

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.  
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), mayo-junio 2025,  
Volumen 9, Número 3.

[https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v9i1](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i1)

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE  
ESTEATOSIS HEPÁTICA EN PACIENTES  
COINFECTADOS DE VIH/VHC**

**IDENTIFICATION OF HEPATIC STEATOSIS BIOMARKERS IN  
HIV/HCV COINFECTED PATIENTS**

**Fabián Antonio Salas Flores**  
Universidad Europea

## Identificación de biomarcadores de esteatosis hepática en pacientes coinfectados de VIH/VHC

Fabián Antonio Salas Flores<sup>1</sup>

[fasalas0395@gmail.com](mailto:fasalas0395@gmail.com)

<https://orcid.org/0009-0002-1209-9821>

Universidad Europea

### RESUMEN

La coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C (VHC) representa un importante desafío clínico. Aunque la terapia con antivirales de acción directa permite la erradicación del VHC, persisten riesgos hepáticos como la esteatosis hepática, cuya prevalencia es alta en personas con VIH (PWH). Este estudio transversal multicéntrico evaluó el perfil metabólico y lipídico plasmático asociado a la presencia de esteatosis hepática en 52 PWH con fibrosis avanzada o cirrosis, que lograron respuesta virológica sostenida (RVS) tras el tratamiento anti-VHC. La esteatosis se determinó mediante el Índice de Esteatosis Hepática (HSI), y los análisis metabólicos y lipídicos se realizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) en modo positivo y negativo, así como electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS). El análisis multivariante (PCA y PLS-DA) reveló una ligera separación entre los grupos con y sin esteatosis, identificando lípidos diferenciales como SM 18:1;O2/18:1, PI 18:0\_18:2 y PA 34:2 (LC-MS ESI-), y PE O-18:1/22:6 y TG 10:0/18:1/1 (LC-MS ESI+). El análisis univariado confirmó diferencias significativas en algunos de estos compuestos. Los resultados sugieren que la esteatosis hepática en PWH post-RVS se asocia con alteraciones persistentes en el perfil lipídico plasmático. Estos lípidos podrían constituir biomarcadores potenciales para el diagnóstico o pronóstico de la esteatosis hepática en esta población. Se requieren estudios adicionales para validar estas asociaciones y esclarecer sus mecanismos fisiopatológicos.

**Palabras clave:** Esteatosis hepática, VIH, Biomarcadores

---

<sup>1</sup> Autor principal

Correspondencia: [fasalas0395@gmail.com](mailto:fasalas0395@gmail.com)

## Identification of Hepatic Steatosis Biomarkers in HIV/HCV Coinfected Patients

### ABSTRACT

Coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) represents a significant clinical challenge. Although direct-acting antiviral therapy enables HCV eradication, hepatic risks such as steatosis persist, with high prevalence among people with HIV (PWH). This multicenter cross-sectional study evaluated the plasma metabolomic and lipidomic profiles associated with hepatic steatosis in 52 PWH with advanced fibrosis or cirrhosis who achieved a sustained virologic response (SVR) following HCV treatment. Hepatic steatosis was assessed using the Hepatic Steatosis Index (HSI), and metabolomic/lipidomic analyses were performed through liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) in both positive and negative ionization modes, and capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE-MS). Multivariate analysis (PCA and PLS-DA) showed a slight separation between groups with and without steatosis, identifying differential lipids such as SM 18:1;O2/18:1, PI 18:0\_18:2, and PA 34:2 (LC-MS ESI-), and PE O-18:1/22:6 and TG 10:0/18:1/1 (LC-MS ESI+). Univariate analysis confirmed significant differences in some of these compounds. The findings suggest that hepatic steatosis in PWH post-SVR is associated with persistent alterations in the plasma lipid profile. These lipids may serve as potential biomarkers for the diagnosis or prognosis of hepatic steatosis in this population. Further studies are needed to validate these associations and clarify the underlying pathophysiological mechanisms.

**Keywords:** Hepatic steatosis, HIV, Biomarkers

*Artículo recibido 05 mayo 2025*

*Aceptado para publicación: 15 junio 2025*



## INTRODUCCIÓN

Desde su identificación, el virus de la hepatitis C (VHC) ha atravesado un recorrido complejo que refleja el notable avance de la medicina moderna. Su historia, estrechamente ligada a los progresos en virología, biología molecular y terapéutica antiviral, puede dividirse en tres grandes etapas que han marcado el rumbo de nuestra comprensión sobre las hepatitis virales.

La primera etapa corresponde a la era de la hepatitis infecciosa y sérica, comprendida entre mediados de los años 50 y principios de los 70. Durante este periodo, se diferenciaban dos tipos principales de hepatitis: la hepatitis infecciosa, transmitida por vía fecal-oral, y la hepatitis sérica, adquirida generalmente por vía parenteral o sexual, con capacidad de inducir enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis. En 1973 se identificó el virus de la hepatitis A, y posteriormente, en 1986, se descubrió el primer biomarcador para el diagnóstico de la hepatitis B: el antígeno de superficie (HBsAg) (León, 2021).

La segunda etapa se inició a finales de los años 80, con el reconocimiento de una hepatitis de origen desconocido, denominada “hepatitis no A no B”, caracterizada por su curso crónico y su potencial para desarrollar cirrosis. A pesar del desconocimiento etiológico, se comenzaron a utilizar tratamientos como el interferón alfa-2b.

El tercer hito se produjo en 1989, cuando Michael Houghton y sus colaboradores lograron identificar mediante técnicas de biología molecular al agente viral responsable de esta hepatitis. A este nuevo virus se le asignó el nombre de hepatitis C, marcando así el inicio de una nueva era en la investigación, diagnóstico y tratamiento de esta infección viral (León, 2021).

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) continúa representando un problema de salud pública de gran magnitud a nivel mundial. Se estima que más de 50 millones de personas están infectadas con el VHC en el año 2024, lo que equivale a una prevalencia global aproximada del 2,8 %. Esta carga no se distribuye de manera uniforme: las regiones del Mediterráneo Oriental presentan la mayor prevalencia, mientras que en Europa, las tasas varían entre el 1 % y el 1,5 %. En España, por ejemplo, la prevalencia estimada es de aproximadamente el 1,2 % de la población, y según datos del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, en 2020 se notificaron 819 nuevos casos de infección por VHC, con una tasa de incidencia de 2,36 por cada 100.000 habitantes. Estas cifras



muestran además una importante variabilidad regional, siendo las comunidades autónomas de Valencia, Murcia y el País Vasco las más afectadas, mientras que otras como Canarias, Extremadura y Galicia reportaron tasas considerablemente menores (García Deltoro y Ricart Olmos, 2019; Hernando et al., 2022).

El VHC pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*, y se caracteriza por su elevada heterogeneidad genética. Hasta la fecha, se han identificado al menos siete genotipos principales y más de 67 subtipos, con diferencias de entre el 20 % y el 35 % en sus secuencias de nucleótidos (Smith et al., 2019; Johnson & Thompson, 2021). Esta variabilidad tiene un impacto directo en la eficacia y duración de las terapias antivirales disponibles, pues cada genotipo responde de forma distinta a los tratamientos (Brown et al., 2023).

Desde el punto de vista estructural, el VHC es un virus de pequeño tamaño (aproximadamente 50 nanómetros de diámetro), envuelto en una membrana lipídica derivada del retículo endoplásmico del huésped. Esta envoltura contiene dos glicoproteínas clave para la entrada viral: E1 y E2 (Chen & Li, 2020; Garcia et al., 2022). En el interior, el virus alberga una nucleocápside que protege su genoma, compuesto por una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva (Kim et al., 2024).

El ciclo de replicación del VHC se inicia con la unión del virus a receptores específicos ubicados en la membrana de los hepatocitos, incluyendo el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), glucosaminoglucanos (GAG), y las proteínas CD81 y CLDN1 (García Deltoro y Ricart Olmos, 2019). Tras la entrada del virus por endocitosis, su ARN genómico se traduce en una poliproteína que es escindida por proteasas virales y celulares para generar las proteínas estructurales y no estructurales necesarias para la replicación. Entre estas últimas, destacan la NS3 (proteasa) y la NS5B (ARN polimerasa), que constituyen blancos terapéuticos clave.

La replicación ocurre en el retículo endoplásmico, y los nuevos viriones son ensamblados y liberados del hepatocito. Dada la ausencia de una actividad correctora de errores por parte de la ARN polimerasa viral, el VHC genera múltiples cuasiespecies, facilitando la evasión inmunológica y la resistencia a tratamientos (García Deltoro y Ricart Olmos, 2019).

Desde la perspectiva fisiopatológica, el VHC provoca una serie de alteraciones hepáticas y extrahepáticas. Entre las principales afecciones hepáticas se encuentran:



- **Esteatosis hepática:** caracterizada por la acumulación excesiva de grasa en el hígado, principalmente en personas infectadas por el genotipo 3 del VHC. Este subtipo viral interfiere con el metabolismo lipídico, promoviendo la lipogénesis y reduciendo la oxidación de ácidos grasos y la secreción de lipoproteínas (Tariq et al., 2022).
- **Fibrosis hepática:** resultado de la activación de las células estrelladas hepáticas y la acumulación de colágeno, lo que conduce progresivamente a la cirrosis hepática.
- **Cirrosis hepática:** fase terminal de la fibrosis, con distorsión de la arquitectura hepática, formación de nódulos y riesgo elevado de complicaciones como hipertensión portal, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular.
- **Carcinoma hepatocelular (CHC):** el tipo más común de cáncer de hígado, cuya principal causa predisponente es la cirrosis derivada de una infección crónica por VHC. El virus puede inducir carcinogénesis mediante mecanismos indirectos e incluso directos como el estrés oxidativo y la alteración de vías de señalización celular (Tariq et al., 2022).

A estos trastornos hepáticos se suman manifestaciones extrahepáticas, incluyendo alteraciones renales, cardiovasculares y metabólicas. La persistencia del VHC en el organismo se debe en gran medida a su capacidad para evadir la respuesta inmunitaria del huésped, lo que permite el establecimiento de una infección crónica.

La esteatosis hepática en contexto de infección por VHC puede explicarse mediante tres mecanismos principales: un efecto citopático directo del virus, una alteración del metabolismo lipídico mediada por la modulación de genes y vías metabólicas, y una respuesta inflamatoria crónica inducida por la infección. Estos factores actúan en sinergia promoviendo la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos y la progresión hacia formas más graves de enfermedad hepática como la enfermedad hepática grasa asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés).

La MASLD se define como una acumulación grasa en el hígado que afecta al menos al 5 % de los hepatocitos y está asociada con alteraciones metabólicas sistémicas como obesidad, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Incluye un espectro que abarca desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y, finalmente, hepatocarcinoma (Saavedra et al., 2021).



Para evaluar de manera no invasiva la presencia de esteatosis, se utiliza el Índice de Esteatosis Hepática (HSI), que combina parámetros como ALT/AST, índice de masa corporal, sexo y presencia de diabetes. Valores superiores a 36 indican alta probabilidad de esteatosis (Priego-Parra et al., 2024). Aunque útil como herramienta de cribado, debe complementarse con pruebas adicionales para confirmar el diagnóstico.

El tratamiento actual del VHC se basa en antivirales de acción directa (AAD), con tasas de curación superiores al 95 % y regímenes de tratamiento que pueden variar entre 8 y 12 semanas. Las combinaciones más utilizadas incluyen elbasvir/grazoprevir, glecaprevir/pibrentasvir, ledipasvir/sofosbuvir y sofosbuvir/velpatasvir, dependiendo del genotipo viral y el estadio de la enfermedad hepática (Calleja et al., 2018).

