.5600
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.52 (0.29–1.19)	0.53 (0.10–1.15)	0.5010
HCV VL (log)	5.6 (1.7–5.9)	5.7 (1.7–7.5)	0.1718
Detectable HIV VL (>100)	6 (30%)	12 (46%)	0.4575

^aMann–Whitney test.^bMedian, IQR.

(Illumina, San Diego, California, USA). Approximately 1 μg of total RNA was used as starting material. Twelve PCR cycles were performed after ligation of the 3' and 5' adapters. Libraries were constructed in batches of 24 samples. To prevent possible confounding due to technical biases, we performed a randomized, balanced representation of the three study groups, progression, nonprogression and healthy individuals, in every batch. Prior to pooling and size selection, individual library yields and molarities were determined, based on an integration of the 135–160 bp size range, with the DNA 1000 Kit on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Libraries exhibited visible size patterns and yields according to specifications (with major peaks expected around 142 bp for miRNAs and 152 for piwiRNAs). All libraries were indexed, based on barcoded adapter ligation. Libraries were combined to form independent pools. Next, an automated pooled library size selection was carried out. Each individual pool was size-selected for products between 115 and 165 bp with the Pippin Prep automated gel system and 3% agarose dye-free gel cassettes with internal standards (Sage Science (Beverly, Massachusetts, USA)). Library pools were cleaned and concentrated by performing column centrifugation, prior to and after size selection, with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Size-selected library pool quality was reassessed with the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). The final concentration was

derived with qPCR, performed with the KAPA library quantification Kit for Illumina (Kapa Biosystems, Woburn, Massachusetts, USA) on a 7900-HT PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Foster City, California, USA). For each of the three pools, sequencing was performed on three independent HiSeq-2500 lanes (Illumina). Sequencing was performed on cBot and HiSeq-2500 instruments (Illumina), with the HiSeq single-read cluster generation, version 4, designed for the cBOT-HiSeq, and the HiSeq sequencing-by-synthesis 50-cycle kit, according to manufacturer protocols. Per-sample raw data files were generated in fastq format with bcl2fastq conversion software (Illumina). We also performed a quality control step to select samples with minimal signs of haemolysis. None of the miRNA sequences that were differentially expressed between cases and controls overlapped with miRNA sequences that originated in platelets or erythrocytes.

miRNA sequence analysis

We discarded sequencing adapters, mapped miRNAs to the reference human genome and assessed the RNA biotypes for each sample with the programs: cutadapt [18], STAR [19] and featureCounts [3,20], respectively. Data were stored with miRBase [21], and sRNAbench [22] was used for the identification of miRNAs (canonical and isomiR variants). MiRNA analyses were performed with miRTop [23]. Output files were generated in the GFF3 format (<http://gmod.org/wiki/>

GFF3). Differential expression analyses were performed with the DeSeq2 [24] and Glimma [25] packages provided in R software (<http://www.r-project.org>). The number of false-differentially expressed miRNAs was reduced with the Approximate Posterior Estimation for the Generalized Linear Model method [26].

Statistical analysis

Associations between miRNA levels and liver fibrosis (transient elastography measurements) were evaluated with the Pearson correlation method. Mean values were compared between groups with the Mann–Whitney test. Frequencies were compared between groups with the Chi-square test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed with the Wilson–Brown method, with a 95% confidence interval (95% CI). All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 8.3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

MiRNA sequence data

The data are publicly available in the GEO database under accession number GSE161845 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Results

Initially, we performed a large-scale deep sequencing analysis of small RNA expression in plasma samples from 46 patients with HIV-1/HCV coinfections that did not exhibit liver fibrosis (stages F0–1) at the time of sampling (Table 1) and in 21 uninfected healthy controls. After a mean of 10.3 years, 26 patients with coinfections developed liver fibrosis (stages F2–4; progression group) and 20 showed no sign of liver fibrosis (stages F0–1; nonprogression group). Remarkably, at the time of sampling, no significant clinical differences were observed between the progression and nonprogression groups (i.e. sex, age, AST, ALT, GGT, platelets, PIIINP, ELF score or FIB-4 index; Table 1). However, the levels of bilirubin, hyaluronic acid and the number of CD4⁺ cells were significantly different in the progression group, compared with the nonprogression group (Table 1). When all patients with HIV-1/HCV coinfections were compared with 21 uninfected healthy patients, those with coinfections had significantly higher levels of hepatic enzymes (ALT and AST), alkaline phosphatase, creatinine and triglycerides, and a lower number of platelets (Supplementary Table 1, <http://links.lww.com/QAD/C84>). Moreover, the 20 patients in the nonprogression group had significantly higher levels of ALT, AST, alkaline phosphatase, creatinine and triglycerides, and a lower number of platelets, compared with healthy controls.

Among an average of 3.2 million miRNA reads per sample, we detected 1065 different miRNAs across all analysed plasma samples (median, 712 miRNAs; interquartile range:

672–750). To identify potential miRNA biomarker candidates, we applied highly stringent cutoff values, for plasma abundance (average log₂ counts per million >5), for effect size (fold-change >2.0) and for significance (adjusted $P < 0.05$). Compared with the 21 healthy controls, the 46 patients with coinfections displayed 16 upregulated and 1 downregulated miRNAs (Supplementary Table 2, <http://links.lww.com/QAD/C85>). Among these 17 identified miRNAs, some (miRNA-122-5p, miRNA-192-5p and miRNA-375) were previously associated with liver disease and NAFLD in the general population [11,12]. Similarly, others were previously associated with HIV-1 infections (miRNA-100-5p, miRNA-99a-5p, miRNA-30a-5p and miRNA-96-5p) [2]. Next, we compared miRNA profiles between the progression and nonprogression groups. As shown in Fig. 1a, among the 16 upregulated miRNAs, seven (miRNA-100-5p, miRNA-192-5p, miRNA-99a-5p, miRNA-122-5p, miRNA-125b-2-3p, miRNA-1246 and miRNA-194-5p) were highly associated with progression to liver fibrosis (Table 2, Fig. 1b). These seven miRNAs were significantly upregulated at baseline in the progression group, and they significantly correlated at the end point with transient elastography scores of the all 46 coinfecting patients (respectively: $r = 0.51$, $P = 0.0003$; $r = 0.47$, $P = 0.0010$; $r = 0.47$, $P = 0.0009$; $r = 0.47$, $P = 0.0010$; $r = 0.42$, $P = 0.0040$; $r = 0.51$, $P = 0.0003$; and $r = 0.40$, $P = 0.0058$; Fig. 2). These results supported the notion that baseline circulating plasma levels of the seven identified miRNAs might have prognostic value in predicting liver fibrosis stage advancement. No significant correlations were found between baseline ALT, AST, PIIINP or FIB-4 values and the transient elastography scores (respectively, $r = 0.02$, $P = 0.4128$; $r = 0.03$, $P = 0.2703$; $r = 0.03$, $P = 0.2381$ and $r = 0.06$, $P = 0.1061$). A weak correlation was observed between baseline CD4⁺ cell counts, ELF scores and transient elastography scores (respectively, $r = -0.31$, $P = 0.0396$; $r = 0.37$, $P = 0.0123$). Levels of two miRNAs, miRNA-100-5p and miRNA-122-5p, also poorly correlated with baseline CD4⁺ cell counts ($r = 0.14$, $P = 0.0108$ and $r = 0.12$, $P = 0.0164$, respectively). Interestingly, these seven miRNAs were highly correlated with each other (Supplementary Table 3, <http://links.lww.com/QAD/C86>). For instance, correlations were $r = 0.95$ ($P < 0.0001$) for miRNA-100-5p and miRNA-99a-5p; $r = 0.89$ ($P < 0.0001$) for miRNA-100-5p and miRNA-192-5p; $r = 0.91$ ($P < 0.0001$) for miRNA-192-5p and miRNA-99a-5p; and $r = 0.89$ ($P < 0.0001$) for miRNA-192 and miRNA-5p-122-5p. The correlations strongly suggested that these miRNAs were equivalent predictors of liver fibrosis; thus, measuring pairs or three of these miRNAs would be unlikely to improve the predictive performance of any one of these seven miRNAs.

Next, we evaluated the diagnostic performance of these seven miRNAs with a ROC analysis. For miRNA-100-5p, the area under the ROC curve (AUC) was 0.902 (95% CI: 0.814–0.990, $P < 0.0001$) (Fig. 3a). With a stringent

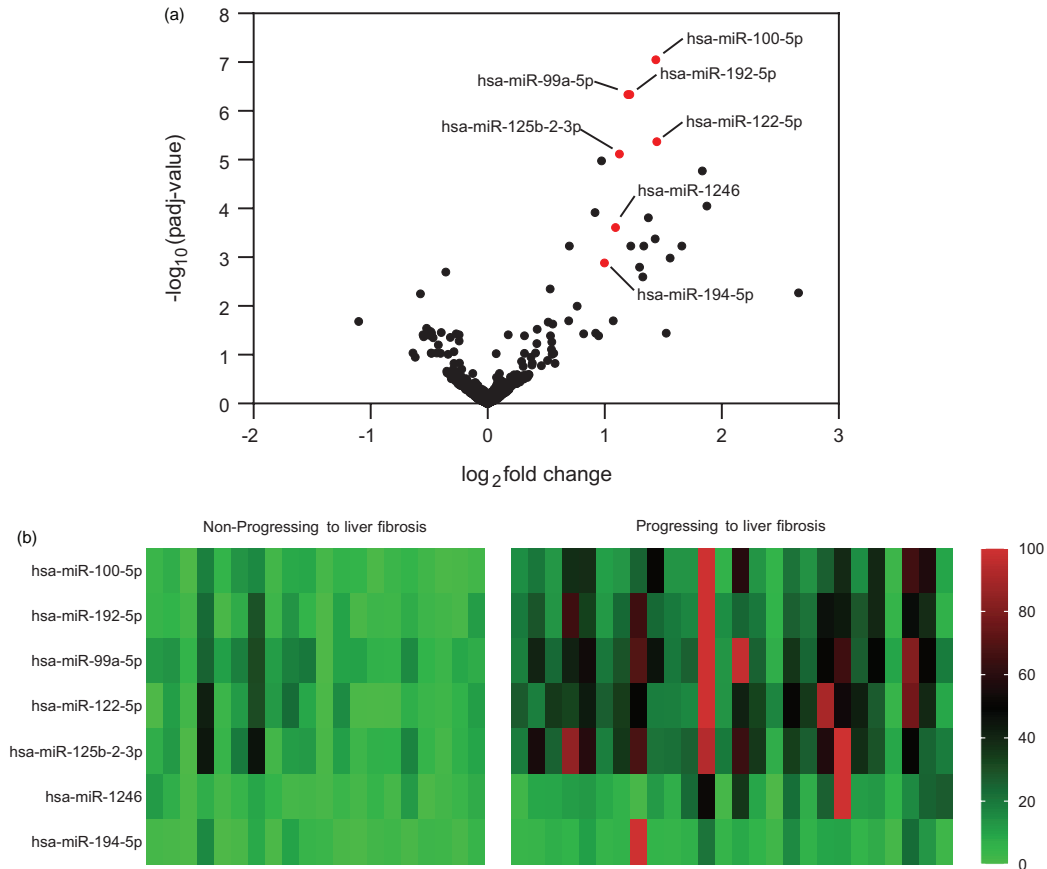


Fig. 1. Differences in baseline microRNA patterns in patients with HIV-1/HCV coinfections that progressed to liver fibrosis. (a) Volcano plot of differentially regulated baseline microRNAs in patients with HIV-1/HCV co-infections that progressed to liver fibrosis. To identify biomarker candidates, we set the cutoff for the plasma concentration (average \log_2 counts per million) to >5 , the fold-change in effect-size to >2.0 and the significance level to an adjusted $P < 0.05$. A set of seven upregulated (red) microRNAs was identified. (b) Expression heat map of regulated miRNAs in plasma of patients with HIV-1/HCV coinfections; red = higher expression than the mean; green = lower expression than the mean, shown in the legend at the bottom.

Table 2. Differential expression at the total miRNA level for HIV-1/HCV coinfection nonprogressing versus progressing patients.

miRNA	Base mean ^a	Fold change ^b	Log2 fold change	P-adjusted ^c
hsa-miR-100-5p	1520.92	2.71	1.44	8.92×10^{-8}
hsa-miR-192-5p	66 477.89	2.32	1.214	4.59×10^{-7}
hsa-miR-99a-5p	569.2	2.29	1.20	4.59×10^{-7}
hsa-miR-122-5p	276.15	2.72	1.44	4.24×10^{-6}
hsa-miR-125b-2-3p	233.45	2.18	1.13	7.67×10^{-6}
hsa-miR-1246	2705.66	2.13	1.10	0.00024
hsa-miR-194-5p	121.47	2.00	1.00	0.0013

^aThe average of the normalized count values according to DeSeq2.

^bThe effect size estimate according to DeSeq2.

^cP value adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg.

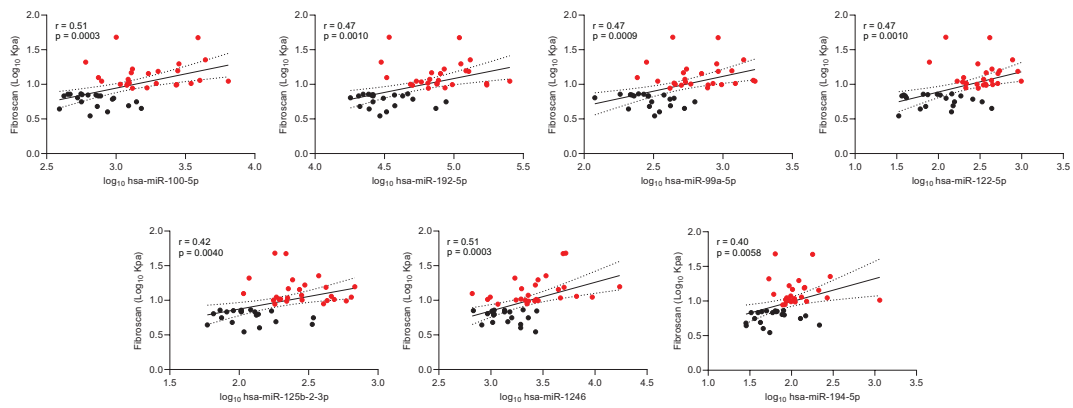


Fig. 2. Pearson linear correlations between baseline plasma levels of miRNAs 100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 and 194-5p and the transient elastography liver fibrosis score. Red = liver fibrosis progression; black = nonprogression.

cutoff of more than 981 miRNA-100-5p counts, we found a sensitivity of 88% (95% CI: 71-96) and a specificity of 83% (95% CI: 64-95) for distinguishing progression from nonprogression. The odds ratio (OR) for an adverse event of the diagnostic performance of miRNA-100-5p was 43.44 ($P < 0.0001$). Similarly, for miRNA-192-5p, the ROC AUC was 0.910 (95% CI: 0.823-0.996, $P < 0.0001$) and, with a stringent cutoff of more than 47 604 miRNA-192-5p counts, the sensitivity and specificity values were 88% (95% CI: 71-96) and 85% (95% CI: 64-95), respectively (OR = 43.44, $P < 0.0001$) (Fig. 3a). Comparable results were obtained with miRNAs 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 and 194-5p, which yielded AUC values of 0.900 (95% CI: 0.811-0.989, $P < 0.0001$), 0.900 (95% CI: 0.807-0.993, $P < 0.0001$), 0.900 (95% CI: 0.803-0.997, $P < 0.0001$), 0.806 (95% CI: 0.671-0.935, $P < 0.0004$) and 0.842 (95% CI: 0.741-0.970, $P < 0.0001$), respectively (Fig. 3a). Importantly, the observed miRNA AUCs exceeded the AUCs of other standard baseline circulating blood parameters, including

ALT, AST, GGT, PIIINP, ELF score and FIB-4, which yielded AUC values of 0.759 (95% CI: 0.615-0.93, $P = 0.0029$), 0.778 (95% CI: 0.636-0.920, $P = 0.0014$), 0.592 (95% CI: 0.424-0.760, $P = 0.2875$), 0.579 (95% CI: 0.396-0.761, $P = 0.3875$), 0.682 (95% CI: 0.510-0.854, $P = 0.0424$) and 0.633 (95% CI: 0.464-0.801, $P = 0.1263$), respectively (Fig. 3b). Overall, these results indicated that circulating miRNAs showed predictive potential as biomarkers of liver fibrosis progression in patients with HIV-1/HCV coinfections.

These results were based on the differential expression of total miRNAs. However, many miRNAs have several length and/or sequence variants, termed isomiRNAs [27]. Variant miRNAs, isomiRNAs and canonical miRNAs are available in several databases (i.e. miRBase). Therefore, we generated matrices to explore miRNA expression at any level: canonical miRNAs, variants, single isomiRNAs or total miRNAs. Interestingly, we found that isomiRNAs had greater statistical power in the differential expression analysis. For example, in the

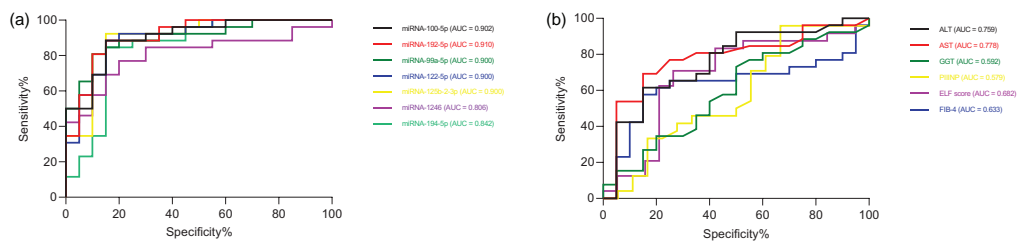


Fig. 3. ROC curves show the diagnostic performance of miRNAs 100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246, and 194-5p for predicting liver fibrosis progression in patients with HIV-1/HCV coinfections. (a) ROC curves of baseline miRNAs; (b) ROC curves of baseline clinical parameters, including aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), procollagen III-amino terminal peptide (PIIINP), enhanced liver fibrosis (ELF) score and fibrosis-4 (FIB-4).

differential expression analysis, the miRNA-100-5p iso_3p:-2 variant exhibited better results than total miRNA-100-5p (Supplementary Table 4, <http://links.lww.com/QAD/C87>). Importantly, the miRNA-100-5p analysis showed that expression of the canonical variant was nearly absent. Furthermore, compared to the total miRNA-100-5p, the miRNA-100-5p iso_3p:-2 variant displayed a better correlation with transient elastography scores ($r=0.61$, $P<0.0001$) and a better AUC (0.919, 95% CI: 0.837–1.000, $P<0.0001$). A differential, single variant analysis of miRNA-192-5p also improved the differential expression results (Supplementary Table 4, <http://links.lww.com/QAD/C87>). In this case, and in contrast to miRNA-100-5p, the canonical variant was the most highly expressed sequence (Supplementary Table 4, <http://links.lww.com/QAD/C87>). An individual analysis of the miRNA-192-5p variant also slightly improved the correlation with transient elastography scores ($r=0.51$, $P=0.0003$) and the AUC (0.915, 95% CI: 0.833–0.997, $P<0.0001$). However, the statistical power of differential expression was increased when the miRNA-192-5p iso_5p:-1 variant was analysed (Supplementary Table 4, <http://links.lww.com/QAD/C87>). This variant was better correlated with transient elastography scores ($r=0.55$, $P<0.0001$) and had a higher AUC (0.927, 95% CI: 0.853–1.000, $P<0.0001$). Thus, isomiRNA variants might provide greater statistical power in the differential expression analysis, due to their specificity, and consequently, they might represent better biomarkers for differentiating among conditions of interest.