En el caso del VIH, el tratamiento estándar es la terapia antirretroviral (TAR), donde los inhibidores de la integrasa como dolutegravir y bictegravir han demostrado gran eficacia. En casos de resistencia, se recurre a combinaciones con inhibidores de la transcriptasa inversa o de la proteasa, guiadas por estudios genotípicos (Gandhi et al., 2022).

La coinfección VIH/VHC constituye un reto clínico adicional. El VIH acelera la progresión de la enfermedad hepática asociada al VHC, aumenta la replicación viral y potencia la inflamación hepática. Aunque los avances terapéuticos han mejorado el pronóstico, la erradicación del VHC no elimina el riesgo de secuelas hepáticas crónicas como la esteatosis (Rotman y Liang, 2009).

Por tanto, el presente estudio cobra relevancia al investigar los cambios metabólicos persistentes tras la erradicación del VHC en personas con VIH, enfocándose en la identificación de biomarcadores plasmáticos que permitan comprender mejor los mecanismos subyacentes a la esteatosis hepática post-tratamiento y mejorar las estrategias de prevención y seguimiento en esta población vulnerable.

## **METODOLOGÍA**

### **1. Diseño y participantes del estudio**

Llevamos a cabo un estudio transversal multicéntrico en 52 personas con VIH (PWH) en TAR y recuperación inmunológica significativa después de completar con éxito el tratamiento contra el VHC en 10 centros en España. Estos pacientes tenían fibrosis avanzada o cirrosis y comenzaron tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) sin interferón (IFN) o basados en IFN (peg-IFN- $\alpha$ /ribavirina o



peg-IFN- $\alpha$ /ribavirina/AAD) entre febrero de 2012 y agosto de 2016, logrando una respuesta virológica sostenida (RVS) (carga de ARN del VHC indetectable 12-24 semanas –dependiendo del régimen– después de finalizar el tratamiento anti-VHC). Todos los pacientes tenían datos clínicos disponibles y muestras de plasma congelado aproximadamente un año después de completar el tratamiento exitoso del VHC. Todos los pacientes estuvieron en TAR estable durante más de seis meses y tenían una carga viral de VIH en plasma indetectable ( $< 50$  copias/mL). Los pacientes con coinfección por el virus de la hepatitis B (VHB), hepatitis C aguda o descompensación hepática fueron excluidos.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (CEI PI 72\_2021) y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Antes del registro, todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito.

## 2. Datos clínicos y muestras

Las características epidemiológicas, clínicas y virológicas de los participantes se recopilaron de los registros médicos utilizando un formulario en línea, cumpliendo con todos los requisitos de confidencialidad. Esta información fue monitoreada.

Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos con EDTA, se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a la extracción y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Biobanco HIV HGM (<http://hivhgmbiobank.com/?lang=en>) hasta su uso.

La inactivación viral de las muestras de plasma se realizó mezclando  $300\ \mu\text{L}$  de plasma con  $900\ \mu\text{L}$  de MeOH:EtOH frío (1:1, v/v), alcanzando una proporción 1:3, v/v. Luego, las muestras se mezclaron en vortex durante 1 minuto y se introdujeron en un baño de hielo durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a  $16000\ \text{g}$ , durante 20 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ , y luego se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

## 3. Variable de resultado

El Índice de Esteatosis Hepática (HSI) es un índice simple que puede ser muy útil para detectar esteatosis hepática y que también ha sido validado en PWH. El HSI se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $\text{HSI} = 8 \times (\text{relación alanina aminotransferasa (ALT)/aspartato aminotransferasa (AST)}) + \text{índice de masa corporal (IMC)}$  (+2, si es mujer; +2, si tiene diabetes mellitus). La variable de resultado fue un HSI elevado ( $\text{HSI} \geq 36$ ) un año después de completar el tratamiento del VHC. Elegimos este



valor de corte porque se ha encontrado que predice la presencia de MAFLD.(Okada et al., 2023),(Lee et al., 2010), (Yanavich et al.,2021).

#### 4. Análisis metabolómico por Electroforesis Capilar 4.1.

##### Extracción de Metabolitos:

La extracción de metabolitos incluyó pasos de descongelación, centrifugación y secado de las muestras de plasma. La resuspensión en ácido fórmico con estándares internos permite la estabilización y la cuantificación relativa de los metabolitos. La desproteínización con filtros de corte de proteína elimina las proteínas de la muestra, las cuales podrían interferir con el análisis por electroforesis capilar.

##### 4.2. Aseguramiento de la Calidad y Muestras Blancas:

Al igual que en el análisis lipídómico, se incluyeron muestras QC y muestras blanco para monitorizar la variabilidad analítica e identificar posibles contaminantes.

##### 4.3. Condiciones Analíticas:

-Electroforesis Capilar (CE): Se utilizó un sistema Agilent CE 7100, que permite la separación de metabolitos cargados en base a su movilidad electroforética. El capilar de sílice fundida proporciona una superficie cargada que interactúa con los analitos, contribuyendo a la separación.

-Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo (TOF-MS): El espectrómetro de masas Agilent 6224 TOF-MS permite la detección y la identificación de metabolitos en base a su m/z. La utilización de una fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo permite la ionización eficiente de una amplia gama de metabolitos.

-Adquisición de Datos: La adquisición de datos en modo de escaneo completo permite registrar un amplio rango de masas, capturando la mayor parte de los metabolitos presentes en las muestras. La adquisición de iones de fragmentos insource (pseudo-MS/MS) proporciona información estructural adicional que facilita la identificación de los metabolitos.

##### 4.4. Proceso de Anotación de Metabolitos:

La identificación de los metabolitos se realizó utilizando una base de datos CE-MS predefinida, integrada en la plataforma CEU Mass Mediator (CMM) (Mamani-Huanca et al., 2021). Esta base de datos contiene información sobre la masa exacta, el tiempo de migración y la fórmula molecular de una



amplia variedad de metabolitos, lo que permite una asignación precisa de los picos detectados en el análisis CE-MS.

#### 5.1 Análisis Lipidómico 5.1. Extracción de Lípidos:

La extracción de lípidos se realizó utilizando una metodología optimizada y validada en el laboratorio, basada en una mezcla de solventes MeOH:MTBE (1:1, v/v) (Gonzalez-Riano et al., 2021). Este método permite una eficiente extracción de una amplia gama de lípidos a partir de muestras de plasma. La adición de estándares internos no endógenos (C17Esfinganina y ácido palmítico d31) permite la cuantificación relativa de los lípidos y la corrección de variaciones en el proceso analítico.

#### 5.2. Aseguramiento de la Calidad y Preparación de Blancos:

La inclusión de muestras de Control de Calidad (QC), preparadas a partir de la combinación de todas las muestras de plasma, permite monitorizar la variabilidad analítica y asegurar la reproducibilidad del método a lo largo del análisis. Las muestras blanco, procesadas con los mismos solventes utilizados en la extracción, permiten identificar contaminantes y compuestos derivados de los reactivos, los cuales son excluidos del análisis posterior.

#### 5.3. Condiciones Analíticas:

-Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución (UHPLC): Se empleó un sistema Agilent 1290 Infinity II, el cual ofrece una alta eficiencia de separación, permitiendo la resolución de un gran número de especies lipídicas. La columna de fase reversa Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC – C18 proporciona una adecuada retención y separación de lípidos basada en su polaridad.

-Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo con Cuadrupolo (QTOF): El espectrómetro de masas Agilent 6546 QTOF, con fuente de ionización por electrospray dual (ESI), permite la detección sensible y la identificación de lípidos en base a su relación masa/carga ( $m/z$ ). La utilización de dos modos de ionización (ESI+ y ESI-) maximiza la cobertura del lipidoma plasmático, ya que diferentes clases de lípidos ionizan de manera más eficiente en uno u otro modo.

-Adquisición de Datos: La adquisición de datos en modo de escaneo completo (full scan) permite registrar un amplio rango de masas, capturando la mayor parte de las especies lipídicas presentes en las muestras. La adquisición iterativa MS/MS en las muestras QC proporciona información estructural adicional al fragmentar los iones precursores, lo que facilita la identificación de los lípidos.



-Corrección de Masa: La infusión continua de masas de referencia (purina y HP0921) garantiza la precisión en la medición de masas a lo largo del análisis.

#### 5.4. Proceso de Anotación Lipídica:

La identificación de los lípidos se llevó a cabo mediante una estrategia que integra la información de diferentes herramientas bioinformáticas:

-Lipid Annotator: Este software utiliza la concordancia de espectros MS/MS para la anotación de lípidos, comparando los espectros experimentales con una base de datos de espectros de referencia (Koelmel et al., 2020).

-MS-DIAL 4: Esta herramienta permite la identificación de lípidos basada en la concordancia de masas exactas y tiempos de retención con bases de datos de lípidos (Tsugawa et al., 2020).

-LipidHunter: Este software emplea un enfoque "de abajo hacia arriba" para la identificación de lípidos, analizando los patrones de fragmentación MS/MS y deduciendo la estructura lipídica a partir de los fragmentos observados (Ni Z et al., 2017).

-LipidMS 3.0: Esta herramienta utiliza reglas de intensidad de fragmentos para la anotación de lípidos, basándose en la abundancia relativa de los diferentes iones de fragmento en el espectro MS/MS (Alcoriza-Balaguer et al., 2018; Alcoriza-Balaguer et al., 2022).

La combinación de estas herramientas, junto con la inspección manual de los espectros MS/MS y la utilización de la plataforma CEU Mass Mediator (CMM) (Gil-De-La-Fuente et al., 2019), permite una anotación lipídica robusta y confiable.

#### 6. Reprocesamiento de Datos

El reprocesamiento de los datos crudos, tanto lipidómicos como metabolómicos, se llevó a cabo mediante una estrategia híbrida (Fernández Requena et al., 2024) que utiliza el software Agilent MassHunter Profinder. Este software permite la alineación de los datos en función del tiempo de retención (para LC-MS) o tiempo de migración (para CE-MS), lo que facilita la comparación entre muestras y la detección de cambios en los perfiles lipídicos y metabolómicos. La extracción de características se realizó de manera dirigida, utilizando una base de datos que incluye información sobre la masa exacta, la fórmula molecular y los posibles aductos de los lípidos y metabolitos de interés.



La consideración de diferentes aductos para cada modo de ionización permite una detección más completa de las especies presentes en las muestras. La utilización de algoritmos de agrupamiento de isótopos y de filtrado de características permite eliminar señales redundantes y asegurar la calidad de los datos.

### 6.1. Normalización y Filtrado de Datos

La normalización de los datos lipidómicos se realizó mediante la transformación de Kuligowski (Kuligowski et al., 2015), la cual corrige las variaciones introducidas por el instrumento o el procesamiento de la muestra, permitiendo una comparación más precisa entre las muestras. En el caso de los datos metabolómicos, la normalización se realizó utilizando un estándar interno (sulfona de metionina), lo que permite corregir las variaciones en la eficiencia de extracción y detección.

El filtrado de datos, basado en el coeficiente de variación (CV) en las muestras QC, permite eliminar especies lipídicas y metabolitos con una alta variabilidad analítica, asegurando que los resultados obtenidos sean robustos y confiables.

### 7. Análisis estadístico

Para la descripción del grupo, las variables continuas se expresaron como mediana (rango intercuartílico, IQR) y las variables categóricas como recuento absoluto (porcentaje). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R. Se utilizaron las pruebas U de MannWhitney y Chi-cuadrado para comparar grupos independientes para variables continuas y categóricas, respectivamente. Los datos de LC-MS (ionización por electrospray (ESI) positiva y negativa) adquiridos del análisis lipidómico y los obtenidos de CE-MS se normalizaron (transformación logarítmica ( $\log_{10}$ ) y escalado automático (centrado en la media y luego dividido por la desviación estándar de la variable)) y se sometieron a análisis estadístico multivariado utilizando el software MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>), que incluyó análisis multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (PLS-DA).