Discussion

The present study demonstrated that a miRNA-based biomarker could anticipate liver disease evolution. Our large-scale deep sequencing analysis identified a signature of seven miRNAs (100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 and 194-5p) that specifically detected liver fibrosis progression before clear signs of fibrosis were evident. In particular, two miRNAs, 100-5p and 192-5p, displayed the highest predictive value, based on sensitivity and specificity.

Remarkably, the miRNAs identified here were previously related to liver injury. MiR-100-5p and 99a-5p, which belong to the miR-100 family, were previously associated with hepatocellular carcinoma (HCC) [28], including hepatitis B virus (HBV)-related HCC [29,30]. These miRNAs were downregulated in HCC liver tissues [31], upregulated in the serum of patients with HCC [29,30], and upregulated in liver tissue of patients with NASH [32]. They are also deregulated in many human cancers, wherein they are considered tumour suppressors, because they target tumour-related genes, such as mTOR, AKT1 and PI3K, among others (Li *et al.*, 2015). MiRNA-192-5p is abundant in human liver

tissue. It has been associated with histological liver disease severity, it is significantly upregulated in NASH, it is correlated with HCC and it is clearly profibrogenic [33,34]. We previously showed that these three miRNAs, 100-5p, 99a-5p and 192-5p, were significantly upregulated in patients with HIV-1 mono-infections [2].

The other four miRNAs, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 and 194-5p, which were associated with liver fibrosis progression, were also previously implicated in liver disease and cancer. MiRNA-122 represents 70% of all miRNA copies found in hepatocytes [35], and was identified as a major regulator of hepatic lipid metabolism [11]. Deregulated miRNA-122 expression was associated with a variety of liver diseases and dysfunctions, including viral hepatitis, alcohol-induced liver disease, NAFLD, NASH and HCC [13,16,34,36–39]. Accumulated evidence has indicated that hepatic miR-122 secretion is promoted by fatty acid dependent mechanisms [40]. Circulating miRNA-125b-2-3p levels were suggested as a novel biomarker for HBV-positive HCC [41]. MiRNA-125b-2-3p was also associated with renal cell carcinoma, wherein it promoted tumour metastasis by targeting EGR1 [39]. MiRNA-1246 was upregulated in the serum of patients that developed HCC, and it was associated with aggressive tumour characteristics [42,43]. MicroRNA-1246 directly targets glycogen synthase kinase 3 β , 25axis inhibition protein2, nuclear factor IB and protein kinase cAMP dependent type I regulatory subunit α . It was also shown to be involved in tumour progression and metastasis [44,45]. Finally, miRNA-194 was described as a valuable prognostic marker of HCC [46]. Its expression was significantly reduced in HCC tissues, and it was an independent prognostic factor for poor HCC prognosis and low disease-free survival rates. MiR-194 regulates the progression of HCC by directly inhibiting the expression of MAP4K4. Plasma levels of miRNA-194-5p were also associated with hepatitis B e-antigen status in patients with chronic HBV infections [47]. In summary, current data on the seven miRNAs described in our study indicate that they all impact liver physiology, which implicates them in liver fibrosis development.

Five of the seven miRNAs identified here (100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p and 125b-2-3p) were formerly found upregulated in the circulating plasma of HCV and HIV-1 mono-infected patients [2]. These results indicated that HIV-1 mono-infections and/or antiretroviral therapy might interfere with liver metabolism. Indeed, previous studies showed that liver fibrosis is more rapid in HIV-1/HCV-coinfected patients as compared to HCV mono-infected [48]. Although high rates of HCV eradication are obtained nowadays, better biomarkers of liver injury progression are needed in HIV-1 patients cured of HCV.

The implication that these seven miRNAs play roles in liver cell metabolism suggested that, in addition to their

potential as predictive markers, they might also serve as therapeutic targets. Indeed, miR-100 expression reduced glioblastoma tumorigenicity, which suggested that it has clinical potential as a miRNA-related therapy for glioblastoma [49]. A phase 2a clinical trial showed that a miRNA-122-antisense oligonucleotide [Miravirsen (Santaris Pharma, Copenhagen, Denmark)] could reduce viral RNA loads in patients with HCV infections [50]. To date, no clinical trials have been designed to test miRNA-based therapies specifically for NAFLD/NASH. However, encouraging data have suggested that miR-122 had pharmacological inhibitory or genetic depletion effects on hepatocyte differentiation, spontaneous progression to fibrosis and carcinogenesis [51,52]. MiRNA-194 is another example of a potential target; the overexpression of miRNA-194 in hepatoma cells increased their sensitivity to sorafenib, a treatment for HCC [53].

Currently, miRNAs are annotated as a single defined sequence (canonical), despite the fact that many miRNAs have been identified with length and/or sequence variations [27]. These variants, called isomiRNAs, were capable of interacting with mRNAs, which demonstrated that isomiRNAs are real, physiological miRNA variants, and not a sequencing artifact. Our results demonstrated that miRNA results could be misinterpreted, when the canonical sequence was used in the differential expression analysis. Thus, abundant data on miRNAs previously obtained with RT-qPCR methods that employed oligonucleotides and probes based on canonical sequences might have been misinterpreted. On the basis of our results, and consistent with previous studies [23,27,54], we concluded that, due to their high specificity, isomiRNAs could provide greater resolution and better differential expression statistical power than canonical sequences.

In conclusion, in this exploratory study, we identified seven microRNAs that were associated with an elevated risk of developing liver fibrosis. These data must be validated in larger cohorts. In particular, miRNAs 100–5p and 192–5p could be candidates for new clinical/biological algorithms for predicting liver disease progression in relevant populations of patients with mono-HIV-1 or HIV-1/HCV coinfections. In addition, circulating levels of miRNAs might be suitable markers of liver fibrosis amelioration in patients with HIV-1/HCV coinfections who were treated with DAAs and cured of the HCV infection.

Acknowledgements

We are indebted to Beatriz Mothe and Patricia Cobarsi for providing the control, uninfected samples and data described in this study. We also thank Lauro Sumoy and

Jose Francisco Sanchez for fruitful discussions regarding the analysis of miRNAs.

S.F., M.A.M. and C.T. conceived the study. S.F., D.B. and C.T. analysed patient data. S.F., D.B. and C.T. supervised data and sample collection from patients with HIV-1/HCV coinfections. M.A.M. wrote the manuscript with inputs and corrections from all authors.

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI18/00157) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-103955RB-I00).

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Verna EC. **Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in patients with HIV.** *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; **2**:211–223.
- Franco S, Buccione D, Pluvinet R, Mothe B, Ruiz L, Nevot M, et al. **Large-scale screening of circulating microRNAs in individuals with HIV-1 mono-infections reveals specific liver damage signatures.** *Antiviral Res* 2018; **155**: 106–114.
- Guaraldi G, Maurice JB, Marzolini C, Monteith K, Milic J, Tsochatzis E, et al. **New drugs for NASH and HIV infection: great expectations for a great need.** *Hepatology* 2020; **71**:1831–1844.
- Maurice JB, Patel A, Scott AJ, Patel K, Thursz M, Lemoine M. **Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in HIV-monoinfection.** *AIDS* 2017; **31**:1621–1632.
- Lemoine M, Lacombe K, Bastard JP, Sèbire M, Fonquernie L, Valin N, et al. **Metabolic syndrome and obesity are the cornerstones of liver fibrosis in HIV-monoinfected patients.** *AIDS* 2017; **31**:1955–1964.
- Ameres SL, Zamore PD. **Diversifying microRNA sequence and function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**:475–488.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, et al. **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:10513–10518.
- Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. **Diabetes mellitus, a microRNA-related disease?** *Transl Res* 2011; **157**:253–264.
- Capobianco V, Nardelli C, Ferrigno M, Iaffaldano L, Pilone V, Forestieri P, et al. **MiRNA and protein expression profiles of visceral adipose tissue reveal miR-141/YWHAG and miR-520e/RAB11A as two potential miRNA/protein target pairs associated with severe obesity.** *J Proteome Res* 2012; **11**:3358–3369.
- Caroli A, Cardillo MT, Galea R, Biasucci LM. **Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease.** *J Cardiol* 2013; **61**:315–320.
- Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, Correia De Sousa M, Foti M. **MiRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy.** *Gut* 2019; **68**:2065–2079.
- Karsdal MA, Daniels SJ, Holm Nielsen S, Bager C, Rasmussen DGK, Loomba R, et al. **Collagen biology and noninvasive biomarkers of liver fibrosis.** *Liver Int* 2020; **40**:736–750.
- Starlinger P, Hackl H, Pereyra D, Skalicky S, Geiger E, Finsterbusch M, et al. **Predicting postoperative liver dysfunction based on blood-derived microRNA signatures.** *Hepatology* 2019; **69**:2636–2651.
- Yahyaei S, Biasin M, Saule I, Gnudi F, De Luca M, Tasca KI, et al. **Identification of a specific miRNA profile in HIV-exposed seronegative individuals.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; **73**:11–19.

15. Austermann C, Schierwagen R, Mohr R, Anadol E, Klein S, Pohlmann A, et al. **microRNA-200a: a stage-dependent biomarker and predictor of steatosis and liver cell injury in human immunodeficiency virus patients.** *Hepatol Commun* 2017; 1:36–45.
16. Anadol E, Schierwagen R, Elfimova N, Tack K, Schwarze-Zander C, Eischeid H, et al. **Circulating MicroRNAs as a marker for liver injury in human immunodeficiency virus patients.** *Hepatology* 2015; 61:46–55.
17. Sanmartín R, Tor J, Sanvisens A, López J, Jou A, Muga R, et al. **Progression of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected individuals on antiretroviral therapy with early stages of liver fibrosis at baseline.** *HIV Med* 2014; 15:203–212.
18. Martin M. **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.** *EMBnet journal* 2011; 17:10.
19. Wang T, Liu J, Shen L, Tonti-Filippini J, Zhu Y, Jia H, et al. **STAR: an integrated solution to management and visualization of sequencing data.** *Bioinformatics* 2013; 29:3204–3210.
20. Liao Y, Smyth GK, Shi W. **FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features.** *Bioinformatics* 2014; 30:923–930.
21. Kozomara A, Birgaonu M, Griffiths-Jones S. **MiRBase: from microRNA sequences to function.** *Nucleic Acids Res* 2019; 47:D155–D162.
22. Aparicio-Puerta E, Lebrón R, Rueda A, Gómez-Martín C, Gianoukakos S, Jaspez D, et al. **SRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression.** *Nucleic Acids Res* 2019; 47:W530–W535.
23. Desvignes T, Lohrer P, Eilbeck K, Ma J, Urgese G, Fromm B, et al. **Unification of miRNA and isomiR research: the mirGFF3 format and the mirtop API.** *Bioinformatics* 2020; 36:698–703.
24. Love MI, Huber W, Anders S. **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** *Genome Biol* 2014; 15:550.
25. Su S, Law CW, Ah-Cann C, Asselin-Labat ML, Blewitt ME, Ritchie ME. **Glimma: interactive graphics for gene expression analysis.** *Bioinformatics* 2017; 33:2050–2052.
26. Zhu A, Ibrahim JG, Love MI. **Heavy-Tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences.** *Bioinformatics* 2019; 35:2084–2092.
27. Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. **IsomiRs: the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome.** *Trends Genet* 2012; 28:544–549.
28. Li C, Gao Y, Zhang K, Chen J, Han S, Feng B, et al. **Multiple roles of microRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential.** *Cell Physiol Biochem* 2015; 37:2143–2159.
29. Wang Y, Gao Y, Shi W, Zhai D, Rao Q, Jia X, et al. **Profiles of differential expression of circulating microRNAs in hepatitis B virus-positive small hepatocellular carcinoma.** *Cancer Biomarkers* 2015; 15:177–186.
30. Jin Y, Wong YS, Goh BKP, Chan CY, Cheow PC, Chow PKH, et al. **Circulating microRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in hepatocellular carcinoma.** *Sci Rep* 2019; 9:10464.
31. Petrelli A, Perra A, Schernhuber K, Cargnelutti M, Salvi A, Migliore C, et al. **Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression.** *Oncogene* 2012; 31:4517–4526.
32. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. **Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression.** *Hepatology* 2008; 48:1810–1820.
33. Piroola CJ, Gianotti TF, Castaño GO, Mallardi P, Martino JS, Ledesma MMGL, et al. **Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum noncoding RNAs to liver histology and disease pathogenesis.** *Gut* 2015; 64:800–812.
34. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. **Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.** *J Clin Oncol* 2011; 29:4781–4788.
35. Chang J, Guo J-T, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. **Liver-Specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells.** *J Virol* 2008; 82:8215–8223.
36. Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al. **MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis.** *J Clin Invest* 2012; 122:2884–2897.
37. Satishchandran A, Ambade A, Rao S, Hsueh YC, Iracheta-Velive A, Tornai D, et al. **MicroRNA 122, regulated by GRLH2, protects livers of mice and patients from ethanol-induced liver disease.** *Gastroenterology* 2018; 154:2338–252e7.
38. Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. **Essential metabolic, anti-inflammatory, and antitumorigenic functions of miR-122 in liver.** *J Clin Invest* 2012; 122:2871–2883.
39. Meng X, Liu K, Xiang Z, Yu X, Wang P, Ma Q. **MiR-125b-2-3p associates with prognosis of ccRCC through promoting tumor metastasis via targeting EGR1.** *Am J Transl Res* 2020; 12:5575–5585.
40. Chai C, Rivkin M, Berkovits L, Simerzin A, Zorde-Khvalevsky E, Rosenberg N, et al. **Metabolic circuit involving free fatty acids, microRNA 122, and triglyceride synthesis in liver and muscle tissues.** *Gastroenterology* 2017; 153:1404–1415.
41. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, et al. **Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma.** *Mol Biol Rep* 2014; 41:4513–4519.
42. Pascut D, Cavalletto L, Pratama MY, Bresolin S, Trentin L, Basso G, et al. **Serum miRNA are promising biomarkers for the detection of early hepatocellular carcinoma after treatment with direct-acting antivirals.** *Cancers (Basel)* 2019; 11:.
43. Chuma M, Toyoda H, Matsuzaki J, Saito Y, Kumada T, Tada T, et al. **Circulating microRNA-1246 as a possible biomarker for early tumor recurrence of hepatocellular carcinoma.** *Hepatol Res* 2019; 49:810–822.
44. Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, et al. **Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246.** *Nat Commun* 2018; 9:771.
45. Zhang WC, Chin TM, Yang H, Nga ME, Lunny DP, Lim EK, et al. **Tumour-initiating cell-specific MIR-1246 and MIR-1290 expression converge to promote nonsmall cell lung cancer progression.** *Nat Commun* 2016; 7:.
46. Zhao Y, Li F, Zhang X, Liu A, Qi J, Cui H, et al. **MicroRNA-194 acts as a prognostic marker and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting MAP4K4.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:12446–12454.
47. Van Der Ree MH, Jansen L, Kruize Z, Van Nuenen AC, Van Dort KA, Bart Takkenberg R, et al. **Plasma microRNA levels are associated with hepatitis B e antigen status and treatment response in chronic hepatitis B patients.** *J Infect Dis* 2017; 215:1421–1429.
48. Chrysanthidis T, Loli G, Metallidis S, Germanidis G. **Mechanisms of accelerated liver fibrosis in HIV-HCV coinfection.** *AIDS Rev* 2017; 19:148–155.
49. Alrfaei BM, Vemuganti R, Kuo JS. **microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models.** *PLoS One* 2013; 8:e80865.
50. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. **Treatment of HCV infection by targeting microRNA.** *N Engl J Med* 2013; 368:1685–1694.
51. Thakral S, Ghoshal K. **miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir.** *Curr Gene Ther* 2015; 15:142–150.
52. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. **miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting.** *Cell Metab* 2006; 3:87–98.
53. Ran RZ, Chen J, Cui LJ, Lin XL, Fan MM, Cong ZZ, et al. **miR-194 inhibits liver cancer stem cell expansion by regulating RAC1 pathway.** *Exp Cell Res* 2019; 378:66–75.
54. Wu CW, Evans JM, Huang S, Mahoney DW, Dukek BA, Taylor WR, et al. **A Comprehensive Approach to Sequence-oriented IsomiR annotation (CASMiR): demonstration with IsomiR profiling in colorectal neoplasia.** *BMC Genomics* 2018; 19:401.

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

En la primera parte de nuestro proyecto comparamos los pacientes mono infectados por VIH-1, los mono infectados por VHC y un grupo control de individuos sanos. La diferencia en el nivel de miRNA se determinó comparando los perfiles de expresión de miRNAs entre cada grupo de pacientes y el grupo control de pacientes sanos.

La Tabla 1 del primer artículo muestra las características de los pacientes y los controles sanos relativos al primer artículo publicado. En comparación con los donantes sanos, las dos cohortes de pacientes mono infectados por VIH-1 y VHC mostraron niveles de enzimas hepáticas significativamente más altos (fosfatasa alcalina, ALT, AST y gamma-glutamyl transferasa) y recuentos de plaquetas normales, pero significativamente inferiores comparado con los controles sanos ($p < 0.005$, ver Tabla 1).

Los pacientes mono infectados por VIH-1, a diferencia de los mono infectados por VHC, mostraron niveles de triglicéridos significativamente más altos que los controles. Dentro del grupo de mono infectados por VIH-1 no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados con TARGA y los no tratados con respecto a sus niveles de ALT o AST ($p = 0.6387$ y $p = 0.7527$, respectivamente).

Los perfiles de expresión de miRNAs en los 20 pacientes mono infectados por VIH-1 que mostraban valores elevados de ALT se compararon con los de donantes sanos y los de 22 pacientes mono infectados por VIH-1 con valores normales o significativamente bajos de ALT ($p < 0.0001$) (Tabla 2 del primer artículo). De manera similar, los perfiles de expresión de miRNAs

determinados en 11 pacientes mono infectados por VIH-1 que presentaban HNR se compararon con los de donantes sanos y los de 22 pacientes del grupo de mono infectados por VIH-1 con niveles normales de ALT. Los pacientes con HNR mostraron niveles más altos de fosfatasa alcalina y menor recuento de plaquetas respecto a los sin HNR ($p = 0.0431$).

Identificamos 1355 miRNAs maduros en las muestras de estudio (mediana de 568 miRNAs; rango intercuartílico [RIQ]: 480-609). En el grupo de mono infectados por VIH-1, 25 miRNAs mostraron una desregulación significativa en comparación con sus niveles en donantes sanos: 24 de estos destacaron por niveles significativamente más elevados [rango: cambio de 4.27 veces a 2.04 veces (*fold change* - FC)], y 1 con niveles suprimidos (-2.57 FC; Fig. 1A y Tabla complementaria 1 del primer artículo).

Supplementary Table 1. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients vs healthy donors.

miRNA	Base Mean¹	Fold Change²	p-value	p-adjusted³
hsa-miR-885-5p	31.31	4.27	1.91E-09	1.03E-06
hsa-miR-629-5p	3.76	3.74	9.20E-08	4.25E-05
hsa-miR-125b-2-3p	9.38	2.86	6.84E-06	0.00033621
hsa-miR-193b-5p	27.74	2.75	1.17E+05	4.23E-04
hsa-miR-483-3p	2.77	2.65	0.00062091	0.00861313
hsa-miR-34a-5p	3.40	2.54	1.03E-03	0.01206372
hsa-miR-1224-5p	12.99	2.49	7.79E+05	1.83E-03
hsa-miR-100-5p	823.88	2.48	2.40E+07	3.25E-05
hsa-miR-215-5p	7.45	2.35	3.16E-04	0.00535068
hsa-miR-141-3p	3.36	2.34	1.50E-03	0.01465954
hsa-miR-192-5p	278.60	2.33	2.97E-06	0.00020073
hsa-miR-3130-5p	2.67	2.22	0.00115276	0.01273341
hsa-miR-99a-5p	325.69	2.21	4.98E+07	4.49E-05
hsa-miR-362-3p	9.45	2.21	2.56E-05	0.00077844
hsa-miR-18b-5p	3.95	2.19	0.00079525	0.00977794
hsa-miR-125b-1-3p	16.27	2.18	0.00031149	0.00535068
hsa-miR-96-5p	176.68	2.16	2.59E-05	0.00077844
hsa-miR-592	3.19	2.13	8.30E-03	4.844E-02
hsa-miR-193b-3p	12.06	2.13	0.00336882	0.02574048
hsa-miR-24-3p	82.26	2.12	6.11E-05	0.00150240
hsa-miR-375	2272.74	2.09	9.28E-06	0.00038638
hsa-miR-203a-3p	9.71	2.05	3.47E-03	0.02574048
hsa-miR-3173-5p	2.97	2.05	3.71E-03	0.02709660
hsa-miR-208b-3p	5.25	2.04	0.01099257	0.06259982
hsa-miR-4429	1.20	-2.57	0.00071599	0.00922268

¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

En el grupo de monoinfectados por VHC, 70 miRNAs mostraron una desregulación significativa en comparación con los controles sanos: 52 resultaron estar aumentados (rango: 9.3 a 2 FC), y 18 disminuidos (rango: -3.27 a -2.04 FC; Fig. 1B y Tabla complementaria 2 del primer artículo).

Supplementary Table 2. Dysregulated circulating miRNAs in HCV mono-infected patients vs healthy donors.

miRNA	Base Mean ¹	Fold Change ²	p-value	p-adjusted ³
hsa-miR-193b-5p	27.74	9.30	1.87E-17	1.16E-14
hsa-miR-483-5p	25.98	6.37	1.39E-11	1.51E-09
hsa-miR-1224-5p	12.99	5.43	1.12E-10	9.94E-09
hsa-miR-125b-1-3p	16.27	5.29	1.46E-11	1.51E-09
hsa-miR-885-5p	31.31	4.90	6.90E-09	4.78E-07
hsa-miR-4532	3.85	4.75	2.17E-07	9.03E-06
hsa-miR-100-5p	823.88	4.74	6.95E-14	2.16E-11
hsa-miR-192-5p	278.60	4.62	5.96E-13	1.24E-10
hsa-miR-592	3.19	4.31	1.97E-06	4.91E-05
hsa-miR-193b-3p	12.06	4.18	6.46E-07	1.92E-05
hsa-miR-125b-2-3p	9.38	3.86	3.79E-07	1.39E-05
hsa-miR-629-5p	3.76	3.67	6.79E-06	1.37E-04
hsa-miR-99a-5p	325.69	3.61	5.43E-12	8.45E-10
hsa-miR-203a-3p	9.71	3.41	9.44E-06	1.78E-04
hsa-miR-122-5p	1.94	3.33	7.62E-05	1.08E-03
hsa-miR-320b	1691.80	3.19	3.07E-08	1.91E-06
hsa-miR-215-5p	7.45	3.16	1.88E-05	3.35E-04
hsa-miR-7704	2.43	3.13	1.25E-04	1.70E-03
hsa-miR-452-5p	10.57	3.11	2.35E-06	5.41E-05
hsa-miR-4516	4.05	3.10	1.57E-04	1.99E-03
hsa-miR-3065-5p	1.23	3.07	2.86E-04	3.12E-03
hsa-miR-34a-5p	3.40	3.02	3.15E-04	3.22E-03
hsa-miR-33b-5p	133.53	3.01	4.99E-08	2.59E-06
hsa-miR-483-3p	2.77	2.97	3.95E-04	3.90E-03
hsa-miR-99a-3p	5.20	2.77	1.39E-04	1.85E-03
hsa-miR-27b-5p	3.60	2.76	1.91E-04	2.25E-03
hsa-miR-873-3p	2.84	2.70	1.35E-03	1.03E-02
hsa-miR-887-3p	8.24	2.69	1.01E-04	1.40E-03
hsa-miR-320d	28.17	2.63	7.86E-07	2.23E-05
hsa-miR-937-3p	3.96	2.62	1.91E-04	0.00224801
hsa-miR-210-3p	517.81	2.57	4.01E-07	1.39E-05
hsa-miR-193a-3p	16.42	2.52	6.85E-05	0.00099258
hsa-miR-141-3p	3.36	2.52	1.81E-03	0.01307957
hsa-miR-3960	4.46	2.50	1.43E-03	0.01057792
hsa-miR-574-5p	15.85	2.48	2.29E-06	5.41E-05
hsa-miR-1295b-5p	1.01	2.48	3.13E-03	0.01912513
hsa-miR-375	2272.74	2.47	4.54E-06	9.75E-05
hsa-miR-147b	1.12	2.40	4.52E-03	0.02529078
hsa-miR-6501-5p	1.10	2.39	4.65E-03	0.02529078
hsa-miR-125b-5p	110.56	2.38	1.29E-06	3.49E-05
hsa-miR-208b-3p	5.25	2.35	5.02E-03	0.02696763
hsa-miR-371b-5p	6.96	2.33	5.05E-04	0.00462639
hsa-miR-3150b-3p	0.74	2.31	2.13E-03	0.01435097
hsa-miR-4482-3p	6.38	2.27	7.68E-03	0.03892343
hsa-miR-150-3p	34.91	2.24	0.00015195	0.00197220
hsa-miR-1180-3p	26.55	2.23	0.00016318	0.00203316
hsa-miR-30c-2-3p	12.87	2.22	0.00025245	0.00289833
hsa-miR-122-3p	6.89	2.19	0.00932550	0.04582726
hsa-miR-362-3p	9.45	2.16	0.00045279	0.00431094
hsa-miR-127-5p	17.38	2.13	0.00236961	0.01537781
hsa-miR-873-5p	9.72	2.13	0.00261558	0.01679903
hsa-miR-320c	150.69	2.00	0.00031138	0.00321579
hsa-miR-491-5p	2.68	-3.27	4.01E-05	0.00063981
hsa-miR-374b-5p	101.07	-2.60	6.41E-07	1.92E-05

hsa-miR-664a-3p	12.63	-2.46	3.39E-05	0.00057148
hsa-miR-20a-3p	3.11	-2.38	0.00219411	0.01454182
hsa-miR-628-3p	304.22	-2.37	3.35E-06	7.46E-05
hsa-miR-361-5p	254.72	-2.27	2.56E-09	1.99E-07
hsa-miR-590-3p	20.69	-2.21	5.89E-05	0.00089953
hsa-miR-3620-3p	3.56	-2.21	0.00307316	0.01912513
hsa-let-7e-3p	2.83	-2.21	0.00532967	0.02766987
hsa-miR-6515-3p	0.74	-2.20	0.00964406	0.04622597
hsa-miR-1343-3p	3.54	-2.17	0.00463231	0.02529078
hsa-miR-335-3p	199.03	-2.16	1.82E-06	4.74E-05
hsa-miR-6810-5p	3.48	-2.16	0.00830776	0.04173978
hsa-miR-32-3p	3.72	-2.12	0.00368517	0.02186533
hsa-miR-5683	32.45	-2.09	0.00093132	0.00734445
hsa-miR-625-3p	17.81	-2.04	0.00214228	0.01435097
hsa-miR-548j-3p	5.66	-2.04	0.00376155	0.02210797
hsa-miR-3074-3p	1.48	-2.04	0.01725251	0.07464105

¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

Estos resultados demostraron que la mono infección crónica por VHC desregula significativamente un mayor número de miRNAs circulantes que la infección por VIH-1 ($p < 0.0001$, prueba de Chi-cuadrado). Además, las FC observadas fueron más altas en las muestras de VHC que en las de VIH-1 ($p = 0.0127$, prueba de Mann Whitney; Tablas complementarias 1 y 2 del primer artículo). Es de resaltar que los 24 miRNAs más expresados encontrados en las muestras de mono infectados por VIH-1, 19 (incluidos los 11 miRNAs más expresados en este grupo) también están significativamente más expresados en el grupo de mono infectados por VHC (Tablas complementarias 1 y 2 del primer artículo).

De los 14 miRNAs más expresados (rango: 9.3-3.4 FC) en el grupo de mono infectados por VHC, 13 miRNAs (mi-R-193b-5p, miR-483-5p, miR-1224-5p, miR-125b-1-3p, miR-885- 5p, miR-100-5p, miR-192-5p, miR-592, miR-193b-3p, miR-125b-2-3p, miR-629-5p, miR-99a-5p y miR-203a-3p) también resultaron estar más expresados en el grupo de mono infectados por VIH-1. Este resultado indica que la infección por VIH-1 induce cambios constantes en los miRNAs circulantes

que están asociados con infección crónica por VHC y daño hepático. Se analizaron los 13 miRNAs más expresados, mencionados anteriormente, en busca de correlaciones con diferentes características clínicas de los pacientes en los grupos de mono infectados por VHC y VIH-1.

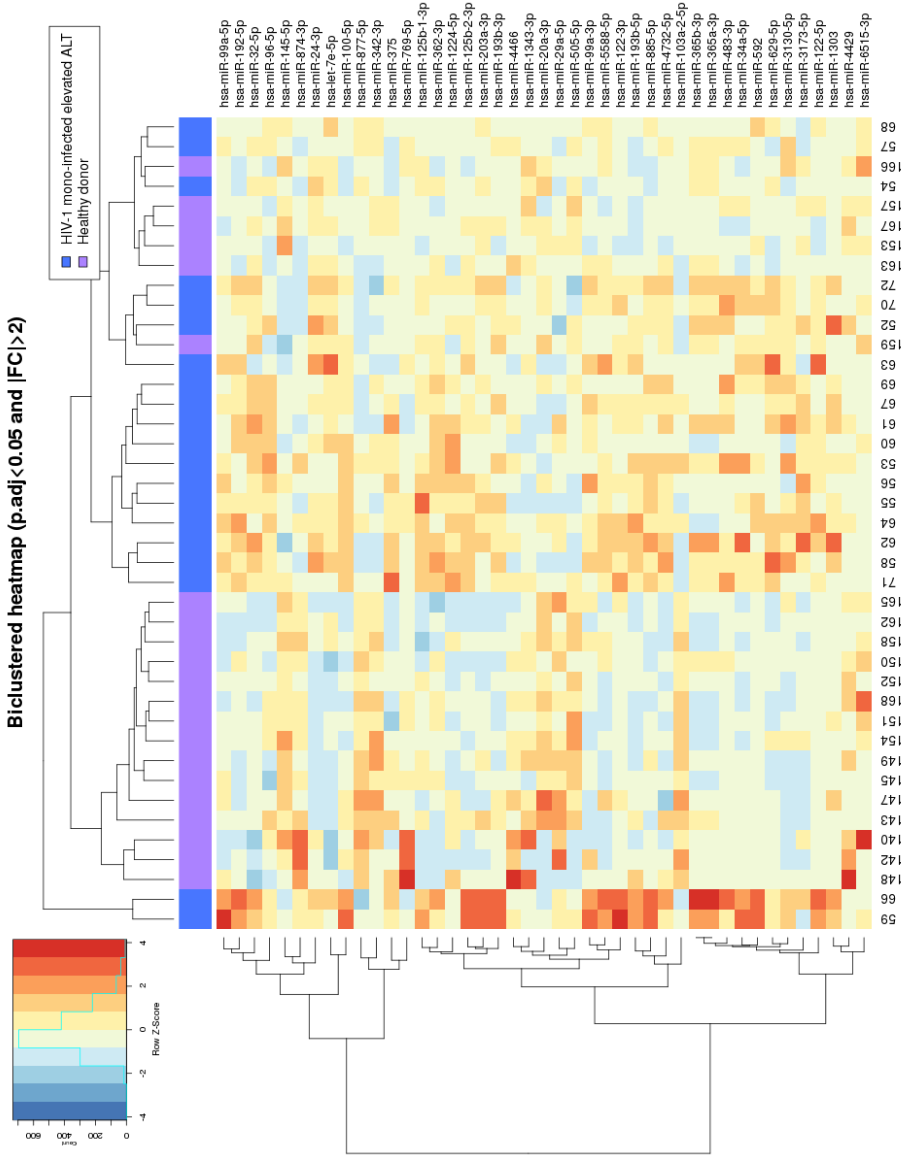
Remarcablemente, 8 y 11 de estos miRNAs se correlacionaron positivamente con los niveles de ALT y AST, respectivamente, en toda la cohorte del estudio, incluidos los donantes sanos (coeficientes de correlación promedio, $r = 0.27$ y $r = 0.36$, respectivamente; Figura 2 del primer artículo). Por lo tanto, los niveles circulantes de estos 8 y 11 miRNAs fueron significativamente más bajos en pacientes con niveles normales de ALT y AST que en pacientes con niveles altos ($p < 0.05$, ver Figuras suplementarias 2 y 3 del primer artículo).

No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de estos miRNAs cuando se compararon los pacientes VIH-1 tratados con TARGA y los no tratados ($p > 0.05$). En conjunto, estos resultados indican que estos 11 miRNAs circulantes podrían estar asociados con el metabolismo y el daño hepáticos.

Entre los pacientes mono infectados por VIH-1, investigamos los biomarcadores circulantes de daño hepático en dos grupos específicos: uno con niveles elevados de ALT y otro con diagnóstico de HNR (Tabla 2 del primer artículo). Comparamos los niveles de miRNAs en plasma en estos dos grupos con los niveles de miRNAs en donantes sanos y en pacientes con mono infección por VIH-1 y niveles normales de ALT. En comparación con los donantes sanos, las muestras de los mono infectados por VIH-1 con niveles elevados de ALT mostraron 48 miRNAs desregulados; 34

fueron más expresados y 14 menos expresados (Figura suplementaria 1A y Tabla suplementaria 3 del primer artículo).

Supplementary Fig. 1A
A



Supplementary Table 3. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients with elevated ALT vs healthy donors.

miRNA	Base Mean ¹	Fold Change ²	p-value	p-adjusted ³
hsa-miR-122-3p	6.89	5.49	6.76E-09	2.20E-06
hsa-miR-885-5p	31.31	5.30	1.42E-10	9.24E-08
hsa-miR-193b-5p	27.74	3.80	5.57E-08	9.08E-06
hsa-miR-125b-2-3p	9.38	3.45	1.04E-06	5.66E-05
hsa-miR-629-5p	3.76	3.20	3.06E-05	0.000603638
hsa-miR-592	3.19	2.98	2.51E-04	3.21E-03
hsa-miR-192-5p	278.6	2.98	7.19E-08	9.37E-06
hsa-miR-193b-3p	12.06	2.97	8.32E-05	0.001300660
hsa-miR-34a-5p	3.40	2.93	2.93E-04	3.68E-03
hsa-miR-483-3p	2.77	2.87	0.000388716	0.004605648
hsa-miR-100-5p	823.88	2.70	3.77E-07	2.89E-05
hsa-miR-99a-3p	5.20	2.61	1.09E-04	0.001619471
hsa-miR-96-5p	176.68	2.52	6.45E-06	0.000233694
hsa-miR-122-5p	1.94	2.48	0.001854828	0.014570453
hsa-miR-365a-3p	2.48	2.47	0.000774828	0.008012172
hsa-miR-365b-3p	2.48	2.47	0.000774828	0.008012172
hsa-miR-99a-5p	325.69	2.44	3.99E-07	2.89E-05
hsa-miR-203a-3p	9.71	2.42	8.12E-04	0.008274602
hsa-miR-125b-1-3p	16.27	2.41	0.000190419	0.002533734
hsa-miR-5588-5p	5.15	2.32	0.001210434	0.010664905
hsa-miR-24-3p	82.26	2.30	7.66E-05	0.001248548
hsa-miR-1303	1.04	2.24	0.007813127	0.043170837
hsa-miR-362-3p	9.45	2.20	0.000167864	0.002328667
hsa-miR-1224-5p	12.99	2.19	2.26E-03	1.72E-02
hsa-miR-3173-5p	2.97	2.17	3.61E-03	2.31E-02
hsa-miR-3130-5p	2.67	2.17	3.51E-03	2.29E-02
hsa-let-7e-5p	502.09	2.15	4.48E-06	0.000182469
hsa-miR-4732-5p	20.09	2.14	0.000403493	0.004605648
hsa-miR-32-5p	200.85	2.12	0.000100352	0.001521611
hsa-miR-375	2272.74	2.08	0.000132901	0.001914147
hsa-miR-208b-3p	5.25	2.06	1.56E-02	7.52E-02
hsa-miR-95-3p	1.85	2.01	0.017750007	0.083259026
hsa-miR-215-5p	7.45	2.01	6.97E-03	3.95E-02
hsa-miR-424-3p	261.44	2.00	9.82E-06	0.000290778
hsa-miR-874-3p	77.19	-2.04	1.24E-05	0.000318256
hsa-miR-342-3p	2143.79	-2.09	3.45E-05	0.000629178
hsa-miR-145-5p	107.82	-2.12	2.29E-07	2.13E-05
hsa-miR-877-5p	4152.27	-2.14	2.31E-05	0.000485934
hsa-miR-1343-3p	3.54	-2.16	0.003091955	0.020783040
hsa-miR-4466	5.37	-2.17	0.004384902	0.026228955
hsa-miR-505-5p	5.49	-2.18	0.001251156	0.010733600
hsa-miR-29a-5p	6.55	-2.19	0.001088448	0.009856504
hsa-miR-5187-3p	0.74	-2.21	0.008955651	0.047861347
hsa-miR-769-5p	1222.09	-2.21	7.96E-05	0.000259436
hsa-miR-20a-3p	3.11	-2.24	0.002485397	0.018005322
hsa-miR-6515-3p	0.74	-2.37	0.004258432	0.025915600
hsa-miR-103a-2-5p	16.32	-2.44	2.23E-05	0.000484266
hsa-miR-4429	1.20	-3.23	8.38E-05	0.001300660

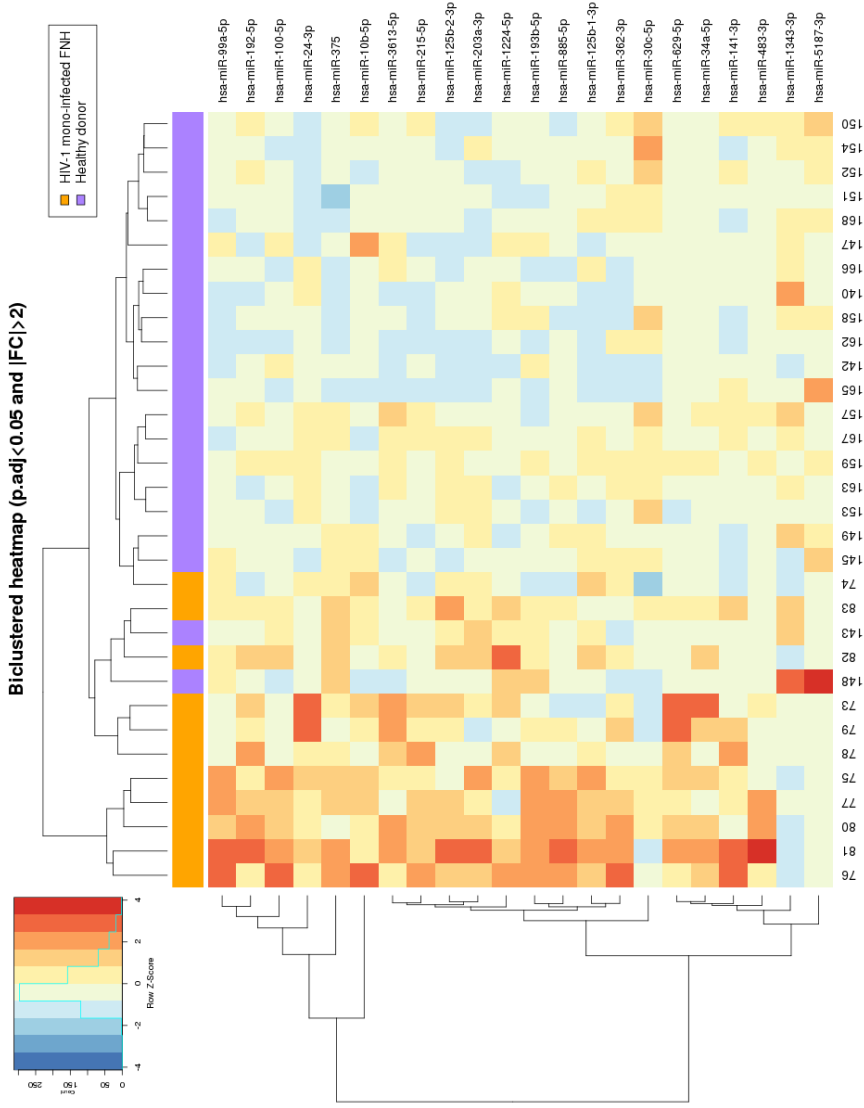
¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

Los 34 miRNAs más expresados incluyen a los 13 miRNAs mencionados antes, que estaban sobreexpresados en pacientes mono infectados por VHC o por VIH-1. Obtuvimos resultados similares en el grupo con HNR. Además de los 13 miRNAs mencionados anteriormente, otros 16 miRNAs estaban más expresados (Figura suplementaria 1B y Tabla suplementaria 4 del primer artículo).