El análisis multivariante es una rama de la estadística que permite estudiar múltiples variables simultáneamente, lo que facilita la comprensión de patrones complejos y relaciones entre ellas. Dentro de este campo, el PCA es una técnica ampliamente utilizada para reducir la dimensionalidad de los datos y asimismo conservar la mayor cantidad de información posible. Este transforma un conjunto de



variables originales en nuevas variables no correlacionadas llamadas componentes principales, que en sí son combinaciones lineales de las variables originales. Estos componentes capturan la mayor variabilidad de los datos, simplifican su estructura y facilitan su interpretación.

En el caso del análisis de discriminación por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) es un análisis supervisado que maximiza la separación entre las clases del conjunto de datos, optimizando la capacidad predictiva del modelo. Además, para evaluar la importancia de las variables en la discriminación entre clases, se utilizó el VIP score (Variable Importance in Projection), calculado en base al modelo PLS-DA. Este puntaje asigna mayor importancia a las variables que contribuyen de manera significativa a la clasificación de las muestras.

Para evaluar las diferencias entre grupos, además del modelo multivariado mediante PCA y PLS-DA, se llevó a cabo un análisis estadístico univariado mediante la prueba de t de Student (t-test). El nivel de significación se definió como valor  $p < 0.05$  (dos colas) y valor  $q < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. Características de los pacientes

Las características de los 52 pacientes coinfectados con VIH/VHC de acuerdo al desarrollo de esteatosis hepática ( $HSI \geq 36$ ) se muestran en la Tabla 1. El 82,7% de los pacientes eran hombres, la mediana de edad era 52,5 años, y el IMC era 25,37 kg/m<sup>2</sup>. El 56,2% eran fumadores habituales, y el 6,2% y el 80% tenían antecedentes de consumo de alcohol y drogas, respectivamente. En cuanto a los aspectos virológicos, el 75% estaban infectados por el genotipo 1 del VHC:

**Tabla 1.** Características clínicas, epidemiológicas y virológicas de pacientes con VIH (PWH) un año después de completar con éxito el tratamiento para el VHC, según la presencia de esteatosis hepática ( $HSI \geq 36$ ).

	Todos	HSI $\geq 36$	HSI $\leq 36$	P
<b>No.</b>	52	15	37	
Edad (años)	52,50	(50- 52,00	(49- 55)	0,345
Sexo (hombre)	43 (82,7%)	14 (93,3%)	29 (78,4%)	0,375
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) (n = 53)	25,37 (22,44-	29,56 (28,63-	23,32 (21,16-	



	28,17)	31,76)	25,50)	<b>&lt;0,001</b>
Fumador (n = 48)				0,052
Nunca	4 (8,3%)	0 (0,0%)	4 (11,4%)	
Previo (>6 meses)	17 (35,4%)	8 (61,5%)	9 (25,7%)	
Actual	27 (56,2%)	5 (38,5%)	22 (62,9%)	
Ingesta alcohol (> 50 g/día) (n = 49)				0,520
<hr/>				
Nunca	26 (54,2%)	7 (53,8%)	19 (54,3%)	
Previo (>6 meses)	19 (39,6%)	6 (46,2%)	13 (37,1%)	
Actual	3 (6,2%)	0 (0,0%)	3 (8,6%)	
<b>Consumo drogas intravenosas</b>				
en los últimos 6 meses	40 (80,0%)	11 (78,6%)	29 (80,6%)	0,999
Terapia HCV previa	29 (55,8%)	8 (53,3%)	21 (56,8%)	0,999
SIDA previo	1 (1,9%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)	0,999
<b>Marcadores hepáticos</b>				
HSI	32,36 (29,63-36,76)	38,30 (37,23-42,21)	30,90 (28,44-32,72)	<b>&lt;0,001</b>
LSM (kPa) (n = 45)	14,10 (8,10-19,20)	15,55 (13,58-22,62)	13,90 (8,00-19,20)	0,248
APRI (n = 51)	0,57 (0,41-0,94)	0,57 (0,43-1,01)	0,57 (0,42-0,87)	0,820
<b>Marcadores HCV previos</b>				
Genotipo HCV				0,904
1	39 (75%)	12 (80%)	27 (73,0%)	
3	7 (13,5%)	1 (6,7%)	6 (16,2%)	
4	5 (9,6%)	2 (13,3%)	3 (8,1%)	

Otros	1 (1,9%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)	
VHC-RNA en log10 (IU/mL)	6,31 (5,84-6,68)	6,08 (5,75-6,74)	6,39 (6,04-6,67)	0,369
VHC-RNA > 850000 (IU/mL)	37 (71,2%)	8 (53,3%)	29 (78,4%)	0,142
<b>Terapia HCV (basada en IFN)</b>	36 (69,2%)	12 (80,0%)	24 (64,9%)	0,459
<b>Terapia antiretroviral HIV</b>				0,564
NRTI + NNRTI,	17 (35,4%)	7 (50,0%)	10 (29,4%)	
NRTI + II	18 (37,5%)	4 (28,6%)	14 (41,2%)	
NRTI + PI	10 (20,8%)	2 (14,3%)	8 (23,5%)	
Otros	3 (6,2%)	1 (7,1%)	2 (5,9%)	

Estadística: Los valores se expresan con número absoluto (porcentaje) y mediana (rango intercuartílico) para variables cualitativas y cuantitativas, respectivamente. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de Chi-cuadrado y la prueba U de Mann-Whitney para variables cualitativas y cuantitativas, respectivamente.

Abreviaturas: HSI, índice de esteatosis hepática; IMC, índice de masa corporal; VHC, virus de la hepatitis C; LSM, medición de la rigidez hepática; kPa, kilopascal; UI, unidades internacionales; peg IFN, interferón pegilado; AAD, antivirales de acción directa; ARN del VHC, carga viral de la hepatitis C; SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida; ITIAN, inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos para el VIH; ITINN, inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos para el VIH; II, inhibidor de la integrasa del VIH; IP, inhibidor de la proteasa del VIH.



## 2. Análisis metabólico

### 2.1. Datos de metabolitos obtenidos mediante electroforesis capilar

#### 2.1.1. Análisis multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA)

El análisis PCA se muestra en la Figura 1. El primer componente principal (PC1) explica un 18.1% de la variabilidad total. El segundo componente (PC2) explica un 14% adicional de la variabilidad. La combinación de PC1 y PC2 nos da una visión inicial de la estructura de los datos y puede revelar agrupamientos o patrones importantes. El tercer componente (PC3) añade otra dimensión a la interpretación, capturando 8,3% de la variabilidad que no está reflejada en los dos primeros componentes. Con PC3 se puede identificar más detalles sobre la estructura subyacente o variabilidad residual en los datos.

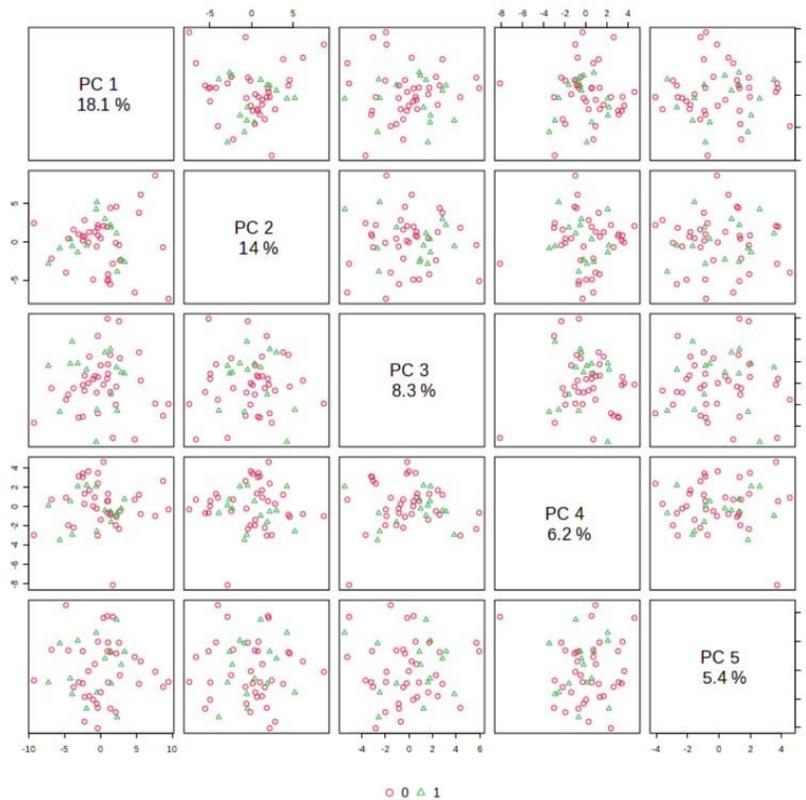
Al observar los componentes PC4 y PC5, se obtiene una comprensión más detallada y matizada. PC4 explica 6,2% de la variabilidad, mientras que PC5 representa 5,4% de la variabilidad total. Estos componentes adicionales pueden mostrar patrones más sutiles o variabilidad residual que no fue capturada en los componentes anteriores.

Los gráficos que muestran las proyecciones de datos en estos componentes ayudan a identificar cómo se distribuyen las muestras. En el plano formado por PC1 y PC2, se pueden observar agrupamientos y patrones generales, mientras que las proyecciones en los planos de PC3 vs. PC4 y PC4 vs. PC5 proporciona perspectivas adicionales sobre la estructura de los datos. Las muestras cercanas entre sí en estos planos tienen características similares, lo que puede indicar agrupaciones o relaciones significativas entre las observaciones.

Como bien se puede observar en la Figura 1 se muestra el análisis PCA el cual se realiza para poder explorar las diferencias en el perfil lipídico entre los dos grupos de estudio. Los puntos rojos (0) representan a las personas con VIH (PWH) sin esteatosis hepática (HSI  $< 36$ ), mientras que los puntos verdes (1) representan a las PWH con esteatosis hepática (HSI  $\geq 36$ ). La distribución de los puntos en los diferentes gráficos del PCA permite visualizar si existen patrones de agrupación o separación entre los dos grupos, lo que indicaría diferencias en su composición metabólica.



**Figura 1.** Análisis de componentes principales mediante análisis multivariante de componentes principales (PCA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) obtenidos mediante electroforesis capilar



### 2.1.2. Análisis multivariante mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA)

Con el análisis de discriminación por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se identifica y maximiza la separación entre diferentes clases en un conjunto de datos. Cada componente en PLS-DA captura la variabilidad que distingue entre las clases, mejorando la capacidad del modelo para realizar predicciones precisas.