B Supplementary Fig. 1B



Supplementary Table 4. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients with focal nodular hyperplasia vs healthy donors.

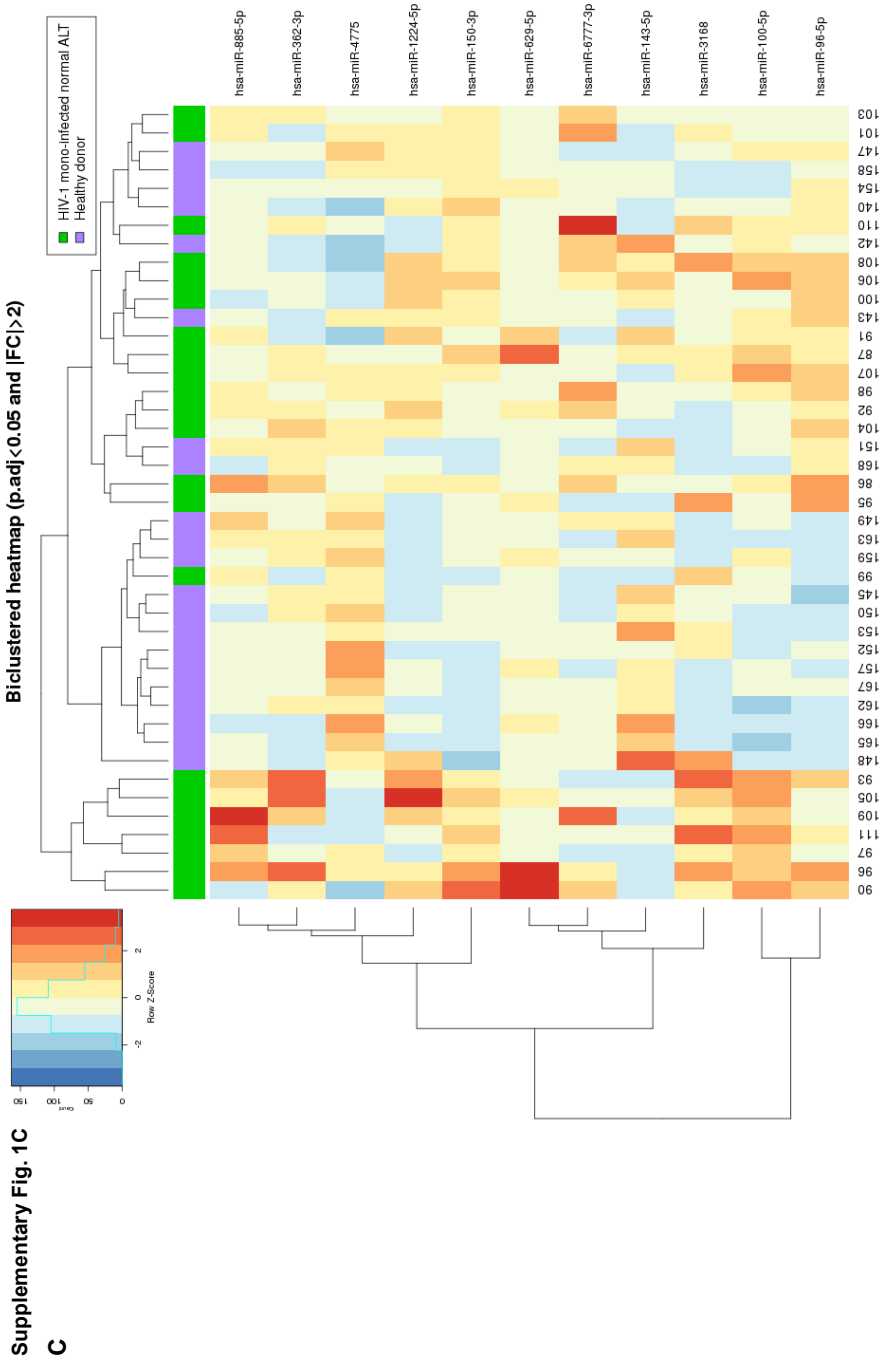
miRNA	Base Mean¹	Fold Change²	p-value	p-adjusted³
hsa-miR-885-5p	31.31	5.17	4.96E-09	3.64E-06
hsa-miR-629-5p	3.76	4.79	8.91E-08	2.59E-05
hsa-miR-193b-5p	27.74	4.10	1.52E-07	2.59E-05
hsa-miR-215-5p	7.45	3.36	1.37E-05	0.00143701
hsa-miR-125b-2-3p	9.38	3.22	2.24E-05	0.00182630
hsa-miR-100-5p	823.88	3.21	1.76E-07	2.59E-05
hsa-miR-141-3p	3.36	3.16	1.16E-04	0.00655319
hsa-miR-483-3p	2.77	3.03	0.00025475	0.00902455
hsa-miR-1224-5p	12.99	2.94	9.62E-05	0.00589209
hsa-miR-34a-5p	3.40	2.84	0.00054997	0.01497151
hsa-miR-99a-5p	325.69	2.82	2.96E-07	3.63E-05
hsa-miR-125b-1-3p	16.27	2.60	0.00023758	0.00902455
hsa-miR-24-3p	82.26	2.59	6.08E-05	0.00406324
hsa-miR-375	2272.74	2.48	3.46E-05	0.00254266
hsa-miR-203a-3p	9.71	2.38	0.00228514	0.03999002
hsa-miR-192-5p	278.6	2.32	0.00025058	0.00902455
hsa-miR-548c-3p	3.42	2.29	0.00562056	0.07511108
hsa-miR-362-3p	9.45	2.26	0.00047865	0.01407239
hsa-miR-4532	3.85	2.23	7.53E-03	0.08781080
hsa-miR-99a-3p	5.20	2.21	0.00362575	0.05438617
hsa-miR-592	3.19	2.20	9.17E-03	9.77E-02
hsa-miR-483-5p	25.98	2.19	5.95E-03	7.68E-02
hsa-miR-10b-5p	60058.10	2.17	1.68E-05	0.00154769
hsa-miR-208b-3p	5.25	2.07	0.01563209	0.14543783
hsa-miR-193a-5p	0.97	2.05	0.01679623	0.15241022
hsa-miR-3613-5p	6.61	2.04	0.00113605	0.02455863
hsa-miR-3130-5p	2.67	2.03	0.01289778	0.12986121
hsa-miR-193b-3p	12.06	2.01	0.01740187	0.15598016
hsa-let-7g-3p	3.68	2.00	0.00737157	0.08781080
hsa-miR-491-5p	2.68	-2.00	0.01592292	0.14629178
hsa-miR-4466	5.37	-2.11	0.00936816	0.09836565
hsa-miR-6515-3p	0.74	-2.15	0.00773563	0.08883890
hsa-miR-4512	1.00	-2.43	0.00284416	0.04544467
hsa-miR-1343-3p	3.54	-2.62	0.00059467	0.01561019
hsa-miR-5187-3p	0.74	-2.83	0.00040162	0.01283430

¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

Cuando se compararon muestras de pacientes monoinfectos por VIH-1 con niveles normales de ALT con muestras de donantes sanos, encontramos que solo 8 miRNAs estaban desregulados en el primer grupo, 7 estaban más expresados y 1 menos (Figura suplementaria 1C y Tabla suplementaria 5 del primer artículo).



Supplementary Table 5. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients with normal ALT vs healthy donors.

miRNA	Base Mean¹	Fold Change²	p-value	p-adjusted³
hsa-miR-629-5p	3.76	2.51	0.00104319	0.01954844
hsa-miR-885-5p	31.31	2.49	0.00044749	0.01349661
hsa-miR-1224-5p	12.99	2.43	0.00050103	0.01349661
hsa-miR-96-5p	176.68	2.11	0.00020272	0.01079296
hsa-miR-100-5p	823.88	2.11	9.70E-05	0.00835966
hsa-miR-150-3p	34.91	2.05	3.02E-04	0.01083228
hsa-miR-362-3p	9.45	2.02	0.00090066	0.01896621
hsa-miR-4775	7.73	-2.11	0.00027546	0.01079296

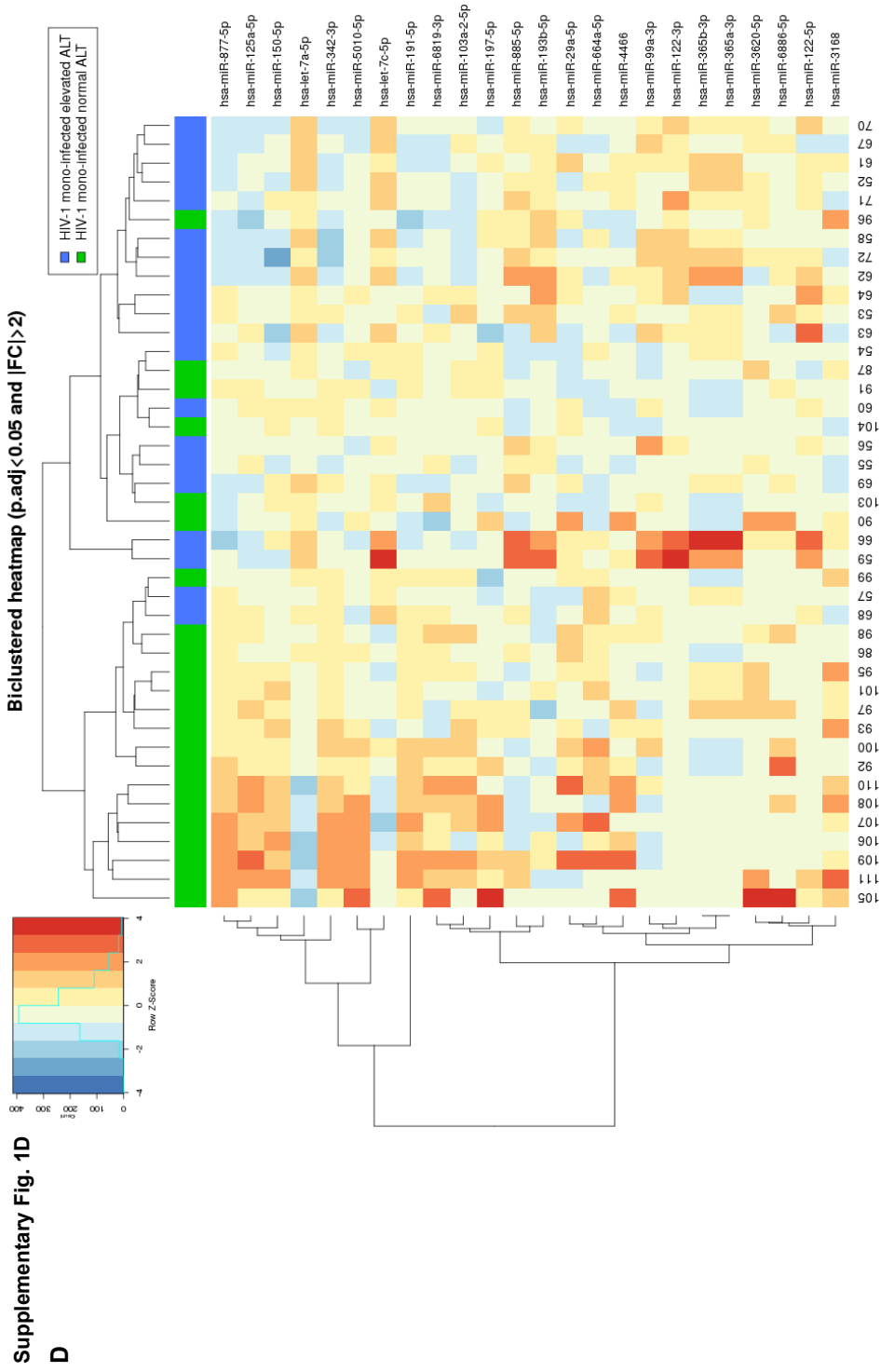
¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

Además, entre los 7 miRNAs regulados positivamente, 4 (miR-1224-5p, miR-885-5p, miR-100-5p y miR-629-5p) pertenecían al grupo de los 13 miRNAs mencionado anteriormente. Cabe destacar que entre estos 4 miRNAs, 2 (miR-629-5p y miR-1224-5p) no se asociaron con niveles elevados de ALT o AST (Figura 2 del primer artículo). Estos resultados indican que la monoinfección por VIH-1 tiene un impacto menor en los niveles de miRNAs circulantes en pacientes con niveles normales de ALT que en pacientes con niveles elevados de ALT. Sin embargo, en ausencia de ALT elevada, la monoinfección por VIH-1 se asocia con la elevada expresión de 4 miRNAs que también están más expresados en el grupo de monoinfectados por el VHC. Cuando se comparan todas las muestras de pacientes monoinfectados por VIH-1 con ALT elevada con todas aquellas con niveles normales de ALT, destaca que 25 miRNAs están desregulados; 9 más expresados y 16 menos (Figura suplementaria 1D y Tabla suplementaria 6 del primer artículo).

Supplementary Fig. 1D



Supplementary Table 6. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients with elevated ALT vs HIV-1 mono-infected patients with normal ALT.

miRNA	Base Mean¹	Fold Change²	p-value	p-adjusted³
hsa-miR-122-3p	6.89	7.37	1.62E-11	1.01E-08
hsa-miR-193b-5p	27.74	2.64	6.10E-05	2.21E-03
hsa-miR-365a-3p	2.48	2.50	0.00076719	0.01496020
hsa-miR-365b-3p	2.48	2.50	0.00076719	0.01496020
hsa-miR-122-5p	1.94	2.50	0.00180534	0.02448987
hsa-miR-99a-3p	5.20	2.29	0.00087860	0.01522904
hsa-let-7c-5p	117.34	2.15	6.37E-08	1.32E-05
hsa-miR-885-5p	31.31	2.13	0.00308537	0.03306728
hsa-let-7a-5p	4513.94	2.05	5.21E-05	0.00203005
hsa-miR-5189-3p	15.94	-2.01	0.00264026	0.03108537
hsa-miR-150-5p	6521.13	-2.03	4.97E-05	0.00203005
hsa-miR-5010-5p	167.8	-2.04	5.50E-07	6.86E-05
hsa-miR-191-5p	289008.37	-2.04	1.43E-06	0.00012740
hsa-miR-6819-3p	17.08	-2.09	0.00026524	0.00662034
hsa-miR-125a-5p	3830.69	-2.13	1.63E-06	0.0001274
hsa-miR-29a-5p	6.55	-2.17	0.00117897	0.01886349
hsa-miR-4466	5.37	-2.25	0.00284124	0.03208882
hsa-miR-342-3p	2143.79	-2.35	8.21E-07	8.54E-05
hsa-miR-664a-5p	4.84	-2.41	0.00041743	0.00936455
hsa-miR-197-5p	10.81	-2.42	4.47E-05	0.00199071
hsa-miR-103a-2-5p	16.32	-2.45	1.62E-05	0.00092012
hsa-miR-3620-5p	2.29	-2.47	0.00241543	0.02955346
hsa-miR-877-5p	4152.27	-2.60	5.06E-08	1.32E-05
hsa-miR-6886-5p	2.38	-2.73	0.00087851	0.01522904
hsa-miR-122-3p	6.89	7.37	1.62E-11	1.01E-08

¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

Los miRNAs más expresados incluyen miR-122-3p, miR-193b-5p, miR-122-5p, miR-99a-3p y miR-885-5p. Una comparación de los niveles de miRNAs en muestras de pacientes con VIH-1, HNR e infectados por VIH-1 con niveles normales de ALT mostró 7 miRNAs expresados diferencialmente, 3 más y 4 menos expresados en el grupo con HNR, comparado con el grupo de VIH-1 con ALT normales (Tabla suplementaria 7 y Figura suplementaria 1E del primer artículo).

Supplementary Table 7. Dysregulated circulating miRNAs in HIV-1 mono-infected patients with normal ALT vs HIV-1 mono-infected patients with focal nodular hyperplasia.

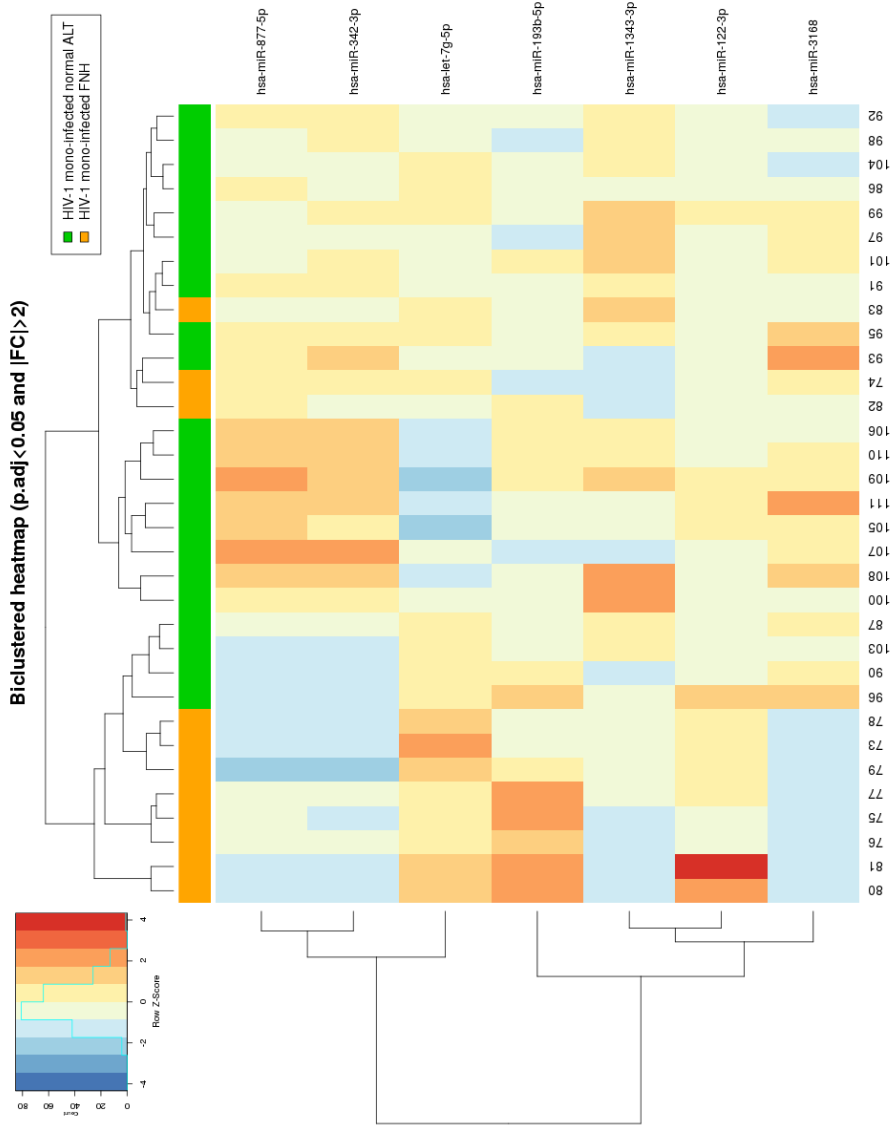
miRNA	Base Mean ¹	Fold Change ²	p-value	p-adjusted ³
hsa-miR-3168	1.59	2.98	0.00027177	0.02328168
hsa-miR-1343-3p	3.54	2.44	0.00160453	0.04340687
hsa-miR-342-3p	2143.79	2.12	0.00013330	0.02283786
hsa-miR-877-5p	4152.27	2.02	0.00040913	0.02815777
hsa-let-7g-5p	1473.33	-2.13	0.00018131	0.02328168
hsa-miR-122-3p	6.89	-2.67	0.00134802	0.04075785
hsa-miR-193b-5p	27.74	-2.85	7.78E-05	0.02283786

¹The average of the normalized count values according to DeSeq2

²The effect size estimate according to DeSeq2

³pvalue adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg

E
Supplementary Fig. 1E

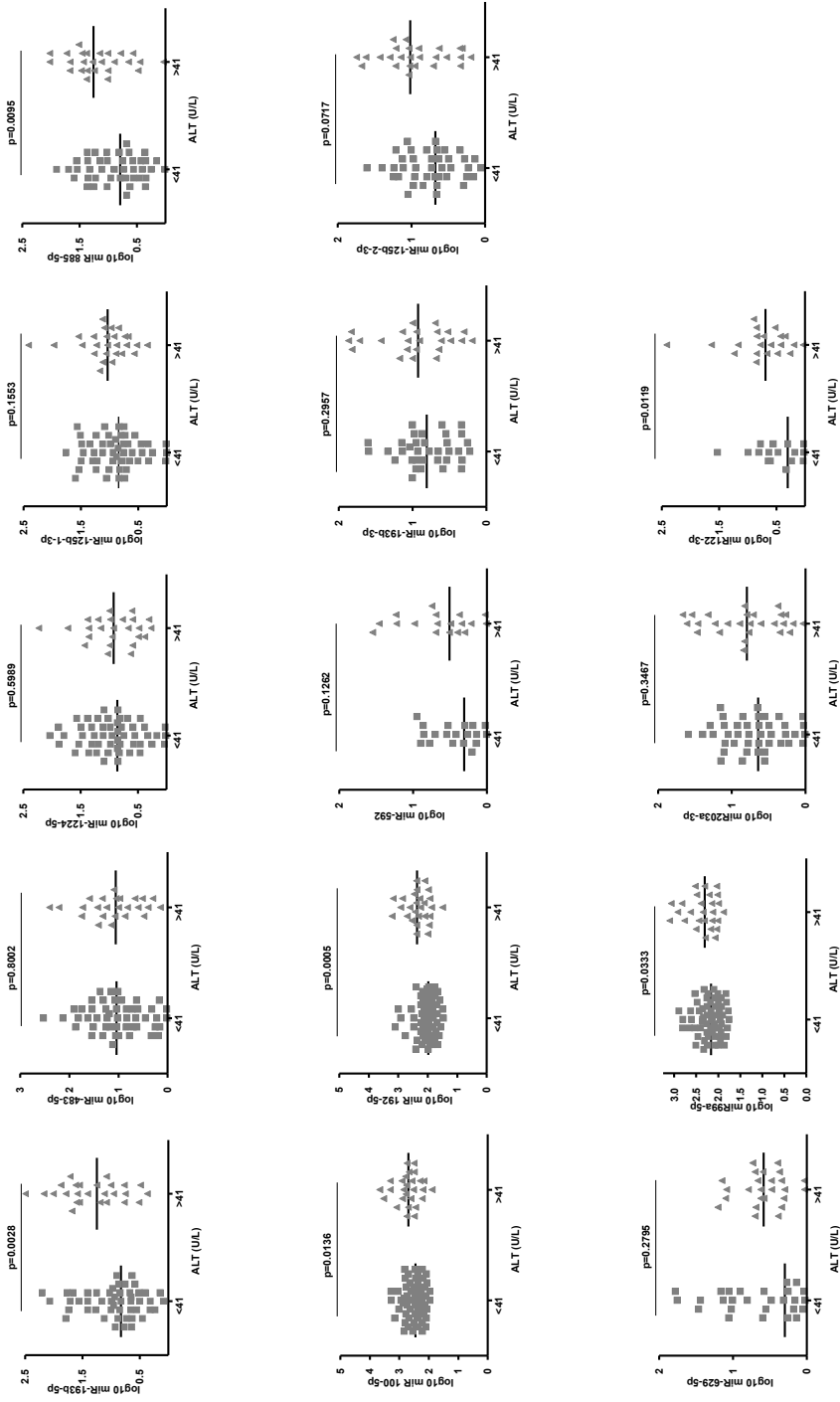


De manera análoga a los resultados obtenidos con muestras de pacientes con niveles elevados de ALT, miR-122-3p y miR-193b-5p fueron los dos miRNAs más sobreexpresados. El grupo mencionado anteriormente de 13 miRNAs no incluía el miR-122-3p, que estaba regulado positivamente en el grupo de mono infectados por VHC (Figura 1B del primer artículo). De hecho, el único grupo de pacientes que no mostró desregulación de este miRNA fue el grupo de mono infectados con el VIH-1 con niveles normales de ALT (Figura suplementaria 1C del primer artículo). Dos miRNAs, miR-122-3p y miR-193b-5p, se correlacionaron significativamente con los niveles de ALT ($r = 0.43$ y 0.44 , $p = 0.0040$ y <0.0001 , respectivamente) y AST ($r = 0.39$ y 0.52 , $p = 0.0099$ y <0.0001 , respectivamente) en toda la cohorte (Figura 2 del primer artículo).

Por el contrario, los niveles circulantes de miR-122-3p y miR-193b-5p fueron significativamente más bajos en muestras con niveles normales de ALT ($p = 0.0119$ y $= 0.0028$, respectivamente) y AST ($p = 0.0078$ y $= 0.1927$, respectivamente) (Figuras suplementarias 2 A y B del primer artículo).

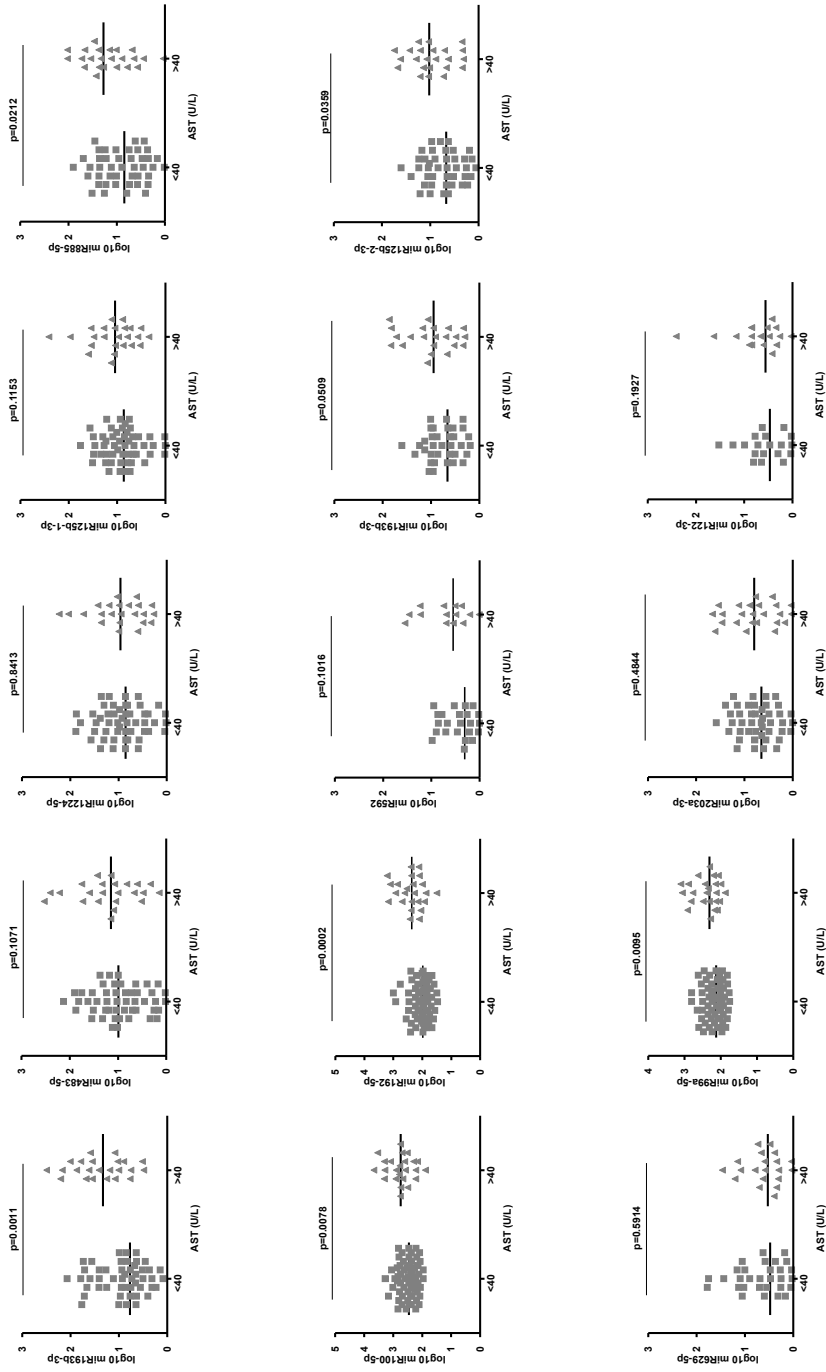
Supplementary Fig. 2A

A



Supplementary Fig. 2B

B



Finalmente, los niveles de miR-122-3p y miR-193b-5p se correlacionaron significativamente con la progresión de la fibrosis hepática en nuestra cohorte de pacientes mono infectados por el VHC ($r = 0.65$ y 0.61 , $p = 0.0435$ y 0.0093 , respectivamente - Figura 3 del primer artículo).

En general, estos resultados mostraron que miR-122-3p y miR-193b-5p se asocian con daño hepático en pacientes con mono infectados por VIH-1.

Una vez analizados los pacientes mono infectados, la etapa sucesiva fue realizar un análisis de secuenciación masiva de miRNAs en las muestras de plasma de 46 pacientes co infectados por VIH-1/VHC que no presentaban fibrosis hepática (estadios F0-1) en el momento de la recogida de la muestra (Tabla 1 del segundo artículo) y en 21 controles sanos no infectados.

Después de una media de 10.3 años, 26 pacientes co infectados desarrollaron fibrosis hepática (estadios F2-4; grupo de progresión) y 20 no mostraron signos de fibrosis hepática (estadios F0-1; grupo de no progresión).

Es remarcable que, en el momento del muestreo, no se observaron diferencias clínicas significativas entre los grupos de progresión y no progresión, es decir, sexo, edad, AST, ALT, GGT, plaquetas, Type III Procollagen Peptid (PIIINP), puntuación ELF o índice FIB-4 (Tabla 1 del segundo artículo). Sin embargo, los niveles de bilirrubina, ácido hialurónico y el número de linfocitos CD4+ fueron significativamente diferentes en el grupo de progresión, en comparación con el grupo de no progresión (Tabla 1 del segundo artículo).

Cuando se compararon todos los pacientes coinfectados por VIH-1/VHC con los 21 donantes sanos, los pacientes tenían niveles significativamente más altos de transaminasas, fosfatasa alcalina, creatinina y triglicéridos, y un menor número de plaquetas (Tabla complementaria 1 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C84>).

Supplementary Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics of the whole study population. de Franco S, Buccione D, et al. AIDS 2021.

	Healthy donors	HIV-1/HCV co-infected	p-value ^a
Parameter	Median (Range) N (%)	Median (Range) N (%)	
N	21	46	-
Age, yr	37 (29-63) ^b	38 (27-59)	0.0876
Gender, Male, N (%)	6 (29)	33 (72)	-
Alkaline Phosphatase (U/L)	54 (30-78)	66 (43-195)	0.0022
Bilirubin, (umol/L)	8 (3.5-25.8)	10.1 (1.5-22)	0.7638
Serum Albumin, (g/L)	-	44 (37-51)	-
Creatinin, (umol/L)	69 (49-107)	82 (62-127)	<0.0001
Total protein, (g/L)	73 (66-81)	73 (61-87)	0.9382
Cholesterol, (mmol/L)	174 (116-259)	166 (73-266)	0.4903
Triglycerides, (mmol/L)	0.9 (0.3-2.4)	1.4 (0.5-7.5)	0.0015
Glucose (mmol/L)	-	4.9 (3.7-7.8)	-
ALT, (U/L)	15 (9-55)	71 (13-422)	<0.0001
AST, (U/L)	18 (10-25)	48 (20-369)	0.0008
GGT, (U/L)	-	78 (12-1949)	-
Platelet counts (x10 ⁹)	347 (166-387)	190 (107-301)	<0.0001

^a Mann Whitney test

^b Median, IQR.

También los 20 pacientes del grupo de no progresión tenían niveles significativamente más altos de ALT, AST, fosfatasa alcalina, creatinina y triglicéridos, y un menor número de plaquetas, en comparación con los controles sanos. Entre un promedio de 3.2 millones de miRNAs por muestra, detectamos 1065 miRNAs diferentes en todas las muestras de plasma analizadas (mediana, 712 miRNAs; RIQ: 672–750).

Para identificar posibles candidatos a biomarcadores de miRNAs, aplicamos valores de corte muy estrictos para la abundancia de plasma (\log_2 promedio por millón > 5), para el tamaño del efecto ($FC > 2.0$) y para la significancia (p ajustado < 0.05). En comparación con los 21 controles sanos, los 46 pacientes coinfectados mostraron 16 miRNAs sobreexpresados y 1 menos expresado (Tabla complementaria 2 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C85>).

Supplementary Table 2. Differential expression (DE) at the total miRNA level for HIV-1/HCV co-infection versus healthy individuals - Franco S, Buccione D, et al. AIDS 2021.

miRNA	BaseMean^a	Fold Change^b	Log2 Fold Change	p-adjusted^c
hsa-miR-122-5p	186.19	18.19	4.19	4.71×10 ⁻²⁴
hsa-miR-100-5p	1059.70	7.51	2.91	1.41×10 ⁻²⁰
hsa-miR-99a-5p	405.58	5.04	2.331	3.62×10 ⁻¹⁷
hsa-miR-192-5p	47236.49	4.79	2.261	8.50×10 ⁻¹⁶
hsa-miR-148a-3p	31916.04	2.02	1.011	2.32×10 ⁻¹⁵
hsa-miR-125b-2-3p	166.35	4.692	2.231	3.70×10 ⁻¹⁴
hsa-miR-125b-5p	155.18	3.542	1.821	1.23×10 ⁻¹¹
hsa-miR-1246	1938.92	4.41	2.14	5.02×10 ⁻¹¹
hsa-miR-29a-3p	1055.93	2.71	1.44	5.86×10 ⁻¹⁰
hsa-miR-30a-5p	4537.43	2.86	1.510	5.23×10 ⁻⁹
hsa-miR-215-5p	692.92	3.03	1.600	2.82×10 ⁻⁸
hsa-miR-501-3p	192.65	2.46	1.30	1.03×10 ⁻⁶
hsa-miR-141-3p	227.49	2.86	1.51	2.58×10 ⁻⁶
hsa-miR-194-5p	90.40	2.73	1.45	4.07×10 ⁻⁵
hsa-miR-96-5p	222.81	3.00	1.58	5.09×10 ⁻⁵
hsa-miR-370-3p	206.27	-2.46	-1.30	0.00022
hsa-miR-375	2162.70	2.15	1.11	0.00037

a The average of the normalized count values according to DeSeq2

b The effect size estimate according to DeSeq2

c p value adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg.

Entre estos 17 miRNAs identificados, algunos (miRNA-122-5p, miRNA-192-5p y miRNA-375) se habían asociado previamente con enfermedad hepática y EHGNA en la población general^{221,222}. De manera similar, otros se habían asociado previamente con infección por VIH-1 (miRNA-100-5p, miRNA-99a-5p, miRNA-30a-5p y miRNA-96-5p) en la primera parte de nuestro estudio.

El siguiente paso fue comparar los perfiles de miRNAs entre los grupos de progresión y no progresión. Como se muestra en la Figura 1A del segundo artículo, entre los 16 miRNAs más expresados, siete (miRNA-100-5p, miRNA-192-5p, miRNA-99a-5p, miRNA-122-5p, miRNA-125b-2-3p, miRNA-1246 y miRNA -194-5p) se asociaron con la progresión a fibrosis hepática (Tabla 2 y Figura 1B del segundo artículo). Estos siete miRNAs estaban inicialmente desregulados de forma significativa en el grupo de progresión, y se correlacionaron significativamente a posteriori con el grado de fibrosis medido mediante ET en los 46 pacientes coinfectados (respectivamente: $r = 0.51$, $p = 0.0003$; $r = 0.47$, $p = 0.0010$; $r = 0.47$, $p = 0.0009$; $r = 0.47$, $p = 0.0010$; $r = 0.42$, $p = 0.0040$; $r = 0.51$, $p = 0.0003$; $r = 0.40$, $p = 0.0058$; Figura 2 del segundo artículo).

Estos resultados respaldan la idea de que los niveles plasmáticos circulantes basales de los siete miRNAs identificados podrían tener valor pronóstico para predecir el avance de la fibrosis hepática. No se ha encontrado una correlación significativa entre los valores iniciales de ALT, AST, PIIINP o FIB-4 y las puntuaciones de fibrosis por ET (respectivamente, $r = 0.02$, $p = 0.4128$; $r = 0.03$, $p = 0.2703$; $r = 0.03$, $p = 0.2381$ y $r = 0.06$, $p = 0.1061$).

Se observa una fuerte correlación entre los recuentos de células CD4+ basales, la puntuación ELF y el grado de fibrosis medido por ET (respectivamente, $r = -0.31$, $p = 0.0396$; $r = 0.37$, $p = 0.0123$). Los niveles de dos miRNAs, miRNA-100-5p y miRNA-122-5p, también se correlacionaron, aunque pobremente, con el recuento iniciales de células CD4+ ($r = 0.14$, $p = 0.0108$ y $r = 0.12$, $p = 0.0164$, respectivamente). Curiosamente, estos siete miRNAs están altamente relacionados entre sí (Tabla complementaria 3 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C86>).