En este análisis, el primer componente principal (PC1) es fundamental para capturar la variabilidad que más contribuye a la separación entre las clases. Explica un 13% de la variabilidad que es relevante para la discriminación entre grupos, proporcionando la mayor parte de la separación observada en los datos. El segundo componente (PC2) añade una dimensión adicional a la separación, explicando un 8,6% de la variabilidad, y ayuda a capturar la separación que no se logra con el primer componente (Figura 2). Luego se introducen más componentes, PC3, PC4 y PC5, que añaden dimensiones adicionales que capturan variabilidad adicional entre las clases. PC3 explica un 6,6% de la variabilidad y puede revelar estructuras adicionales en los datos que no son evidentes en los primeros dos componentes. PC4 y PC5,

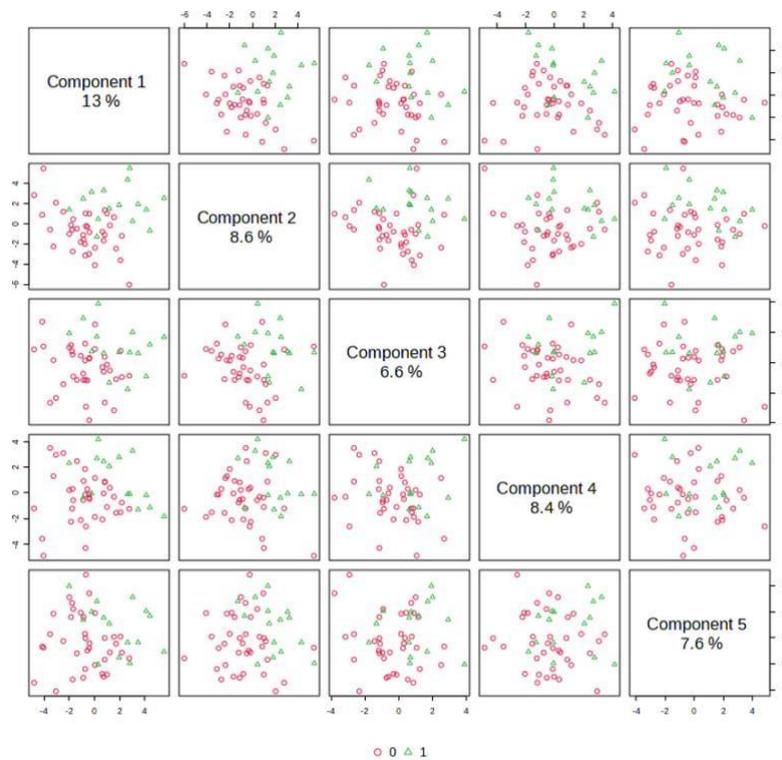
que explican 8,4% y 7,6% de la variabilidad respectivamente, proporcionan detalles más refinados sobre la separación entre clases y pueden capturar variabilidad residual que no fue abordada por los componentes anteriores.

Los gráficos de PLS-DA que muestran la proyección de datos en estos componentes ayudan a visualizar cómo se separan las clases. En el plano formado por PC1 y PC2, se observa una separación inicial entre las clases, mientras que los planos de PC3 vs. PC4 y PC4 vs. PC5 proporciona perspectivas adicionales sobre cómo las clases se agrupan y se distinguen en dimensiones adicionales. Las muestras que están cercanas entre sí en estos gráficos tienen características similares, lo que indica que el modelo ha logrado capturar patrones de discriminación significativos.

En la Figura 2 se muestra el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) realizado para identificar las variables metabolómicas que mejor discriminan entre las PWH con esteatosis hepática ( $HSI \geq 36$ , puntos verdes) y sin esteatosis hepática ( $HSI < 36$ , puntos rojos). A diferencia del PCA, el PLS-DA busca maximizar la separación entre los grupos. En este análisis, se observa una ligera tendencia a la separación entre los grupos, aunque con una considerable superposición de los puntos rojos y verdes. Los componentes discriminantes 1 y 2 explican un 21,6% de la varianza, lo que indica que el modelo tiene una capacidad moderada para discriminar entre los grupos en función de su perfil lipidómico. La distribución de los puntos en los diferentes gráficos del PLS-DA permite visualizar la capacidad del modelo para discriminar entre los dos grupos en función de su perfil metabolómico.



**Figura 2.** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) obtenidos mediante electroforesis capilar

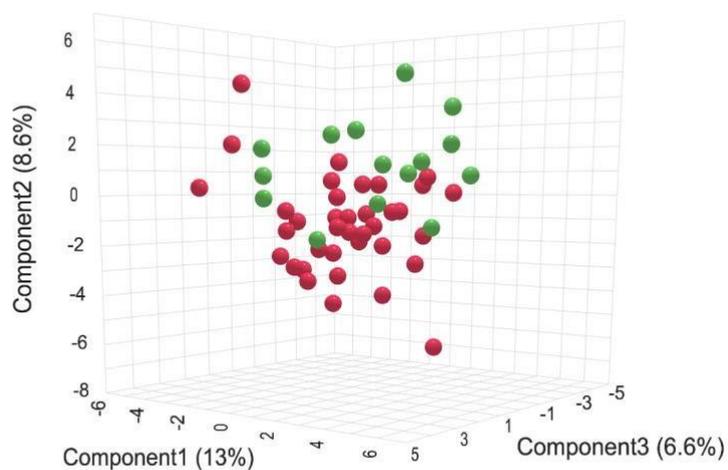


Las características de estos datos pueden observarse con mayor detalle en la Figura 3. Esta figura proporciona una visualización clara de la distribución de las muestras en el espacio definido por los tres primeros componentes principales (PC1, PC2 y PC3). Se observa una dispersión de puntos rojos y verdes que representan nuestros dos grupos ( $HSI \geq 36$  y  $HSI <$

36). Aunque existe cierto grado de solapamiento entre estas clases, se puede apreciar una tendencia de separación, particularmente a lo largo del eje del Componente 1, que explica el mayor porcentaje de variabilidad (13%).

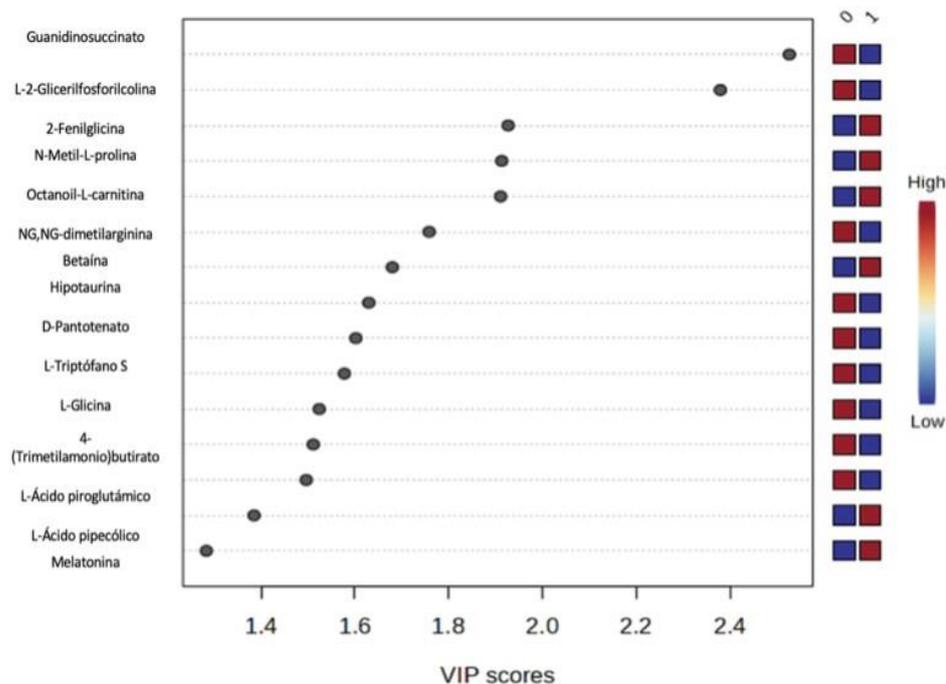
La distribución de los puntos indica que, si bien hay diferencias detectables entre los dos grupos, también existe variabilidad dentro de cada grupo. Algunos puntos de ambos colores se encuentran más dispersos, alejados del núcleo principal de su respectivo grupo, lo que podría indicar muestras atípicas o con características particulares dentro de cada clase.

**Figura 3.** Gráfico sincronizado en 3D del PLS-DA en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) obtenido mediante electroforesis capilar



La Figura 4 muestra los resultados del análisis VIP (Variable Importance in Projection). Los VIP scores reflejan la importancia de cada metabolito en la diferenciación entre grupos en el modelo PLS-DA. Guanidinosuccinato tiene el VIP score más alto, seguido por  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina, lo que indica su relevancia en la separación de grupos. Las barras de colores representan la abundancia relativa de los metabolitos entre los grupos comparados. Este análisis identifica los metabolitos clave para la discriminación, siendo aquellos con VIP scores superiores a 1 los más relevantes.

**Figura 4.** Gráfico de calor los resultados de un análisis VIP (Variable Importance in Projection) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) obtenidos mediante electroforesis capilar



### 2.1.3. Diferencias entre grupos mediante análisis univariado (t-test)

**Tabla 2.** Resultado de metabolitos significativos obtenidos mediante del t-test

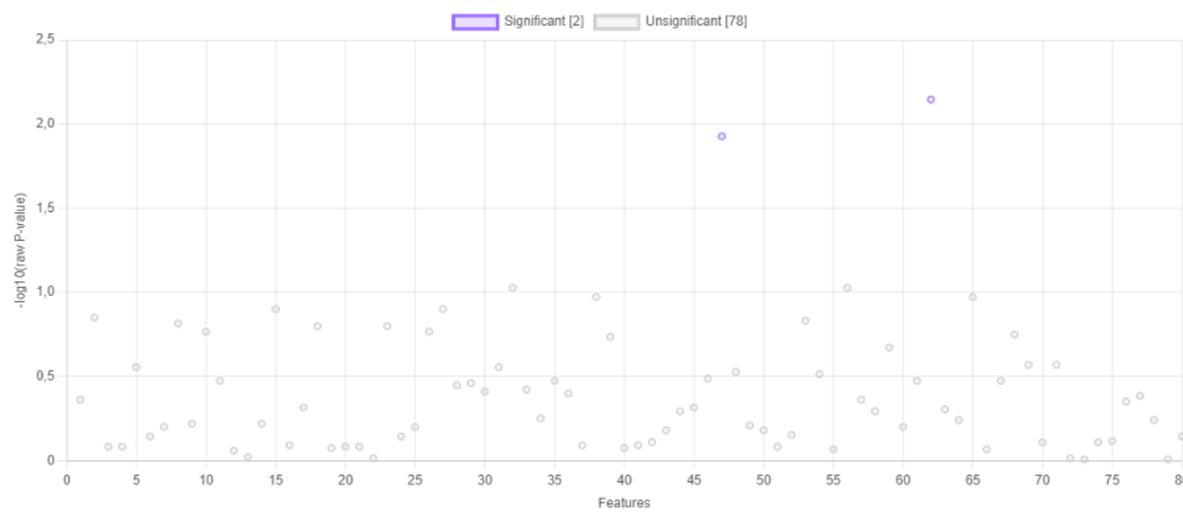
Metabolitos obtenidos	Valor p	Valor q
$\alpha$ -glicerilfosforilcolina	0,007	0,473
ácido guanidinosuccínico	0,011	0,473

La Figura 5 muestra los resultados del análisis univariado mediante un test que estudia las diferencias para cada metabolito individual entre ambos grupos. El gráfico de dispersión presenta los valores de  $-\log_{10}(p\text{-value})$  en el eje Y frente a los metabolitos en el eje X. Este tipo de gráfico permite visualizar de manera clara qué tan significativos son los resultados, ya que cuanto mayor es el valor en el eje Y, menor es el valor de p.

En la gráfica, los puntos violetas representan los metabolitos con valores de p menores al umbral de significancia ( $p < 0,05$ ), mientras que los puntos blancos son aquellos que no alcanzaron esta significancia. Los dos metabolitos más destacados,  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina y ácido guanidinosuccínico,

tienen los valores de p más bajos (0,007 y 0,011, respectivamente), lo que indica que son los más relevantes para diferenciar los grupos estudiados.

**Figura 5.** Gráfico de dispersión que muestra los resultados del análisis univariado t-test aplicado obtenidos mediante electroforesis capilar



En la figura 5 El análisis univariado mediante t-test, que compara las medias de cada metabolito entre los grupos con y sin esteatosis hepática, reveló diferencias en dos metabolitos:  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina y ácido guanidinosuccínico. Si bien estos metabolitos mostraron valores p inferiores a 0.05 en el análisis inicial, es importante destacar que estas diferencias no se mantuvieron tras la aplicación de la corrección por múltiples comparaciones (valor q = 0,473). Esto sugiere que, en el contexto del análisis global y considerando la posibilidad de falsos positivos,  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina y ácido guanidinosuccínico no presentan diferencias significativas entre los grupos con y sin esteatosis hepática.