Supplementary Table 3. Expression Pearson linear correlation between pairs of miRNAs - Franco S, Buccione D, et al. AIDS 2021.

miRNA pair	Pearson r	p value
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-192-5p	0.89	< 0.0001
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-99a-5p	0.95	< 0.0001
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-122-5p	0.81	< 0.0001
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-125b-2-3p	0.85	< 0.0001
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-1246	0.69	< 0.0001
hsa-miR-100-5p-hsa-miR-194-5p	0.99	< 0.0001
hsa-miR-192-5p-hsa-miR-99a-5p	0.90	< 0.0001
hsa-miR-192-5p-hsa-miR-122-5p	0.89	< 0.0001
hsa-miR-192-5p-hsa-miR-125b-2-3p	0.88	< 0.0001
hsa-miR-192-5p-hsa-miR-1246	0.63	< 0.0001
hsa-miR-192-5p-hsa-miR-194-5p	0.79	< 0.0001
hsa-miR-99a-5p-hsa-miR-122-5p	0.84	< 0.0001
hsa-miR-99a-5p-hsa-miR-125b-2-3p	0.91	< 0.0001
hsa-miR-99a-5p-hsa-miR-1246	0.72	< 0.0001
hsa-miR-99a-5p-hsa-miR-194-5p	0.72	< 0.0001
hsa-miR-122-5p-hsa-miR-125b-2-3p	0.85	< 0.0001
hsa-miR-122-5p-hsa-miR-1246	0.57	< 0.0001
hsa-miR-122-5p-hsa-miR-194-5p	0.73	< 0.0001
hsa-miR-125b-2-3p-hsa-miR-1246	0.70	< 0.0001
hsa-miR-125b-2-3p-hsa-miR-194-5p	0.73	< 0.0001
hsa-miR-1246-hsa-miR-194-5p	0.39	0.0082

Por ejemplo, las correlaciones fueron $r = 0,95$ ($p < 0.0001$) para miRNA-100-5p y miRNA-99a-5p; $r = 0.89$ y $p < 0.0001$ para miRNA-100-5p y miRNA-192-5p; $r = 0.91$ y $p < 0.0001$ para miRNA-192-5p y miRNA-99a-5p; $r = 0,89$ y $p < 0.0001$ para miRNA-192 y miRNA-5p-122-5p. La fuerte correlación evidenciada sugiere que estos miRNAs son todos predictores equivalentes de fibrosis hepática. Por lo tanto, es poco probable que medir más miRNAs a la vez mejore el rendimiento predictivo de cualquiera de estos siete miRNA.

A continuación, evaluamos el rendimiento diagnóstico de estos siete miRNAs mediante la elaboración de una *receiver operating characteristic curve* (ROC). Para el miRNA-100-5p, el área bajo la curva (AUC) fue 0.902 (IC 95%: 0.814-0.990, $p < 0.0001$) (Figura 3A del segundo artículo). Con un riguroso corte de más de 981 recuentos de miRNA-100-5p, encontramos una sensibilidad del 88% (IC 95%: 71-96) y una especificidad del 83% (IC 95%: 64-95) para distinguir la progresión de la no progresión. La odds ratio (OR) para el rendimiento diagnóstico del miRNA-100-5p fue de 43,44 ($p < 0.0001$). De manera similar, para miRNA-192-5p, el AUC de la curva ROC fue 0.910 (IC 95%: 0.823-0.996, $p < 0.0001$) y, con un límite estricto de más de 47604 recuentos de miRNA-192-5p, los valores de sensibilidad y especificidad fueron 88% (IC del 95%: 71-96) y 85% (IC del 95%: 64-95), respectivamente (OR = 43.44, $p < 0.0001$) (Figura 3A del segundo artículo).

Se obtuvieron resultados comparables con los miRNAs 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 y 194-5p, que arrojaron valores de AUC de 0.900 (IC 95%: 0.811-0.989, $p < 0.0001$), 0.900 (95% IC: 0.807–0.993, $p < 0.0001$), 0.900 (IC 95%: 0.803– 0.997, $p < 0.0001$), 0.806 (IC 95%: 0.671–0.935,

$p = 0.0004$) y 0.842 (IC 95%: $0.741-0.970$, $p < 0.0001$), respectivamente (Figura 3A del segundo artículo). Es importante destacar que las AUC de los miRNAs excedieron las AUC de otros parámetros sanguíneos circulantes de referencia estándar, como ALT, AST, GGT, PIIINP, ELF y FIB-4, que arrojaron valores de AUC de 0.759 (IC 95%: $0.615-0.93$, $p = 0,0029$), 0.778 (IC 95%: $0.636-0.920$, $p = 0.0014$), 0.592 (IC 95%: $0.424-0.760$, $p = 0,2875$), 0.579 (IC 95%: $0.396-0.761$, $p = 0.3875$), 0.682 (IC 95%: $0.510-0.854$, $p = 0,0424$) y 0.633 (IC 95%: $0.464-0.801$, $p = 0.1263$), respectivamente (Figura 3B del segundo artículo).

En general, los datos publicados indican que los miRNAs circulantes tienen un potencial predictivo como biomarcadores de la progresión de la fibrosis hepática en pacientes coinfectados por VIH-1/VHC. Los resultados obtenidos se basan en la expresión diferencial de miRNAs totales.

Un aspecto que quisimos tener en cuenta es que muchos miRNAs tienen variantes de longitud y/o secuencia, denominados isomiRNAs. Los miRNAs variantes, isomiRNAs y miRNAs canónicos están disponibles en varias bases de datos (por ejemplo, miRBase).

Para este propósito generamos matrices para explorar la expresión de miRNAs a cualquier nivel: miRNAs canónicos, variantes, isomiRNAs individuales o miRNAs totales. Es de resaltar que encontramos que los isomiRNAs tenían mayor poder estadístico en el análisis de expresión diferencial. Por ejemplo, la variante miRNA-100-5p iso_3p:-2 mostró mejores resultados que el miRNA-100-5p total (Tabla complementaria 4 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C87>).

Supplementary Table 4. Differential expression (DE) at the miRNA 100-5p and 192-5p variant level for HIV-1/HCV co-infection non-progressing versus progressing patients - Franco S, Buccione D, et al. AIDS 2021.

miRNA	Variant	BaseMean ^a	Log2 Fold Change ^b	p-adjusted ^c
hsa-miR-100-5p	iso_3p:-2	969.20	1.74	1.00×10 ⁻⁷
	iso_3p:-1	397.76	1.05	0.00014
	iso_3p:-4	26.51	1.11	0.00020
	iso_3p:-3	11.25	1.30	0.0021
	Canonical	21.45	0.16	-
hsa-miR-192-5p	Canonical	45684.25	1.22	1.30×10 ⁻⁷
	iso_5p:-1	9550.76	1.43	9.76×10 ⁻⁷
	iso_3p:-1	3753.22	1.64	5.7×10 ⁻⁷
	iso_add:+1	343.49	1.25	7.40×10 ⁻⁶
	iso_5p:+1	335.23	1.39	2.81×10 ⁻⁶

a The average of the normalized count values according to DeSeq2

b The effect size estimate according to DeSeq2

c p value adjusted for false discovery rate by the method of Benjamini and Hochberg.

Es importante destacar que el análisis de miRNA100-5p mostró que la expresión de la variante canónica estaba casi ausente. Además, en comparación con el miRNA-100-5p total, la variante miRNA-100-5p iso_3p: -2 mostró una mejor correlación con el grado de fibrosis medido por ET ($r = 0,61$, $P < 0,0001$) y una mejor AUC (0.919, IC 95%: 0.837-1.000, $p < 0,0001$).

El análisis diferencial de una sola variante de miRNA-192-5p también mejoró los resultados de la expresión diferencial (Tabla complementaria 4 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C87>). En este caso, y en contraste con miRNA-100-5p, la variante canónica fue la secuencia más expresada (Tabla complementaria 4, <http://links.lww.com/QAD/C87>). El análisis individual de la variante miRNA-192-5p también mejoró ligeramente la correlación con el grado de fibrosis medido por ET ($r = 0.51$, $p = 0.0003$) y el AUC (0.915, IC 95%: 0.833-0.997, $p < 0.0001$). Sin embargo, el poder estadístico de la expresión diferencial aumentó cuando se analizó la variante miRNA-192-5p iso_5p: -1 (Tabla complementaria 4 del segundo artículo, <http://links.lww.com/QAD/C87>). Esta variante se correlacionó mejor con el grado de fibrosis medido por ET ($r = 0.55$, $p < 0.0001$) y tuvo un AUC más alta (0.927, IC 95%: 0.853-1.000, $p < 0.0001$).

Así, las variantes de isomiRNAs podrían aportar mayor poder estadístico en el análisis de expresión diferencial, debido a su especificidad, y podrían representar mejores biomarcadores para diferenciar entre condiciones de interés.

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En el presente estudio, hemos realizado un cribado a gran escala de todo el genoma para construir un perfil de miRNAs plasmáticos circulantes relacionados con el daño hepático en pacientes con VIH-1 no coinfectados con virus hepatotrópicos y en pacientes coinfectados con VHC.

Se desconoce en la actualidad si la curación de la infección por el VHC con las nuevas estrategias de AADs libres de interferón elimina el riesgo de presentar complicaciones hepáticas, tratándose de pacientes en los que persisten otros factores asociados a progresión hepática, a pesar de la curación del VHC. Evidencias recientes sugieren que los miRNAs regulan diversas funciones en el hígado y juegan un papel en la patología del mismo.

En nuestra primera publicación se ha detectado una elevada expresión de 14 miRNAs en los pacientes mono infectados por VHC, destacando una elevada expresión de estos mismos miRNAs también en pacientes mono infectados por VIH-1 con niveles elevados de transaminasas o HNR, como causa de hipertensión portal no cirrótica y hepatopatía en el paciente VIH-1. Esto nos ha demostrado el potencial de los miRNAs como biomarcadores de la progresión de hepatopatía en pacientes mono infectados por VIH-1.

Es interesante mencionar que en los pacientes mono infectados por VIH-1 con niveles normales de transaminasas no hay un claro aumento de la expresión de todos los miRNAs identificados, pero cabe destacar que 4 de los 14 miRNAs, están significativamente más expresados también en

este subgrupo. Este hallazgo sugiere que, incluso en ausencia de indicadores de daño hepático, la infección por VIH-1 y/o el TARGA podrían interferir con el metabolismo hepático.

Cabe destacar que cada miRNA identificado se ha relacionado previamente con la presencia de daño hepático. MiR-99a-5p y miR-100-5p, ambos miembros de la familia miR-100, están asociados con CHC²⁰³. Estudios anteriores han demostrado que están menos expresados en los tejidos hepáticos del CHC²⁰⁹ y más expresados en el suero de pacientes con CHC²¹⁵, estando desregulados también en otros cánceres humanos.

En general, se consideran supresores de tumores, porque se dirigen a genes relacionados con el tumor, como mTOR, AKT1 o PI3K, entre otros²⁰³. De la misma manera, miR-125b inhibe la migración e invasión de células de CHC al dirigirse a LIN28B²⁰⁶, y está desregulado en el CHC asociado a la infección por VHB o por VHC²⁰⁷. La desregulación de miR-193b, miR-483-5p y miR-592 se correlaciona con el CHC asociado al VHB^{223,214}. MiR-193b suprime los tumores al dirigirse al protooncogén similar a CRK y a la quinasa de adhesión focal²⁰⁸. MiR-483-5p inhibe la fibrosis hepática del ratón, al dirigirse a dos factores profibróticos, el factor de crecimiento β derivado de las plaquetas y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2, que suprimen la activación de las células estrelladas hepáticas²⁰⁵. MiR-592 se dirige al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina para suprimir la proliferación celular, la migración y la invasión en el CHC²¹³. MiR-203-3p se dirige a IL-24 para modular el CHC²⁰⁰. Los niveles séricos de miR-203a también predicen la fibrosis hepática en pacientes con infección por VHC²¹¹. Además, miR-629-3p induce la transformación estable de hepatocitos *in vitro* e *in vivo*, y su inhibición suprime el crecimiento de CHC¹⁹⁸.

Especial interés tienen los miembros de la familia de miR-122, que se consideran factores clave en la enfermedad hepática¹⁹⁷. MiR-122 es el miRNA más abundante en los hepatocitos, representando el 70% de todas las copias de miRNA encontradas en estas células²⁰². Facilita la replicación del RNA viral del VHC²⁰¹ y, en estos pacientes, los niveles séricos elevados de los miembros de la familia miR-122 se correlacionan con transaminasas elevadas, progresión de la fibrosis hepática y CHC¹⁹⁶.

La expresión desregulada de miRNA-122 se asocia con una variedad de enfermedades y disfunciones hepáticas, incluyendo hepatitis viral, enfermedad hepática inducida por alcohol, EHGNA, EHNA y HCC^{196,224-229}. MiRNA-122 ha sido identificado como un importante regulador del metabolismo de los lípidos hepáticos²²¹ y la evidencia acumulada indica que la secreción hepática de miR-122 es promovida por mecanismos dependientes de los ácidos grasos²³⁰.

Los niveles plasmáticos de miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-192-5p y miR-193b-3p están asociados con infección por VHB²¹². MiR-1224 se asoció con la insuficiencia hepática aguda en un modelo murino. Este efecto de miR-1224 está mediado por la represión en los hepatocitos del gen antiapoptótico Nfib²¹⁰. Finalmente, miR-885 se ha relacionado con transaminasas elevadas y daño hepático en un modelo de enfermedad canina²⁰⁴.

El siguiente paso en nuestro estudio fue valorar los pacientes coinfectados con VIH-1/VHC, como subgrupo de interés para seguimiento estricto, por ser una población de alto riesgo para hepatopatía.

Mediante la secuenciación masiva del RNA del plasma de nuestros pacientes, identificamos una firma genética de siete miRNAs (100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p, 125b-2-3p, 1246 y 194-5p) capaces de detectar específicamente la progresión de la fibrosis hepática antes de su evidencia clínica. En particular, 100-5p y 192-5p, mostraron el valor predictivo más alto. MiRNA-192-5p es abundante en el tejido hepático humano y se ha asociado con la gravedad de la enfermedad hepática histológica. Se encuentra más expresado en la EHNA, se correlaciona con el CHC y es claramente profibrogénico^{231,225}.

En nuestra primera publicación demostramos que 100-5p, 99a-5p y 192-5p, están significativamente más expresados en pacientes con mono infectados por VIH-1. Los otros cuatro miRNAs asociados con la aparición de progresión de la fibrosis hepática en nuestros pacientes son 122-5p, 125b-2-3p, 1246 y 194-5p. Todos se han relacionado previamente con la enfermedad hepática y con el cáncer. Se ha hablado ya en detalle del miR-122.

Los niveles circulantes de miRNA-125b-2-3p se propusieron como un nuevo biomarcador del CHC positivo para el VHB²³² y este mismo microRNA también se ha asociado con el carcinoma de células renales, en el que promueve la aparición de metástasis al dirigirse a EGR-1²²⁹.

El miRNA-1246 está más expresado en el suero de los pacientes que desarrollan CHC y se asocia con características tumorales agresivas^{233,234}.

El microRNA-1246 se dirige directamente a la glucógeno sintasa quinasa 3b, la inhibición del eje 25 de la proteína 2, el factor nuclear IB y la proteína quinasa cAMP dependiente de la subunidad

reguladora de tipo Ia. También se ha demostrado que participa en la progresión tumoral y aparición de metástasis^{233,235}.

Por último, el miRNA-194 se considera como un buen marcador pronóstico de CHC. Se ha demostrado una reducción significativa de su expresión en los tejidos de CHC y los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran que es un factor pronóstico independiente de mal pronóstico de CHC y que está relacionado con unas bajas tasas de supervivencia libre de enfermedad²³⁶. MiR-194 regula la progresión del CHC, inhibiendo directamente la expresión de MAP4K4. Los niveles plasmáticos de miRNA-194-5p también se asocian los niveles del Ag HBe de la hepatitis B en los pacientes con infección crónica con VHB²¹².

En resumen, los datos actuales sobre los siete miRNAs descritos en nuestro segundo estudio indican que todos tienen un impacto en la fisiología del hígado, hecho que los implica en el desarrollo de la fibrosis hepática. Cinco de los siete miRNAs identificados (100-5p, 192-5p, 99a-5p, 122-5p y 125b-2-3p) se detectaron anteriormente en nuestro primer artículo como sobreexpresados en el plasma de pacientes mono infectados con el VHC o el VIH-1, confirmando la sospecha de que la mono infección con el VIH-1 y/o la terapia antirretroviral podrían interferir con el metabolismo hepático.

Estudios anteriores demostraron que la fibrosis hepática es más rápida en pacientes coinfectados con VIH-1/VHC en comparación con los mono infectados con el VHC²³⁷. Aunque en la actualidad se obtienen altas tasas de erradicación del VHC, se necesitan mejores biomarcadores de la progresión de la lesión hepática en pacientes con VIH-1 curados del VHC.

La implicación de que estos siete miRNAs juegan un papel en el metabolismo de las células hepáticas sugiere que, además de su potencial como marcadores predictivos, también podrían servir como dianas terapéuticas.

Por ejemplo, en el glioblastoma la regulación de la expresión de miR-100 redujo su tumorigenicidad, lo que sugiere el potencial clínico de este miRNA como diana terapéutica²³⁸. Un ensayo clínico de fase IIa mostró que un oligonucleótido antisentido de miRNA-122 [Miravirsen (Santaris Pharma, Copenhagen, Dinamarca)] podría reducir la carga de RNA viral en pacientes con infección con el VHC²³⁹. Hasta la fecha, no se han diseñado ensayos clínicos para probar terapias basadas en miRNAs específicamente para EHGNA/EHNA.

Sin embargo, datos alentadores sugieren que miR-122 tiene efectos farmacológicos inhibidores o de depleción genética en la diferenciación de los hepatocitos, en la progresión espontánea a fibrosis y en la carcinogénesis^{240,241}. MiRNA-194 es otro ejemplo de un objetivo potencial. La sobreexpresión de miRNA-194 en células de CHC aumenta su sensibilidad al sorafenib, el cual es un tratamiento para el CHC²⁴².

Finalmente, mención aparte merecen las isoformas de los miRNAs. Nuestros resultados demuestran que los miRNAs secuenciados podrían malinterpretarse, cuando se utilizan sus secuencias canónicas en el análisis de expresión diferencial. Por tanto, es posible que se hayan malinterpretado abundantes datos sobre miRNAs obtenidos previamente con métodos RT-qPCR que empleaban oligonucleótidos y sondas basadas en secuencias canónicas. Sobre la base de nuestros resultados, y de acuerdo con estudios previos²⁴³⁻²⁴⁵, llegamos a la conclusión de que,

debido a su alta especificidad, los isomiRNAs podrían proporcionar una mayor resolución y una mejor expresión diferencial de poder estadístico que las secuencias canónicas.

Las limitaciones de nuestro estudio son diversas.

En general, el tamaño muestral analizado impone la necesidad de validar los resultados obtenidos en cohortes más grandes.

Un punto para destacar es la imposibilidad de analizar la asociación de los miRNAs circulantes con los hallazgos histológicos de los pacientes con infección por el VIH-1 con transaminasas elevadas más allá de la exclusión de la coinfección por virus hepatotropos, ante el alto porcentaje de pacientes en curso de TARGA (91%).