## 2.2. Datos del análisis lipidómico obtenidos mediante LC-MS ESI-

### 2.2.1. Análisis multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA)

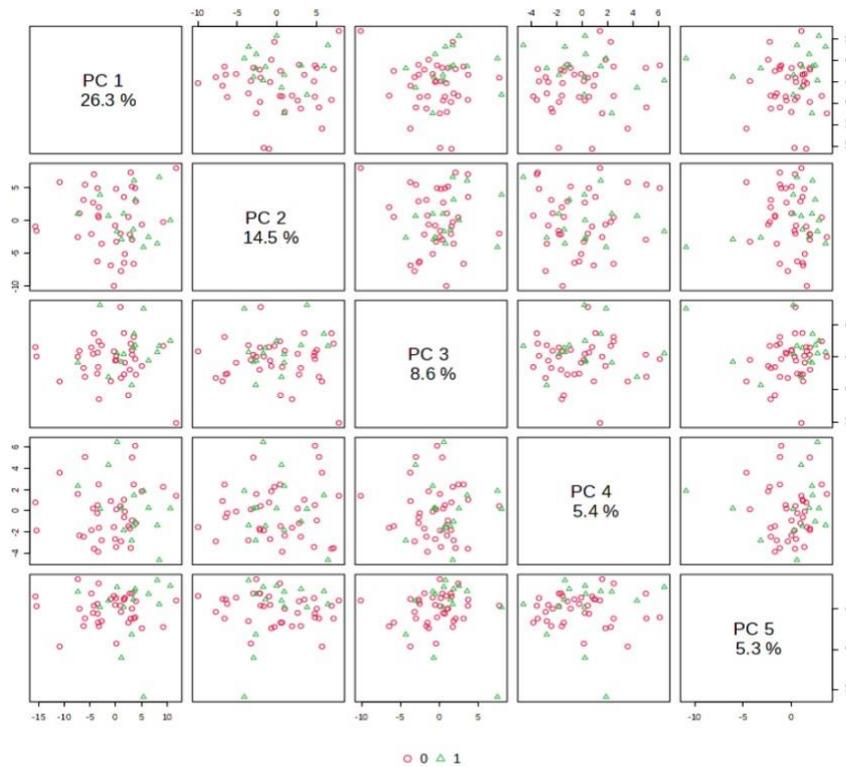
Con el análisis de componentes principales (PCA) se busca identificar patrones y reducir la dimensionalidad de los datos, conservando la mayor cantidad de información posible. Cada componente principal captura una parte de la variabilidad total de los datos, y la combinación de varios componentes permite visualizar la estructura de los datos desde diferentes perspectivas.

En este análisis, el primer componente principal (PC1) es fundamental para capturar la variabilidad en el perfil lipídico obtenido mediante LC-MS ESI-. Explica un 26,3% de la variabilidad total, proporcionando una visión general de las principales diferencias entre las muestras. El segundo componente (PC2) añade una dimensión adicional al análisis, explicando un 14,5% de la variabilidad, y ayuda a visualizar patrones que no se aprecian en el primer componente (Figura 6).

Luego se introducen más componentes, PC3, PC4 y PC5, que añaden dimensiones adicionales y capturan variabilidad adicional en los datos. PC3 explica un 8,6% de la variabilidad y puede revelar estructuras adicionales en los datos que no son evidentes en los primeros dos componentes. PC4 y PC5, que explican 5,4% y 5,3% de la variabilidad respectivamente, proporcionan detalles más refinados sobre la estructura de los datos y pueden capturar variabilidad residual que no fue abordada por los componentes anteriores. Los gráficos de PCA que muestran la proyección de datos en estos componentes ayudan a visualizar cómo se distribuyen las muestras. En el plano formado por PC1 y PC2, se observa una ligera tendencia a la separación entre las PWH con esteatosis hepática ( $HSI \geq 36$ , puntos verdes) y sin esteatosis hepática ( $HSI < 36$ , puntos rojos), mientras que los planos de PC3 vs. PC4 y PC4 vs. PC5 proporcionan perspectivas adicionales sobre cómo se agrupan las muestras en dimensiones adicionales. Las muestras que están cercanas entre sí en estos gráficos tienen características similares en su perfil lipídico.



**Figura 6.** Análisis de componentes principales mediante análisis multivariante de componentes principales (PCA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) para análisis lipidómico obtenidos mediante LC-MS ESI-

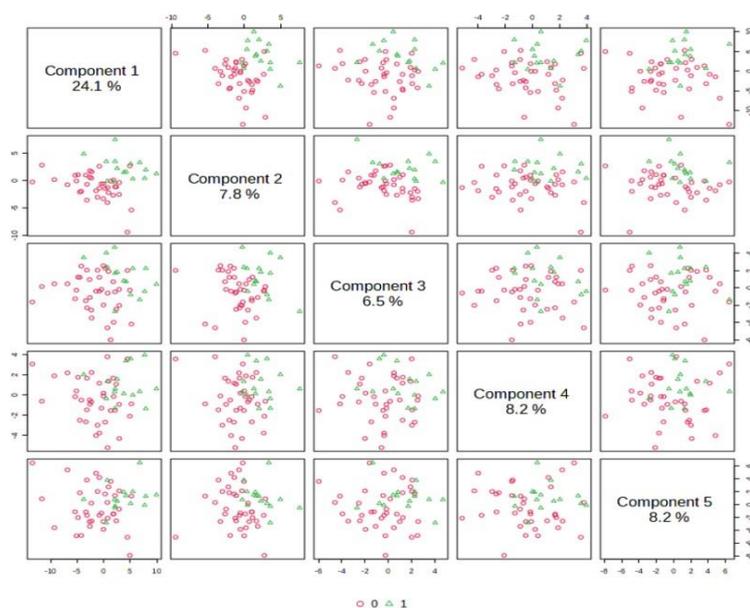


### 2.2.2. Análisis multivariante mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA)

Las características de los datos lipidómicos obtenidos mediante LC-MS ESI- pueden observarse con mayor detalle en la Figura 6. Esta figura proporciona una visualización clara de la distribución de las muestras en el espacio definido por los cinco primeros componentes principales (PC1, PC2, PC3, PC4 y PC5). Se observa una dispersión de puntos rojos y verdes que representan nuestros dos grupos ( $HSI \geq 36$  y  $HSI < 36$ ). Aunque existe cierto grado de solapamiento entre estas clases, se puede apreciar una ligera tendencia de separación, particularmente a lo largo del eje del Componente 1, que explica el mayor porcentaje de variabilidad (26,3%).

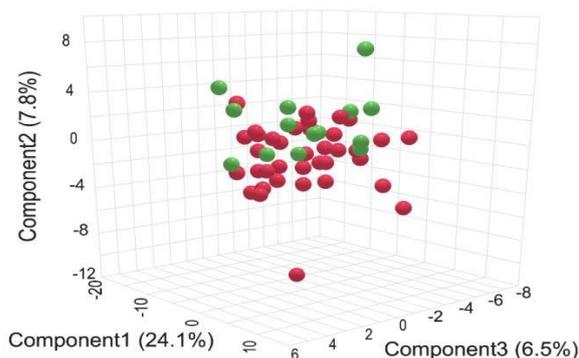
La distribución de los puntos indica que, si bien hay diferencias detectables entre los dos grupos en su perfil lipidómico, también existe variabilidad dentro de cada grupo. Algunos puntos de ambos colores se encuentran más dispersos, alejados del núcleo principal de su respectivo grupo, lo que podría indicar la presencia de muestras atípicas o con características particulares dentro de cada clase.

**Figura 7.** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) para análisis lipídómico obtenidos mediante LC-MS ESI-



La representación tridimensional del PLS-DA lo podemos observar en la Figura 8 esto permitió visualizar la separación entre los grupos con HSI alto y bajo en un espacio tridimensional. Se observó una clara segregación entre ambos grupos, lo que confirma la diferencia en sus perfiles metabólicos y refuerza la idea de que la esteatosis hepática está asociada a alteraciones metabólicas específicas.

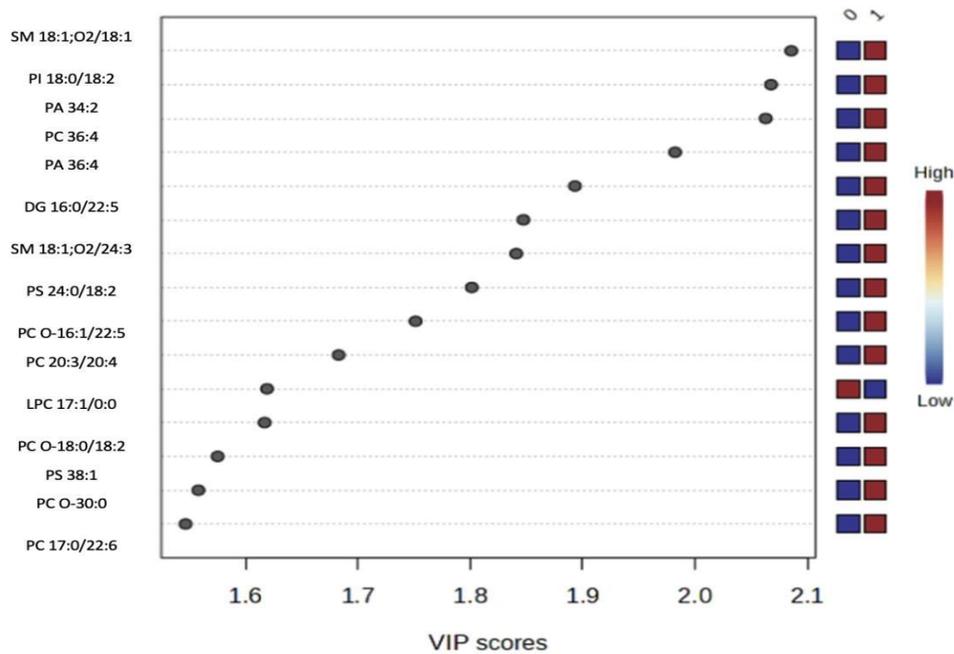
**Figura 8.** Gráfico sincronizado en 3D del PLS-DA en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1)



El análisis de importancia de las variables en la proyección (VIP, por sus siglas en inglés) representado en la Figura 9, permitió identificar aquellos metabolitos que ejercen una mayor influencia en la discriminación entre los grupos con esteatosis hepática alta (HSI alto) y baja (HSI bajo) en el modelo PLS-DA previamente construido. Este análisis, que evalúa la contribución de cada variable a la varianza

explicada por el modelo, reveló que los metabolitos con mayor poder discriminante fueron SM 18:1;O2/18:1, PI 18:0\_18:2, y PA 34:2.

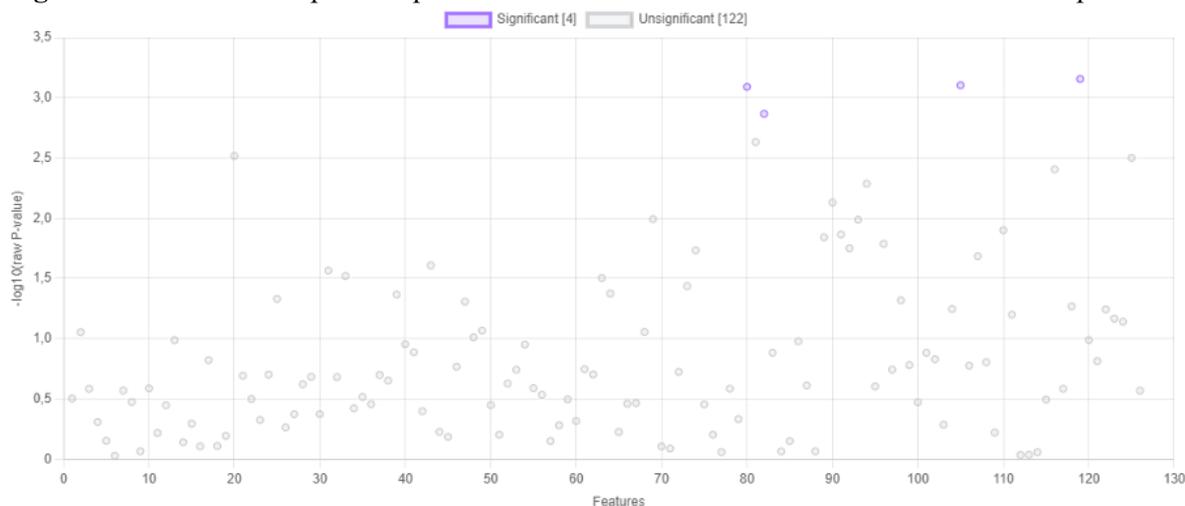
**Figura 9.** Gráfico de calor los resultados de un análisis VIP (Variable Importance in Projection)



### 2.2.3. Diferencias entre grupos mediante análisis univariado (t-test)

El análisis univariado (t-test) se aplicó para evaluar las diferencias en la abundancia de cada metabolito individual entre los grupos con HSI alto y bajo. La Figura 10 muestra el gráfico de dispersión de los resultados del t-test para cada metabolito, donde se observan 4 metabolitos con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos grupos: esfingomielina (SM) 18:1;O2/18:1, fosfatidilinositol (PI) 18:0/18:2, ácido fosfatídico (PA) 34:2 y PC 36:4.

**Figura 10.** Gráfico de dispersión que muestra los resultados del análisis univariado t-test aplicado



**Tabla 3.** Metabolitos significativos resultantes del t-test

	t.stat	Valor p	-LOG10(p)	Valor q
SM 18:1;O2/18:1	-3,615	<0,001	3,156	0,034
PI 18:0/18:2	-3,576	<0,001	3,104	0,034
PA 34:2	-3,565	<0,001	3,091	0,034
PC 36:4	-3,393	<0,001	2,867	0,043

El análisis univariado mediante t-test reveló diferencias significativas en varios lípidos entre los grupos con y sin esteatosis hepática. En la Tabla 3, se presentan los metabolitos significativos, donde se observan valores de  $p < 0,05$  y un valor q ajustado menor a 0,05, lo que indica una fuerte evidencia de diferencias entre los grupos.

Entre los lípidos significativos, SM 18:1;O2/18:1 mostró el menor valor de  $p$  ( $<0,001$ ), seguido por los fosfolípidos PI 18:0/18:2, PA 34:2 y PC 36:4, todos con valores de  $p$  menores a 0,001. Además, los valores de  $-\text{LOG}_{10}(p)$  indican una alta relevancia estadística de estos metabolitos. Los resultados del valor q son  $<0,05$  confirmando que las diferencias siguen siendo significativas tras corregir por múltiples comparaciones, lo que refuerza la solidez de estos hallazgos.

## 2.3. Datos de metabolitos obtenidos mediante LC-MS ESI+

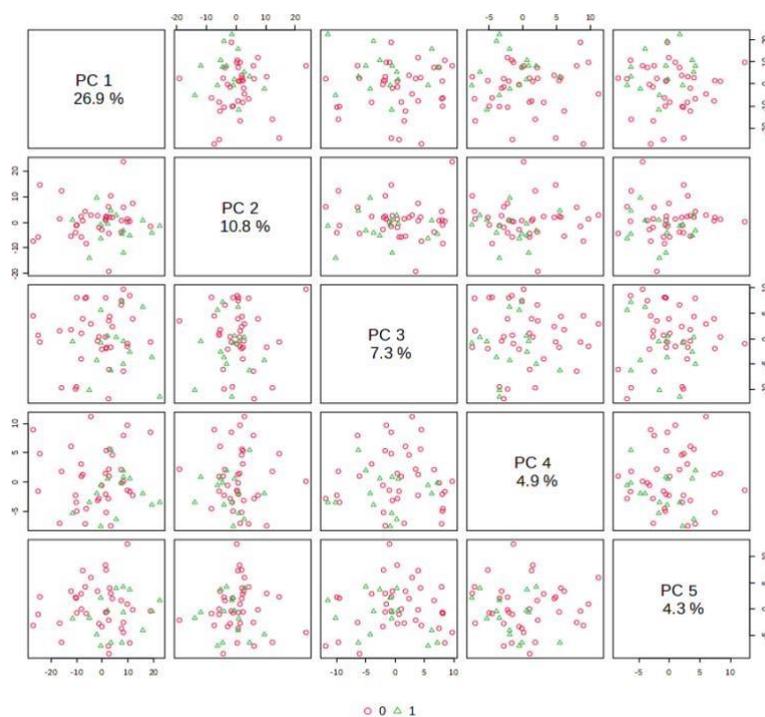
### 2.3.1. Análisis multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA)

En este análisis, el primer componente principal (PC1) es fundamental para capturar la variabilidad en el perfil de metabolitos obtenido mediante LC-MS ESI-. Explica un 26,9% de la variabilidad total, proporcionando una visión general de las principales diferencias entre las muestras. El segundo componente (PC2) añade una dimensión adicional al análisis, explicando un 10,8% de la variabilidad, y ayuda a visualizar patrones que no se aprecian en el primer componente (Figura 11).

Luego se introducen más componentes, PC3, PC4 y PC5, que añaden dimensiones adicionales y capturan variabilidad adicional en los datos. PC3 explica un 7,3% de la variabilidad y puede revelar estructuras adicionales en los datos que no son evidentes en los primeros dos componentes. PC4 y PC5, que explican 4,9% y 4,3% de la variabilidad respectivamente, proporcionan detalles más refinados sobre la estructura de los datos y pueden capturar variabilidad residual que no fue abordada por los componentes anteriores. Los gráficos de PCA que muestran la proyección de datos en estos componentes ayudan a visualizar cómo se distribuyen las muestras. En el plano formado por PC1 y PC2, se observa una ligera tendencia a la separación entre las PWH con esteatosis hepática ( $HSI \geq 36$ , puntos verdes) y sin esteatosis hepática ( $HSI < 36$ , puntos rojos), mientras que los planos de PC3 vs. PC4 y PC4 vs. PC5 proporciona perspectivas adicionales sobre cómo se agrupan las muestras en dimensiones adicionales. Las muestras que están cercanas entre sí en estos gráficos tienen características similares en su perfil metabólico.



**Figura 11.** Análisis de componentes principales (PCA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) para análisis lipidómico obtenidos mediante LC-MS ESI+



### 2.3.2. Análisis multivariante mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA)

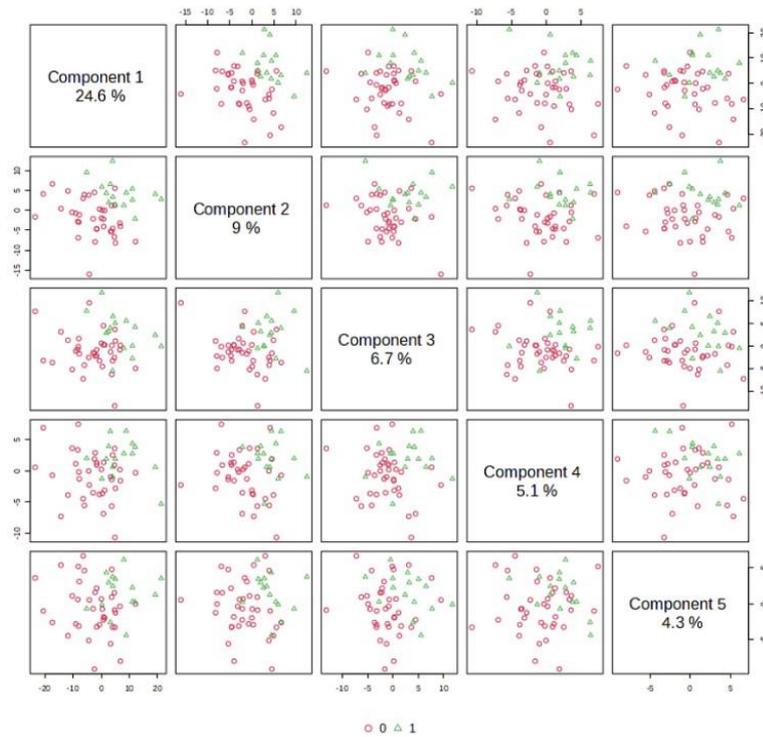
Las características de los datos metabolómicos obtenidos mediante LC-MS ESI+ pueden observarse con mayor detalle en la Figura 12. Esta figura proporciona una visualización clara de la distribución de las muestras en el espacio definido por los cinco primeros componentes discriminantes. Se observa una dispersión de puntos rojos y verdes que representan nuestros dos grupos ( $HSI \geq 36$  y  $HSI < 36$ ). Aunque existe cierto grado de solapamiento entre estas clases, se puede apreciar una ligera tendencia de separación, particularmente a lo largo del eje del Componente 1, que explica el mayor porcentaje de variabilidad (24,6%).

La distribución de los puntos indica que, si bien hay diferencias detectables entre los dos grupos en su perfil metabolómico, también existe variabilidad dentro de cada grupo. Algunos puntos de ambos colores se encuentran más dispersos, alejados del núcleo principal de su respectivo grupo, lo que podría indicar la presencia de muestras atípicas o con características particulares dentro de cada clase

El análisis PLS-DA aplicado a los datos de LC-MS ESI- (Figura 12) confirmó la separación entre los grupos con HSI alto y bajo. La separación observada entre los grupos con esteatosis hepática alta y baja

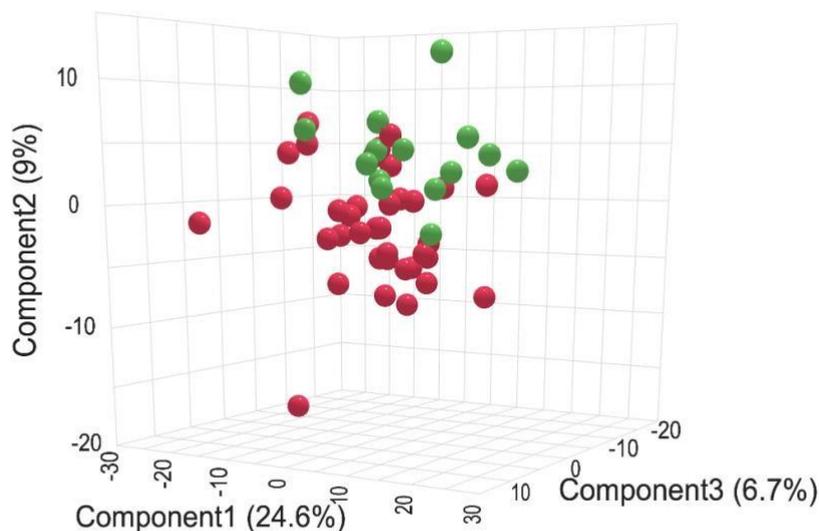
en este análisis fue similar o incluso ligeramente mayor a la obtenida con los datos de LC-MS ESI+ (Figura 7). La dirección de la separación a lo largo de los ejes del gráfico indica que los componentes 1 y 2 del PLS-DA son los que más contribuyen a la discriminación entre los grupos.