Interesante, por ejemplo, hubiera sido poder valorar en nuestra cohorte la desregulación de los miRNAs descritos asociada con la esteatosis hepática, la toxicidad de los antirretrovirales, el impacto directo de la infección por el VIH-1 o la propia inmunosupresión asociada con la.

7. CONCLUSIONES

1. La determinación de miRNAs asociados con daño hepático en pacientes con infección por el VIH-1 sin coinfección por virus hepatotropos sugiere un impacto directo del VIH-1 sobre el metabolismo del hígado.
2. Los pacientes mono infectados con el VHC y los mono infectados con el VIH-1 con ALT elevadas o con hiperplasia nodular regenerativa comparten la sobre expresión de ciertos miRNAs en plasma, principalmente miRNA 122-3p y 193b-5b.
3. En los pacientes infectados con el VHC los miRNA 122-3p y 193b-5b están asociados con el grado de elevación de las transaminasas y la gravedad de la fibrosis hepática.
4. En nuestra cohorte de pacientes coinfectados por el VIH-1 y el VHC con estadios de fibrosis F0-F1 seguidos durante más de 10 años, siete microRNAs han mostrado una buena predicción de la progresión de la fibrosis. Concretamente los miRNAs 100-5p y 192-5p han mostrado una sensibilidad y especificidad superior al 85% en la predicción de progresión hepática.
5. Ciertos miRNAs en plasma podría ser utilizados como biomarcadores de daño hepático en pacientes infectados por el VIH-1 con o sin coinfección por el VHC.

8. APLICACIONES Y PROYECTOS FUTUROS

1. Los resultados obtenidos demuestran que por sí sola la infección con el VIH-1 juega un papel en la progresión de la enfermedad hepática, aunque sin poder discriminar los posibles efectos del TARGA. Las investigaciones futuras deberían incluir un análisis de cohortes de pacientes VIH-1 *naïves* sin tratamiento previo.
2. Los niveles circulantes de miRNAs podrían ser marcadores adecuados de la fibrosis hepática en pacientes con coinfecciones VIH-1/VHC tratados con AADs y curados de la infección por VHC. Estos datos deben validarse en cohortes más grandes.
3. Las variantes de isomiRNAs podrían aportar mayor poder estadístico en el análisis de expresión diferencial de los miRNAs, debido a su especificidad, y podrían representar mejores biomarcadores para diferenciar entre condiciones de interés.
4. Recientemente en nuestra población de estudio se han valorado los posibles cambios en los niveles circulantes de miRNAs en individuos coinfectados por VIH-1/VHC que han alcanzado una RVS con terapias AADs. Se ha analizado un total de 81 sujetos coinfectados

con VIH-1/VHC, llevando a cabo un estudio longitudinal con seguimiento desde el inicio de la terapia con AADs (T0) hasta 12 semanas después de finalizar el tratamiento (T12).

Los niveles circulantes de miR-100-5p, miR-122-5p y miR-192-5p (los tres microRNAs circulantes desregulados y ya relacionados en nuestras publicaciones anteriores con la progresión de la fibrosis hepática en sujetos coinfectados por VIH-1/VHC) se determinaron mediante PCR en tiempo real en T0 y T12. Los parámetros clínicos y el estadio de fibrosis hepática, determinados por ET, se controlaron en T0, T12 y después de dos años de alcanzar la RVS. Según nuestros resultados, después de la terapia con AADs, 77 sujetos (95%) alcanzaron una RVS. La ET en T0 indicó que la mayoría de los sujetos del estudio se encontraban en una etapa avanzada de fibrosis hepática (F0-1 9%, F2 11%, F3 31%, F4 49%).

Dos años después de la RVS, los sujetos con curados del VHC redujeron significativamente la rigidez hepática ($p < 0,0001$). En T0, se observaron niveles significativamente más altos de miR-100-5p y miR-122-5p ($p = 0.0120$ y $p = 0.0008$, respectivamente) en individuos portadores del polimorfismo I148M de PNPLA3 (*patatin-like phospholipase domain-containing 3*), que es uno de los factores de riesgo genético más relacionado con la progresión de la EHGNA/EHNA y de la fibrosis hepática.

En T12, la RVS se ha asociado significativamente con una reducción del número de miR-100-5p, miR-122-5p y miR-192-5p circulantes ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p = 0.0180$,

respectivamente) en la cohorte total y en el subgrupo con fibrosis hepática F3-4 ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p = 0.0011$, respectivamente). En T12 no se observó una reducción significativa de los niveles de miR-100-5p, miR-122-5p y miR-192-5p en individuos que no alcanzaron RVS.

En conclusión, el tratamiento con AADs se asocia a una reducción significativa en los niveles circulantes de miRNAs asociados a enfermedad hepática, alcanzando niveles plasmáticos observados en donantes sanos, lo que respalda la idea de que el perfil de los miRNAs circulantes en los individuos con VHC y RVS es el resultado de la erradicación del VHC.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hu, J., Liu, K. & Luo, J. HIV–HBV and HIV–HCV coinfection and liver cancer development. in *Cancer Treatment and Research* vol. 177 231–250 (Cancer Treat Res, 2019).
2. R, W. *et al.* Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Arch. Intern. Med.* **166**, 1632–1641 (2006).
3. Hooshyar, D. *et al.* Trends in perimortal conditions and mortality rates among HIV-infected patients. *AIDS* **21**, 2093–2100 (2007).
4. T, P. & G, S. Hepatic steatosis, hepatitis C, and human immunodeficiency viruses: A complex interplay. *Hepatology* **66**, 673–674 (2017).
5. JK, R. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) in HIV. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **14**, 47–53 (2017).
6. DM, P. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. cancer* **118**, 3030–3044 (2006).
7. MONITORING AND EVALUATION FOR VIRAL HEPATITIS B AND C: RECOMMENDED INDICATORS AND FRAMEWORK.
8. MP, M. *et al.* Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, (2017).
9. N, P.-S., AJ, P., J, M., P, B. & SM, B. Hepatitis C virus genotypes in two different patient cohorts in Johannesburg, South Africa. *Arch. Virol.* **153**, 2049–2058 (2008).
10. HE, S. & J, K. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1679–1681 (1995).
11. E, G., C, E., S, B., K, R.-S. & H, R. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **61**, S45–S57 (2014).
12. Messina, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **61**, 77–87 (2015).
13. ZM, Y. *et al.* Effects of sofosbuvir-based treatment, with and without interferon, on outcome and productivity of patients with chronic hepatitis C. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, (2014).
14. DP, W., P, K. & GM, D. Hepatitis C. *Lancet (London, England)* **385**, 1124–1135 (2015).
15. LE, T. *et al.* Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 645–653 (2002).
16. MR, P. & JR, H. Hepatitis C virus in pregnancy. *Am. J. Perinatol.* **30**, 149–159 (2013).
17. CB, P., SN, S., KE, J. & A, G. Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1123–1131 (2007).
18. NA, T. *et al.* Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology* **57**, 881–889 (2013).
19. Afdhal, N. H. The natural history of hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* **24 Suppl 2**, 3–8 (2004).
20. Seeff, L. B. The natural history of hepatitis C-A quandary. *Hepatology* **28**, 1710–1712 (1998).
21. Seeff, L. B. Why is there such difficulty in defining the natural history of hepatitis C? *Transfusion* **40**, 1161–1164 (2000).
22. Yang, J. D. & Roberts, L. R. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 448–458 (2010).
23. Bartosch, B., Thimme, R., Blum, H. E. & Zoulim, F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **51**, 810–820 (2009).
24. DB, S., T, W., DL, T. & LB, S. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* **39**, 1147–1171 (2004).
25. F, A., A, O., L, S., B, B. & G, I. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9633–9652 (2014).
26. G, L. & E, D. C. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* **142**, 83–122 (2017).
27. M, C. *et al.* Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 649–659 (2015).
28. M, M. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir plus ribavirin in patients with genotype 1 or 4 hepatitis C virus

- infection and advanced liver disease: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet. Infect. Dis.* **16**, 685–697 (2016).
29. De Sanidad, M. INFORME DE SITUACIÓN DEL PLAN ESTRATÉGICO PARA EL ABORDAJE DE LA HEPATITIS C CRÓNICA PRESENTADO AL CONSEJO INTERTERRITORIAL DEL SNS JUNIO 2017 SECRETARÍA GENERAL DE SANIDAD Y CONSUMO.
 30. Nacional De Salud, S. Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en Octubre 2020.
 31. L, P. *et al.* Efficacy and safety of direct-acting antiviral regimens in HIV/HCV-co-infected patients - French ANRS CO13 HEPAVIH cohort. *J. Hepatol.* **67**, 23–31 (2017).
 32. EG, M. Update in HIV-hepatitis C virus coinfection in the direct acting antiviral era. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **33**, 120–127 (2017).
 33. M, M. *et al.* Interferon-free treatment with sofosbuvir/daclatasvir achieves sustained virologic response in 100% of HIV/hepatitis C virus-coinfected patients with advanced liver disease. *AIDS* **30**, 1039–1047 (2016).
 34. Analysis, D. Web Annex B . WHO estimates of the prevalence and incidence of hepatitis C virus infection by WHO Centre for Disease Analysis In : Global hepatitis report 2017. (2017).
 35. P, G. Hepatitis C Virus and HIV Type 1 Co-Infection. *Infect. Dis. Rep.* **5**, 31–37 (2013).
 36. I, A. *et al.* High Rate of Hepatitis B and C Coinfections Among People Living with HIV-1 in Bulgaria: 2010–2014. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **33**, 228–229 (2017).
 37. INFORME EPIDEMIOLÒGIC CEEISCAT SIVES 2015 Document tècnic núm. 22 Sistema Integrat de Vigilància Epidemiològica de la SIDA/VIH/ITS a Catalunya. (2015).
 38. M, P.-O. *et al.* Virological characteristics of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals with chronic hepatitis C: implications for treatment. *AIDS* **16**, 493–495 (2002).
 39. N, M. *et al.* Survival and prognostic factors of HIV-infected patients with HCV-related end-stage liver disease. *AIDS* **20**, 49–57 (2006).
 40. JA, P. *et al.* HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology* **41**, 779–789 (2005).
 41. JS, P., N, S. & DT, D. HBV plus HCV, HCV plus HIV, HBV plus HIV. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **8**, 67–74 (2006).
 42. RM, L. *et al.* Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on hepatitis B virus (HBV)-specific T cell responses in patients who have resolved HBV infection. *J. Infect. Dis.* **191**, 1169–1179 (2005).
 43. F, G. *et al.* HIV mono-infection is associated with an impaired anti-hepatitis C virus activity of natural killer cells. *AIDS* **30**, 355–363 (2016).
 44. CB, H. & WJ, C. Hepatocellular carcinoma in a patient with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus coinfection: an emerging problem? *South. Med. J.* **97**, 401–406 (2004).
 45. A case of hepatocellular carcinoma in HIV-infected patient - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8884341/>.
 46. EJ, Y. & KQ, H. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 53–56 (2006).
 47. I, G. & EJ, B. Impact of human immunodeficiency virus infection on the prevalence and severity of steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **44**, 1026–1032 (2006).
 48. The pathogenesis of liver disease in the setting of HIV-hepatitis B virus coinfection - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19430090/>.
 49. KV, S. *et al.* Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection. *HIV Med.* **17**, 581–589 (2016).
 50. AJ, S. & L, R. Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients. *Curr. Opin. Oncol.* **14**, 538–542 (2002).
 51. EE, P., M, N. & P, K. HIV and hepatitis C coinfection: pathogenesis and microbial translocation. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 472–477 (2011).
 52. DL, T. Growing importance of liver disease in HIV-infected persons. *Hepatology* **43**, (2006).
 53. Merwat, S. N. & Vierling, J. M. HIV infection and the liver: the importance of HCV-HIV coinfection and drug-induced liver injury. *Clin. Liver Dis.* **15**, 131–152 (2011).
 54. Benhamou, Y. *et al.* Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* **34**, 283–287 (2001).

55. Mehta, S. H. *et al.* The effect of antiretroviral therapy on liver disease among adults with HIV and hepatitis C coinfection. *Hepatology* **41**, 123–131 (2005).
56. Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655–1669 (2008).
57. Balagopal, A. *et al.* Kupffer Cells are Depleted with HIV Immunodeficiency and Partially Recovered with Antiretroviral Immunoreconstitution: HIV, Kupffer Cells and Antiretroviral Therapy. *AIDS* **23**, 2397 (2009).
58. Housset, C. *et al.* Immunohistochemical evidence for human immunodeficiency virus-1 infection of liver Kupffer cells. *Hum. Pathol.* **21**, 404–408 (1990).
59. Schmitt, M. P. *et al.* Multiplication of human immunodeficiency virus in primary cultures of human Kupffer cells--possible role of liver macrophage infection in the physiopathology of AIDS. *Res. Virol.* **141**, 143–152 (1990).
60. Balagopal, A. *et al.* Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology* **135**, 226–233 (2008).
61. Thein, H. H., Yi, Q., Dore, G. J. & Krahn, M. D. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS* **22**, 1979–1991 (2008).
62. Bräu, N. *et al.* Slower fibrosis progression in HIV/HCV-coinfected patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. *J. Hepatol.* **44**, 47–55 (2006).
63. SG, D., R, T. & DC, D. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity* **39**, 633–645 (2013).
64. Justice, A. C. HIV and aging: time for a new paradigm. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **7**, 69–76 (2010).
65. RB, E. *et al.* Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 542–553 (2008).
66. Plankey, M. W. *et al.* The relationship between methamphetamine and popper use and risk of HIV seroconversion in the multicenter AIDS cohort study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **45**, 85–92 (2007).
67. Justice, A. C. *et al.* Veterans Aging Cohort Study (VACS): Overview and description. *Med. Care* **44**, (2006).
68. M Longini Jr, W S Clarks, L I Gardner & J F Brundage. The dynamics of CD4+ T-lymphocyte decline in HIV-infected individuals: a Markov modeling approach - PubMed. *J Acquir Immune Defic Sundr* **4**, 1141–7 (1988).
69. Rosenberg, P. S., Goedert, J. J. & Biggar, R. J. Effect of age at seroconversion on the natural AIDS incubation distribution. Multicenter Hemophilia Cohort Study and the International Registry of Seroconverters. *AIDS* **8**, 803–810 (1994).
70. Hessel, N. A. *et al.* Progression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection among homosexual men in hepatitis B vaccine trial cohorts in Amsterdam, New York City, and San Francisco, 1978-1991. *Am. J. Epidemiol.* **139**, 1077–1087 (1994).
71. Veugelers, P. J. *et al.* Determinants of HIV disease progression among homosexual men registered in the Tricontinental Seroconverter Study. *Am. J. Epidemiol.* **140**, 747–758 (1994).
72. Pezzotti, P. *et al.* Category of exposure to HIV and age in the progression to AIDS: longitudinal study of 1199 people with known dates of seroconversion. HIV Italian Seroconversion Study Group. *BMJ Br. Med. J.* **313**, 583 (1996).
73. Darby, S. C., Ewart, D. W., Giangrande, P. L. F., Spooner, R. J. D. & Rizza, C. R. Importance of age at infection with HIV-1 for survival and development of AIDS in UK haemophilia population. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation. *Lancet (London, England)* **347**, 1573–1579 (1996).
74. Schneider, M. F. *et al.* Patterns of the hazard of death after AIDS through the evolution of antiretroviral therapy: 1984-2004. *AIDS* **19**, 2009–2018 (2005).
75. Schmucker, D. L. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp. Gerontol.* **40**, 650–659 (2005).
76. Hommes, M. J. T., Romijn, J. A., Endert, E., Eeftinck Schattenkerk, J. K. M. & Sauerwein, H. P. Insulin sensitivity and insulin clearance in human immunodeficiency virus-infected men. *Metabolism.* **40**, 651–656 (1991).
77. Lee, G. A. *et al.* The metabolic effects of lopinavir/ritonavir in HIV-negative men. *AIDS* **18**, 641–649

- (2004).
78. Noor, M. A. *et al.* The effects of HIV protease inhibitors atazanavir and lopinavir/ritonavir on insulin sensitivity in HIV-seronegative healthy adults. *AIDS* **18**, 2137–2144 (2004).
 79. Brown, T. T. *et al.* Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study. *Arch. Intern. Med.* **165**, 1179–1184 (2005).
 80. Shlay, J. C. *et al.* Long-term body composition and metabolic changes in antiretroviral naive persons randomized to protease inhibitor-, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-, or protease inhibitor plus nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based strategy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **44**, 506–517 (2007).
 81. Tien, P. C. Fat distribution in women with HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **42**, 562–571 (2006).
 82. P, B. *et al.* Fat distribution in men with HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **40**, 121–131 (2005).
 83. Tien, P. C. *et al.* Incidence of lipoatrophy and lipohypertrophy in the women’s interagency HIV study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **34**, 461–466 (2003).
 84. Tien, P. C. *et al.* Relation of stavudine discontinuation to anthropometric changes among HIV-infected women. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **44**, 43–48 (2007).
 85. Hadigan, C. *et al.* Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 130–139 (2001).
 86. Heath, K. V. *et al.* Antiretroviral treatment patterns and incident HIV-associated morphologic and lipid abnormalities in a population-based cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **30**, 440–447 (2002).
 87. Martinez, E. *et al.* Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet (London, England)* **357**, 592–598 (2001).
 88. Grunfeld, C. *et al.* Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 1045–1052 (1992).
 89. Riddler, S. A. *et al.* Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA* **289**, 2978–2982 (2003).
 90. Périard, D. *et al.* Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation* **100**, 700–705 (1999).
 91. Purnell, J. Q. *et al.* Effect of ritonavir on lipids and post-heparin lipase activities in normal subjects. *AIDS* **14**, 51–57 (2000).
 92. AK, P. & JM, G. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**, 371–402 (2014).
 93. Chang, P. E. *et al.* Idiopathic portal hypertension in patients with HIV infection treated with highly active antiretroviral therapy. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 1707–1714 (2009).
 94. Shimamatsu, K. & Wanless, I. R. Role of ischemia in causing apoptosis, atrophy, and nodular hyperplasia in human liver. *Hepatology* **26**, 343–350 (1997).
 95. Mikkelsen, W. P., Edmondson, H. A., Peters, R. L., Redeker, A. G. & Reynolds, T. B. Extra- and intrahepatic portal hypertension without cirrhosis (hepatoportal sclerosis). *Ann. Surg.* **162**, 602–620 (1965).
 96. Sherlock, S., Feldman, C. A., Moran, B. & Scheuer, P. J. Partial nodular transformation of the liver with portal hypertension. *Am. J. Med.* **40**, 195–203 (1966).
 97. Sama, S. K. *et al.* Noncirrhotic portal fibrosis. *Am. J. Med.* **51**, 160–169 (1971).
 98. Wanless, I. R., Mawdsley, C. & Adams, R. On the pathogenesis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Hepatology* **5**, 1194–1200 (1985).
 99. Wanless, I. R. Micronodular transformation (nodular regenerative hyperplasia) of the liver: a report of 64 cases among 2,500 autopsies and a new classification of benign hepatocellular nodules. *Hepatology* **11**, 787–797 (1990).
 100. SCIOT, R. *et al.* Incomplete septal cirrhosis: histopathological aspects. *Histopathology* **13**, 593–603 (1988).
 101. Schouten, J. N. L., Garcia-Pagan, J. C., Valla, D. C. & Janssen, H. L. A. Idiopathic noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology* **54**, 1071–1081 (2011).
 102. Okudaira, M., Ohbu, M. & Okuda, K. Idiopathic portal hypertension and its pathology. *Semin. Liver Dis.* **22**, 59–71 (2002).
 103. Hillaire, S. *et al.* Idiopathic non-cirrhotic intrahepatic portal hypertension in the West: a re-evaluation in 28