**Figura 12.** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) para análisis lipídómico obtenidos mediante LC-MS ESI+



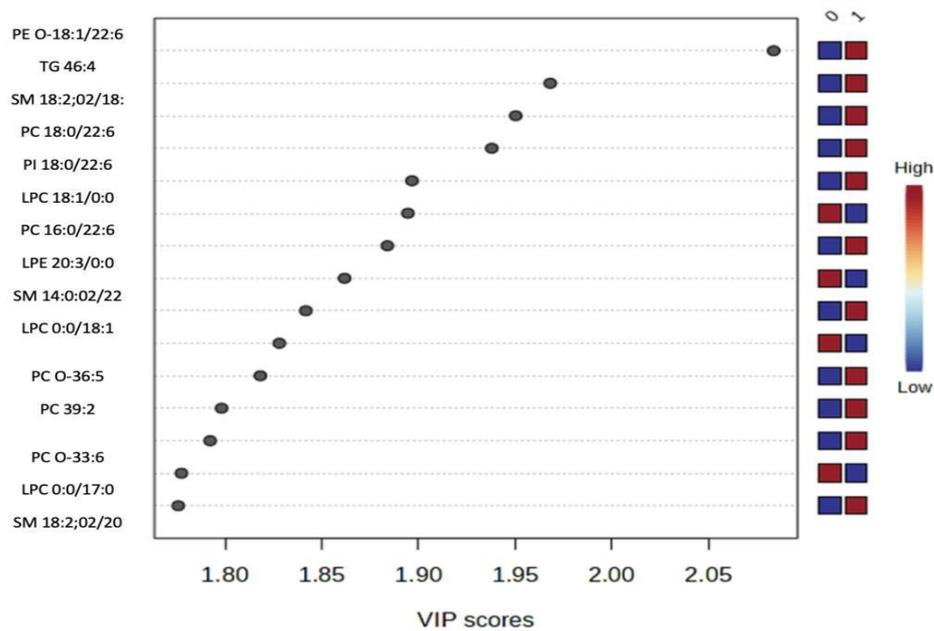
La representación tridimensional del PLS-DA con los datos de LC-MS ESI+ en la Figura 13 permitió visualizar la separación entre los grupos con HSI alto y bajo en un espacio tridimensional. Se observó una clara segregación entre ambos grupos, lo que sugiere la existencia de diferencias en los perfiles metabólicos y refuerza la idea de que la esteatosis hepática está asociada a alteraciones en metabolitos que se ionizan negativamente.

**Figura 13.** Gráfico sincronizado en 3D del PLS-DA en pacientes con VIH sin esteatosis hepática (0) y pacientes con VIH con esteatosis hepática (1) para análisis lipidómico obtenidos mediante LC-MS ESI+



El análisis VIP (Figura 14) permitió identificar los metabolitos que más contribuyen a la discriminación entre los grupos con HSI alto y bajo en el análisis PLS-DA con los datos de LCMS ESI+. Los metabolitos con mayor poder discriminante fueron fosfatidiletanolamina (PE) O-18:1/22:6, triglicérido (TG) 46:4 y SM 18:2;O2/18:1. Es importante destacar que estos metabolitos, detectados por LC-MS ESI+, se caracterizan por su polaridad y capacidad para ionizarse negativamente, y podrían estar involucrados en posibles vías metabólicas o procesos biológicos relacionados con la esteatosis hepática. Los VIP scores obtenidos del análisis PLS-DA permiten identificar los metabolitos que más contribuyen a la separación entre los grupos con y sin esteatosis hepática.

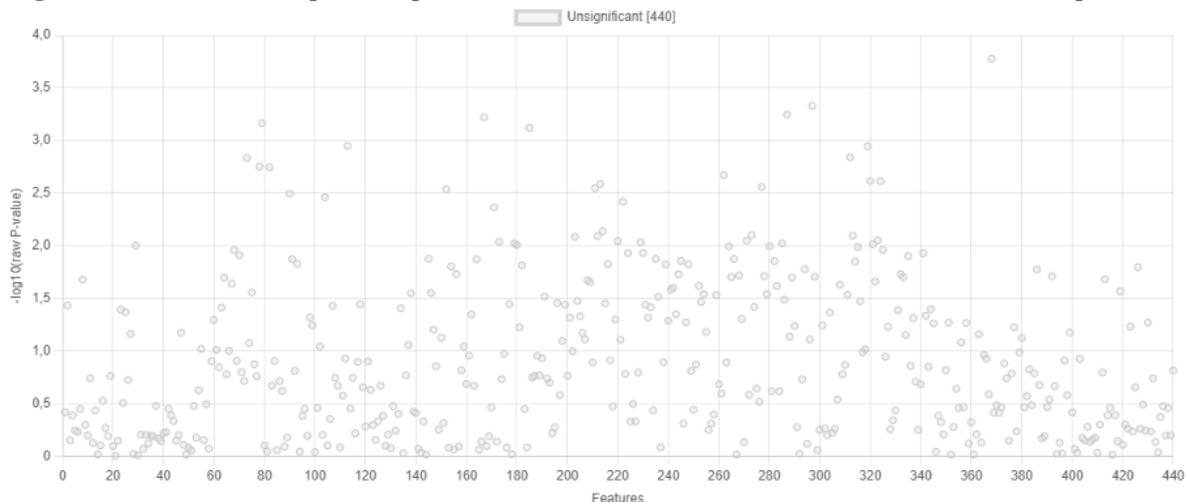
**Figura 14.** Gráfico de calor los resultados de un análisis VIP (Variable Importance in Projection) para análisis lipidómico obtenidos mediante LC-MS ESI+



### 2.3.3. Diferencias entre grupos mediante análisis univariado (t-test)

El análisis univariado, mediante la aplicación del t-test a los datos de LC-MS ESI+ (Figura 15), no reveló diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de metabolitos individuales entre los grupos con esteatosis hepática alta y baja. Este resultado podría sugerir que las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática en este conjunto de datos podrían estar definidas por sutiles cambios en múltiples metabolitos y no por variaciones significativas en metabolitos individuales.

**Figura 15.** Gráfico de dispersión que muestra los resultados del análisis univariado t-test aplicado



## DISCUSIÓN

En este estudio transversal multicéntrico se propuso determinar el perfil lipídico y metabólico plasmático asociado con la presencia de esteatosis hepática en personas con VIH (PWH) que habían logrado la erradicación del virus de la hepatitis C (VHC). La esteatosis hepática, caracterizada por la acumulación excesiva de grasa en el hígado, es una complicación frecuente en PWH, con una prevalencia que oscila entre el 20% y el 80% (Lonardo et al., 2020). Aunque la erradicación del VHC mejora la función hepática en PWH, no elimina por completo el riesgo de esteatosis hepática, la cual puede contribuir a la progresión de la enfermedad hepática y aumentar el riesgo de fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. De hecho, un estudio reciente (Maurice et al., 2017) encontró una prevalencia del 35% de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHNA) en pacientes con VIH monoinfectados, lo que destaca la persistencia del riesgo de enfermedad hepática grasa incluso en ausencia de VHC.

Para lograr este objetivo, se analizaron muestras de plasma de 52 PWH con fibrosis avanzada o cirrosis que habían alcanzado una respuesta virológica sostenida (RVS) después del tratamiento anti-VHC. Se emplearon tres enfoques analíticos complementarios: electroforesis capilar, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en modo de ionización positiva (LC-MS ESI+) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en modo de ionización negativa (LC-MS ESI-). La decisión de combinar estas técnicas se basa en la premisa de que diferentes plataformas analíticas proporcionan información complementaria, aumentando la cobertura del metaboloma y permitiendo una caracterización más completa de las alteraciones metabólicas (Dumas et al., 2006). Esta estrategia combinada proporciona una visión global del perfil metabólico y lipídico de los participantes, permitiendo una caracterización más completa de las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática.

Los resultados de los análisis multivariantes (PCA y PLS-DA) mostraron una ligera tendencia a la separación entre los grupos con y sin esteatosis hepática, tanto en los datos de electroforesis capilar como en los datos de LC-MS ESI+ y LC-MS ESI-. Esto sugiere que existen diferencias en el perfil metabólico y lipídico entre ambos grupos, aunque estas diferencias no son muy marcadas. Es importante destacar que el análisis PCA de los datos LC-MS ESI- explicó un mayor porcentaje de la varianza en comparación con el análisis de electroforesis capilar (40.8% vs. 32.1%), lo que indica que



la técnica LC-MS ESI- aporta información adicional sobre las diferencias entre los grupos. Este hallazgo resalta la importancia de utilizar diferentes plataformas analíticas en estudios metabólicos para obtener una visión más completa de las alteraciones metabólicas.

El análisis PLS-DA, una técnica supervisada que busca maximizar la separación entre grupos (Barker & Rayens, 2003), permitió identificar los metabolitos y lípidos que más contribuyen a la discriminación entre las PWH con y sin esteatosis hepática. En los datos de electroforesis capilar, el  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina y el ácido guanidinosuccínico mostraron los mayores VIP scores, lo que indica su relevancia en la separación de los grupos. El  $\alpha$ -glicerilfosforilcolina es un precursor de la fosfatidilcolina, un componente importante de las membranas celulares, y alteraciones en su metabolismo podrían afectar la función de las membranas y contribuir al desarrollo de esteatosis hepática (Li et al., 2006; van der Veen et al., 2012). Estudios previos han demostrado que la proporción de fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina influye en la integridad de la membrana y está implicada en el desarrollo de la esteatohepatitis (Li et al., 2006). El ácido guanidinosuccínico, por otro lado, está involucrado en el ciclo de la urea y en el metabolismo de la arginina, y alteraciones en estas vías metabólicas podrían afectar la función hepática y contribuir a la acumulación de grasa en el hígado.

En los datos de LC-MS ESI-, los lípidos SM 18:1;O2/18:1, PI 18:0\_18:2, y PA 34:2 fueron los más relevantes en la discriminación entre los grupos. Estos lípidos pertenecen a las clases de esfingolípidos, fosfatidilinositoles y ácidos fosfatídicos, respectivamente. Como se describe en (Wenk, 2010) estas clases de lípidos juegan un papel crucial en diversos procesos celulares, incluyendo la estructura y función de las membranas celulares, la señalización celular y el metabolismo de lípidos. En los datos de LC-MS ESI-, los lípidos PE O-18:1/22:6, TG 46:4 y SM 18:2;O2/18:1 fueron los que más contribuyeron a la discriminación. Estos lípidos pertenecen a las clases de fosfatidiletanolaminas, triglicéridos y esfingolípidos, respectivamente, y también están involucrados en una variedad de procesos celulares, incluyendo el metabolismo energético, la señalización celular y la respuesta inflamatoria (Harayama & Riezman, 2018).

El análisis univariado (t-test) confirmó la importancia de algunos de los metabolitos y lípidos identificados en el PLS-DA. En los datos de LC-MS ESI-, se observaron diferencias significativas en la abundancia de SM 18:1;O2/18:1, PI 18:0(18:2, PA 34:2 y PC 36:4 entre los grupos con y sin esteatosis



hepática. Sin embargo, en los datos de electroforesis capilar y LC-MS ESI+, no se encontraron diferencias significativas después de la corrección por múltiples comparaciones. Es importante tener en cuenta que la falta de significancia estadística en el análisis univariado no descarta la relevancia biológica de los metabolitos identificados en el PLS-DA. Es posible que las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática en este conjunto de datos estén definidas por sutiles cambios en múltiples metabolitos y no por variaciones significativas en metabolitos individuales.