- patients. *Gut* **51**, 275–280 (2002).
104. Krishan Dhiman, R. *et al.* Non-cirrhotic portal fibrosis (idiopathic portal hypertension): experience with 151 patients and a review of the literature. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 6–16 (2002).
 105. Hartleb, M., Gutkowski, K. & Milkiewicz, P. Nodular regenerative hyperplasia: evolving concepts on underdiagnosed cause of portal hypertension. *World J. Gastroenterol.* **17**, 1400–1409 (2011).
 106. Colina, F., Alberti, N., Solis, J. A. & Martinez-Tello, F. J. Diffuse nodular regenerative hyperplasia of the liver (DNRH). A clinicopathologic study of 24 cases. *Liver* **9**, 253–265 (1989).
 107. Mallet, V. *et al.* Nodular regenerative hyperplasia is a new cause of chronic liver disease in HIV-infected patients. *AIDS* **21**, 187–192 (2007).
 108. Mallet, V. *et al.* Nodular regenerative hyperplasia is a new cause of chronic liver disease in HIV-infected patients. *AIDS* **21**, 187–192 (2007).
 109. Maida, I. *et al.* Antiretroviral-Associated Portal Hypertension: A New Clinical Condition? Prevalence, Predictors and Outcome: <https://doi.org/10.1177/135965350801300111> **13**, 103–107 (2008).
 110. Li, S. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, Vol. 16, Pages 26087–26124 **16**, 26087–26124 (2015).
 111. Gao, B. & Bataller, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* **141**, 1572–1585 (2011).
 112. Nolan, S. *et al.* HIV-infected individuals who use alcohol and other drugs, and virologic suppression. *AIDS Care* **29**, 1129–1136 (2017).
 113. Parsons, J. T., Starks, T. J., Millar, B. M., Boonrai, K. & Marcotte, D. Patterns of substance use among HIV-positive adults over 50: implications for treatment and medication adherence. *Drug Alcohol Depend.* **139**, 33–40 (2014).
 114. Skalski, L. M., Sikkema, K. J., Heckman, T. G. & Meade, C. S. Coping styles and illicit drug use in older adults with HIV/AIDS: Bulletin of the society of psychologists in addictive behaviors: Bulletin of the society of psychologists in substance abuse. *Psychol. Addict. Behav.* **27**, 1050–1058 (2013).
 115. Williams, E. C. *et al.* Alcohol Use and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Current Knowledge, Implications, and Future Directions. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **40**, 2056–2072 (2016).
 116. Cortés, M. T. Consumo Intensivo de alcohol. Barcelona: Socidrogalcohol. in (2016).
 117. Galvan, F. H. *et al.* The prevalence of alcohol consumption and heavy drinking among people with HIV in the United States: results from the HIV Cost and Services Utilization Study. <http://dx.doi.org/10.15288/jsa.2002.63.179> **63**, 179–186 (2015).
 118. González-Álvarez, S., Madoz-Gúrpide, A., Parro-Torres, C., Hernández-Huerta, D. & Mangado, E. O. Relationship between alcohol consumption, whether linked to other substance use or not, and antiretroviral treatment adherence in HIV+ patients. *Adicciones* **31**, 8–17 (2019).
 119. Han, D., Shinohara, M., Ybanez, M. D., Saberi, B. & Kaplowitz, N. Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. *Handb. Exp. Pharmacol.* **196**, 267–310 (2010).
 120. Roy, D. N. & Goswami, R. Drugs of abuse and addiction: A slippery slope toward liver injury. *Chem. Biol. Interact.* **255**, 92–105 (2016).
 121. Kloss, M. W., Cavagnaro, J., Rosen, G. M. & Rauckman, E. J. Involvement of FAD-containing monooxygenase in cocaine-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **64**, 88–93 (1982).
 122. Powell CJ, Charles SJ & Mullervy J. Cocaine hepatotoxicity: a study on the pathogenesis of periportal necrosis - PubMed. *Int J Exp Pathol.* **75**, 415–24 (1994).
 123. Pellinen, P. *et al.* Regenerative changes in hepatic morphology and enhanced expression of CYP2B10 and CYP3A during daily administration of cocaine. *Hepatology* **23**, 515–523 (1996).
 124. J H Samet, A. Y. W. B. Illicit drugs, alcohol, and addiction in human immunodeficiency virus - PubMed. *Panminerva Med.* **49**, 67–77 (2007).
 125. Ong, J. P. & Younossi, Z. M. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin. Liver Dis.* **11**, 1–16 (2007).
 126. Vodkin, I., Valasek, M. A., Bettencourt, R., Cachay, E. & Loomba, R. Clinical, biochemical and histological differences between HIV-associated NAFLD and primary NAFLD: a case-control study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **41**, 368–378 (2015).
 127. Dyson, J. K., Anstee, Q. M. & McPherson, S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to

- diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol.* **5**, 211–218 (2014).
128. Angelico, F. *et al.* Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1578–1582 (2005).
 129. Goupil de Bouillé, J. *et al.* Factors Associated With Being Overweight and Obesity in People Living With Human Immunodeficiency Virus on Antiretroviral Therapy: Socioclinical, Inflammation, and Metabolic Markers. *J. Infect. Dis.* **224**, 1570–1580 (2021).
 130. Lemoine, M., Serfaty, L. & Capeau, J. From nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis in HIV-infected patients: diagnosis and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **25**, 10–16 (2012).
 131. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55**, 2005–2023 (2012).
 132. V, R., S, B., H, C.-P., C, D. & G, M. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J. Hepatol.* **53**, 372–384 (2010).
 133. Sebastiani, G. *et al.* The impact of liver disease aetiology and the stages of hepatic fibrosis on the performance of non-invasive fibrosis biomarkers: an international study of 2411 cases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 1202–1216 (2011).
 134. DallaPiazza, M., Amorosa, V. K., Localio, R., Kostman, J. R. & Lo Re, V. Prevalence and risk factors for significant liver fibrosis among HIV-monoinfected patients. *BMC Infect. Dis.* **10**, (2010).
 135. Nishijima, T. *et al.* Traditional but not HIV-related factors are associated with nonalcoholic fatty liver disease in Asian patients with HIV-1 infection. *PLoS One* **9**, (2014).
 136. Rivero-Juárez, A. *et al.* Incidence of liver damage of uncertain origin in HIV patients not co-infected with HCV/HBV. *PLoS One* **8**, (2013).
 137. Price, J. C. *et al.* Risk factors for fatty liver in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 695–704 (2014).
 138. Gilmore, I. T. *et al.* Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London. *Gut* **36**, 437–441 (1995).
 139. Perrillo, R. P. The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology* **26**, (1997).
 140. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J. Hepatol.* **66**, 153–194 (2017).
 141. Bourlière, M. *et al.* Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2134–2146 (2017).
 142. Gane, E. J. *et al.* Sofosbuvir-velpatasvir with ribavirin for 24 weeks in hepatitis C virus patients previously treated with a direct-acting antiviral regimen. *Hepatology* **66**, 1083–1089 (2017).
 143. Feld, J. J. *et al.* Sustained virologic response of 100% in HCV genotype 1b patients with cirrhosis receiving ombitasvir/paritaprevir/r and dasabuvir for 12weeks. *J. Hepatol.* **64**, 301–307 (2016).
 144. Sulkowski, M. S. *et al.* Ombitasvir, paritaprevir co-dosed with ritonavir, dasabuvir, and ribavirin for hepatitis C in patients co-infected with HIV-1: a randomized trial. *JAMA* **313**, 1223–1231 (2015).
 145. Poordad, F. *et al.* ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1973–1982 (2014).
 146. Mikolasevic, I. *et al.* Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuationparameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand? *World J. Gastroenterol.* **22**, 7236 (2016).
 147. Winters, A. C., Mittal, R. & Schiano, T. D. A review of the use of transient elastography in the assessment of fibrosis and steatosis in the post-liver transplant patient. *Clin. Transplant.* **33**, e13700 (2019).
 148. Fouad, R. *et al.* Evaluation of accuracy of elastography point quantification versus other noninvasive modalities in staging of fibrosis in chronic hepatitis C virus patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**, 882–887 (2018).
 149. Yoshioka, K., Kawabe, N. & Hashimoto, S. Transient elastography: Applications and limitations. *Hepatol. Res.* **38**, 1063–1068 (2008).
 150. Caballería, L. *et al.* Hígado graso no alcohólico. Documento de posicionamiento de la Societat Catalana de Digestologia. *Gastroenterol. Hepatol.* **37**, 372–383 (2014).
 151. Poynard, T. *et al.* Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest,

- HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp. Hepatol.* **3**, 1–12 (2004).
152. Wai, C. T. *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 518–526 (2003).
 153. Sterling, R. K. *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* **43**, 1317–1325 (2006).
 154. Koda, M. *et al.* FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **45**, 297–306 (2007).
 155. Imbert-Bismut, F. *et al.* Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet (London, England)* **357**, 1069–1075 (2001).
 156. Lok, A. S. F. *et al.* Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: Results of the HALT-C cohort. *Hepatology* **42**, 282–292 (2005).
 157. Sud, A. *et al.* Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* **39**, 1239–1247 (2004).
 158. Forns, X. *et al.* Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* **36**, 986–992 (2002).
 159. McHutchison, J. G. *et al.* Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 945–951 (2000).
 160. Rosenberg, W. M. C. *et al.* Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* **127**, 1704–1713 (2004).
 161. Calès, P. *et al.* A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* **42**, 1373–1381 (2005).
 162. Zaman, A. *et al.* Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am. J. Med.* **120**, (2007).
 163. Adams, L. A. *et al.* Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin. Chem.* **51**, 1867–1873 (2005).
 164. Wang, J., Chen, J. & Sen, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.* **231**, 25–30 (2016).
 165. Gupta, P., Cairns, M. J. & Saksena, N. K. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Viol. J. 2014 111* **11**, 1–14 (2014).
 166. O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, (2018).
 167. Kai, K., Dittmar, R. L. & Sen, S. Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **78**, 22–36 (2018).
 168. Chevillet, J. R., Lee, I., Briggs, H. A., He, Y. & Wang, K. Issues and prospects of microRNA-based biomarkers in blood and other body fluids. *Molecules* **19**, 6080–6105 (2014).
 169. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
 170. Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T. & Tollervey, D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* **153**, 654–665 (2013).
 171. Jonas, S. & Izauralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 421–433 (2015).
 172. Zen, K. & Zhang, C. Y. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med. Res. Rev.* **32**, 326–348 (2012).
 173. O’Driscoll, L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2359–2362 (2015).
 174. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–435 (2011).
 175. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–5008 (2011).
 176. Cortez, M. A. *et al.* MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 467–477 (2011).

177. Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* **56**, 1733–1741 (2010).
178. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
179. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
180. Morello, M. *et al.* Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle* **12**, 3526–3536 (2013).
181. Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q. & Panaretakis, T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 103–111 (2012).
182. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* **2**, (2011).
183. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
184. Batagov, A. O., Kuznetsov, V. A. & Kurochkin, I. V. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* **12 Suppl 3**, (2011).
185. Stein, L. D. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol.* **11**, 1–7 (2010).
186. Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. & Jabado, N. What can exome sequencing do for you? *J. Med. Genet.* **48**, 580–589 (2011).
187. Knierim, E., Lucke, B., Schwarz, J. M., Schuelke, M. & Seelow, D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PLoS One* **6**, (2011).
188. Motameny, S., Wolters, S., Nürnberg, P. & Schumacher, B. Next Generation Sequencing of miRNAs - Strategies, Resources and Methods. *Genes (Basel)*. **1**, 70–84 (2010).
189. Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A. & Pantel, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 145–156 (2014).
190. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10513–10518 (2008).
191. Guay, C., Roggli, E., Nesca, V., Jacovetti, C. & Regazzi, R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl. Res.* **157**, 253–264 (2011).
192. Hilton, C., Neville, M. J. & Karpe, F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. **37**, 325–332 (2013).
193. Caroli, A., Cardillo, M. T., Galea, R. & Biasucci, L. M. Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *J. Cardiol.* **61**, 315–320 (2013).
194. Condrat, C. E. *et al.* miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* **9**, (2020).
195. Szabo, G. & Csak, T. Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 1314–1324 (2016).
196. Anadol, E. *et al.* Circulating MicroRNAs as a marker for liver injury in human immunodeficiency virus patients. *Hepatology* **61**, 46–55 (2015).
197. Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T. F. & Zeisel, M. B. miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* **62**, 448–457 (2015).
198. Hatziapostolou, M., Polytarchou, C. & Iliopoulos, D. miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 361–373 (2013).
199. Hung, C. H. *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. *Int. J. Cancer* **138**, 714–720 (2016).
200. Huo, W. *et al.* miR-203a-3p.1 targets IL-24 to modulate hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis. *FEBS Open Bio* **7**, 1085–1091 (2017).
201. Jopling, C. L., Yi, M. K., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. Molecular biology: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (80-.)*. **309**, 1577–1581 (2005).
202. Kitano, M. & Mark Bloomston, P. Hepatic Stellate Cells and microRNAs in Pathogenesis of Liver Fibrosis. *J. Clin. Med.* **2016**, Vol. 5, Page 38 **5**, 38 (2016).
203. Li, C. *et al.* Multiple Roles of MicroRNA-100 in Human Cancer and its Therapeutic Potential. *Cell*.

- Physiol. Biochem.* **37**, 2143–2159 (2015).
204. Koenig, E. M. *et al.* The beagle dog MicroRNA tissue atlas: identifying translatable biomarkers of organ toxicity. *BMC Genomics* **17**, (2016).
 205. Li, F. *et al.* Overexpression of miR-483-5p/3p cooperate to inhibit mouse liver fibrosis by suppressing the TGF- β stimulated HSCs in transgenic mice. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 966–974 (2014).
 206. Liang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology* **52**, 1731–1740 (2010).
 207. Liu, W. *et al.* Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncotargets. Ther.* **10**, 3843–3851 (2017).
 208. Mazzu, Y. Z. *et al.* miR-193b-Regulated Signaling Networks Serve as Tumor Suppressors in Liposarcoma and Promote Adipogenesis in Adipose-Derived Stem Cells. *Cancer Res.* **77**, 5728–5740 (2017).
 209. Petrelli, A. *et al.* Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. *Oncogene 2012 3142* **31**, 4517–4526 (2012).
 210. Roy, S. *et al.* miR-1224 inhibits cell proliferation in acute liver failure by targeting the antiapoptotic gene Nfib. *J. Hepatol.* **67**, 966–978 (2017).
 211. Shaker, O. G. & Senousy, M. A. Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. *J. Viral Hepat.* **24**, 636–644 (2017).
 212. Van Der Ree, M. H. *et al.* Plasma MicroRNA Levels Are Associated With Hepatitis B e Antigen Status and Treatment Response in Chronic Hepatitis B Patients. *J. Infect. Dis.* **215**, 1421–1429 (2017).
 213. Wang, W. *et al.* MicroRNA-592 targets IGF-1R to suppress cellular proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* **13**, 3522–3528 (2017).
 214. Wang, W., Zhao, L. J., Tan, Y. X., Ren, H. & Qi, Z. T. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **18**, 5442–5453 (2012).
 215. Wang, Y. *et al.* Profiles of differential expression of circulating microRNAs in hepatitis B virus-positive small hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers* **15**, 171–180 (2015).
 216. Wang, X., He, Y., MacKowiak, B. & Gao, B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut* **70**, 784–795 (2021).
 217. Yahyaei, S. *et al.* Identification of a Specific miRNA Profile in HIV-Exposed Seronegative Individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **73**, 11–19 (2016).
 218. Egaña-Gorroño, L. *et al.* Differential MicroRNA Expression Profile between Stimulated PBMCs from HIV-1 Infected Elite Controllers and Viremic Progressors. *PLoS One* **9**, e106360 (2014).
 219. Fulcher, J. A. *et al.* Unique microRNA Expression in the Colonic Mucosa During Chronic HIV-1 Infection. *AIDS* **31**, 1925 (2017).
 220. Swaminathan, G., Navas-Martín, S. & Martín-García, J. MicroRNAs and HIV-1 Infection: Antiviral Activities and Beyond. *J. Mol. Biol.* **426**, 1178–1197 (2014).
 221. Gjorgjieva, M., Sobolewski, C., Dolicka, D., Correia De Sousa, M. & Foti, M. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut* **68**, 2065–2079 (2019).
 222. Karsdal, M. A. *et al.* Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int.* **40**, 736–750 (2020).
 223. Mao, K. *et al.* Restoration of miR-193b sensitizes Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Cancer Lett.* **352**, 245–252 (2014).
 224. Starlinger, P. *et al.* Predicting Postoperative Liver Dysfunction Based on Blood-Derived MicroRNA Signatures. *Hepatology* **69**, 2636–2651 (2019).
 225. Zhou, J. *et al.* Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4781–4788 (2011).
 226. Tsai, W. C. *et al.* MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **122**, 2884–2897 (2012).
 227. Satishchandran, A. *et al.* MicroRNA 122, Regulated by GRLH2, Protects Livers of Mice and Patients From Ethanol-Induced Liver Disease. *Gastroenterology* **154**, 238-252.e7 (2018).
 228. Hsu, S. H. *et al.* Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver.

- J. Clin. Invest.* **122**, 2871–2883 (2012).
229. Xiangyu Meng, K. L. X. Y. W. M. MiR-125b-2-3p associates with prognosis of ccRCC through promoting tumor metastasis via targeting EGR1 - PubMed. *Am J Transl Res* 5575–5585 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33042439/> (2020).
 230. Chai, C. *et al.* Metabolic Circuit Involving Free Fatty Acids, microRNA 122, and Triglyceride Synthesis in Liver and Muscle Tissues. *Gastroenterology* **153**, 1404–1415 (2017).
 231. Pirola, C. J. *et al.* Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* **64**, 800–812 (2015).
 232. Giray, B. G. *et al.* Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 4513–4519 (2014).
 233. Cooks, T. *et al.* Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 234. Chuma, M. *et al.* Circulating microRNA-1246 as a possible biomarker for early tumor recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* **49**, 810–822 (2019).
 235. Zhang, W. C. *et al.* Tumour-initiating cell-specific miR-1246 and miR-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
 236. Zhao, Y. *et al.* MicroRNA-194 acts as a prognostic marker and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting MAP4K4. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 12446–12454 (2015).
 237. Theofilos Chrysanthidis, Georgia Loli, Simeon Metallidis & Georgios Germanidis. Mechanisms of accelerated liver fibrosis in HIV-HCV coinfection - PubMed. *AIDS Rev* **19**, 148–155 (2017).
 238. Alrfaei, B. M., Vemuganti, R. & Kuo, J. S. microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models. *PLoS One* **8**, (2013).
 239. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
 240. Thakral, S. & Ghoshal, K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr. Gene Ther.* **15**, 142–150 (2015).
 241. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **3**, 87–98 (2006).
 242. Ran, R. Z. *et al.* miR-194 inhibits liver cancer stem cell expansion by regulating RAC1 pathway. *Exp. Cell Res.* **378**, 66–75 (2019).
 243. Desvignes, T. *et al.* Unification of miRNA and isomiR research: the mirGFF3 format and the mirtop API. *Bioinformatics* **36**, 698–703 (2020).
 244. Neilsen, C. T., Goodall, G. J. & Bracken, C. P. IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet.* **28**, 544–549 (2012).
 245. Wu, C. W. *et al.* A Comprehensive Approach to Sequence-oriented IsomiR annotation (CASMiR): demonstration with IsomiR profiling in colorectal neoplasia. *BMC Genomics* **19**, (2018).