Los resultados obtenidos en este estudio se alinean con la evidencia previa que describe alteraciones en el metabolismo lipídico en personas con VIH (PWH) que presentan esteatosis hepática. (Lonardo et al., 2020), en su exhaustiva revisión de la literatura, concluyen que la esteatosis hepática en PWH se asocia a un perfil lipídico particular. Este perfil se caracteriza por un incremento en los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol total, junto con una disminución en las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En un estudio similar, (Puri et al;2009) analizaron la firma lipídica en individuos con esteatohepatitis no alcohólica, identificando alteraciones en diversas clases de lípidos, incluyendo fosfatidilcolinas, esfingomielinas y ceramidas. En conjunto, estos estudios, junto con los hallazgos del presente trabajo, sugieren que la esteatosis hepática, tanto en PWH como en la población general, se asocia a un desequilibrio en el metabolismo lipídico que afecta a múltiples clases de lípidos.

#### Limitaciones del estudio

Es importante reconocer las limitaciones de nuestro estudio. El tamaño muestral relativamente pequeño (n=52) limita la capacidad de generalizar los resultados a toda la población de PWH. Si bien este estudio aporta valiosa información sobre las alteraciones metabólicas en personas con VIH y esteatosis hepática, es importante reconocer que el tamaño muestral, aunque significativo, podría ampliarse en futuras investigaciones para obtener resultados más generalizables. Además, el diseño transversal del estudio no permite establecer relaciones de causa-efecto entre las alteraciones metabólicas y la esteatosis hepática. Asimismo, este diseño no permite establecer una relación causal entre las alteraciones metabólicas observadas y la esteatosis hepática, lo cual podría ser abordado mediante estudios longitudinales. Futuros estudios con mayor tamaño muestral y diseño longitudinal son necesarios para confirmar nuestros hallazgos y determinar la causalidad de las asociaciones observadas.



También sería interesante incluir en futuros estudios otras variables que podrían estar relacionadas con la esteatosis hepática en PWH, como la dieta, el ejercicio físico y el consumo de alcohol. Es importante destacar que este estudio no consideró la influencia de factores como la dieta, el ejercicio físico, el consumo de alcohol y otras comorbilidades, elementos que podrían ser relevantes en el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio proporciona información valiosa sobre las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática en PWH después de la erradicación del VHC. Los metabolitos y lípidos identificados podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de la esteatosis hepática en esta población. Finalmente, la complejidad inherente al metaboloma humano y la variabilidad individual en el metabolismo pueden dificultar la identificación de biomarcadores específicos para la esteatosis hepática, un desafío que la investigación metabolómica continúa explorando. Además, nuestros resultados sugieren que intervenciones dirigidas a corregir las alteraciones metabólicas, como la modificación del estilo de vida o el uso de fármacos hipolipemiantes, podrían ser útiles para prevenir o tratar la esteatosis hepática en PWH.

## **CONCLUSIONES**

Este estudio transversal multicéntrico ha arrojado luz sobre el complejo panorama metabólico asociado a la esteatosis hepática en personas con VIH que han logrado la erradicación del VHC. Más allá de confirmar la presencia de alteraciones metabólicas en esta población, nuestros resultados sugieren la existencia de un perfil lipídico y metabolómico particular, caracterizado por modificaciones específicas en diversas clases de lípidos y metabolitos. Estos hallazgos, si bien preliminares, abren prometedoras vías de investigación en el campo del diagnóstico y pronóstico de la esteatosis hepática en personas con VIH. La posibilidad de utilizar los metabolitos y lípidos identificados como biomarcadores podría traducirse en herramientas clínicas más precisas para la detección temprana y el seguimiento de esta condición. Sin embargo, es crucial reconocer que la naturaleza transversal de este estudio limita la posibilidad de establecer relaciones causales y que se requieren estudios longitudinales con mayor tamaño muestral para confirmar estos hallazgos y profundizar en la comprensión de los mecanismos subyacentes a las asociaciones observadas. En última instancia, este estudio representa un paso importante en la búsqueda de estrategias más eficaces para abordar la esteatosis hepática en



personas con VIH, un desafío creciente en el contexto del envejecimiento de esta población y la erradicación del VHC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Okada, G. Yamada, T. Kimura, Y. Hagiwara, S. Yamaguchi, K.I. Kurakawa, M. Nangaku, T. Yamauchi, Y. Matsuyama, T. Kadowaki, Diagnostic ability using fatty liver and metabolic markers for metabolic-associated fatty liver disease stratified by metabolic/glycemic abnormalities, *J Diabetes Investig* 14(3) (2023) 463-478.
- Alcoriza-Balaguer MI, García-Cañaveras JC, López An, Conde I, Juan O, Carretero Jn, et al. LipidMS: an R package for lipid annotation in untargeted liquid chromatography-data independent acquisition-mass spectrometry lipidomics. *Analytical chemistry*. 2018;91(1):836-45.
- Alcoriza-Balaguer MI, García-Cañaveras JC, Ripoll-Esteve FJ, Roca M, and Lahoz A. LipidMS 3.0: an R-package and a web-based tool for LC-MS/MS data processing and lipid annotation. *Bioinformatics*. 2022;38(20):4826-8.
- Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). *Gastroenterología y Hepatología*, 41(9), 597-608. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2018.07.010>
- Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17(3), 166-173.
- Brown, A., Davis, B., & Evans, C. (2023). Impacto de la variabilidad genética del VHC en la respuesta al tratamiento antiviral. *Journal of Virology*, 97(5), 1234-1245.
- C. Yanavich, A.G. Pacheco, S.W. Cardoso, E.P. Nunes, U. Chaves, G. Freitas, R. Santos, M. Morata, V.G. Veloso, B. Grinsztejn, H. Perazzo, Diagnostic value of serological biomarkers for detection of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and/or advanced liver fibrosis in people living with HIV, *HIV Med* 22(6) (2021) 445-456. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33529485/>
- Calleja, J. L., Macías, J., Forns, X., García, F., Berenguer, M., García-Deltoro, M., ... & Pineda, J. A. (2018). Guía de tratamiento de la infección por virus de la hepatitis C.
- Centro Nacional de Epidemiología. (2022). Vigilancia epidemiológica de la hepatitis C en España, 2020. Madrid: Instituto de Salud Carlos III. Recuperado de: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/En>



Chen, L., & Li, M. (2020). Estructura y función de la envoltura lipídica del VHC. *Virology*, 542, 87-95.

Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stamler J, Elliott P, Chan Q, Holmes E. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem*. 2006 Apr 1;78(7):2199-208. doi: 10.1021/ac0517085. PMID: 16579598; PMCID: PMC6561113.

[fermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20AZ/Hepatitis%20C/Vigilancia\\_HepatitisC\\_2020.pdf](#)

Fernández Requena B, Nadeem S, Reddy VP, Naidoo V, Glasgow JN, Steyn AJ, et al. LiLA: lipid lung-based ATLAS built through a comprehensive workflow designed for an accurate lipid annotation. *Communications Biology*. 2024;7(1):45.

Gandhi RT, Bedimo R, Hoy JF, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2022 Recommendations of the International

García Deltoro, M., & Ricart Olmos, C. (2019). Infección por el virus de la hepatitis C y nuevas estrategias de tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(Supl 1), 15-19. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedadesinfecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X19301776>

Garcia, P., Rodriguez, Q., & Sanchez, R. (2022). Papel de las glucoproteínas E1 y E2 en la entrada del VHC. *Journal of Infectious Diseases*, 225(8), 1321-1330.

Gil-De-La-Fuente A, Godzien J, Saugar S, Garcia-Carmona R, Badran H, Wishart DS, et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*. 2019;18(2):797-802

Gonzalez-Riano C, Gradillas A, and Barbas C. Exploiting the Formation of Adducts in Mobile Phases with Ammonium Fluoride for the Enhancement of Annotation in Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry (LCHR-MS)-based Lipidomics. *Journal of Chromatography Open*. 2021:100018.



- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 281-296.
- J.H. Lee, D. Kim, H.J. Kim, C.H. Lee, J.I. Yang, W. Kim, Y.J. Kim, J.H. Yoon, S.H. Cho, M.W. Sung, H.S. Lee, Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease, *Dig Liver Dis* 42(7) (2010) 503-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19766548/>
- Johnson, D., & Thompson, E. (2021). Diversidad genética del VHC: implicaciones para el diagnóstico y tratamiento. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00123-20.
- Kim, N., Park, O., & Lee, P. (2024). Organización y replicación del genoma del VHC. *Annual Review of Virology*, 11, 257-278.
- Koelmel JP, Li X, Stow SM, Sartain MJ, Murali A, Kemperman R, et al. Lipid annotator: towards accurate annotation in non-targeted liquid chromatography highresolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS) lipidomics using a rapid and user-friendly software. *Metabolites*. 2020;10(3):101.
- Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, and Quintás G. Inbatch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst*. 2015;140(22):7810-7.
- León, R. V. (2021). Hepatitis C: Del Descubrimiento a la Curación. A propósito del Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2020. *Revista GEN*, 75(1), 25-33. Recuperado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S001635032021000100025](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S001635032021000100025)
- Li, Z., Agellon, L. B., Allen, T. M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., & Vance, D. E. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 3(5), 321-331
- Lonardo, A., et al. (2020). Nonalcoholic fatty liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Metabolism*, 77, 57-69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32130386/>
- Mamani-Huanca M, de la Fuente AG, Otero A, Gradillas A, Godzien J, Barbas C, et al. Enhancing confidence of metabolite annotation in capillary electrophoresis-mass spectrometry untargeted metabolomics with relative migration time and in-source fragmentation. *Journal of Chromatography A*. 2021;1635:461758.



- Mamani-Huanca M, Gradillas A, Gil de la Fuente A, López-González An, and Barbas C. Unveiling the fragmentation mechanisms of modified amino acids as the key for their targeted identification. *Analytical chemistry*. 2020;92(7):4848-57.
- 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 Jul 17;31(11):1621-1632. doi: 10.1097/QAD.0000000000001504. PMID: 28398960.
- Ni Z, Angelidou G, Lange M, Hoffmann R, and Fedorova M. LipidHunter identifies phospholipids by high-throughput processing of LC-MS and shotgun lipidomics datasets. *Analytical Chemistry*. 2017;89(17):8800-7.
- Priego-Parra, B. A., Triana-Romero, A., Martínez-Pérez, G. P., Reyes-Díaz, S. A., Ordaz-Alvarez, H. R., Bernal-Reyes, R., ... & Remes-Troche, J. M. (2024). Hepatic
- Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1827-38. doi: 10.1002/hep.23229. PMID: 19937697; PMCID: PMC5031239.
- Rotman, Y., & Liang, T. J. (2009). Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: Virological, immunological, and clinical outcomes. *Journal of Virology*, 83(15), 7366-7374. <https://doi.org/10.1128/JVI.00191-09>
- Saavedra-Chacón, M. F., Pérez, S., & Guevara, L. G. (2021). Enfermedad del hígado graso asociada con la disfunción metabólica. Una nueva propuesta para una dolencia en auge. *Iatreia*, 34(3), 241-252. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.101>
- Smith, F., Jones, G., & Williams, H. (2019). Clasificación y evolución del VHC. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 169-182.
- Steatosis Index (HSI): A Valuable Biomarker in Subjects with Metabolic Dysfunction-associated Fatty Liver Disease (MAFLD). *Annals of Hepatology*, 29, 101391. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2024.101391>
- Tariq, M., Shoukat, A. B., Akbar, S., Hameed, S., Naqvi, M. Z., Azher, A., Saad, M., Rizwan, M., Nadeem, M., Javed, A., & Aziz, S. (2022). Epidemiology, risk factors, and pathogenesis



associated with a superbug: A comprehensive literature review on hepatitis C virus infection.

*SAGE Open Medicine*, 10, 1–14.

Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, et al. MS-DIAL 4: accelerating lipidomics using an MS/MS, CCS, and retention time atlas. *BioRxiv*. 2020:2020.02.11.944900.

van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Groen, A. K. (2012). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1818(9), 1423-1436.

Wenk, M. R. (2010). Lipidomics: a new window into the metabolic diversity of lipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(11), 1949-1969.

